



HAL
open science

Rôle des canaux calciques Cav3.2 dans les interneurons de la lamina II de la moelle épinière

Miriam Candelas

► **To cite this version:**

Miriam Candelas. Rôle des canaux calciques Cav3.2 dans les interneurons de la lamina II de la moelle épinière. Médecine humaine et pathologie. Université Montpellier, 2017. Français. NNT : 2017MONTT027 . tel-01684274

HAL Id: tel-01684274

<https://theses.hal.science/tel-01684274>

Submitted on 15 Jan 2018

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.

THÈSE POUR OBTENIR LE GRADE DE DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE MONTPELLIER

En Neurosciences

École doctorale Sciences Chimiques et Biologiques pour la Santé (CBS2)

Unité de recherche CNRS UMR5203 – INSERM U1191

Rôle de canaux calciques Cav3.2 dans les interneurons de
la lamina II de la moelle épinière

Présentée par Miriam CANDELAS

Le 12 Octobre 2017

Sous la direction de Pierre-François Méry

Devant le jury composé de

Patrick CARROLL, Directeur de Recherche, INSERM

Emmanuel DEVAL, Chargé de Recherche, CNRS

Myriam ANTRI, Maître de Conférences, Université Clermont Auvergne

Abdelaziz MOQRICH, Directeur de Recherche, CNRS

Emmanuel BOURINET, Directeur de Recherche, CNRS

Yves LE FEUVRE, Chargé de Recherche, CNRS

Perrine INQUIMBERT, Maître de Conférences, Université Strasbourg

Pierre-François MERY, Chargé de Recherche, INSERM

Président

Rapporteur

Rapporteur

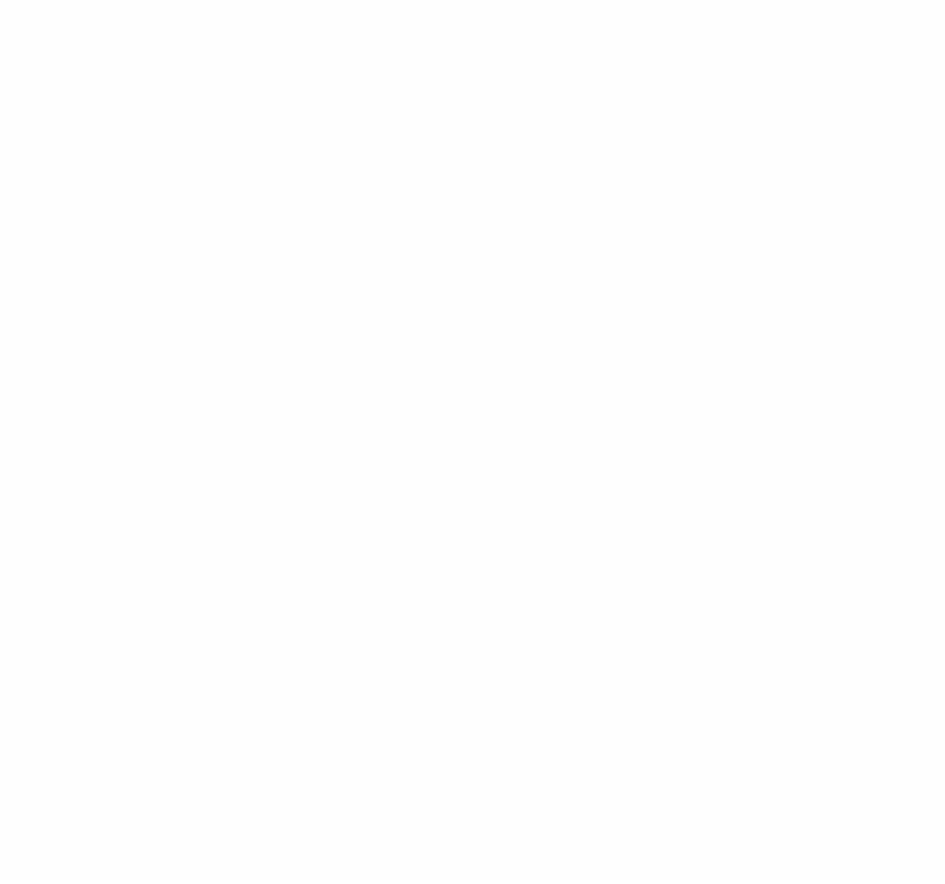
Examineur

Examineur

Chercheur invité

Chercheur invitée

Directeur de Thèse



Résumé : La douleur est un mécanisme essentiel pour la survie, mais les douleurs chroniques sont souvent invalidantes. Les douleurs de longue durée sont une des premières causes de consultation médicale, et affectent 20% de la population. Par contre, les traitements actuels sont souvent inefficaces au long cours, avec un ratio bénéfice/risque faible. Ainsi, la recherche de nouveaux agents thérapeutiques constitue l'une des priorités de la recherche. Pour ce faire, la compréhension de réseaux impliqués dans la douleur est essentielle.

Plusieurs études ont montré que Cav3.2, un canal calcique à bas seuil, pourrait être une cible analgésique prometteuse. En fait, Cav3.2 est exprimé tout le long de voies douloureuses, au niveau périphérique ainsi qu'au niveau central. Notamment, Cav3.2 est fortement exprimé dans la corne dorsale de la moelle épinière, qui constitue le premier relai d'intégration de l'information douloureuse. De plus, grâce à son activation aux potentiels proche du repos, Cav3.2 est bien placé pour réguler l'excitabilité neuronale et l'intégration synaptique.

Au cours de cette thèse nous avons étudié la distribution de ce canal dans les interneurons de la lamina II de la corne dorsale. Nos résultats montrent que le canal est exprimé dans différents types d'interneurones (~60%), majoritairement excitateurs, mais aussi inhibiteurs. De façon intéressante, tous les neurones PKC γ , impliqués dans l'allodynie mécanique, expriment le canal Cav3.2. Nous avons ensuite utilisé une approche virale pour marquer et étudier les propriétés électrophysiologiques des neurones exprimant Cav3.2, ainsi que pour réprimer de façon spécifique le canal dans la partie lombaire de la moelle épinière. Nos résultats montrent que Cav3.2 participe aux rebonds dépolarisants sous-liminaires, aux propriétés des potentiels d'action et est impliqué dans les profils d'activité électrique de ces neurones. Ainsi, Cav3.2 pourrait jouer un rôle important dans les états douloureux au niveau spinal, caractérisés par des changements dans l'excitabilité.

Mots clés : canaux calciques à bas seuil, Cav3.2, lamina II, moelle épinière, douleur

Abstract: Acute pain is essential for survival, but chronic pain is often invalidating. Prolonged pain states are one of the first causes of medical consultation, and they are experienced by as much as 20% of the population. However, our current analgesics are not fully reliable in alleviating chronic pains, with low beneficial/risk ratio. Thus, finding new pharmacological agents are a primordial objective. A better understanding of pain networks is necessary.

Several studies have suggested that the T-type calcium channel, Cav3.2, might be a promising target for analgesics. Indeed, Cav3.2 is expressed all along pain pathways, both within the peripheral nociceptive track and within the central nervous system. Interestingly, Cav3.2 is strongly expressed in the dorsal horn of the spinal cord, which is the first relay for pain processing. Furthermore, thanks to their activation near resting potentials, Cav3.2 channels fit well in regulating neuronal excitability and synaptic integration.

In this thesis, we have analyzed Cav3.2 expression in dorsal horn interneurons. Our results show that Cav3.2 is expressed in different types of interneurons (~60%), mostly excitatory, but also inhibitory. Interestingly, all PKC γ neurons, involved in mechanical allodynia, expressed Cav3.2. We then used a viral approach to label and study electrophysiological properties of Cav3.2-expressing neurons, and also to specifically delete this channel in the lumbar spinal cord. Our results show that Cav3.2 is involved in subthreshold depolarizations, in the properties of the action potentials and in the firing patterns of these neurons. Thus, Cav3.2 might play an important role in pain states at the spinal cord level, characterized by neuronal excitability alterations.

Key words: low threshold calcium channels, Cav3.2, lamina II, spinal cord, pain

Discipline : Neuroscience

Laboratoire : IGF – CNRS UMR 5203 – INSERM U661 – Université de Montpellier, 141 rue de la Cardonille 34094 Montpellier CEDEX 5

Remerciements

On dit souvent que la thèse est un travail individuel, mais je n'aurais jamais pu finir ce travail sans l'aide et le support de nombreuses personnes qui ont toujours été là quand j'en avais besoin.

Je souhaite tout d'abord remercier très sincèrement Emmanuel Bourinet pour m'avoir accueillie au sein de son équipe et m'avoir donné l'opportunité de faire une thèse sur la douleur. J'ai énormément apprécié partager les discussions scientifiques et son enthousiasme pour la science, qui m'ont autant inspirée. Je remercie mon directeur de thèse Pierre-François Méry pour m'avoir encadré lors de ces années, pour le temps dédié, les conseils et son support.

Je tiens à remercier tous les membres de mon jury de thèse : Emmanuel Deval et Myriam Antri pour avoir accepté de juger ce travail en tant que rapporteurs, Patrick Carroll, Aziz Moqrich, Yves Le Feuvre et Perrine Inquimbert, pour avoir suivi de près mes travaux durant ces années, pour leurs conseils et encouragements et pour avoir accepté de participer à ma soutenance.

Je remercie spécialement Yves Le Feuvre, de m'avoir donné l'opportunité d'apprendre l'électrophysiologie et de m'avoir transmis sa fascination pour la moelle épinière. J'exprime aussi ma gratitude à Aziz Moqrich et Ana Reynders, pour leurs grande aide et disponibilité, et de m'avoir accueillie dans son laboratoire.

Je remercie très chaleureusement tous les membres de mon équipe, avec lesquels j'ai passé autant de bons moments et j'ai appris. Merci Sophie pour tous tes conseils, encouragements, discussions sur la science et 'autres'. Merci Pierre pour m'avoir aidé depuis mon arrivée, pour tes cours de danse et pour avoir étiré les pipettes d'électrophys jusqu'à la dernière minute. Merci Antoine pour tout ton support, pour toutes nos discussions scientifiques, mais surtout pour nos moments de fou rire. Merci Francina, pour ton encouragement, ton amitié et de m'aider à ne pas oublier l'espagnol. Je remercie aussi Anne et Maud, pour leurs conseils et les bons moments.

J'exprime toute ma gratitude aux nombreuses personnes qui m'ont autant aidé dans mon aventure dans la biologie moléculaire : Margarita Arango, Céline Lemmers, Arnaud Monteil, Vincent Compan et Isabelle Bidaud. Sans vous je n'aurais jamais réussi ! Je remercie également Tristan Bouschet, Pauline Tarot, Laura Cutando, Denis Greuet, Emmanuel Valjent, Hélène Hirbec, Philippe Lory, et beaucoup d'autres qui m'ont aidée lors de ce travail.

Je remercie tous les gens du 'couloir', Malik, Matthias, Pierre, Alex, Andie ...pour tous les bons moments et pour n'avoir jamais cessé de me proposer des pauses café ! Je n'oublie pas les gens des autres étages et du lointain nord : Matthias, Jennifer, Samy, Camille, Amélie, Hugo, Laura, Pauline...

Je remercie énormément tous mes amis Montpelliérains, Elisa, Helvin, Elida, Daiane, Amal, Raid, pour tout votre support et encouragement. Merci à '*los amigos*' Youssra, Enoch et Anna, que malgré la distance je sens toujours si proches. Un grand merci aussi à Anass, pour avoir cru en moi et m'encourager à faire une thèse.

Je remercie aussi tous mes amis d'Espagne, qui n'ont toujours pas compris le sujet de ma thèse, mais m'envoient des forces à distance. Merci Pedro, Juan, Noelia, Elena, Fatima, Patricia, Marina, Irene, Alba, Javi...

Un grand merci à mes parents, pour leur support inconditionnel dans mes décisions et aventures et à ma petit sœur, mon amie et confidente, qui m'encourage toujours à être meilleure.

SOMMAIRE

SOMMAIRE	7
TABLE DE FIGURES ET TABLEAUX	10
PREFACE	16
INTRODUCTION : Première partie : Corne dorsale de la moelle épinière	17
1. Introduction	18
2. Afférences primaires	18
2.1.-Classification selon la vitesse de conduction.....	19
2.2.-Classification selon la modalité sensorielle	19
2.3.-Classification selon la neurochimie	24
2.4.-Projection dans la moelle épinière	28
3. Cytoarchitecture de la corne dorsale de la moelle épinière.....	31
4. Lamina II	31
4.1-Développement de la moelle épinière.....	31
4.2.-Classification morphologique	34
4.3.-Classification électrophysiologique.....	35
4.4.-Fonction du profil de décharge	41
4.5.-Connexions entre neurones de la lamina II.....	45
4.6.-Classification neurochimique	47
4.6.1.-Marqueurs neurochimiques et limites	47
4.6.2.-Etudes fonctionnelles	50
INTRODUCTION : Deuxième partie : Douleur	59
1. Définition de la douleur.....	60
1.1.- Classification de douleurs.....	60
1.1.1.-Selon la durée.....	60
1.1.2.-Selon le mécanisme.....	61
2. Anatomie de voies douloureuses.....	63
2.1.-Nocicepteurs : neurones sensoriels.....	64
2.2.-Réseaux de la moelle épinière	64
2.3.-Voies ascendantes	66
2.4.-Régions supérieures	69
2.5.-Voies descendantes	70
3. Modèles animaux de douleurs chroniques	72
3.1.-La douleur chez l'animal	72
3.2.-Modèles animaux.....	73
3.2.1.-Modèles de douleur neuropathique	73
3.3.- Limites de modèles animaux	75
4. Physiopathologie des douleurs chroniques	76
4.1.- Contributions périphériques	77
4.2.-Contributions spinales	78

5.	Traitements.....	86
5.1-	Traitements pharmacologiques.....	87
5.2.-	Traitements non pharmacologiques.....	90
5.3.-	Avenir.....	90
INTRODUCTION : Troisième partie : Canaux calciques à bas seuil.....		91
1.	Découverte des canaux calciques dépendants du voltage.....	92
2.	Diversité des canaux calciques voltages dépendants.....	93
3.	Structure des canaux calciques dépendants du potentiel.....	95
4.	Propriétés biophysiques des canaux T.....	97
5.	Régulation de canaux T.....	103
6.	Localisation des canaux T.....	109
6.1.-	Régulation de l'expression.....	110
7.	Fonction des canaux T dans le système nerveux.....	111
7.1.-	Transmission synaptique.....	111
7.2.-	Profil de décharge.....	113
7.3.-	Intégration synaptique.....	117
7.4.-	Plasticité synaptique.....	118
7.5.-	Segment initial de l'axone.....	119
8.	Canaux Cav3.2 et douleur.....	120
OBJECTIFS.....		125
MATERIEL ET METHODES.....		127
1.	Modèle animal.....	128
2.	Enregistrements en patch clamp.....	128
2.1.-	Préparation des tranches.....	128
2.2.-	Enregistrements en patch clamp.....	128
2.3.-	Analyse et statistique.....	132
3.	Production de virus.....	132
3.1.-	Clonage.....	132
3.2.-	Production de virus.....	135
3.3.-	Titration des virus.....	136
4.	Chirurgie.....	136
4.1.-	Injection intraspinale.....	136
4.2.-	SNI : <i>Spared Nerve Injury</i>	137
5.	Immunohistochimie.....	137
5.1.-	Préparation de coupes.....	137
5.2.-	Protocole et anticorps.....	138
5.3.-	Acquisition et quantification des images.....	139
6.	ISH.....	139
6.1.-	Préparation des coupes de moelle épinière.....	139
6.2.-	Préparation des sondes ARN antisens.....	140
6.3.-	Protocole d'hybridation <i>in situ</i> et immunomarquage.....	141

RESULTATS	143
Draft article.....	144
Résultats complémentaires	184
DISCUSSION ET PERSPECTIVES	191
BIBLIOGRAPHIE	208

TABLE DE FIGURES ET TABLEAUX

Figure 1. Schéma de l'anatomie du système nerveux périphérique	18
Figure 2. Vitesse de conduction des différentes fibres sensorielles	19
Figure 3. Caractéristiques des mécanorécepteurs.....	21
Figure 4. Caractéristiques des thermorécepteurs.....	23
Figure 5. Classification des fibres sensorielles.	27
Figure 6. Diagramme d'un glomérule dans la moelle épinière.	29
Figure 7. Organisation des afférences dans la moelle épinière.	30
Figure 8. Schéma de l'anatomie des unités de traitement LTMR.....	30
Figure 9. Origine des neurones de la lamina II	33
Figure 10. Morphologie des neurones de la lamina II.....	35
Figure 11. Propriétés électrophysiologiques des interneurons de la lamina II.	36
Figure 12. Mécanismes qui sous-tendent le profil de décharge.	39
Figure 13. Courants sous-liminaires dans la lamina II.....	40
Figure 14. Graphique montrant la distribution de neurones toniques et transitoires.	41
Figure 15. Relation entre la dynamique d'initiation du potentiel d'action et le mode fonctionnel de décharge.....	42
Figure 16. Théorie sur les réseaux dans la moelle épinière.....	44
Figure 17. Corrélation entre le type de profil de décharge et les réponses aux différents stimuli.....	45
Figure 18. Connexion inhibitrice dans la lamina II.....	46
Figure 19. Résumé des principaux marqueurs neurochimiques dans la lamina II.	49
Figure 20. Localisation des principaux marqueurs dans la corne dorsale.....	50
Figure 21. Circuit feed-forward inhibiteur entre neurones PKCY+ et interneurons glycinergiques.	52
Figure 22. Circuit entre les neurones PV et PKC γ	54
Figure 23. Schéma sur les circuits dans la corne dorsale de la moelle.	57
Figure 24. Facteurs associés aux douleurs chroniques.....	61
Figure 25. Schéma sur la relation entre l'intensité de douleur et l'intensité du stimulus.	62
Figure 26. Types de douleur primaire et secondaire.	63
Figure 27. Circuits dans la corne dorsale de la moelle épinière.....	65
Figure 28. Propriétés de stimulation des neurones WDR.	66
Figure 29. Schéma sur les principales voies ascendantes.	69

Figure 30. Régions cérébrales impliquées dans la perception douloureuse	70
Figure 31. Voies descendantes du contrôle de la nociception.....	72
Figure 32. Modèles de douleur neuropathique.	75
Figure 33. Mécanismes de la transmission nociceptive.	78
Figure 34. La perte d'inhibition diminue le seuil douloureux.....	81
Figure 35. Sensibilisations centrales.	81
Figure 36. Types de plasticité synaptique.	84
Figure 37. Schéma des principaux mécanismes impliqués dans l'établissement de douleurs chroniques dans la moelle épinière.	86
Figure 38. Site d'action des principaux analgésiques.	89
Figure 39. Nouveaux analgésiques commercialisés depuis 1990.	89
Figure 40. Activation des conductances potassiques et sodiques selon la dépolarisation.	92
Figure 41. Courants calciques à bas et haut seuil.....	93
Table 1. Propriétés électrophysiologiques et pharmacologiques des différents courants calciques à haut seuil.....	94
Figure 42. Similarité de séquences des sous-unités $\alpha 1$ des canaux calciques dépendants du potentiel.....	95
Figure 43. Schéma de la structure de la sous-unité $\alpha 1$ du canal calcique dépendant du potentiel	96
Table 2. Propriétés électrophysiologiques des canaux de type T.....	98
Figure 44. Propriétés électrophysiologiques des canaux T.	99
Figure 45. Courant de fenêtre dans un neurone du thalamus.	100
Figure 46. Décharges en rebond de neurones thalamiques.	101
Figure 47. Participation des canaux T aux décharges de potentiels d'action.....	102
Figure 48. Neurotransmetteurs et hormones modulant les courant T.	104
Figure 49. Sites et molécules de régulation des canaux T.....	106
Figure 50. Interaction des canaux T avec d'autres canaux dans deux types de synapses dans le cervelet.	108
Figure 51. Localisation subcellulaire des canaux Cav3.2.	109
Figure 52. Localisation des canaux T dans le système nerveux.....	110
Figure 53. Participation des canaux T à la transmission synaptique.....	113
Figure 54. Les décharges en bouffée des neurones TC du thalamus dépendent du canal Cav3.1	114
Figure 55. Participation des canaux T aux oscillations.	116
Figure 56. Participation des canaux T aux décharges toniques.....	116
Figure 57. Participation des canaux T à l'intégration synaptique.	118
Figure 58. Participation des canaux T à la plasticité synaptique.	119

Figure 59. Rôle des canaux T dans la douleur.	123
Table 3. Solutions pour les enregistrements de patch clamp.	131
Table 4. Solutions interne utilisées pour les enregistrements en patch clamp.	131
Figure 60. Plasmide 1 : pAAV-Cav3.2-hChR2-mCherry-WPRE.....	133
Figure 61. Plasmide pAAV-Cav3.2-mCherry-WPRE.	134
Figure 62. Plasmide pAAV-Cav3.2-Cre-mCherry.....	134
Figure 63. Schéma de la production du virus AAV.	136
Table 5. Liste d'anticorps primaires utilisés.	138
Table 6. Liste d'anticorps secondaires utilisés.....	139
Table 7. Sondes ARN antisens utilisées.....	141
Figure 64. Rôle des canaux T dans la transmission synaptique dans la corne dorsale de la moelle épinière.	196
Figure 65. Dépolarisation en rebond des neurones profonds de la moelle épinière.....	199
Figure 66. Résumé des résultats sur le rôle de Cav3.2 dans le profil de décharge.	203

GLOSSAIRE

4-AP, *4-Aminopyridine*

AAV, *Adeno-Associated Virus*

ACC, *Anterior Cingulate Cortex*

ADN, *Acide Désoxyribonucléique*

ARNm, *ARN messenger*

ASICs, *Acid-sensing ion channels*

ATP, *Adénosine TriPhosphate*

BID, *Beta subunit Interacting Domain*

CB, *Calbindin*

CCD, *Compression of Dorsal Root Ganglion*

CCI, *Chronic Constriction Injury*

CGRP, *Calcitonin Gene-Related Peptide*

CR, *Calretinin*

C-terminal, *Carboxy-terminal*

DHP, *Dihydropyridine*

DRG, *Dorsal Root Ganglia*

EDTA, *Éthylène Diamine Tétra-Acétique*

ERK, *Extracellular signal-regulated kinase*

GABA, *acide gamma-amino butyrique*

GDNF, *Glial-Derived Neurotrophic Factor*

GFP, *Green Fluorescent Protein*

GRP, *Gastrin-releasing peptide*

GRP-R, *Gastrin-releasing peptide Receptor*

hChR2, *H134R Channelrhodopsin-2*

HCN, *Hyperpolarisation-activated Cyclic-Nucleotid modulated Cation Non-selective Channel*

HEK-293, *Human Embryonic Kidney 293*

HGF, *Hepatocyte Growth Factor*

HS, *Hydrogen sulfide*

HVA, *High Voltage Activated*

IASP, *International Association for the Study of Pain*

IBS, *Irritable Bowel Syndrome*

ISH, *in situ hybridization*

ITR, *Inverted Terminal Repeat*
Iva, *Ivabradine*
LTD, *Long Term Depression*
LTMR, *Low Threshold Mechanoreceptor*
LTP, *Long Term Potentiation*
LTS, *Low Threshold Spike*
LVA, *Low Voltage Activated*
mEPSC, *Miniature Excitatory Post-synaptic Current*
mIPSC, *Miniature Inhibitory Post-synaptic Current*
MRGPRD, *Mas-Related G-Protein Couple Receptor Member D*
NGF, *Nerve Growth Factor*
NKA, *Neurokinin A*
NKB, *Neurokinin B*
NLS, *Nuclear Localization Sequence*
NMDA, *N-méthyl-D-aspartate*
nNOS, *neuronal Nitric Oxide Synthase*
NPY: *Neuropeptide Y*
NT, *Neurotensine*
N-terminal, *Amino-terminal*
PAB, *Parabrachial*
PAD, *Primary Afferent Depolarization*
PAG, *Periaqueductal gray*
PBS, *Phosphate Buffered Saline*
PCR, *Polymerase Chain Reaction*
PFA, *paraformaldehyde*
PFC, *Prefrontal Cortex*
PKA, *Protéine Kinase dépendante de l'AMP_c*
PKC, *Protéine Kinase C*
PKG, *Protéine kinase dépendante du GMP_c*
PV, *Parvalbumin*
RA-LTMR, *Rapid Adapting Low Threshold Mechanoreceptor*
RCPG, *Récepteur Couplé aux Protéines G*
ROR α , *Nuclear orphan receptor*
rtPCR, *Retro Transcriptase Polymerase Chain Reaction*

SA-LTMR, *Slow Adapting Low Threshold Mechanoreceptor*
SNI, *Spared Nerve Injury*
SNL, *Spinal Nerve Ligature*
SNRI, *Serotonin Norepinephrine Reuptake Inhibitors*
SP, *Substance P*
TBS, *Tris Buffered Saline*
TC, *Thalamocortical*
TEA, *Tetraethylammonium chloride*
TrkA, *Tropomyosine receptor kinase A*
TrkB, *Tropomyosine receptor kinase B*
TrkC, *Tropomyosine receptor kinase C*
TRP, *Transient Receptor Potential*
TRPA, *Transient Receptor Potential subfamily A*
TRPM8, *Transient Receptor Potential subfamily M*
TRPV1, *Transient Receptor Potential Vanilloid 1*
TTA-A2, *2-(4-cyclopropylphenyl)-N-((1R)-1-{5-[(2,2,2-trifluoroethyl)oxo]-pyridin-2-yl}ethyl)acetamide*
TTX, *Tetrodotoxin*
WDR, *Wide Dynamic Range*
WPRE, *Woodchuck Hepatitis Virus (WHP) Posttranscriptional Regulatory Element*
WT, *Wild Type*

PREFACE

Chaque neurone exprime une multitude de canaux ioniques, dont la localisation précise et l'activité concertée génèrent des réponses spécifiques. Au regard rapide des nombreuses familles et sous-types de canaux, on pourrait penser qu'ils sont redondants et que certains sont facultatifs. Inversement, les canalopathies, où la fonction d'un seul canal est altérée, que ce soit au niveau de l'expression, de la localisation ou de la fonction, nous montre l'importance de chaque canal pour le bon fonctionnement cellulaire. Ainsi, grâce au grand nombre de canaux présents dans chaque neurone, ceux-ci seront capables de répondre aux différents stimuli, et également d'avoir une variété de réactivité aux changements. Au cours de cette thèse, nous nous sommes intéressés aux canaux calciques à bas seuil, et pas n'importe lesquels, puisqu'il s'agit de Cav3.2. Ainsi, dans ces travaux, on verra l'importance des propriétés biophysiques de ces canaux, qui leur confèrent des rôles spécifiques et complémentaires d'autres partenaires.

Cette étude a porté sur la fonction de Cav3.2 dans les neurones de la lamina II, une région de la moelle épinière essentielle au traitement de l'information somatosensorielle, telle que le toucher, la perception de la température, la perception chimique et la douleur. Cette région contient un complexe de réseaux d'interneurones qui filtrent et traitent l'information d'une façon déterminante avant de la transmettre vers les structures suprasegmentaires. Pour ce faire, les neurones ont besoin de transmettre l'information sensorielle, en utilisant, entre autres, leurs propriétés électrophysiologiques. Les canaux ioniques jouent ici des rôles essentiels dans le bon fonctionnement de ce réseau. Ainsi, dans ces travaux on a montré l'importance du canal Cav3.2 dans l'excitabilité des interneurones de la lamina II de la moelle épinière chez la souris. Ces rôles interviennent très probablement dans la bonne transmission physiologique de l'information.

INTRODUCTION

Première partie :

Corne dorsale de la moelle épinière

1. Introduction

Les organismes ont besoin de détecter des stimuli provenant de l'extérieur, qu'ils soient mécaniques, thermiques, chimiques ou nociceptifs, pour s'adapter au milieu et survivre. Ainsi, le système chargé de détecter ces stimuli est un des plus anciens et développé chez les êtres vivants (Smith and Lewin 2009). Il est appelé système somatosensoriel cutané et contient des neurones sensoriels capables de détecter les stimuli provenant de la peau. Ces neurones envoient ensuite l'information vers le système nerveux central, dont la partie dorsale de la moelle épinière est le premier relais. Cette région n'est pas un simple passage pour l'information, mais une région essentielle pour l'intégration. Grâce aux réseaux des interneurones qu'elle contient, cette région traite l'information avant de l'envoyer vers les régions supérieures. Ainsi, la partie dorsale de la moelle épinière joue un rôle clé dans le traitement de l'information somatosensorielle.

2. Afférences primaires

Les neurones sensoriels ou fibres primaires sont les cellules chargées de détecter les stimuli et de transmettre l'information au système nerveux central. Ces neurones sont pseudounipolaires (Tandrup 1995), avec un axone dirigé vers la périphérie, et un autre axone dirigé vers la moelle épinière. L'axone périphérique contient des récepteurs et canaux ioniques pour détecter différents types de stimuli, et il peut aussi s'accompagner d'organes de détection (Ruffini, Merkel). Les somas de ces neurones se trouvent dans les ganglions de la racine dorsale (DRG : *Dorsal Root Ganglia*) (fig.1). Les fibres sensorielles peuvent être classées selon leur vitesse de conduction, leur cible périphérique, leurs modalités sensorielles et leur neurochimie.

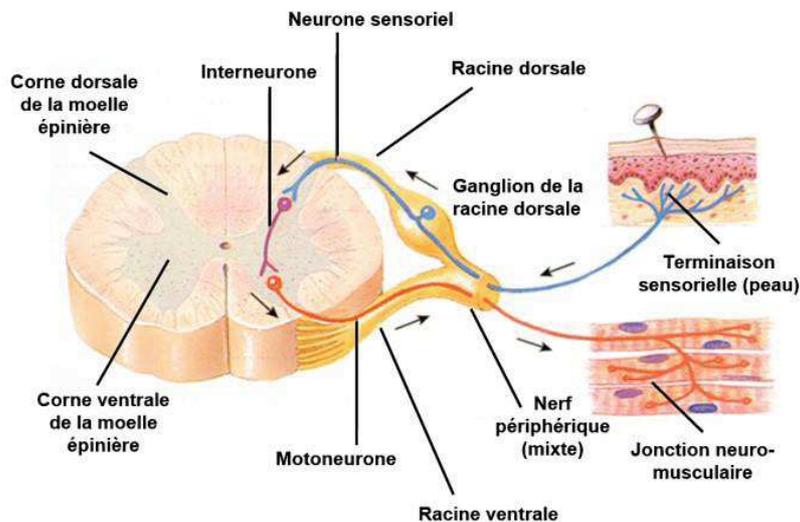


Figure 1. Schéma de l'anatomie du système nerveux périphérique. La peau est innervée par les terminaisons des neurones sensoriels primaires dont les somas se trouvent dans le ganglion de la racine

dorsale. Ces neurones projettent dans la moelle épinière où ils contactent des interneurons puis des motoneurons dans la partie ventrale de la moelle, qui sont responsables de réflexes en activant des muscles.

2.1.-Classification selon la vitesse de conduction

Les fibres sensorielles ont été d'abord divisées en trois groupes selon leur vitesse de conduction : A β , A δ et C (Horch, Tuckett et al. 1977). Les axones des afférences A β et A δ sont myélinisés et ont des vitesses de conduction élevées (30-120m/s et 4-30m/s), alors que les fibres C sont amyélinisées et plus lentes (0.4-2m/s) (fig.2).

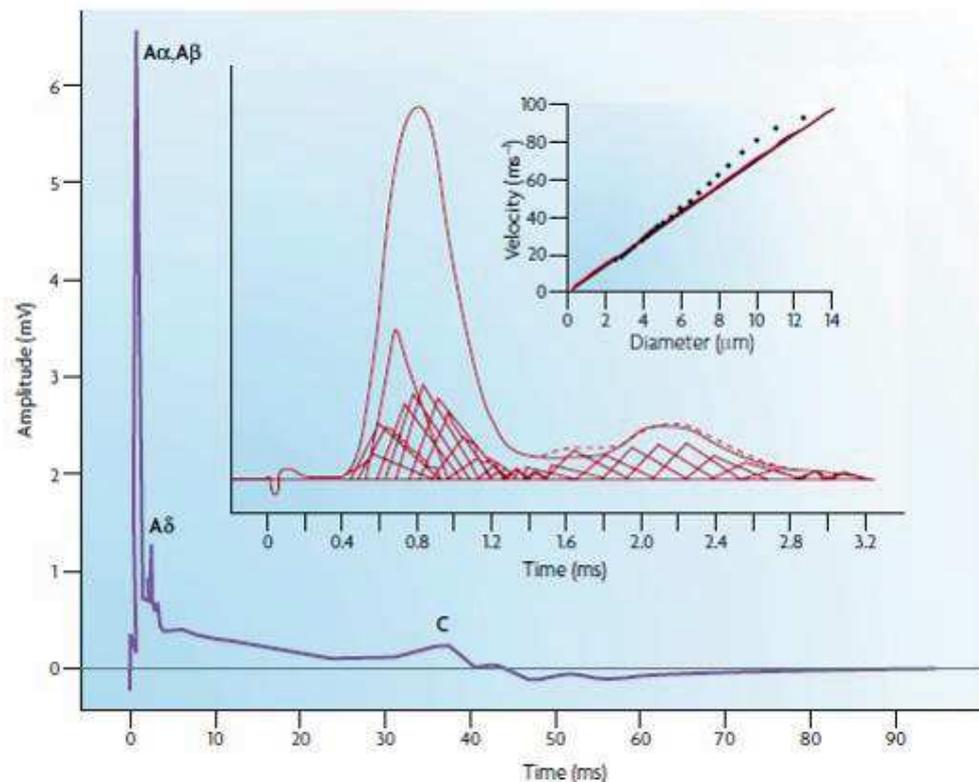


Figure 2. Vitesse de conduction des différentes fibres sensorielles. Ce graphe montre l'enregistrement des potentiels d'action au sein d'un même nerf. Les fibres myélinisées A α , A β et A δ ont des vitesses beaucoup plus rapides que les fibres C. Le graphe central est un agrandissement de la première partie pour illustrer la sommation des différents potentiels d'action de fibres A. Le graphe extérieur montre la relation linéaire entre le diamètre des axons et la vitesse de conduction, d'après des prédictions (rouge) et des enregistrements (points). D'après (Perl 2007).

2.2.-Classification selon la modalité sensorielle

Les fibres primaires peuvent détecter différentes modalités sensorielles : thermiques, mécaniques, chimiques et nociceptives. On peut donc classifier les fibres selon leurs modalités sensorielles en mécanorécepteurs, thermorécepteurs et nocicepteurs. Pour détecter chaque type de stimuli, les fibres contiennent des récepteurs ou canaux ioniques spécifiques. Il existe ainsi des récepteurs pour détecter les températures (TRPA1, TRPV1, TRPM8), les stimuli

mécaniques (TREK, Piezzo) et différentes substances chimiques (ASIC, MRGPRD) (Smith and Lewin 2009). Plusieurs de ces récepteurs sont polymodaux dans leurs mécanismes d'activation car ils répondent à plusieurs types de stimuli, comme le récepteur TRPV1 qui est activé par la capsaïcine, les protons et la température (Caterina, Schumacher et al. 1997), ASIC3 qui est activé par les protons et les lipides (Marra, Ferru-Clement et al. 2016), ou encore TREK1 qui répond entre autres à la pression mécanique et au refroidissement. Selon l'intensité nécessaire pour activer les fibres sensorielles, elles se divisent en fibres à bas seuil ou à haut seuil. Cette division implique que les mécanorécepteurs et quelques fibres thermiques, dont les fibres à haut seuil sont des nocicepteurs (Zhang 2015).

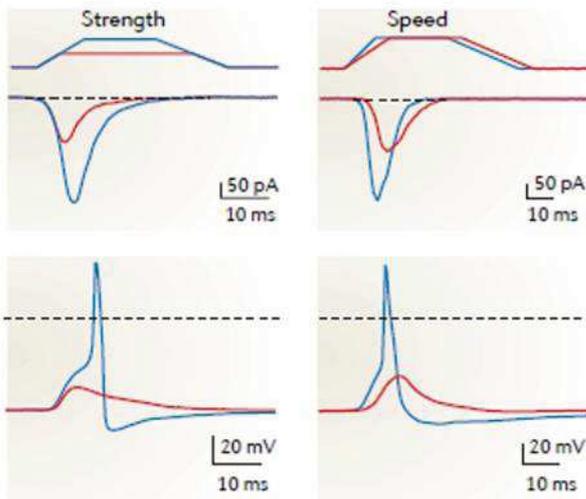
- **Mécanorécepteurs**

Les mécanorécepteurs sont majoritairement des fibres A β et quelques fibres A δ et C à bas seuil (LTMR : *low threshold mechanoreceptor*) qui détectent des stimuli mécaniques faibles, des déformations, appliqués sur la peau (Li, Rutlin et al. 2011, Abraira and Ginty 2013). Ils peuvent se diviser selon le type de décharge suite à une stimulation en fibres à adaptation rapide (RA-LTMR : *rapidly adapting*) ou fibres à adaptation lente (SA-LTMR : *slow adapting*). Ces propriétés permettront aux fibres de coder les aspects des stimuli tels que la vitesse ou intensité (fig.3). Ces fibres détectent différents types de stimuli mécaniques tels que vibrations (déformations en un point au cours du temps), textures (irrégularités d'une surface), ou des mouvements de poils (permettant la captation d'un changement externe par des récepteurs internes). Pour ce faire, leurs terminaisons périphériques sont très spécialisées avec des profils d'innervation de la peau différents selon le type de fibre (Li, Rutlin et al. 2011, Wu, Williams et al. 2012). Ainsi, les fibres A β innervent les peaux poilues et glabres et s'associent à des organes de réception comme les corpuscules de Paccini ou les disques de Merkel. Les fibres A δ et C innervent la peau poilue et forment des terminaisons lancéolées autour des poils (Li, Rutlin et al. 2011). Ces terminaisons contiennent des échafaudages de protéines impliquées dans la mécanosensation, capables de détecter des stimuli mécaniques et de les transduire en signaux électriques. On trouve de nombreux canaux ioniques, de la famille ASIC (ASICs : *Acid-sensing ion channels*) (Delmas, Hao et al. 2011), de la famille TRP (TRP : *Transient receptor potential*), tels que TRPA1 et TRPC1 (Vilceanu and Stucky 2010, Garrison, Dietrich et al. 2012) et TREK1 et Piezzo2 (Delmas, Hao et al. 2011, Coste, Marthur et al. 2010).

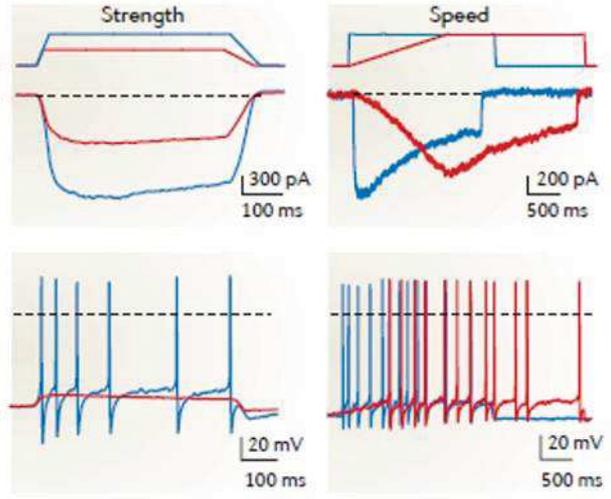
A

Receptor subtype	Hair follicles	Meissner corpuscle	Pacinian corpuscle	Merkel cell-neurite complex	Ruffini corpuscle	C-fibre LTM	Mechano-nociceptor Polymodal nociceptor
Skin stimulus	Light brush 	Dynamic deformation 	Vibration 	Indentation depth 	Stretch 	Touch 	Injurious forces
Afferent response	RA, LT 	RA, LT 	RA, LT 	SA, LT 	SA, LT 	SA, LT 	SA, HT
Stimulus							
Receptive field							
Perceptual functions	Skin movement	Skin motion: detecting slipping objects	Vibratory cues transmitted by body contact when grasping an object	Fine tactile discrimination: form and texture perception	Skin stretch: direction of object motion, hand shape and finger position	Pleasant contact: social interaction	Skin injury: pain

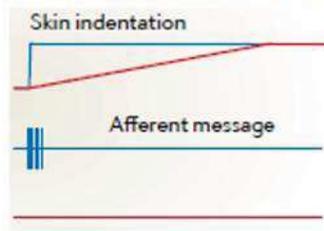
B1 Rapidly adapting mechanosensitive current



B2 Ultra-slowly adapting mechanosensitive current



C1 Sensor for phasic mechanical stimuli



C2 Sensor for tonic mechanical stimuli

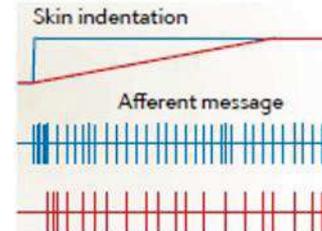


Figure 3. Caractéristiques des mécanorécepteurs. (A). Tableau avec les propriétés de différentes fibres sensorielles innervant la peau. Les fibres peuvent être différenciées par le stimulus optimal pour leur activation, leur terminaison périphérique dans la peau, le type de réponse et le champ récepteur. (B). Les courants mécanosensibles codent les paramètres biologiquement pertinents des stimuli mécaniques. (B1). Exemple d'un courant mécanosensible à adaptation rapide (RA: rapidly adapting)

exprimé dans un neurone sensoriel non nociceptif. Réponses en *current* et *voltage clamp* évoquées avec des stimuli mécaniques de différente amplitude (5 et 8.5µm, traces rouge et bleue respectivement) ou différentes vitesses (560 et 800µm per s, traces rouge et bleue). Notez que les courants RA sont plus efficaces pour déclencher des potentiels d'action avec stimulations de majeure amplitude ou vitesses, elles agissent donc comme détecteurs de vitesse. **(B2)**. Exemple d'un courant à adaptation très lente (SA : *slowly adapting*) exprimé dans un neurone sensoriel nociceptif. Réponses en *current* et *voltage clamp* évoquées par des stimuli mécaniques de différente amplitude (5 et 8.5µm, traces rouge et bleue respectivement) ou différentes vitesses (3 et 80µm per s, traces rouge et bleu). Notez que les vitesses lentes ne préviennent pas la décharge des potentiels d'action. Les courants mécanosensibles SA agissent comme détecteurs de stimuli toniques. **(C)**. Prédiction de signal électrique qui pourrait être généré par les terminaisons sensorielles avec courants d'adaptation rapide (C1) ou très lente (C2) sur des stimulations mécaniques de différente vitesse sur la peau. D'après (Delmas, Hao et al. 2011).

- **Thermorécepteurs**

De nombreuses fibres C et Aδ avec des terminaisons libres cutanées transmettent une activité électrique en réponse à des changements de température. On distingue des thermorécepteurs qui s'activent dans une gamme de températures physiologiques (20-40°C), des thermocicepteurs dont l'activité est détectée hors de cette gamme (fig.4). La famille de canaux ioniques TRP contient un grand nombre de membres sensibles à différentes gammes de températures. Ainsi, les canaux TRPV3 et TRPV4 s'activent avec températures inoffensives supérieures à 30°C et 27°C respectivement. Ils semblent coopérer avec des fibres TRPV1+ pour transduire les températures chaudes (Zhang 2015). Les températures froides sont détectées par les canaux TRPM8 <26°C et TRPC5 <37°C. L'ablation génomique sélective de thermorécepteurs, tels que TRPV1 (Caterina, Leffler et al. 2000), TRPV3 (Moqrich, Hwang et al. 2005), TRPV4 (Lee, Iida et al. 2005), TRPA1 (Bautista, Jordt et al. 2006) et TRPM8 (Bautista, Siemens et al. 2007), a suggéré qu'une protéine ne supportait pas à elle seule la détection d'une gamme de température. Une redondance serait en partie assurée par un recouvrement des températures détectées par ces différentes protéines. Cette redondance peut être portée par un type de terminaison particulière. En effet, l'invalidation des neurones afférents primaires exprimant TRPM8 (et pas seulement de la protéine TRPM8) provoque une insensibilité aux températures froides (inoffensives et nociceptives) sans affecter les sensations du chaud, mécanique et proprioceptive (Knowlton, Palkar et al. 2013). La thermoréception n'est pas une modalité simple pour une autre raison. En effet, TRPV3 et TRPV4 sont exprimés dans les kératinocytes de la peau, et pas dans les neurones sensoriels. C'est par la sécrétion d'ATP, et l'activation de récepteurs purinergiques des terminaisons libres que les kératinocytes participeraient à la transduction de la chaleur. Ainsi, la thermoréception repose à la fois sur des propriétés de thermosensibilité et de chemosensibilité.

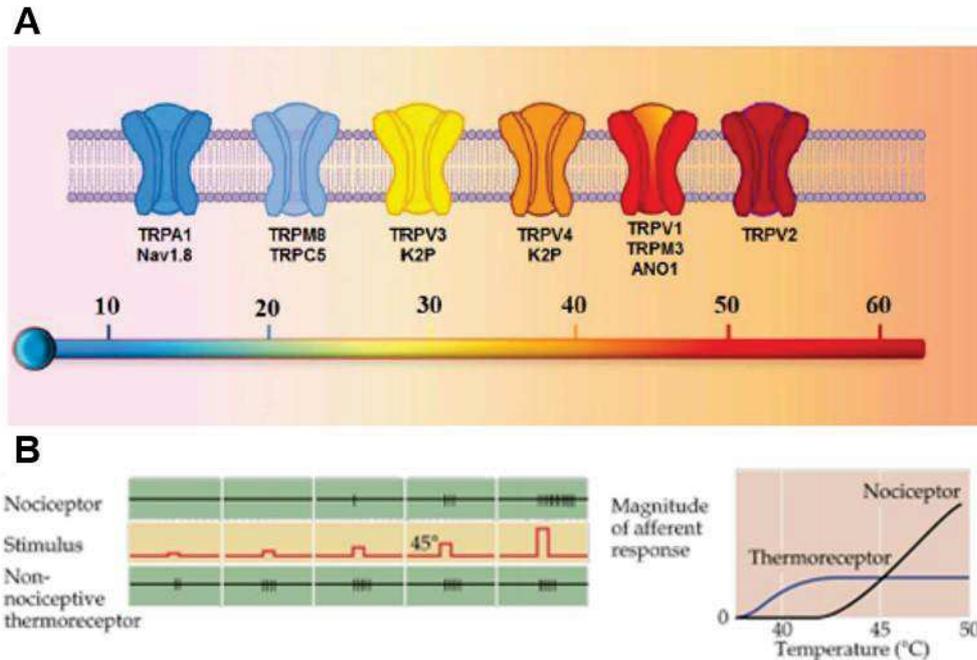


Figure 4. Caractéristiques des thermorécepteurs. (A) Schéma avec les principaux canaux ioniques sensibles à la température selon le seuil d'activation. D'après (Zhang 2015). (B). Enregistrement de réponses des fibres thermiques nociceptives et non nociceptives suite aux stimulations thermiques de la peau. Notez que les nocicepteurs répondent à des seuils de température plus élevés et de façon linéaire une fois activés, alors que les fibres non nociceptives arrivent au plateau pour des stimulations nociceptives.

- **Nocicepteurs**

Les neurones nocicepteurs possèdent des terminaisons libres dans la peau et sont constitués des fibres à haut seuil d'activation $A\delta$ et C, et quelques fibres $A\beta$. Puisque la propagation est fonction du diamètre et de la myélinisation, la participation des différents types de fibres générerait une hiérarchie, un codage temporel au cours duquel l'information transmise par les fibres C arriverait toujours en dernier (Julius and Basbaum 2001). Leur profil de décharge ajouterait une possibilité de codage, et les fibres $A\delta$, au contraire des fibres C, ont une activité tonique au cours d'une stimulation nociceptive. La différence entre ces deux types de fibres est aussi qualitative puisque les fibres $A\delta$, bien mieux que des fibres C, codent pour l'intensité et la surface de la stimulation. On distingue des mécano-nocicepteurs et des nocicepteurs polymodaux qui codent pour des stimuli nociceptifs mécaniques, thermiques ou chimiques. Il existe aussi des nocicepteurs silencieux uniquement activés par des lésions envahissantes dont l'équivalent ne peut être reproduit *in vitro*, et qui ne sont pas ou peu provoquées *in vivo* pour des raisons éthiques. Plusieurs familles de canaux et de récepteurs participent au codage des différentes formes de nociception, puisqu'ils peuvent être des récepteurs aux températures extrêmes, des mécanorécepteurs, des récepteurs d'agents destructeurs, intrusifs, ou irritants.

Ces protéines sont souvent exprimées dans un même neurone (Zhang 2015, Deval, Noel et al. 2008). Les kératinocytes jouent aussi un rôle dans ce codage puisqu'ils expriment TRPV1 et TRPA1, et peuvent en sécrétant l'ATP modifier l'activité de nombreuses terminaisons voisines. La notion de neurone polymodal a toutefois été remise en cause à plusieurs reprises. En effet, l'ablation des neurones exprimant le récepteur MRGPRD (MRGPRD : *mas-related G protein-coupled receptor*) modifie la mécano-nociception et ne change pas le comportement vis-à-vis des températures extrêmes, nociceptives. A l'inverse, l'injection intrathécale de capsaïcine qui provoque une ablation des fibres exprimant TRPV1, élimine la thermo-nociception au chaud sans changement de la mécano-nociception et de la nociception au froid. Une autre étude sur des souris déplétées de neurones sensoriels TRPV1+, de neurones TRPM8+, et de quelques neurones Mrg+, montre la perte totale de nociception au froid et au chaud, sans affecter le toucher ni la mécano-nociception (Mishra, Tisel et al. 2011). A une échelle moléculaire, les réponses des nocicepteurs ont été enregistrées *in vivo* par imagerie calcique suite à différents types de stimulation de la patte (Emery, Luiz et al. 2016). Ils suggèrent que la plupart, soit 85-95% des nocicepteurs, ne sont pas polymodaux, mais spécifiques à un type de stimulus nociceptif, soit thermique au chaud, froid ou mécanique. De plus, ces proportions ne sont pas grandement modifiées sous l'effet d'une sensibilisation chimique. Cette étude récente, émanant d'un seul groupe, remet en question un grand nombre de travaux basés sur des techniques *ex vivo* (DRG en culture, skin nerve, ...) qui illustrent la notion de nocicepteur polymodal. Cela mérite une confirmation par d'autres explorations cellulaires *in vivo* qui sont désormais accessibles avec les dernières avancées techniques d'imagerie calcique comme l'utilisation des sondes GCamp6.

En conclusion, la plupart des nocicepteurs posséderaient une modalité spécifique même si ces neurones possèdent de nombreuses similitudes, qui concernent les protéines impliquées dans la reconnaissance des agents douloureux. L'information afférente aux réseaux de la moelle épinière est donc probablement extrêmement spécialisée, ce qui suggère l'existence de nombreux réseaux impliqués dans la prise en charge de toutes ces informations spécifiques.

2.3.-Classification selon la neurochimie

L'analyse d'expression de marqueurs neurochimiques tels que les récepteurs sensoriels ou les facteurs de transcription a aussi été largement utilisée pour identifier des populations discrètes au niveau moléculaire. Tout d'abord la présence de la protéine NF200 (NF200 : *Neurofilament 200*) marque les fibres myélinisées et la protéine périphérine les fibres non myélinisées. L'étude

de l'embryogenèse et de la diversification des neurones sensoriels à partir leurs progéniteurs a permis de trouver des marqueurs pour différencier des populations de fibres. Ainsi, l'expression de récepteurs de facteurs neurotrophiques tels que le récepteur-kinase à la tropomyosine TrkA (TrkA : *tropomyosine receptor kinase A*) pour le NGF (NGF : Nerve Growth Factor), TrkB pour le BDNF (BDNF : *Brain-derived Neurotrophic Factor*), TrkC pour la NT3 (NT3 : *neurotrophin 3*), les récepteurs tyrosine-kinase Met pour le HGF (HGF : *Hepatocyte Growth Factor*), et Ret pour GDNF (GDNF : *Glial-Derived Neurotrophic Factor*) permettent de différencier différentes populations de neurones (Lallemend and Ernfors 2012). Ces récepteurs sont exprimés par cycles pendant l'embryogenèse des neurones sensoriels. Ainsi, le profil d'expression de ces différents facteurs au cours du développement déterminera différentes populations de neurones à l'âge adulte (fig.5). Globalement, le facteur TrkA contrôle le développement des nocicepteurs (fibres TRPV1+, TRPM8+ et Mrg+), le facteur TrkC définit des mécanorécepteurs, et TrkB des propriorécepteurs (Huang, Wilkinson et al. 1999).

L'utilisation des marqueurs moléculaires tels que peptides et récepteurs a aussi permis de différencier des populations fonctionnelles. Classiquement, on différencie des fibres peptidergiques C et A δ qui expriment le peptide CGPR (CGRP : *calcitonin gene-related peptide*) et non peptidergiques, avec une forte affinité par l'isolectine B4 (IB4). Des études plus récentes ont trouvé des différences entre ces populations. Ainsi, les fibres C peptidergiques se différencient entre elles par l'expression de la substance P. Parmi les fibres IB4+, celles exprimant le récepteur MRGPRD activé par la β -alanine définissent une population de fibres C non peptidergiques discrète au niveau d'expression de gènes (Reynders, Mantilleri et al. 2015). La tyrosine hydroxylase (TH), TAFA4 et VGLUT3 définissent une population de fibres C non peptidergiques qui ne lie pas l'IB4, les fibres C-LTMR (Seal, Wang et al. 2009, Delfini, Mantilleri et al. 2013).

Des études plus récentes utilisant des techniques d'analyse d'ARN ont permis d'identifier 11 sous-populations de fibres selon le profil d'expression de gènes (Usoskin, Furlan et al. 2015). Cette classification est en partie en accord avec les populations de neurones identifiés par l'expression de récepteurs aux neurotrophines ou d'autres marqueurs (fig.5). Par contre, il faudrait faire des études fonctionnelles pour vérifier l'identité de ces groupes de neurones.

L'ensemble de ces résultats suggèrent de plus en plus l'existence de populations fonctionnelles discrètes parmi les neurones sensoriels, avec une grande spécificité sensorielle. Par contre, le

nombre de types de neurones sensoriels uniques au niveau moléculaire et fonctionnel n'est pas encore déterminé. Il existe des résultats contradictoires, tels que des populations de fibres découvertes avec des méthodes moléculaires dont la fonction reste inconnue (Usoskin, Furlan et al. 2015). A l'inverse, les données fonctionnelles sont des fois contradictoires avec les données d'expression de gènes et/ou protéines avec comme une des causes probables la non spécificité d'anticorps utilisés dans un certain nombre d'études. Il est possible que les mêmes fibres puissent se comporter de façon différente selon le type de stimulation, ce qui pourrait biaiser les conclusions sur le nombre de types de fibres. Ainsi, ces écarts doivent encore être étudiés. Les études utilisant une combinaison des approches fonctionnelles et moléculaires est nécessaire, surtout si l'on se place dans la translation des données précliniques sur les rongeurs vers la situation chez l'homme.

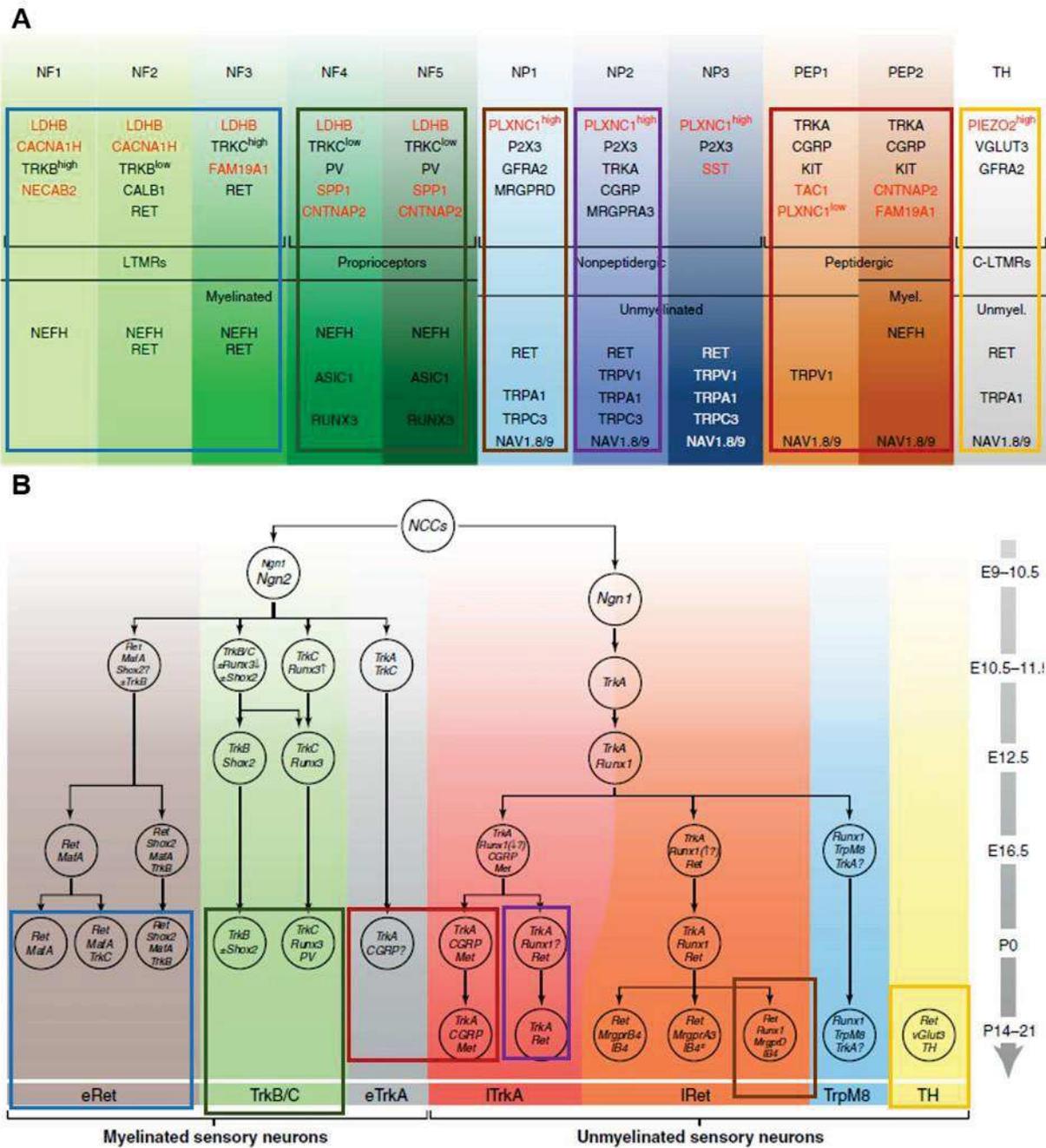


Figure 5. Classification des fibres sensorielles. (A). Classification des fibres sensorielles selon le profil d'expression de gènes. Cette classification est basée sur l'analyse transcriptionnelle des ARNm et différencie 11 types de fibres. Les gènes en haut sont proposés comme marqueurs spécifiques de sous-populations (en rouge les nouvelles propositions et en noir celles utilisées précédemment). Les gènes en bas sont des marqueurs classiques utilisés pour classifier les fibres sensorielles. D'après (Usoskin, Furlan et al. 2015). **(B). Diversification des neurones sensoriels au cours du développement de souris.** Schéma montrant les principales lignées avec les marqueurs moléculaires exprimés à chaque étape. La colonne de droite représente les différentes étapes du développement (E : embryonnaire, P : post-natal). Les carrés montrent les populations de fibres que sont identifiées comment populations fonctionnelles discrètes dans les deux classifications. D'après (Lallemend and Ernors 2012).

2.4.-Projection dans la moelle épinière

Les fibres primaires projettent dans la moelle épinière d'une façon très organisée selon leur modalité sensorielle et selon la région de peau innervée (somatotopie). Ainsi, les projections des fibres sensorielles suivent une organisation horizontale, par rapport aux laminae de la moelle épinière, selon la modalité sensorielle (fig.7). Les fibres nociceptives C et A δ peptidergiques projettent principalement dans les laminae I et IIo, et V. Les fibres nociceptives C et A δ non peptidergiques projettent dans la lamina II. Les fibres LTMRs projettent dans les couches plus profondes : les C-LTMRs dans la lamina III et III et les fibres A β et A δ dans les laminae III et IV (Abraira and Ginty 2013, Abraira, Kuehn et al. 2017).

La partie dorsale de la moelle épinière contient une grande diversité des neurones, avec un certain grade de spécialisation sensorielle (voir le prochain chapitre). Les études montrent que les fibres projettent préférentiellement avec des types neuronaux précis. Par exemple, quasi exclusivement les fibres nociceptives peptidergiques sont capables de contacter les neurones de projection de la lamina I (Todd, Puskar et al. 2002). D'autre part, des études électrophysiologiques et immunohistologiques faites dans des populations de neurones de la lamina II montrent que la plupart des neurones reçoivent des synapses provenant de différents types de fibres (Abraira, Kuehn et al. 2017). Il y a ainsi encore des débats sur la spécificité de projections, avec souvent des résultats contradictoires. Par exemple une étude de microscopie électronique sur une population de neurones PKC γ ⁺ a montré que malgré la projection des fibres C-LTMR dans les mêmes régions, ils ne sont pas connectés de façon monosynaptique (Peirs, Patil et al. 2014). Une autre étude plus récente avec une approche immunohistochimique suggère que ces neurones PKC γ ⁺ recevraient des connexions des fibres C-LTMR (Abraira, Kuehn et al. 2017). Il reste donc encore des questions en suspens.

Certaines synapses entre les fibres sensorielles et les neurones de la moelle épinière forment des complexes appelées *glomeruli* (fig.6). Ces structures contiennent différents types de synapses, axo-dendritiques, axo-axoniques et dendro-axoniques et se localisent préférentiellement dans la lamina II (Ribeiro-da-Silva and Coimbra 1982). Elles se forment principalement sur les fibres C non peptidergiques IB4⁺ et A δ -LTMRs. Les fibres A β et A δ nociceptives forment des synapses plus simples, avec quelques contacts axo-axoniques. Ces structures reflètent les différents contrôles que subissent les afférences primaires pour moduler le passage de l'information, montrant encore la complexité des réseaux dans la lamina II. Ces structures sont par exemple importantes pour la dépolarisation des afférences primaires (PAD :

primary afferent depolarization), une forme d'inhibition présynaptique générée par des interneurons GABAergiques (Bardoni, Takazawa et al. 2013). Les contacts peuvent aussi provenir des afférences descendantes de régions cérébrales, qui sont un substrat important de régulation de la douleur.

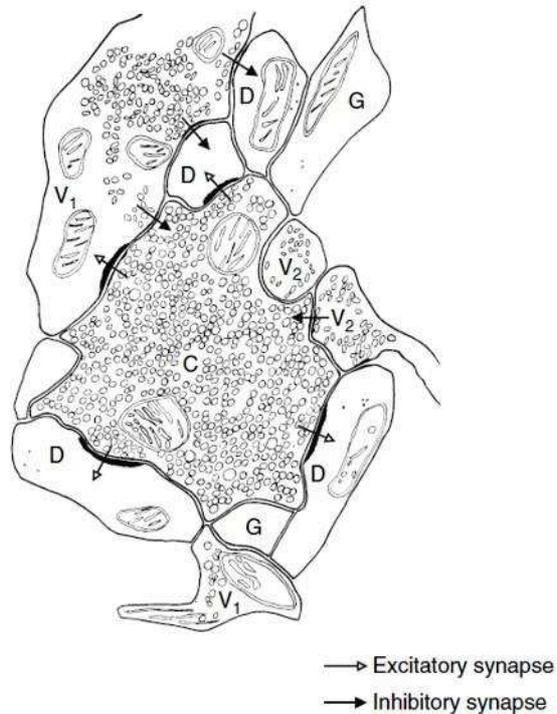


Figure 6. Diagramme d'un glomérule dans la moelle épinière. Schéma fait à partir une micrographie de microscopie électronique montrant l'organisation des contacts synaptiques reçus par la terminaison d'une afférence primaire. C : bouton central, G : profil glial, D : dendrite régulier, V₁ : dendrite présynaptique et V₂ : bouton axonal périphérique. D'après (Ribeiro-da-Silva and Coimbra 1982).

Les projections dans la moelle épinière suivent une organisation somatotopique en colonnes verticales (fig.7). Ainsi, la partie médiale de la moelle reçoit des afférences de fibres innervant les parties extrêmes, et la partie latérale les parties plus internes (Corder, Siegel et al. 2010).

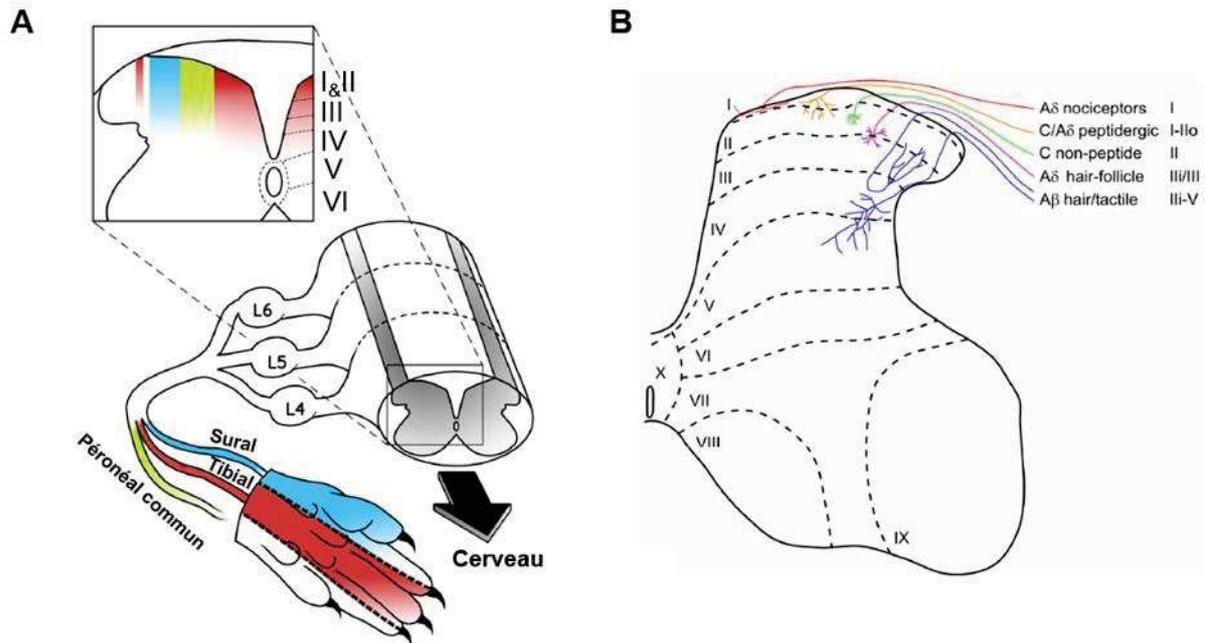


Figure 7. Organisation des afférences dans la moelle épinière. (A). Schéma de l'organisation somatotopique des branches surale, tibiale et péronéale commune du nerf sciatique. Les nerfs sural, tibial et péronéal innervent la partie interne, médiale et externe de la patte respectivement, et projettent dans la partie latérale, medio-centrale et médiane de la corne dorsale. Adapté de (Corder, Siegel et al. 2010). **(B). Projection des fibres primaires dans la corne dorsale de la moelle épinière.** Chaque type de fibres innerve préférentiellement une lamina. D'après (Todd 2010).

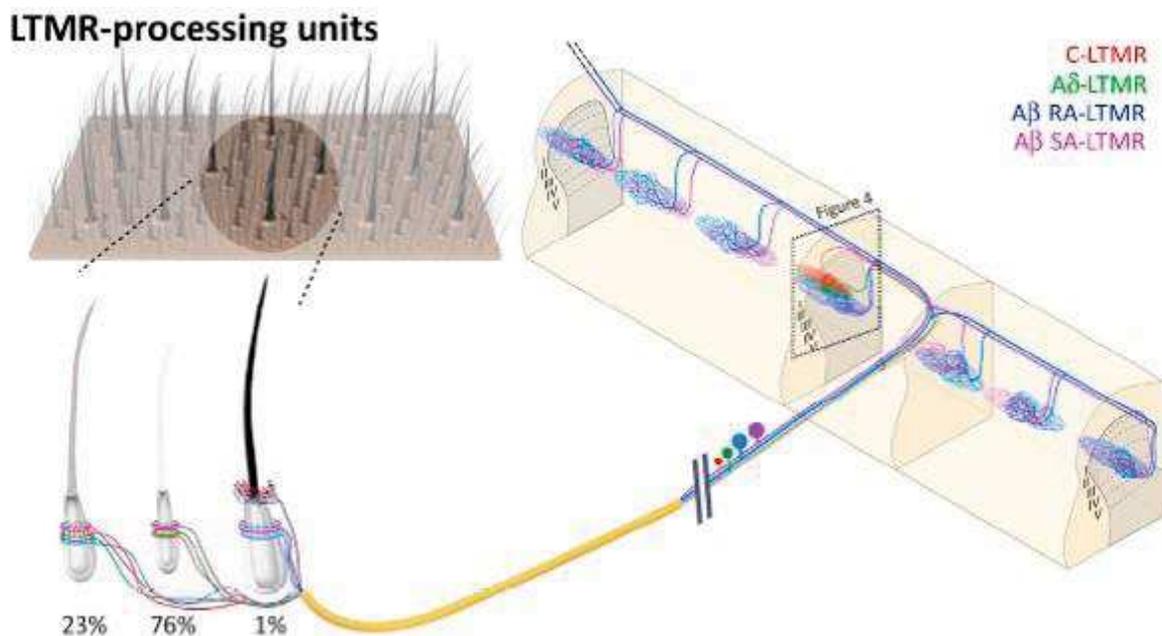


Figure 8. Schéma de l'anatomie des unités de traitement LTMR. Chaque follicule pileux chez la souris est innervé avec une combinaison fixe et unique de neurones sensoriels LTMR. L'information des LTMRs provenant d'un groupe de poils converge dans une unité de traitement en colonne dans la moelle épinière. D'après (Abraira and Ginty 2013).

3. Cytoarchitecture de la corne dorsale de la moelle épinière

La moelle épinière peut être divisée en *laminae* suivant des critères morphologiques de taille et de densité de corps cellulaires (Rexed 1952). La partie dorsale de la moelle épinière comprend les laminae I-V. Ces laminae contiennent des neurones de projection, quand l'axone projette vers le cerveau, et des interneurons, quand l'axone reste dans la moelle épinière. Les laminae III-V contiennent une densité plus faible de corps neuronaux, avec des gros neurones de projection et interneurons (Cordero-Erausquin, Inquimbert et al. 2016). Les laminae I-II, aussi appelées *lamina marginale* et *substance gelatinosa* respectivement, contiennent principalement des interneurons, avec seulement 5% de neurones de projection dans la lamina I (Todd 2017). La lamina II est aussi divisée en partie externe, la partie plus dorsale (IIo), et partie interne, plus ventrale (IIi). Ces laminae forment la partie superficielle de la corne dorsale de la moelle, et ont reçu un intérêt particulier, car elles reçoivent de nombreuses afférences nociceptives, et jouent donc un rôle dans l'intégration de la douleur.

4. Lamina II

La lamina II de la corne dorsale de la moelle épinière est une région male connue du système somatosensoriel. Plusieurs classifications des interneurons qu'elle contient ont été faites, d'un point de vue morphologique, électrophysiologique et neurochimique. Pourtant, l'organisation de cette structure n'est pas établie, même si quelques réseaux ont été identifiés. A plus forte raison, les fonctions de cette structure restent vagues et les hypothèses à ce sujet sont fortement influencées par l'évolution des données concernant les neurones afférents primaires.

4.1-Développement de la moelle épinière

La moelle épinière se forme à partir de la partie caudale du tube neural. Puis, la combinaison de différents facteurs de transcription ainsi que l'expression de différents facteurs neurotrophiques déterminent l'orientation en types cellulaires différenciés. Des études chez la souris ont montré que le développement a lieu en deux étapes principales. C'est entre les jours embryonnaires E10-12.5 qu'apparaissent 11 domaines de progéniteurs neuronaux « *early-born* » (Helms and Johnson 2003). Six populations ont une localisation dorsale (dII1-6) et les cinq restantes forment la partie ventrale (V0-3, MN) (Lai, Seal et al. 2016). Une seconde vague plus tardive (E11-E13) apparaît dans la partie dorsale (dII_A et dII_B). La ségrégation dorso-ventrale est assurée par des gradients de morphogènes libérés depuis le '*roof plate*' ou le '*floor plate*'. *Sonic hedgehog*, sécrété depuis le « *floor plate* » est essentiel pour l'initiation de

l'identité ventrale, alors que BMPs et WNT, libérés par le « *roof plate* », permettront les cascades d'expression de facteurs de transcription associées aux identités dorsales. La ségrégation antéro-postérieure est assurée par d'autres gradients, d'acide rétinoïque, de GDF11 et de FGF. Dans le même temps, c'est un antagonisme entre des éléments de la voie notch – proliférative- et plusieurs facteurs de transcription bHLH « *basic helix loop helix* » -pro-différentiation- qui va conditionner la profondeur du stock de précurseurs et l'apparition des caractères post-mitotiques. Les phénotypes pleinement différenciés sont obtenus grâce à l'expression/extinction de facteurs de transcription bHLH et de facteurs à homéodomaines, ainsi que par des répressions réciproques entre populations voisines. A priori, cette profusion de marqueurs potentiels devrait permettre d'identifier les diverses sous populations de neurones différenciés. Toutefois, certains gènes, tel vGluT3, sont exprimés de manière transitoire et ne peuvent plus être utilisés comme marqueurs à l'âge adulte (où vGlut3 est un marqueur de fibres afférentes non myélinisées) (Peirs, Williams et al. 2015). De plus, la maturation de la moelle intègre des étapes de migration à partir des domaines d'origine ce qui fait que l'historique des neurones ne correspond pas avec l'organisation en laminae de Rexed, et que des neurones voisins peuvent avoir des phénotypes opposés et/ou des origines très différentes (Lai, Seal et al. 2016).

En conséquence, les populations neuronales de la lamina II proviennent des progéniteurs dI4 et dI5 et dIL_A et dIL_B, qui dérivent de la lignée Lbx1 (protéine d'expression limitée à la moelle et tronc cérébral) (Gross, Dottori et al. 2002) (fig.9). Les gènes Tlx3 et Pax2 sont responsables de la différenciation de neurones excitateurs et inhibiteurs, respectivement, grâce à leur répression réciproque dans la corne dorsale. Ces gènes contrôlent l'expression de marqueurs glutamatergiques (VGLUT2, AMPA, kainate) et GABAergiques (GAD1, 2) (Cheng, Arata et al. 2004). Les neurones inhibiteurs, qu'ils soient GABAergiques ou glycinergiques, proviennent des populations dI4 et dIL_A, qui expriment Ptf1a (Glasgow, Henke et al. 2005). Toutefois, des lignées développementales peuvent être associées à une modalité sensorielle (Lai, Seal et al. 2016). Par exemple, les neurones GRPR⁺, qui dérivent de la lignée dI5/dIL_B, sont impliqués dans la sensation de démangeaison chimique alors que les neurones NPY⁺, qui dérivent de la lignée dI4/dIL_A, participent à la démangeaison mécanique (Sun and Chen 2007, Bourane, Duan et al. 2015). L'association de l'origine développementale avec une modalité sensorielle n'est pas la règle puisque les interneurones à dynorphine, qui possèdent une origine homogène, dIL1A, semblent jouer un rôle dans le réseau de la démangeaison (induite par des perturbateurs chimiques) ainsi que dans le réseau de douleur mécanique (Lai, Seal et al. 2016).

En conclusion, la présence de marqueurs de développement à l'âge adulte peut être utile (c'est le cas de Tlx3 et de Pax2) et est rarement suffisante pour définir une sous-population fonctionnelle d'interneurones de la lamina II.

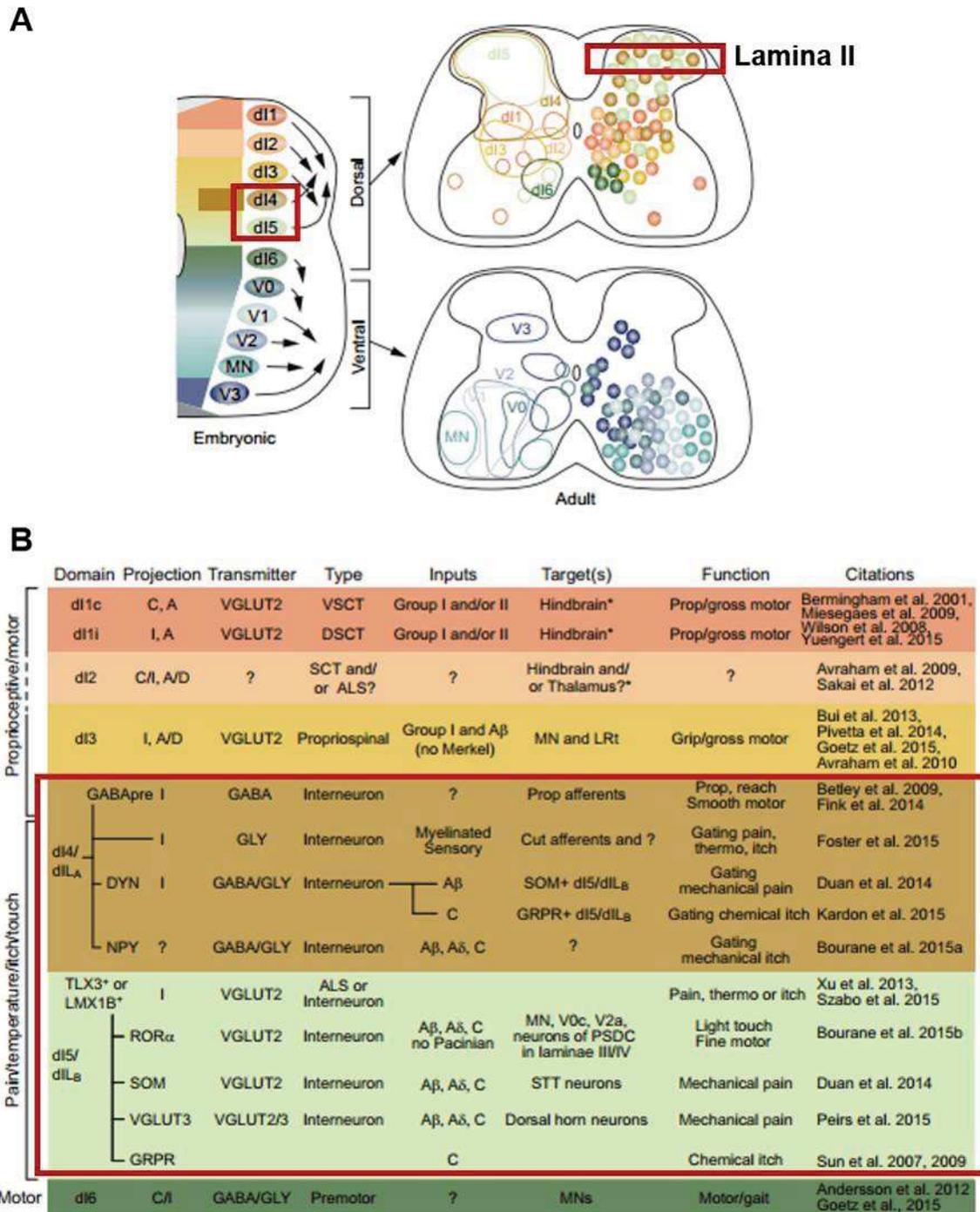


Figure 9. Origine des neurones de la lamina II. (A). Les neurones provenant de mêmes domaines progéniteurs migrent sur de longues distances depuis leur localisation originale. De plus, il n'y a pas une correspondance exacte avec les laminae de Rexed. Les neurones de la lamina II proviennent des groupes d14, d1LA, d15 et d1LB qui migrent dorsale et latéralement (carré rouge). (B). Les neurones qui dérivent d'un même progéniteur ont tendance à former des neurones impliqués dans circuits associés avec une

fonction somatosensorielle particulière. Notez que les neurones provenant de progéniteurs dI4 et dI5 participent aux modalités sensorielles du touché, de la thermosensation et de la douleur (carré rouge). D'après (Lai, Seal et al. 2016).

4.2.-Classification morphologique

La première classification des neurones de la lamina II fut faite par Ramon y Cajal qui distingua trois types : centraux, traverses (*transvers*) et limitantes (*limiting cells of Cajal*) (Ramon y Cajal 1909). La classification la plus utilisée de nos jours a été obtenue chez le hamster (Grudt and Perl 2002), et décrit 5 types de neurones : île (*islet*), centraux, radiaux, verticaux et médial-latéraux (fig.10). Cette classification se base sur des critères morphologiques comme la distribution de l'arbre dendritique et la localisation du soma dans la lamina II. Ainsi, les neurones *île* se localisent dans la partie interne de la lamina II (IIi) et ont un arbre dendritique très prononcé dans l'axe rostre-caudal (>400µm). Les neurones *centraux* se localisent dans la lamina IIi avec des dendrites aussi dirigés principalement vers l'axe rostre-caudal, mais plus courtes (<400µm). Les neurones *radiaux* se localisent entre la partie externe de la lamina II (IIo) et IIi avec des dendrites dirigés dans tous les directions. Les neurones *verticaux* se localisent dans la lamina IIo et ses dendrites se prolongent principalement ventralement depuis le soma et peuvent arriver jusqu'à la lamina III. Les neurones *médial-latéraux* se caractérisent par un arbre dendritique plus important dans l'axe médio-latéral que dorso-ventral. Cette classification fut aussi retrouvée chez le rat (Yasaka, Kato et al. 2007). Par contre, cette classification ne permet pas de caractériser tous les neurones, avec 20 à 25% de neurones qui restent non identifiés (Grudt and Perl 2002, Yasaka, Kato et al. 2007).

Les différences dans les projections des prolongations suggèrent différents rôles. Ainsi, les neurones avec des prolongements importants dans l'axe rostre-caudal serviraient à connecter différents segments de la moelle épinière. Les projections ventrales des neurones verticaux servent à traiter l'information de différentes *laminae* et donc probablement provenant de différents types d'afférences.

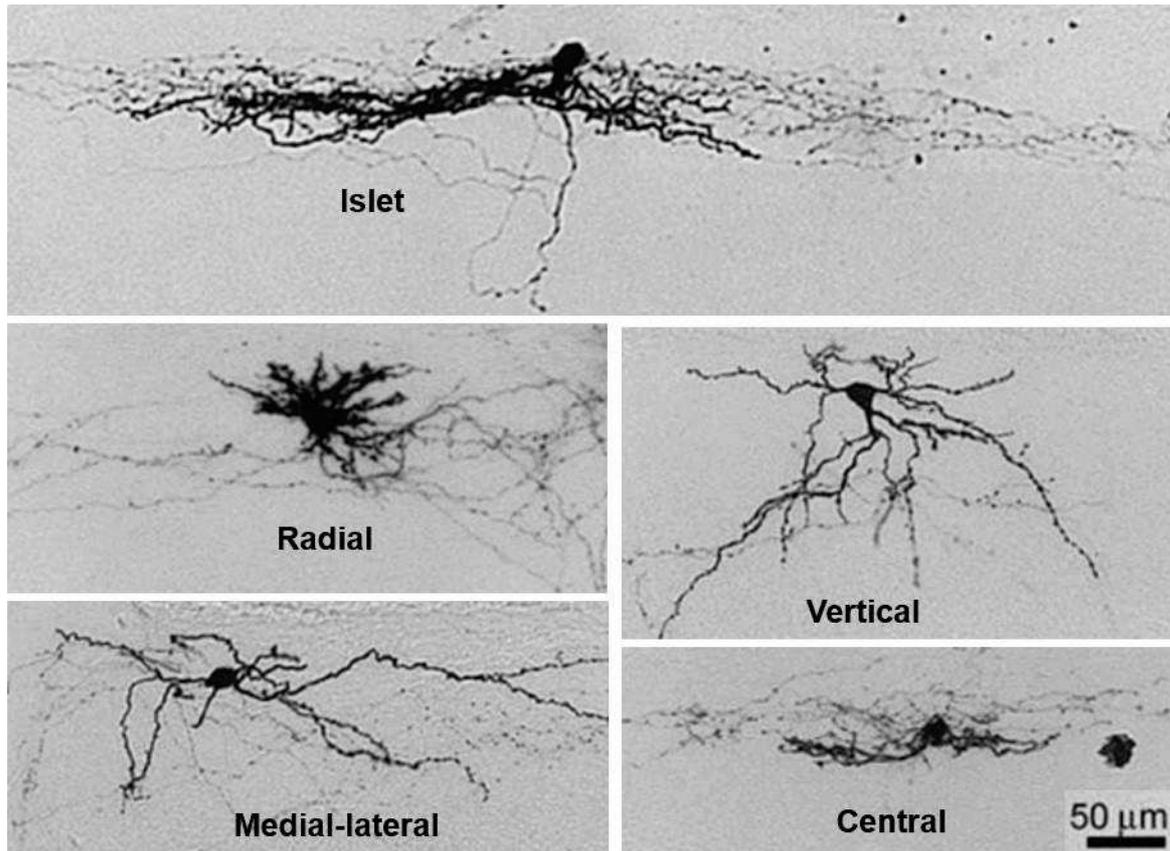


Figure 10. Morphologie des neurones de la lamina II. Images montrant les 5 principales morphologies des neurones de la lamina II après révélation de la neurobiotine suite aux enregistrements de patch clamp sur tranches parasagittales. D'après (Grudt and Perl 2002).

3.3.-Classification électrophysiologique

Le type de décharge des neurones est un des principaux moyens de communication entre eux. Brièvement, un potentiel d'action est une inversion brutale et transitoire du potentiel de membrane, qui obéit à la loi du tout ou rien et se propage sans atténuation. Il met un jeu l'activation des canaux sodiques qui dépolarisent très rapidement le neurone et des canaux potassiques pour la repolarisation. Il existe de nombreux types de canaux sodiques et potassiques, dont les différentes cinétiques d'activation-inactivation vont pouvoir moduler les paramètres de dépolarisation et repolarisation du potentiel d'action, et finalement le type de décharge. D'autres types de canaux sous-liminaires, principalement sodiques, potassiques et calciques vont aussi moduler le type de décharge. Ainsi, la combinaison de différents types de canaux sodiques et potassiques, ainsi que des canaux sous-liminaires détermineront le profil de décharge des neurones (Prescott, De Koninck et al. 2008).

Les neurones de la lamina II peuvent être divisés selon le type de profil de décharge obtenu par une injection de courant dépolarisant en 5 types : tonique, transitoire (*transient*), *gap*, retardé (*delayed*) et *reluctant* (Grudt and Perl 2002, Ruscheweyh and Sandkuhler 2002) (fig.11). Il faut noter que 10% des interneurons spinaux ne rentrent pas dans ces types, et présentent des caractéristiques intermédiaires (Ruscheweyh and Sandkuhler 2002).

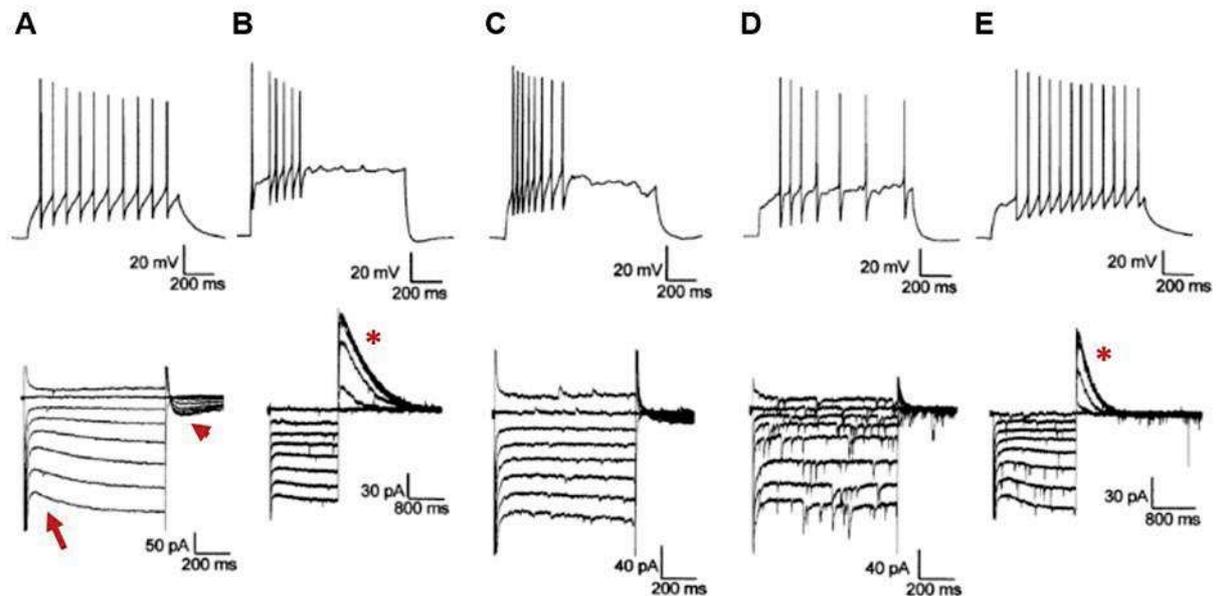


Figure 11. Propriétés électrophysiologiques des interneurons de la lamina II. (A). Exemple d'un neurone île avec décharge tonique exprimant un courant I_h (flèche) et un courant entrant rectifiant (tête de flèche). (B-C). Exemple de deux neurones centraux avec décharge transitoire et fort courant I_A sensible au 4-AP (*) ou sans courant I_A . (D). Exemple d'un neurone radial avec une décharge retardée (*delayed*). (E). Exemple d'un neurone médial-latéral avec décharge tonique avec courant I_A . Adapté de (Grudt and Perl 2002).

- **Profil de décharge tonique**

Ce profil est défini comme une décharge régulière de potentiels d'action tout le long du pulse de stimulation. En ce qui concerne les conductances impliquées, les canaux sodiques et potassiques *delayed-rectifier* (K_{DR}) sensibles aux TEA (1mM) semblent être suffisants pour générer ce profil (Melnick, Santos et al. 2004). La fréquence de décharge peut être modulée par des canaux potassiques activés par le calcium et sensibles à l'apamine (K_{Ca}) (Melnick, Santos et al. 2004, Yang 2016) (fig.12). Quand ces canaux s'activent, ils provoquent une sortie de potassium qui hyperpolarise le neurone, en augmentant l'intervalle entre deux potentiels d'action, et donc en diminuant la fréquence de décharge. Parmi les canaux K_{Ca} , ceux de la famille SK semblent être responsables du contrôle de la fréquence de décharge dans les neurones toniques dans la partie dorsale de la moelle épinière (Yang 2016).

- **Profil de décharge transitoire**

Ce profil se caractérise par une décharge seulement au début du pulse de stimulation. Cela veut dire que le neurone s'adapte et arrête de décharger. Une explication pour cette adaptation suggère que les conductances sodiques sont moins exprimées, car le blocage de ces canaux par la TTX convertit progressivement une décharge tonique en transitoire (Melnick, Santos et al. 2004). D'autres auteurs ont proposé que ce profil soit dû à un équilibre entre des conductances potassiques sortantes à bas seuil, K_{DR} , et des conductances entrantes à bas seuil (Prescott, De Koninck et al. 2008). Les conductances potassiques K_{DR} s'inactivent lentement, ce qui provoque une hyperpolarisation qui finit par empêcher le neurone de décharger (d'atteindre le seuil d'activation de canaux sodiques). Parmi les conductances entrantes à bas seuil, les courants calciques à bas seuil sont de bons candidats puisque leur inhibition convertit un profil tonique en profil transitoire. D'autres études montrent que les neurones avec ce type de profil n'exprimeraient pas de conductances activées par le calcium (K_{Ca}) (Melnick, Santos et al. 2004).

- **Profil de décharge retardé (*delayed*)**

Le profil de décharge retardé se définit par un délai important avant l'arrivée du premier potentiel d'action. Un courant sortant potassique d'activation et inactivation rapide (I_A) sensible à la 4-AP (5mM) est responsable de ce comportement (Ruscheweyh and Sandkuhler 2002). Les canaux $Kv4.2$ semblent être responsables de ce courant I_A dans la lamina II (Hu, Carrasquillo et al. 2006)(fig.12). D'autres études ont montré qu'un potentiel de membrane inférieur à -50mV est nécessaire pour la présence du délai (Ruscheweyh and Sandkuhler 2002). En fait un même neurone avec un potentiel de repos plus dépolarisé peut changer de profil de décharge, de retardé vers tonique. Cela s'explique car le courant I_A présent dans ces neurones a une inactivation partielle à des potentiels inférieurs à -50mV, mais totale à des potentiels plus dépolarisés. Cela suggère qu'un même type de neurone peut exprimer deux types de décharge selon le potentiel de membrane.

- **Profil de décharge *reluctant***

Les neurones *reluctant* ne déclenchent pas de potentiels d'action malgré une stimulation dépolarisante supérieure au seuil de potentiel d'action. Ce comportement a été une énigme et un paradoxe, induisant à penser que les neurones enregistrés n'étaient pas en bonne santé. Des études ont finalement montré que ces neurones expriment un courant potassique I_A sensible à la température et au 4-AP (Graham, Brichta et al. 2008). Ce courant sortant empêche le neurone

de décharger. Des études montrent qu'avec des potentiels de membrane plus dépolarisés ou un blocage du courant I_A (5mM 4-AP), ces neurones déchargent des potentiels d'action (Graham, Brichta et al. 2008). Les courants I_A dans la lamina II sont générés par les canaux $K_v4.2$, au moins en partie (Hu, Carrasquillo et al. 2006). Ces courants peuvent être inhibés par les kinases ERK (ERK : *extracellular signal-regulated kinases*) dans différentes conditions de douleur, et provoquer une augmentation de l'excitabilité des neurones spinaux (Hu, Glauner et al. 2003). Ainsi, on peut imaginer que ces neurones sont silencieux en conditions physiologiques et deviennent actifs en conditions de sensibilisation telle que la douleur.

- **Profil de décharge *single spiking***

Il a aussi été décrit des neurones *single spiking*, qui déchargent un maximum de deux potentiels d'action. Le courant sortant potassique d'activation et inactivation rapide I_A sensible au 4-AP (0.5mM) semble être impliqué (Ruscheweyh and Sandkuhler 2002). Une activation lente de ce canal permettrait seulement un ou deux potentiels d'action avant l'hyperpolarisation des neurones aux potentiels plus bas que le seuil du potentiel d'action. D'autres auteurs proposent que c'est l'absence des courants entrants à bas seuil, qui induisent un rôle plus important des courants potassiques sortants à bas seuil (Prescott, De Koninck et al. 2008). Des études montrent que le blocage (4-AP 0.5mM) de courants sortants à bas seuil convertit des neurones à décharge *single spiking* en neurones à profil tonique (Ruscheweyh and Sandkuhler 2002), ce qui confirme le rôle déterminant du courant potassique pour empêcher la décharge de plus de potentiels d'action.

- **Profil de décharge *gap***

Les neurones dits *gap* sont définis par des espaces sans décharge des potentiels d'action à l'intérieur du pulse de stimulation. La combinaison entre courants potassiques I_A d'inactivation rapide et courants potassiques à bas seuil qui ne s'inactivent pas seraient responsables de ce profil de décharge (Prescott, De Koninck et al. 2008).

La plupart de ces études ont été faites à température ambiante, alors qu'il a été montré que la température peut influencer l'excitabilité (Graham, Brichta et al. 2008)(fig.12). Notamment, les canaux potassiques qui jouent un rôle majeur pour déterminer le profil de décharge semblent être plus sensibles à la température (Lee, Callaway et al. 2005).

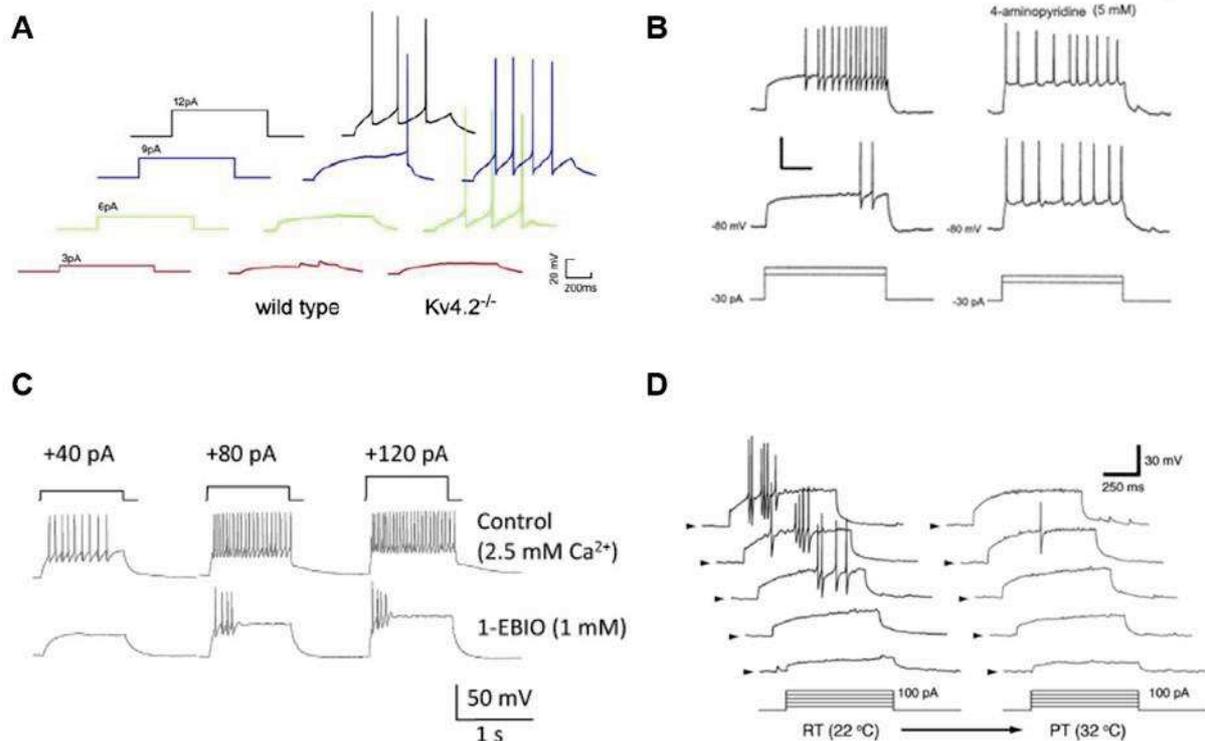


Figure 12. Mécanismes qui sous-tendent le profil de décharge. (A). Traces montrant les profils de décharges dans une souris WT ou KO pour le canal potassique Kv4.2. Notez que l'absence du canal Kv4.2 augmente l'excitabilité. D'après (Hu, Carrasquillo et al. 2006). (B). Trace du profil de décharge avant et après le blocage des canaux potassiques avec 4-AP (5mM). Notez que le délai du premier potentiel d'action diminue avec le blocage des canaux potassiques. D'après (Ruscheweyh and Sandkuhler 2002). (C). Profils de décharge en condition contrôle ou en présence de 1-EBIO, un activateur de canaux potassiques activés par le calcium SK. Notez que l'activation de ces canaux provoque une forte diminution de l'excitabilité. D'après (Yang 2016). (D). Traces de profil de décharge du même neurone à différentes températures. Notez que l'augmentation de la température diminue l'excitabilité. D'après (Graham, Brichta et al. 2008).

La proportion de chaque type de profil dans la lamina II varie selon les études. Elle peut aller de 0-25% pour le profil tonique, de 12-40% pour le profil retardé, de 12-30% pour le profil transitoire, de 12-22% pour le profil *reluctant*, 15-22% pour le profil *single spiking* et 7% pour le *gap* (Grudt and Perl 2002, Ruscheweyh and Sandkuhler 2002, Graham, Brichta et al. 2008, Tadros, Harris et al. 2012). Ces différences peuvent être dues aux différentes espèces étudiées, températures d'enregistrements et zones enregistrées de la moelle. Dans une étude chez la souris, il a aussi été décrit que ces proportions restent stables dans tous les niveaux de la moelle épinière (Tadros, Harris et al. 2012). Il a aussi été montré que les quatre principaux types de décharge (tonique, retardé, transitoire et *single spiking*) sont retrouvés aussi *in vivo* avec le même type de stimulation (Graham, Brichta et al. 2004, Graham, Brichta et al. 2007).

D'autres études ont enregistré les courants sous-liminaires présents dans les neurones de la lamina II (fig.13). Ces études montrent une proportion majoritaire des neurones avec courants

potassiques I_A (~60%), ce qui est en accord avec la proportion plus fréquente de profils de décharge retardé, *reluctant* et *single spiking*, qui dépendent de ce courant (Rivera-Arconada and Lopez-Garcia 2010, Tadros, Harris et al. 2012). Une proportion moins importante des neurones présente des courants calciques à bas seuil et des courants cationiques non sélectifs I_h . Ces courants peuvent aussi participer au type de décharge (Chemin, Monteil et al. 2002, Liao, Tsai et al. 2011).

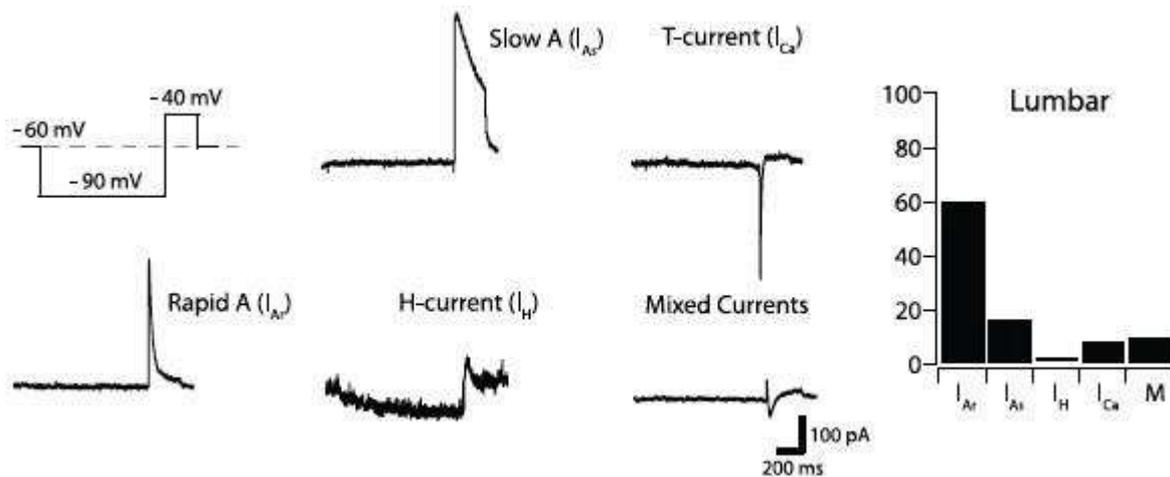


Figure 13. Courants sous-liminaires dans la lamina II. Traces d'enregistrements en *voltage clamp* évoqués par un pulse à -40mV depuis un potentiel bas (-90mV). Les courants I_{Ar} sont les plus fréquents au niveau lombaire, suivis par les courants I_{As} , mixtes, calciques (I_{Ca}) et I_h . D'après (Tadros, Harris et al. 2012).

Des études suggèrent que les profils résultants de courants I_A , retardé, *single spiking* et *gap*, sont plus fréquents dans les neurones excitateurs, et les toniques et transitoires dans les inhibiteurs (Todd 2017), mais il existe des exceptions. Des études sur la relation entre la morphologie des neurones et le profil de décharge montre une corrélation faible (Grudt and Perl 2002, Yasaka, Kato et al. 2007).

Il est important de noter, que malgré les différences entre ces profils de décharge, la distribution des paramètres dans une population de neurones suggère un continuum (Schneider 2003) (fig. 14). On peut ainsi imaginer qu'un même neurone puisse exprimer différents types de profil selon les conditions. L'observation que certains profils changent avec le potentiel de membrane (Schneider 2003, Melnick, Santos et al. 2004), et le fait que l'activité de canaux ioniques est fortement modulée par différentes voies cellulaires (Hu, Glauner et al. 2003), appuient cette théorie.

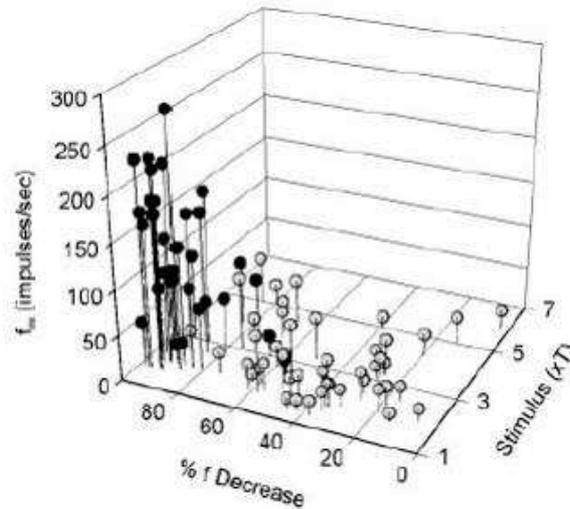


Figure 14. Graphique montrant la distribution de neurones toniques et transitoires. Ce graphe en trois dimensions montre la fréquence initiale (f_{ini}), le pourcentage de diminution de fréquence ($f_{ini} - f_{end}/f_{ini} * 100$) et l'intensité de la stimulation (xT) pour des neurones avec décharge tonique (cercle noir) et transitoire (cercle gris). Les neurones transitoires ont une fréquence d'adaptation plus importante que les neurones toniques pour les mêmes stimulations. Notez aussi que l'ensemble de réponses forme un continuum. D'après (Schneider 2003).

4.4.-Fonction du profil de décharge

Dans la partie précédente, on a vu que chaque type de fibre est capable de répondre préférentiellement à un type de stimuli, et de coder des aspects du stimulus, tel que l'intensité et la durée. Ainsi, les fibres sensorielles transforment différents types de stimuli en signaux électriques, qui vont circuler jusqu'à être interprétés et générer une perception (dans le cortex) ou générer des réflexes moteurs. Pour une bonne perception, l'information initiale (type de stimuli, intensité, durée) doit être gardée tout le long de la voie. Au début de cette partie on suggérait le rôle essentiel du profil de décharge pour la communication entre neurones. Dans la suite, on décrira ce qu'on sait de la relation entrée-sortie (*input-output*) des neurones de la corne dorsale et donc comment ces neurones répondent aux différents stimuli et transforment cette information en potentiels d'action.

Une étude selon la dynamique d'initiation du premier potentiel d'action différencie trois types de profils de décharge : tonique, transitoire et *single spiking* (Prescott, De Koninck et al. 2008). Dans ce modèle, les canaux sous-limaires joueraient un rôle essentiel dans la détermination du profil de décharge. Chaque profil est associé à un type de fonction. Ainsi, les neurones toniques fonctionneraient comme intégrateurs alors que les neurones transitoires et notamment les *single spiking* fonctionneraient comme détecteurs de coïncidence (Ratte, Hong et al. 2013).

D'autres études ont aussi montré que les neurones toniques agissent comme intégrateurs et peuvent coder l'intensité du stimulus (Prescott and De Koninck 2005). Ainsi, chaque type de profil serait spécialisé pour répondre à un type de stimuli et aurait une fonction différente (fig.15).

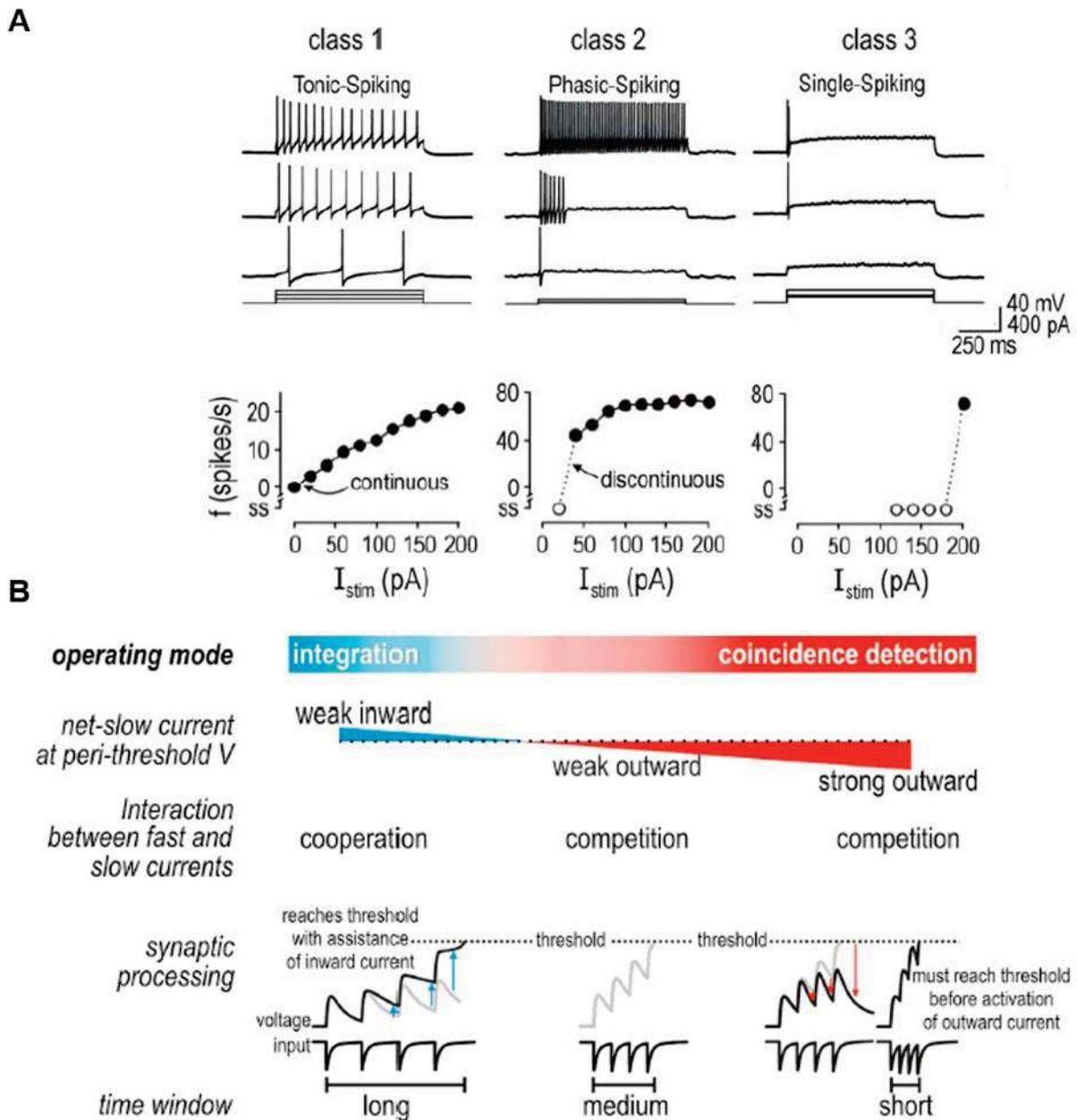


Figure 15. Relation entre la dynamique d'initiation du potentiel d'action et le mode fonctionnel de décharge. (A). Classes d'excitabilité neuronale selon Hodgkin. Exemples de profil de décharge de chaque classe déterminé par Hodgkin. Cette classification est basée sur la courbe fréquence de potentiels d'action par seconde et courant injecté ($f-I$), qui différencie les neurones avec des réponses continues (class 1), discontinues (class 2) et indéfinies (class 3), car les mesures ont besoin d'au moins 2 potentiels d'action. D'après (Prescott, De Koninck et al. 2008). **(B). Propriétés de chaque classe de neurones selon les dynamiques d'initiation du potentiel d'action.** Les neurones de classe 1 agissent comme intégrateurs et les neurones de classe 3 comme détecteurs de coïncidence. Les différences dans l'initiation du potentiel d'action peuvent être attribuées à la direction et à la magnitude des courants

lents nets activés aux potentiels proches du seuil du potentiel d'action. Les courants entrants aident à maintenir la dépolarisation provoquée par des courants synaptiques excitateurs, allongeant ainsi la fenêtre temporelle d'intégration. Les courants sortants tronquent la dépolarisation, raccourcissant ainsi la fenêtre du temps d'intégration. D'après (Ratte, Hong et al. 2013).

Différentes études ont essayé d'étudier les corrélations entre le type de stimuli et le type de décharge des neurones dans la corne dorsale. Les études sur la correspondance entre les réponses aux stimulations de la racine dorsale et les profils de décharge, *in vivo* ou *in vitro*, ne trouvent de bonnes corrélations ni dans les laminae I et II (Grudt and Perl 2002, Dougherty and Chen 2016), ni dans les laminae III-V (Schneider 2005). Ceci est probablement dû au fait que ce type de stimulation ne permet pas une activation précise de sous-types des fibres sensorielles et peut être loin des stimulations physiologiques.

Des études sur des stimulations plus physiologiques ont été faites *in vitro* en gardant une partie des nerfs et de peau, ou *in vivo*. Une étude a analysé les réponses aux différents stimuli mécaniques (brossage rapide ou lente, pression, etc.) des neurones dans les laminae III-V, dans une préparation *in vitro* de la moelle épinière avec une partie du nerf-peau associée (Schneider 2005). Ils observent que les neurones transitoires répondent préférentiellement aux stimuli dynamiques (rapides), alors que les neurones toniques répondent de la même façon aux stimuli dynamiques ou statiques. Ainsi, ils suggèrent que les neurones phasiques sont adaptés pour signaler les stimuli transitoires (ou le taux de changement dans l'amplitude ou la position d'un stimulus), alors que les neurones toniques sont mieux adaptés pour traiter l'information sur la vitesse et l'intensité. Ils proposent donc l'existence de réseaux spécifiques d'interneurones pour une modalité sensorielle, voire adaptés à certaines propriétés des fibres mécanosensorielles cutanées (RA ou SA). Cette étude supporte ainsi le fait que les propriétés intrinsèques des neurones spinaux sont importantes pour l'intégration de l'information sensorielle mécanique (fig.16).

Des études similaires dans les laminae superficielles n'ont pas reproduit des résultats aussi clairs (Lopez-Garcia and King 1994, Dougherty and Chen 2016). Des stimulations *in vivo* identifient quatre types de neurones selon le type de réponse aux stimuli tactiles (brossage) ou nociceptifs (pincement). Ils classifient les interneurones en nociceptifs quand la réponse est maximale pour les stimuli nociceptifs, en tactiles (*light touch*) quand la réponse est maximale pour les stimuli tactiles, en sous-liminaire (*subthreshold*) quand les neurones répondent aux deux types de stimuli avec des dépolarisations, et en hyperpolarisés (*hyperpolarizing*) quand

les neurones répondent aux deux types de stimuli avec une hyperpolarisation. Ces travaux montrent qu'il n'y pas de relation entre le type de profil de décharge (évoqué par une injection de courant) et les réponses aux stimuli mécaniques sur la patte (Graham, Brichta et al. 2004, Graham, Brichta et al. 2007) (fig.17). Ces résultats suggèrent que les *laminae* I et II sont plus hétérogènes. Ceci peut être expliqué car les laminae superficielles traitent des stimuli nociceptifs ainsi que non-nociceptifs thermiques et mécaniques, alors que les laminae plus profondes reçoivent presque exclusivement des stimuli mécaniques (Abraira and Ginty 2013).

Le raffinement de l'approche « skin-nerve-spinal cord » développé récemment par le groupe de S Ross permet d'envisager un contrôle précis des afférences (brush, chaud, froid...) tout en enregistrant les interneurones ou les neurones spinaux de projection (Hachisuka, Baumbauer et al. 2016). De ce point de vu l'exploration de l'excitabilité du réseau spinal s'en trouvera probablement amélioré.

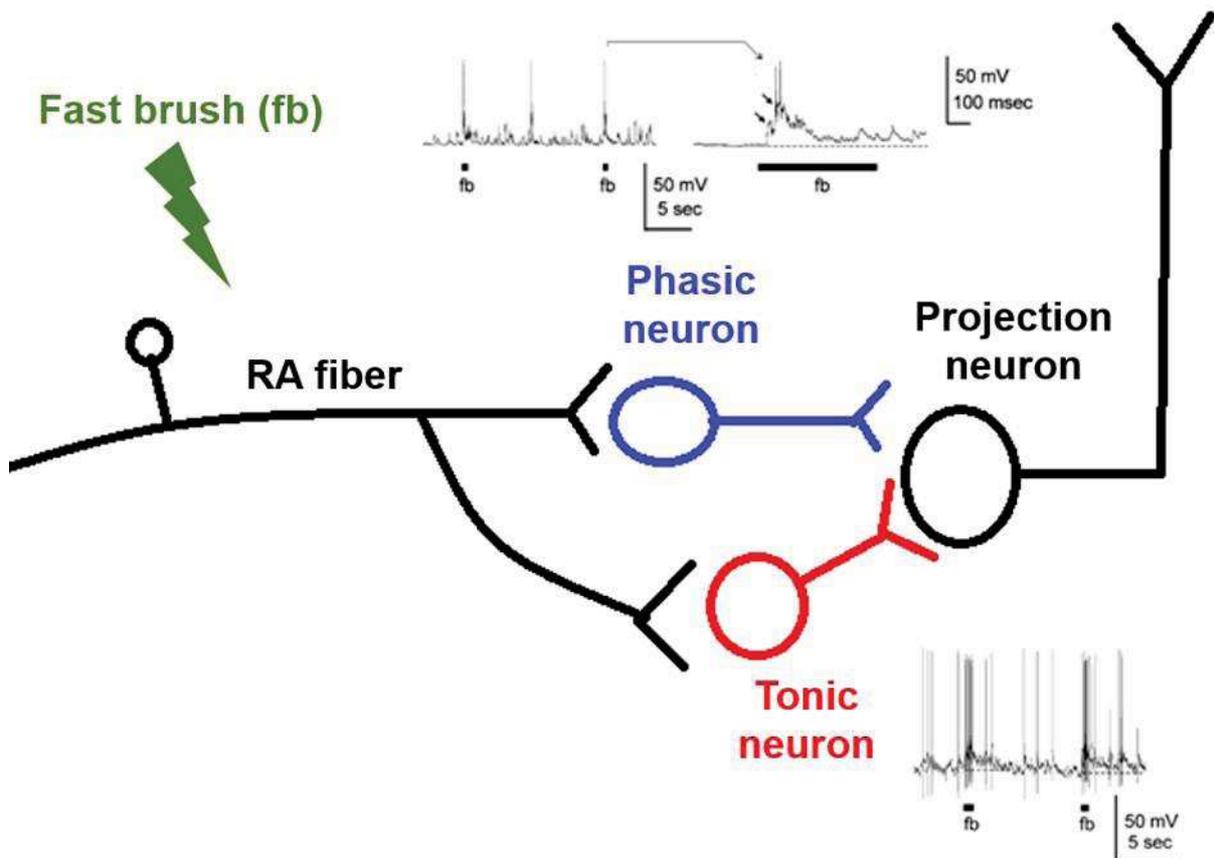


Figure 16. Théorie sur les réseaux dans la moelle épinière. D'après les résultats expérimentaux qui montrent que des neurones avec différents profils de décharge (transitoire et tonique) répondent aux mêmes stimuli (fb : *fast brush* (brossage rapide)) mais différemment, et du fait qu'un seul type de profil ne peut coder tous les types d'information d'un stimulus, il est probable que ces neurones convergent dans un neurone de projection. Ainsi, chaque neurone codera l'information pour laquelle son profil de décharge est le plus adéquat (tonique pour la durée, etc.), et le neurone de projection intégrera

l'information provenant de chaque neurone. Il faut noter que c'est une simplification, il est probable que plus de neurones participent à l'intégration (théorie du profil). Adapté d'après (Schneider 2005).

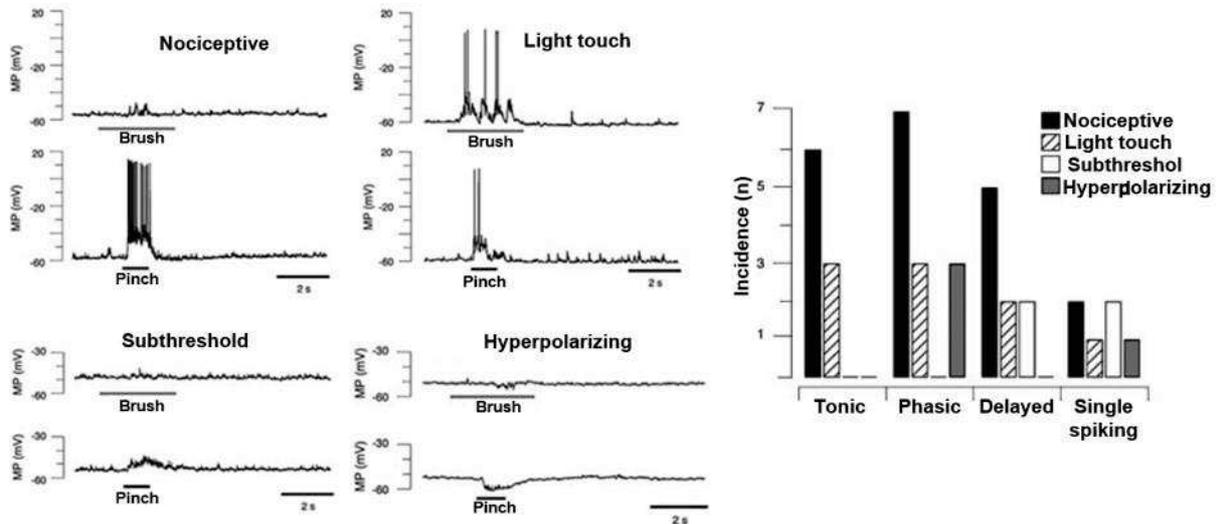


Figure 17. Corrélation entre le type de profil de décharge et les réponses aux différents stimuli. Notez que tous les types de neurones selon leurs réponses aux stimuli peuvent avoir tous les types de profil de décharge. D'après (Graham, Brichta et al. 2004).

4.5.-Connexions entre neurones de la lamina II

Les études électrophysiologiques en double patch sur les connexions dans la corne dorsale se basent sur la relation temporelle entre une décharge de potentiels d'action générée dans le neurone « présynaptique » et les courants synaptiques évoqués dans le neurone « post-synaptique ». Tout d'abord, le faible pourcentage de neurones connectés à une distance inférieure à 250µm (~11%) (Lu and Perl 2003) suggère que les connexions dans la corne dorsale sont spécifiques et sélectives (Lu and Perl 2005). Alternativement, le contexte de la tranche, où une partie des connexions synaptiques est détruite par la coupe pourrait être responsable d'un biais.

Une étude sur les neurones dans la lamina II a trouvé une connexion unidirectionnelle entre neurones inhibiteurs île et neurones centraux avec décharges transitoires (Lu and Perl 2003) (fig.18). Des stimulations des racines pendant l'enregistrement de deux interneurones montrent aussi qu'ils reçoivent des afférences différentes. Les neurones île inhibiteurs recevraient des entrées de fibres plus rapides que les neurones centraux. D'autres travaux ont montré des connexions unidirectionnelles excitatrices entre les neurones centraux et les neurones verticaux, ainsi qu'entre les neurones verticaux et les neurones de projection de la lamina I (Lu and Perl

2005). Une autre étude a montré une connexion parfois bidirectionnelle entre deux types d'interneurones inhibiteurs (Zheng, Lu et al. 2010). Ces auteurs confirment des connexions entre les neurones île et centraux transitoires. Pour sélectionner le type d'afférences au contact de ces interneurones, ils enregistrent les courants mEPSC en absence/présence d'agonistes de TRPV1 (capsaïcine) ou de TRPM8 (iciline), qui sont présents dans des types de fibres différents. Ils observent une augmentation de la fréquence de mEPSC avec la capsaïcine dans les neurones île et transitoires centraux, mais pas avec l'iciline.

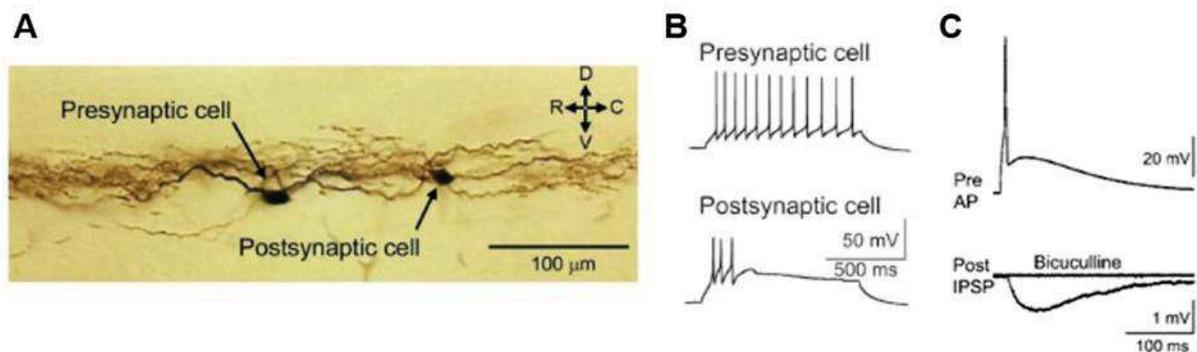


Figure 18. Connexion inhibitrice dans la lamina II. (A). Image révélant la morphologie des deux neurones enregistrés marqués à la biocytine. (B). Le neurone présynaptique décharge de façon tonique et le neurone postsynaptique de façon transitoire. (C). Trace d'un enregistrement en double patch. L'injection de courant dans le neurone présynaptique déclenche un potentiel d'action qui provoque un potentiel postsynaptique inhibiteur (IPSP) bloqués par le bloqueur GABAergique bicuculline. D'après (Lu and Perl 2003).

La plupart de ces études montrent des connexions centrifuges, depuis les régions les plus ventrales vers les régions les plus dorsales (Kato, Kawasaki et al. 2009). Ceci est confirmé par la morphologie des interneurones. Les interneurones verticaux de la lamina IIo contactent des neurones de la lamina I, envoient des dendrites ventralement jusqu'à la lamina III (Yasaka, Kato et al. 2007). Ceci a été confirmé avec une population isolée phénotypiquement, les neurones cholinergiques des laminae profondes (III-IV) qui projettent dorsalement jusqu'à la lamina II (Mesnage, Gaillard et al. 2011). D'autres auteurs ont obtenu des résultats complémentaires, avec des communications fonctionnelles entre les laminae superficielles et profondes, suggérant entre autre que l'information nociceptive peut être transmise aux couches profondes via des interneurones excitateurs (Biella, Riva et al. 1997, Petitjean, Hugel et al. 2014).

D'autres études se sont portées sur les types d'afférences reçues par les différents types d'interneurones. Une étude utilisant des stimulations de racine dorsale couplées aux

enregistrements en patch clamp révèle que les interneurons île et les interneurons centraux reçoivent des contacts monosynaptiques de fibres C, uniquement (Yasaka, Kato et al. 2007). Les neurones radiaux et les neurones verticaux reçoivent des contacts monosynaptiques de fibres C et A δ . Ils montrent aussi, et ce n'est pas inattendu, que tous les types de neurones reçoivent aussi des inhibitions GABAergiques. Une étude utilisant une stimulation optogénétique des fibres afférentes Mrgprd⁺ montre que ces afférences se connectent monosynaptiquement à chaque type d'interneurone, sauf au type île (Wang and Zylka 2009).

Ces travaux montrent qu'il existe un certain niveau de sélectivité dans les connexions entre interneurons de la lamina II, ainsi que dans les types de fibres qu'ils reçoivent. Par contre, la classification morphologique des interneurons, ou leur classification par leur profil électrophysiologique, ainsi que la classification des fibres afférentes par leur seule vitesse de conduction, sont des index insuffisants pour décrire ces réseaux. Ainsi, il est nécessaire de trouver des marqueurs plus spécifiques pour classifier / phénotyper des interneurons et analyser leurs profils de connexion.

4.6.-Classification neurochimique

4.6.1.-Marqueurs neurochimiques et limites

L'analyse neurochimique a tout d'abord permis de connaître les proportions des neurones inhibiteurs et excitateurs dans la lamina II. Des anticorps dirigés contre le GABA montrent que 30% des interneurons de la lamina II sont inhibiteurs (Polgar, Durrieux et al. 2013). La détection des corps cellulaires excitateurs fut plus compliquée, car les antigènes utilisés, comme les transporteurs VGLUT, sont transportés rapidement vers les terminaisons. Ils se trouvent donc à basse concentration dans le soma. Ainsi, la proportion d'interneurones excitateurs fut longtemps considérée comme complémentaire de celle des neurones GABAergiques (i.e., 100-30=70%). Plus récemment, cette proportion a été confirmée par des immunomarquages et des hybridations *in situ* pour les facteurs de transcription Pax2 et Tlx3, qui définissent respectivement des interneurons inhibiteurs et excitateurs (Cheng, Arata et al. 2004, Del Barrio, Bourane et al. 2013). Des interneurons glycinergiques sont aussi présents dans la corne dorsale, peu fréquents dans les laminae I et II, et plus fréquents dans la lamina III (Todd and Sullivan 1990). La plupart, sinon la totalité, des neurones glycinergiques sont aussi GABAergiques (Polgar, Durrieux et al. 2013).

Le nombre de marqueurs utilisés pour identifier des neurones dans la lamina II est extensif, comprenant de nombreux peptides (substance P, neurokinine A et B (NKA/B), enképhaline, GRP (GRP : *gastric releasing peptide*), somatostatine, dynorphines et endomorphines, neurotensine, neuropeptide Y (NPY)); des protéines qui lient le calcium (calbindine (CB), parvalbumine (PV), calretinine (CR)); des enzymes (nNOS, PKCg) ou des récepteurs (à la somatostatine SST2a, aux endorphines DOR, KOR et MOR) (Todd 2017). Un marqueur suffisant rarement à définir une population homogène, des études de colocalisations entre ces marquages ont abouti à classer des sous-populations de neurones, inhibiteurs et excitateurs (fig.19). Ainsi, parmi les neurones inhibiteurs, cinq marqueurs ne se superposent pas: nNOS, NPY, PV, galanin/dynorphine et calretinin (CR) (Polgar, Sardella et al. 2013, Smith, Boyle et al. 2015). Deux limites à cette classification sont apparues : 1) quelques colocalisations entre NPY et galanine ont été décrites chez la souris ; et 2) les marqueurs dynorphine (galanine négatifs; Sardella, Polgar et al. 2011), nNOS et PV, sont non seulement exprimés dans des interneurons inhibiteurs, mais aussi exprimés par des neurones excitateurs. De même pour la CR qui est exprimée majoritairement par des neurones excitateurs dans la corne dorsale de la moelle (Smith, Boyle et al. 2015) (Smith, Boyle et al. 2015, Abraira, Kuehn et al. 2017) (Sardella, Polgar et al. 2011, Hughes, Sikander et al. 2012). Le même type d'études propose quatre marquages qui ne se superposent pas dans la vaste population d'interneurones excitateurs : NKB, SP, NT et GRP (Gutierrez-Mecinas, Furuta et al. 2016).

Une autre étude récente a utilisé une stratégie génétique pour identifier des populations indépendantes codant pour les stimuli mécaniques (Abraira, Kuehn et al. 2017). Ils analysent les régions de projection des fibres afférentes LTMRs dans la corne dorsale de la moelle (laminae IIiv-III). D'après cette étude, la protéine 2 d'interaction avec le canal Kv (Kcnp2 : *Kv channel interacting protein-2*) est un marqueur des neurones inhibiteurs. La Cerebelin-3 (Cbln2) et le facteur de croissance Igfbp5 (Igfbp5 : *insulin-like growth factor binding proteine 5*) seraient des marqueurs spécifiques de sous-populations de neurones excitateurs. Ils différencient aussi les neurones PV excitateurs et inhibiteurs. En se basant sur une analyse se composant de multiples paramètres morphologiques et électrophysiologiques, ils affirment que ces populations forment des catégories différentes. Par contre, les études fonctionnelles sur ces populations qui confirmeraient ces conclusions n'ont pas encore été faites.

La plupart de ces marqueurs sont présents dans des interneurons offrant différentes morphologies (arborisation dendritique). Ceci est vrai pour les neurones CR (Smith, Boyle et

al. 2015), les neurones PKC γ (Alba-Delgado, El Khoueiry et al. 2015), les neurones NPY (Polgar, Sardella et al. 2011, Iwagaki, Ganley et al. 2016), les neurones nNOS (Sardella, Polgar et al. 2011), les neurones GRP (Gutierrez-Mecinas, Watanabe et al. 2014), les neurones somatostatinerigiques (Duan, Cheng et al. 2014). De plus, certains marquages ne sont pas spécifiques d'une lamina : nNOS, NPY, SOM sont exprimés tout le long des laminae I, II et III (fig. 20). Ceci suggère qu'ils ne forment pas de populations homogènes.

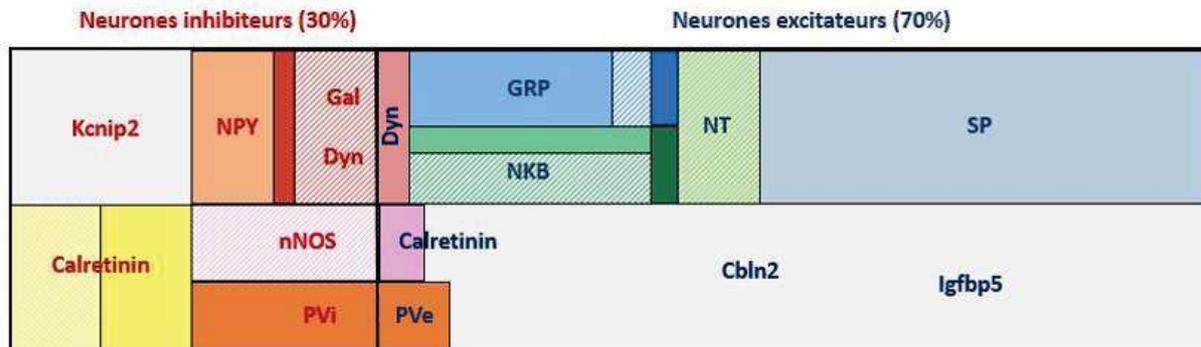


Figure 19. Résumé des principaux marqueurs neurochimiques dans la lamina II. La taille de chaque carré représente la proportion relative de chaque marqueur. Dans les neurones inhibiteurs (rouge), les parties rayées plus claires représentent la colocalisation avec le récepteur à la somatostatine SSTA2. Dans les neurones excitateurs (bleu), les parties rayées plus claires représentent la colocalisation avec la PKC γ . Notez que certains marqueurs marquent à la fois des neurones inhibiteurs et excitateurs. Les parties plus foncées montrent la colocalisation entre deux marqueurs (GRP et NKB avec NT, ou NPY avec Gal/Dyn). PV (parvalvumine), nNOS (*neuronal Nitric Oxide Synthase*), NPY (neuropeptide Y), Gal (galanine), Dyn (dynorphine), GRP (*Gastric Releasing Peptid*), NKB (neurokinine B), NT (neurotensine), SP (substance P), Kcnp2 (*Kv channel interacting protein-2*), Cbln2 (*Cerebelin-3*) et Igfbp5 (*insulin-like growth factor binding proteine*). Adapté d'après (Abraira, Kuehn et al. 2017, Todd 2017).

Parmi ces marqueurs, les neuropeptides sont potentiellement les plus intéressants. D'une part, certains d'entre eux caractérisent une population issue d'une voie de différenciation développementale particulière (Lai, Seal et al. 2016). D'autre part, les récepteurs pour ces neuropeptides sont présents dans des cellules de la moelle épinière et/ou dans les afférences primaires, ce qui suggère qu'ils participent activement à la transmission somatosensorielle, et donc potentiellement au transfert d'une information spécifique du neurone hôte. La distribution différentielle des neuropeptides suggérerait donc des rôles différentiels pour les neurones qui les portent. De façon intéressante, seuls les interneurons excitateurs (60%) expriment la somatostatine (Gutierrez-Mecinas, Furuta et al. 2016), qui provoque des hyperpolarisations (inhibition) dans les neurones cibles. De plus, seuls les interneurons inhibiteurs expriment le récepteur à la somatostatine SST $_{2a}$ (Polgar, Durrieux et al. 2013). Ceci suggère qu'une action de la somatostatine aboutirait à une désinhibition des réseaux de la corne dorsale. A l'échelle

comportementale, l'injection intrathécale de somatostatine provoque des démangeaisons (Seybold, Hylden et al. 1982, Kardon, Polgar et al. 2014). Le même traitement réalisé chez une souris sans interneurons inhibiteurs nNOS et Dyn/gal, provoque très peu de démangeaisons, ce qui suggère une action tonique inhibitrice de la somatostatine sur un réseau transmettant la sensation de démangeaison. Ce type de conclusion est à confirmer par d'autres méthodes, puisque la somatostatine, comme d'autres (galanine, substance P), est exprimée par certains neurones afférents primaires (Goswami, Mishra et al. 2014).

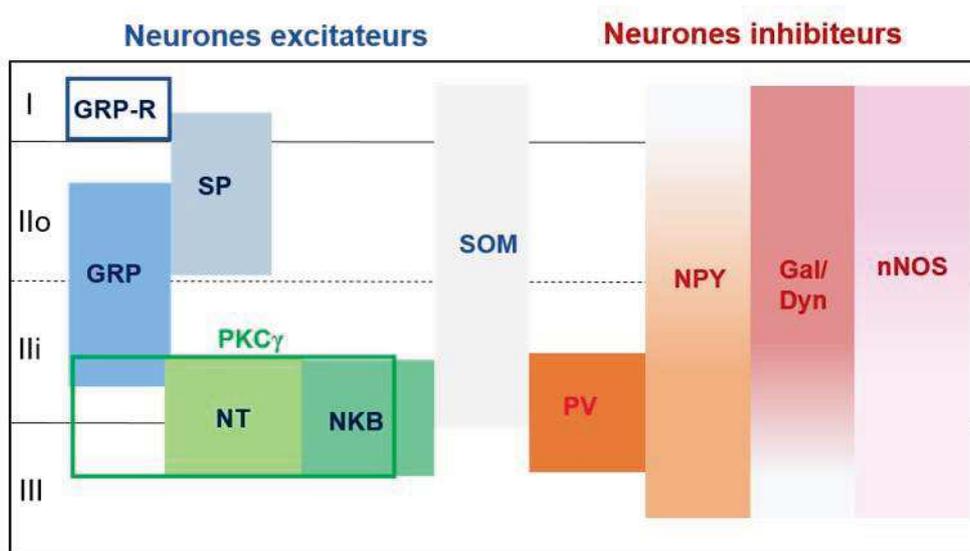


Figure 20. Localisation des principaux marqueurs dans la corne dorsale. Ce schéma montre la localisation selon les laminae de Rexed des principaux marqueurs. Notez que certains marqueurs ont une expression plus restreinte (SP, NT, GRP, PV) que d'autres (SOM, NPY, Gal/Dyn, nNOS). Pour ceux qui sont exprimés dans plusieurs laminae, il y a un gradient d'expression. D'après (Todd 2017).

4.6.2.-Etudes fonctionnelles

- **Toucher**

Les interneurons excitateurs $ROR\alpha$ (*nuclear orphan receptor*) des laminae Iii et III participent au toucher (Bourane, Grossmann et al. 2015). L'élimination des neurones $ROR\alpha$ réduit les réponses aux stimuli tactiles (mécanique légers), mais n'affecte pas les réponses aux stimuli nociceptifs ou de démangeaison. Ces résultats sont en accord avec les projections qu'ils reçoivent, majoritairement des fibres LTMR, et pas/peu de fibres nociceptives (peptidergiques CGRP+, non-myélinisées NF-) ou des fibres proprioceptives (TrkC+, PV+). De plus, l'activité de c-fos est sélectivement stimulée dans les neurones $ROR\alpha$ suite aux stimulations tactiles (Bourane, Grossmann et al. 2015).

Les neurones qui expriment la calbindine (CB) sont principalement excitateurs (Antal, Polgar et al. 1991) et n'expriment pas la somatostatine (Duan, Cheng et al. 2014). L'ablation de ces neurones ne provoque pas de modifications aux stimuli nociceptifs mécaniques, ni de changements dans des modèles de neuropathie (Duan, Cheng et al. 2014). La seule modification observée est une perte de détection de stimuli mécaniques à bas seuil, suggérant leur participation au toucher léger.

- **Douleur**

L'allodynie mécanique est un des signes caractéristiques des douleurs chroniques, et est définie comme une sensation douloureuse évoquée par des stimuli non douloureux. Selon la théorie du portillon (voir dans le prochain chapitre), suite à des lésions nerveuses, la perte d'inhibition provoque l'ouverture de la 'porte', et les fibres non nociceptives peuvent ainsi activer des voies nociceptives. De ce fait, un circuit polysynaptique contrôlé par l'inhibition des interneurons connecterait des afférences mécaniques non nociceptives aux neurones de projection nociceptifs. Différentes études mimant la désinhibition montrent l'apparition des symptômes allodymiques (Baba, Ji et al. 2003, Torsney and MacDermott 2006). L'ablation de neurones glycinergiques dans la moelle épinière provoque une hyperalgésie mécanique et thermique ainsi que des comportements de douleur spontanée (Foster, Wildner et al. 2015). Au contraire, l'activation de ces neurones glycinergiques diminue les réponses douloureuses et de démangeaison (Foster, Wildner et al. 2015). Ces résultats confirment l'importance de l'inhibition pour contrôler les circuits de douleur et démangeaison. Lors des dernières années différentes études ont identifié des neurones participant à ces circuits.

Les neurones PKC γ se localisent entre les laminae II et III et constituent ~30% des neurones dans ces régions (Peirs, Patil et al. 2014). C'est une population très hétérogène, englobant les neurones NT+, 60% des neurones NKB+ et des contingents de neurones CB et de neurones nNOS (Hughes, Averill et al. 2008, Gutierrez-Mecinas, Furuta et al. 2016). D'autres auteurs ont divisé cette population selon la morphologie et le comportement électrophysiologique en PKC γ radiaux et centraux (Alba-Delgado, El Khoueiry et al. 2015). L'inhibition ou la délétion de cette kinase chez des souris empêche l'établissement de l'allodynie mécanique (Malmberg, Chen et al. 1997, Miraucourt, Dallel et al. 2007), suggérant la participation de ces neurones à la transmission de l'information entre des fibres primaires non-nociceptives et des neurones de projection de la lamina I. Une étude récente a identifié que les fibres mécanoréceptrices A β faisaient synapse simultanément sur des interneurons inhibiteurs

GABAergiques/glycinergiques et sur des neurones $PKC\gamma^+$, formant un circuit *feed-forward* dans lequel l'activité des interneurons inhibiteurs empêcherait les excitations d'origine $A\beta$ d'activer une voie nociceptive (Lu, Dong et al. 2013) (fig.21). Parmi les cibles des neurones $PKC\gamma$ se trouvent des neurones transitoires centraux qui, eux, reçoivent des afférences C (Lu, Dong et al. 2013). Les neurones transitoires centraux sont connectés aux neurones verticaux qui, ultimement, connectent des neurones de projection de la lamina I (Lu and Perl 2005).

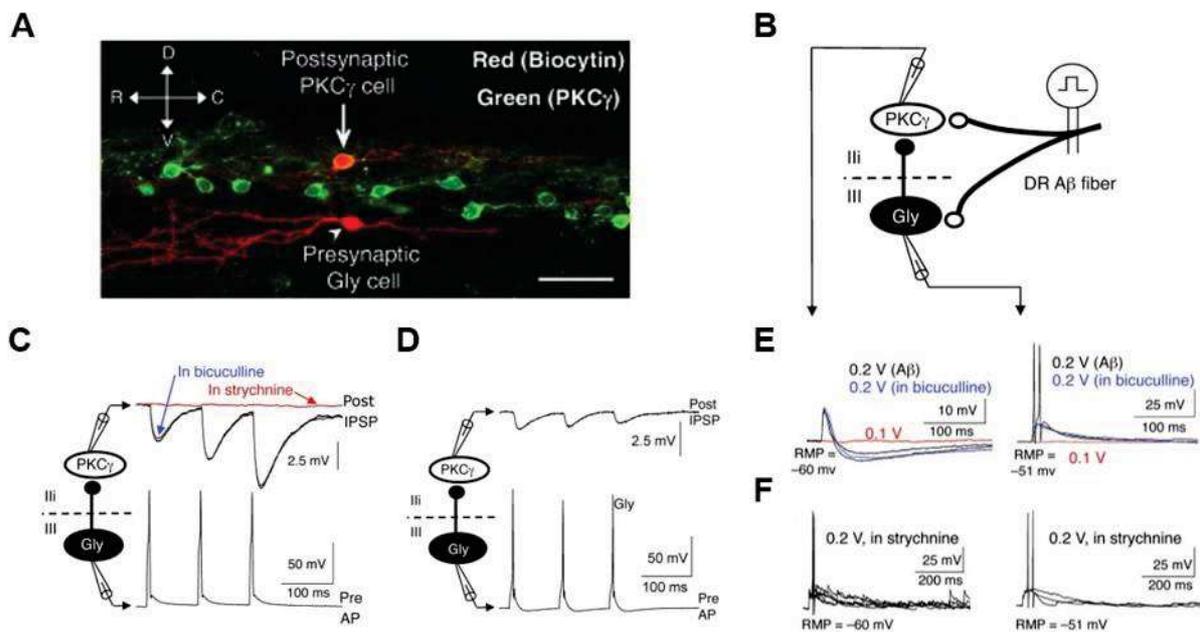


Figure 21. Circuit feed-forward inhibiteur entre neurones $PKC\gamma^+$ et interneurons glycinergiques. (A). Image montrant une coupe parasagittale de moelle épinière avec une paire de neurones enregistrés révélés après dialyse et révélation de biocytine (rouge) et marquage par immunofluorescence de la $PKC\gamma^+$ (vert). Bar d'échelle $100\mu m$. (B) Schéma du protocole d'enregistrement. Les racines dorsales sont stimulées électriquement dans les gammes de recrutement des fibres $A\beta$, et simultanément, les activités de neurones glycinergique (Gly) et $PKC\gamma^+$ sont enregistrés avec les techniques de patch clamp. (C). La stimulation des neurones Gly évoque des événements inhibiteurs (IPSP) dans les neurones $PKC\gamma^+$ qui sont bloqués par un antagoniste glycinergique (Strychnine), et pas par un antagoniste $GABA_A$ ergique (Bicuculline). (D). Après lésion nerveuse (SNL : *Spinal Nerve Ligation*), l'inhibition évoquée par les neurones glycinergiques sur les neurones dans les neurones $PKC\gamma^+$ est très fortement déprimée. (E). La stimulation des racines dorsales aux intensités recrutant les fibres $A\beta$ (0.2V) provoque des réponses biphasiques dans les neurones $PKC\gamma^+$: excitateurs monosynaptiques (EPSP) et inhibiteurs poly-synaptiques (IPSP) et dans les neurones glycinergiques des réponses excitatrices (EPSP) avec potentiels d'action. (F). Suite à la stimulation des racines dorsales la strychnine bloque l'évènement inhibiteur polysynaptique (IPSP) et permet le déclenchement de potentiels d'action dans les neurones $PKC\gamma^+$.

Les neurones qui expriment la parvalbumine (PV) forment une population très hétérogène de neurones inhibiteurs (60%) et minoritairement excitateurs (40% ; Antal, Polgar et al. 1991, Abraira, Kuehn et al. 2017) distribués entre les laminae Iii et III (Abraira, Kuehn et al. 2017).

Ces neurones présentent des profils de décharge soit toniques soit transitoires, et des morphologies type île et centrale (Hughes, Sikander et al. 2012). Ces neurones reçoivent des afférences myélinisées (Hughes, Sikander et al. 2012) et il a été suggéré qu'ils participent à l'inhibition présynaptique de fibres myélinisées LTM, importante pour coder l'information mécanique (Ribeiro-da-Silva and Coimbra 1982, Hughes, Sikander et al. 2012). De plus, des études d'induction de c-fos ont montré que ces fibres ne sont pas activées par des stimulations nociceptives, ce qui suggère qu'elles ne participent pas à une transmission nociceptive aiguë (Polgar, Sardella et al. 2013). Par contre, l'activation pharmacologique (CNO) d'un DREADD spécifiquement exprimé dans une population de neurones inhibiteurs PV provoque une augmentation de seuils nociceptifs mécaniques (Petitjean, Pawlowski et al. 2015). Cette procédure entraîne aussi une résistance à l'allodynie mécanique, sans changement de l'hyperalgésie thermique, dans un modèle murin de douleur chronique. Ces interneurons PV font synapse avec des neurones excitateurs PKC γ , impliqués dans l'allodynie mécanique (voir ci-dessus). Plus important, la densité de ces synapses diminue dans le modèle de douleur chronique, provoquant une réduction de l'inhibition des neurones excitateurs PKC γ , suite aux lésions des nerfs, ce qui permettrait à des stimuli tactiles d'évoquer des comportements douloureux (Petitjean, Pawlowski et al. 2015)(fig.22). D'ailleurs, l'ablation de ces neurones PV, basée sur l'utilisation de saporine, provoque une diminution des seuils mécano-nociceptifs, mais pas thermo-nociceptifs, ainsi qu'une forte augmentation de l'induction de c-fos dans les laminae I-III suite à une stimulation mécanique légère. Ces résultats suggèrent que les neurones PV inhibiteurs sont importants dans le contrôle de l'interaction entre l'information mécanique et nociceptive. Ils sont peut-être les neurones glycinergiques dont le rôle a été mis en évidence au cours de l'allodynie mécanique (voir ci-dessus), puisqu'ils expriment GlyT2, le transporteur de la glycine (Petitjean, Pawlowski et al. 2015). Alternativement, ils pourraient agir de concert avec d'autres interneurons glycinergiques pour le contrôle des neurones excitateurs PKC γ .

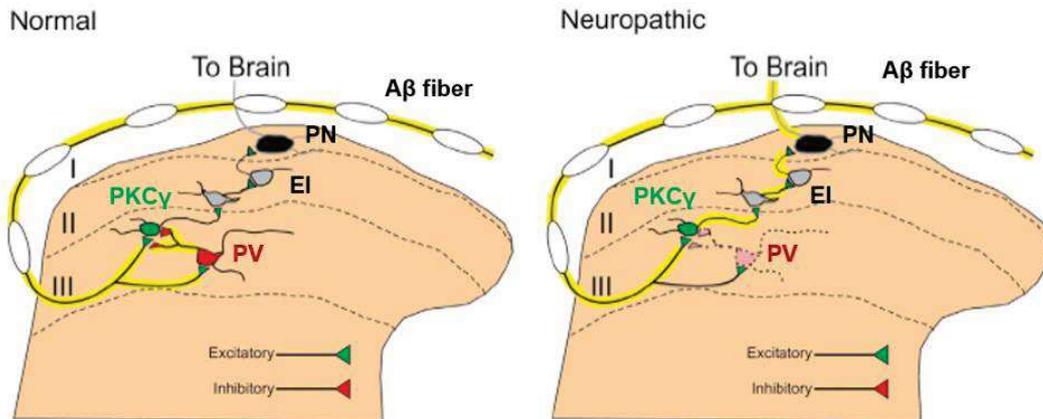


Figure 22. Circuit entre les neurones PV et PKC γ . Les neurones de projection nociceptifs de la lamina I ne sont pas connectés par les fibres A β en condition normale, grâce à l'inhibition exercée par les interneurons PV. Dans une condition neuropathique, il y a une perte d'inhibition au niveau des interneurons PV, qui permet le passage d'informations tactiles jusqu'aux neurones de projection de la lamina I. PN : *projection neuron*, EI : *excitatory neuron*, PV : *Parvalbumin*. D'après (Petitjean, Pawlowski et al. 2015).

Les neurones excitateurs qui expriment de façon transitoire VGLUT3 colocalisent en partie avec PKC γ et se localisent dans la lamina IIi/III (Peirs, Williams et al. 2015). Ces neurones reçoivent des afférences A β et contrôlent le passage de l'information tactile aux neurones de projection de la lamina I. De plus, l'activation de ces neurones provoque une hyperalgésie mécanique, alors que la suppression de VGLUT3 diminue l'hyperalgésie mécanique dans un modèle de neuropathie (SNI) et dans un modèle d'hyperactivation inflammatoire (carrageenan) (Peirs, Williams et al. 2015). Une étude récente montre que l'ablation de ces neurones diminue l'allodynie mécanique (Cheng, Duan et al. 2017). Des études de traçage montrent que ces neurones connectent des neurones PKC γ et CR dans les laminae plus superficielles (IIo) (Peirs, Williams et al. 2015). L'activation de neurones CR provoque une allodynie mécanique (Peirs, Williams et al. 2015). De plus, ces neurones sont activés par des stimuli nociceptifs mécaniques (pincement) et la capsaïcine (Smith, Boyle et al. 2015). Ces résultats suggèrent que ces neurones font partie de circuits essentiels dans l'allodynie mécanique.

Comme évoqué ci-dessus, la somatostatine (SOM) est un neuropeptide présent dans un grand nombre de neurones excitateurs (Gutierrez-Mecinas, Furuta et al. 2016), dont l'injection intrathécale provoque une sensation de démangeaison (Seybold, Hylden et al. 1982, Kardon, Polgar et al. 2014; voir ci-dessus). Dans une autre étude, l'ablation à 82% des neurones SOM ne change pas le toucher, les perceptions au froid et au chaud, mais entraîne une perte de la mécano-nociception aiguë (Duan, Cheng et al. 2014). De plus, l'allodynie mécanique (provoquée dans des modèles de neuropathie ou de douleur inflammatoire) est absente ou

réduite chez ces animaux, sans changement de l'hyperalgésie au chaud. Par comparaison, l'ablation des neurones NKB ne provoque pas de changements pour ces mêmes modalités sensorielles (Duan, Cheng et al. 2014). Or, les neurones NKB sont majoritairement SOM et comptent pour 20% de la population des neurones SOM (Gutierrez-Mecinas, Furuta et al. 2016). Il faudrait des études complémentaires pour identifier la sous-population de neurones SOM qui provoque cet effet, et à quel point elle est différente de la population impliquée dans le réseau de la démangeaison.

Pour conclure, certains interneurons de la corne dorsale peuvent être représentés dans un réseau du toucher léger, éventuellement dérégulé au cours de l'allodynie tactile. Ils peuvent être définis par leur profil d'expression d'un ou plusieurs marqueurs, en association avec une description histologique. Néanmoins, ces descriptions ne sont pas extensives, et laissent provisoirement en suspens la question de l'hétérogénéité de ces populations, et éventuellement aussi, l'hétérogénéité de leur origine embryologique.

- **Démangeaison**

Les neurones qui expriment le neuropeptide Y (NPY) constituent une population morphologiquement hétérogène localisée tout le long des laminae I-III (Iwagaki, Ganley et al. 2016). Ils reçoivent des contacts synaptiques des fibres LTMRs et projettent vers des neurones de projection de la lamina III et des neurones PKC γ (Polgar, Shehab et al. 1999, Polgar, Sardella et al. 2011). Ces connexions LTMR laissent à penser que ces interneurons NPY jouent un rôle dans la perception tactile. Par contre, il a été montré que ces neurones sont activés par des stimuli nociceptifs mécaniques, et certaines par la capsaïcine (Polgar, Sardella et al. 2013). Par contre, d'autres études ont montré que l'ablation de ces neurones ne provoque pas une allodynie mécanique (Duan, Cheng et al. 2014) et ne change pas les seuils pour des stimuli nociceptifs thermiques, chimiques ou pruritogènes, mais provoque des démangeaisons spontanées (Bourane, Duan et al. 2015). Ces études ont aussi montré que des stimulations mécaniques dans la peau induisaient des démangeaisons. Ces résultats suggèrent que les neurones NPY contrôlent la démangeaison mécanique.

Les neurones qui expriment le peptide GRP se localisent dans la lamina II et 13% expriment la PKC γ (Solorzano, Villafuerte et al. 2015). La suppression de GRP n'altère pas les seuils mécaniques suite aux lésions des nerfs. Ces neurones se situent à proximité des neurones exprimant le récepteur pour le GRP, qui très probablement seront leurs cibles. L'ablation du

récepteur au GRP ne change pas les réponses aux stimuli mécaniques et thermiques en condition physiologiques ou de douleur neuropathique ou inflammatoire (Sun and Chen 2007). Par contre, l'absence du récepteur GRPR provoque une diminution des réponses aux stimuli de démangeaison. Dans la même direction, les antagonistes de ces récepteurs provoquent une diminution du comportement de démangeaison. Il est donc probable que les neurones GRP participent au traitement de la démangeaison.

La perte de neurones nNOS et galanine/dynorphine inhibiteurs dans une souris KO pour le facteur de transcription Bhlhb5, provoque des réponses exacerbées aux stimuli pruritogènes sans altérer d'autres modalités comme la mécanique, thermique ou chimique (capsaïcine, huile de moutard, carrageenan) (Ross, Mardinly et al. 2010, Kardon, Polgar et al. 2014). Ces résultats suggèrent que les neurones inhibiteurs nNOS et galanine/dynorphine participent au contrôle de la démangeaison chimique. Il faut noter que ces neurones sont hétérogènes. La nNOS est exprimée de façon très discrète dans les laminae I-III (Sardella, Polgar et al. 2011). Elle peut être colocalisée dans des neurones excitateurs avec la CR ou la PKC γ (Hughes, Averill et al. 2008, Smith, Boyle et al. 2015). Les neurones à galanine se localisent dans les laminae I-IIo et minoritairement dans la lamina III (Tiong, Polgar et al. 2011) et expriment aussi la dynorphine (Sardella, Polgar et al. 2011). Les neurones à dynorphine se localisent principalement dans les laminae I et IIo et minoritairement dans les laminae III et V (Duan, Cheng et al. 2014). 15% des neurones à dynorphine sont excitateurs et n'expriment pas la galanine (Duan, Cheng et al. 2014). En ce qui concerne leurs cibles, les neurones nNOS et galanine/dynorphine inhibiteurs contactent des neurones de projection de la lamina I (Puskar, Polgar et al. 2001, Polgar, Al-Khater et al. 2008) et des neurones verticaux et île dans la lamina II (Zheng, Lu et al. 2010).

D'autres études ont montré que l'ablation de neurones dynorphine provoque une allodynie mécanique sans changer les réponses aux stimuli thermiques ou pruritogènes (Duan, Cheng et al. 2014). Des études ont montré que ces neurones sont activés (cfos ou pERK) suite aux stimuli nociceptif mécaniques, thermiques et chimiques (Polgar, Sardella et al. 2013). Ces observations sont cohérentes avec les afférences qu'ils reçoivent des fibres LTMR et fibres nociceptives qui expriment les récepteurs TRPV1, TRPA1 et TRPM8 (Duan, Cheng et al. 2014, Ganley, Iwagaki et al. 2015). D'autre part, la dynorphine agit sur le récepteur opioïde K (KOR), et l'injection intrathécale d'agonistes de ces récepteurs supprime le comportement de démangeaison suite à l'injection de chloroquine (Kardon, Polgar et al. 2014). La dynorphine s'exprime de façon transitoire dans la moelle épinière, donc il est possible que dans ces expériences, ils affectent

d'autres cellules que les neurones dynorphine à l'âge adulte. Il est aussi possible qu'un même neurone participe aux différentes modalités sensorielles, par exemple avec la libération de différentes molécules.

L'ensemble de ces résultats montre que le traitement de l'information par les réseaux de la moelle épinière est essentiel pour percevoir des stimuli sensoriels (fig.23). Par exemple, un traitement incorrect peut provoquer des perceptions anormales comme l'allodynie mécanique (Prescott and Ratte 2012). De plus, ils suggèrent un grade de spécialisation dans les différentes populations de neurones pour des modalités sensorielles.

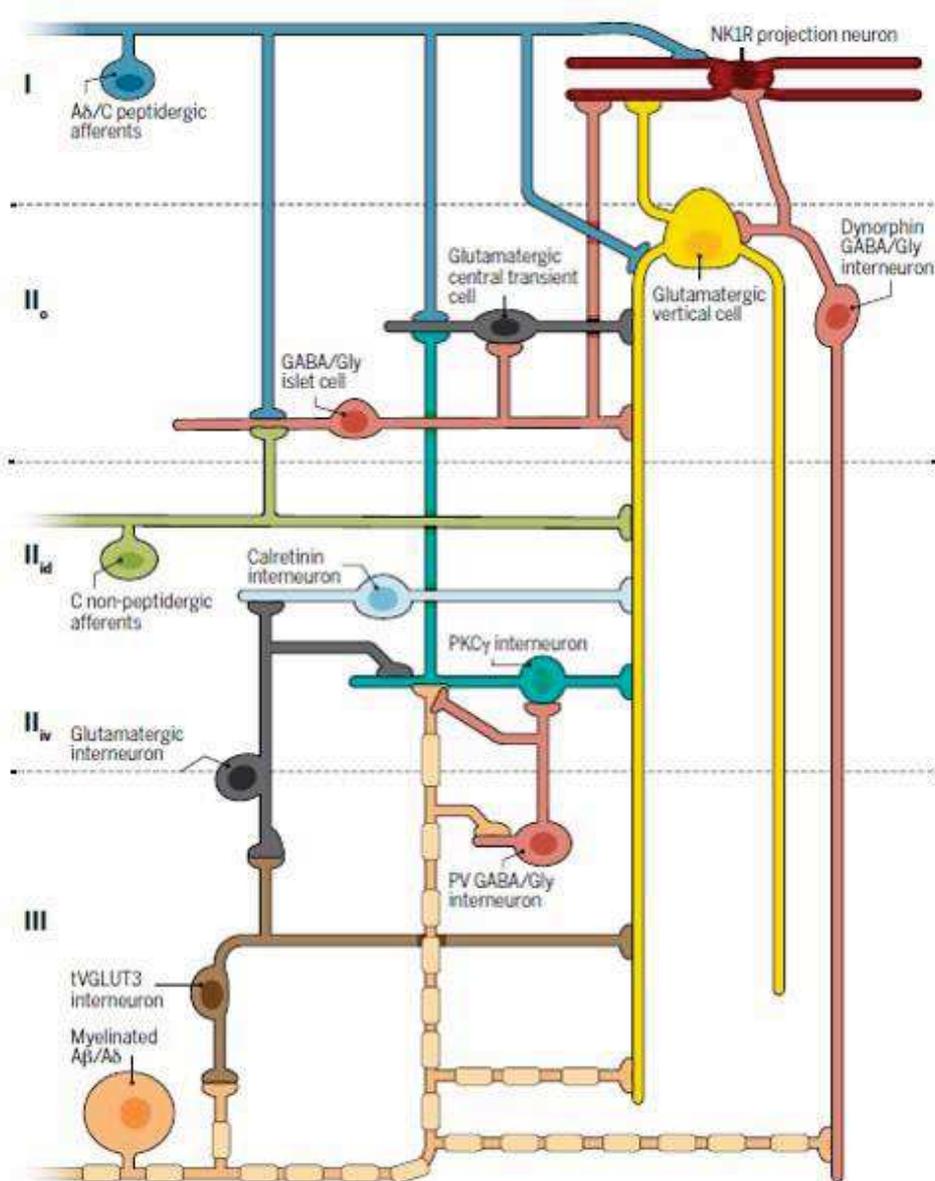


Figure 23. Schéma sur les circuits dans la corne dorsale de la moelle. Les fibres nociceptives peptidergiques (bleu) projettent dans les laminae superficielles et contactent les neurones de projection

NK1 (rouge) et des interneurones excitateurs (gris). Les fibres non peptidergiques (vert) projettent dans la lamina IIid et contactent des neurones inhibiteurs île (rose) et des cellules verticales (jaune). Les fibres à bas seuil A β et A δ innervent la lamina III et contactent des neurones excitateurs PKC γ (bleu sarcelle), Vglut3 (marron) et verticales. Ces fibres myélinisées contactent aussi des neurones inhibiteurs PV (rose) et Dynorphine (rose). Les neurones VGLUT3 contactent les neurones verticaux et d'autres interneurones excitateurs de la lamina IIiv. Les neurones inhibiteurs préviennent l'activation des voies nociceptives par les fibres A via un circuit *feed-forward* sur les neurones PKC γ . Après lésions nerveuses, l'inhibition exercée par les interneurones PV et Dynorphine est réduite, ce qui permet aux fibres A d'activer un circuit qui peut à son tour activer les neurones de projection NK1. D'après (Peirs and Seal 2016).

INTRODUCTION

Deuxième partie :

Douleur

1. Définition de la douleur

Selon l'association internationale pour l'étude de la douleur (IASP : *International Association for the Study of Pain*) elle se définit comment une '*expérience sensorielle et émotionnelle désagréable associée à un dommage tissulaire réel ou potentiel, ou décrite en termes d'un tel dommage*'. La douleur aiguë est donc un comportement complexe, dont le but essentiel serait d'alerter. Elle est constituée de la détection de stimuli potentiellement intrusifs, ou nociception, et aussi d'une composante « émotionnelle » résultant des influences cognitives et neurovégétatives sur le transfert de l'information sensorielle (Almeida, Roizenblatt et al. 2004). Ainsi la douleur met donc en jeu des systèmes discriminatifs pour déterminer les aspects qualitatifs, tels que la localisation et la durée des douleurs, et des systèmes d'intégration émotionnelle et cognitive tels que le cortex préfrontal ou l'amygdale.

1.1.- Classification de douleurs

La douleur est une des principales causes de consultation chez le médecin. Des études montrent que les douleurs chroniques touchent 15% de la population, avec une incidence plus importante chez les personnes âgées (33%) (Breivik, Collett et al. 2006). Ainsi, la douleur, et notamment les douleurs pathologiques sont considérées comme un problème social majeur, avec un coût économique non négligeable.

1.1.1.-Selon la durée

Les douleurs peuvent être classées selon leurs durées, en aiguës et chroniques (Almeida, Roizenblatt et al. 2004). Les douleurs aiguës sont considérées comme un signal d'alarme pour l'organisme, participant à la planification d'une réaction adéquate. Elles assurent ainsi l'intégrité physique des organismes. Elles sont limitées dans le temps et disparaissent avec la résolution du processus pathologique. De ce fait, les individus, humains ou animaux, présentant des maladies congénitales qui empêchent le développement de la douleur, ou de la nociception, présentent de graves lésions qui limitent leur survie (Cox, Reimann et al. 2006).

A l'opposé, les douleurs chroniques persistent 3-6 mois, par définition. De ce fait, elles perdent leur valeur protectrice et deviennent invalidantes. A ce critère temporel s'en ajoute d'autres (voir ci-dessous), tels que des dysfonctionnements des systèmes impliqués dans la génération de douleurs physiologiques. De plus, elles sont souvent associées à d'autres pathologies telles que la dépression, des problèmes cognitifs, des troubles du sommeil (van Hecke, Torrance et

al. 2013). Au plan clinique, le statut social, la santé mentale et l'histoire du patient sont également susceptibles d'influencer l'apparition et la maintenance des douleurs chroniques (van Hecke, Torrance et al. 2013) (fig.24). Elles sont donc considérées comme une maladie en soi.

Modifiable	Pain Mental health Other co-morbidities Smoking Alcohol Obesity Physical activity/exercise Sleep Nutrition Employment status and occupational factors
Non-modifiable	Age Sex Cultural background Socioeconomic background History of trauma/injury/interpersonal violence Heritable factors (including genetic)

Figure 24. Facteurs associés aux douleurs chroniques. Des facteurs modifiables tels que le sommeil, la nutrition ou le statut social, ou des facteurs non-modifiables tels que l'âge et l'histoire du patient, peuvent contribuer à la prévalence et l'intensité des douleurs chroniques. D'après (van Hecke, Torrance et al. 2013).

1.1.2.-Selon le mécanisme

L'étiologie des syndromes douloureux est très variée. Ils peuvent être classifiés selon le mécanisme en :

***Douleurs par excès de nociception** : ces douleurs émergent par une stimulation excessive des nocicepteurs. Selon l'IASP, un stimulus nociceptif est un '*stimulus capable d'induire une lésion tissulaire*'. On distingue des stimuli nociceptifs d'origine thermiques, mécaniques et chimiques. La stimulation des nocicepteurs active durablement les voies de la douleur. On y inclut les douleurs post-traumatiques, post-opératoires, dentaires et rhumatismales.

***Douleurs neuropathiques** : selon l'IASP '*c'est une douleur initiée ou causée par une lésion primitive ou un dysfonctionnement du système nerveux*'. La douleur neuropathique est la plus fréquente parmi les douleurs chroniques, avec des prévalences allant de 1 à 8% de la population selon l'étude (Torrance, Smith et al. 2006). Ses principaux symptômes sont la douleur

spontanée, l'hyperalgésie et l'allodynie (fig.25). Les douleurs spontanées sont des douleurs produites sans stimulation. L'hyperalgésie est une augmentation de la sensibilité aux stimuli nociceptifs. L'allodynie est une sensation douloureuse produite par un stimulus non douloureux. Chez l'humain, ces douleurs sont secondaires à des cancers, des diabètes ou des traumatismes, et elles évoluent souvent vers une résistance aux traitements pharmacologiques actuels.

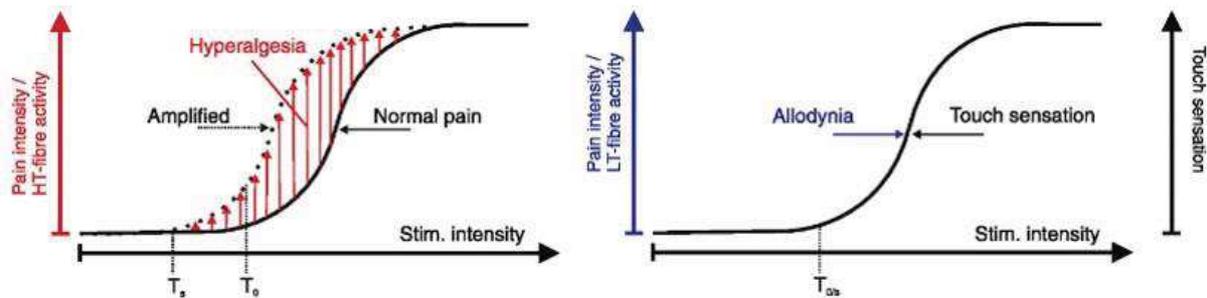


Figure 25. Schéma sur la relation entre l'intensité de douleur et l'intensité du stimulus. L'hyperalgésie implique une diminution du seuil pour les stimuli nociceptifs ou une augmentation de réponses pour des stimuli nociceptifs. T0 représente le seuil nociceptif physiologique (Threshold) et TS le seuil après sensibilisation. L'allodynie est la douleur provoquée par des stimuli à bas seuil (tactiles). T0/S représente le seuil pour le touché. D'après (Sandkuhler 2009).

***Douleurs inflammatoires :** la mise en jeu de processus inflammatoires est suivie d'une augmentation de la sensibilité des neurones nociceptifs, ce qui provoque des douleurs dites inflammatoires (Kidd and Urban 2001). Elles peuvent être secondaires à des lésions tissulaires ou des processus de tumorigénèse. Elles résultent des actions combinées de molécules pro-inflammatoires, telles que cytokines, chémokines, neuropeptides et prostaglandines, qui modifient les propriétés des récepteurs et des canaux ioniques impliqués dans la nociception au niveau périphérique, et central, provoquant ainsi des états d'hypersensibilité (Richter, Natura et al. 2010).

***Douleurs dysfonctionnelles :** elles sont liées à un dysfonctionnement des systèmes de contrôle de la douleur sans qu'une lésion puisse y être associée. Des pathologies, telles que la fibromyalgie, le syndrome du côlon irritable ou la céphalée de tension, sont à l'origine de ces douleurs dysfonctionnelles. Elles résultent de dysfonctionnements des mécanismes endogènes d'inhibition de la douleur (Ossipov, Morimura et al. 2014). Alors que les traitements pharmacologiques restent très inefficaces contre ces douleurs, des prises en charge basées sur des approches non-pharmacologiques sont quelques fois plus efficaces ou appropriées.

2. Anatomie de voies douloureuses

La douleur n'est pas nécessairement en relation avec les propriétés du stimulus nociceptif. Dans la situation physiologique, la douleur commence, en périphérie, avec la détection d'un stimulus nociceptif et finit dans le cortex. Il existe des voies anatomiques spécifiques pour transmettre la douleur qui sont formées au minimum par 3 neurones (Almeida, Roizenblatt et al. 2004). Le neurone de premier ordre ou neurone sensoriel est chargé de détecter le stimulus nociceptif. Le neurone de deuxième ordre est un neurone de projection dans la moelle épinière qui projette vers diverses structures cérébrales. Le neurone de troisième ordre se situe dans le cerveau, et projette vers le cortex somatosensoriel. Les voies de la douleur reflètent les différentes composantes impliquées dans la douleur, depuis les aspects discriminatifs jusqu'aux aspects émotionnels, selon les différentes régions innervées.

Il est aussi possible de différencier les types de douleur physiologiques selon les types de fibres activées, en primaire ou rapide et secondaire ou lente (fig.26). Le premier type est produit par une activation des fibres A δ et le deuxième par une activation des fibres C. Cette classification se base sur des stimulations nociceptives et les réponses décrites par les sujets. Les délais décrits sur les réponses correspondent aux vitesses de conduction de différentes fibres. Des études ont montré que ces types de douleur provoquent l'activation des différentes aires cérébrales. Ainsi, les douleurs primaires provoquent préférentiellement l'activation du cortex somatosensoriel primaire (S1) et les douleurs secondaires du cortex cingulaire antérieur (ACC) (Ploner, Gross et al. 2002). Les douleurs primaires sont donc associées aux aspects discriminatifs et transmettent une information douloureuse rapide et aiguë. Les douleurs secondaires transmettent une sensation plus tardive et durable et sont associées aux aspects affectifs.

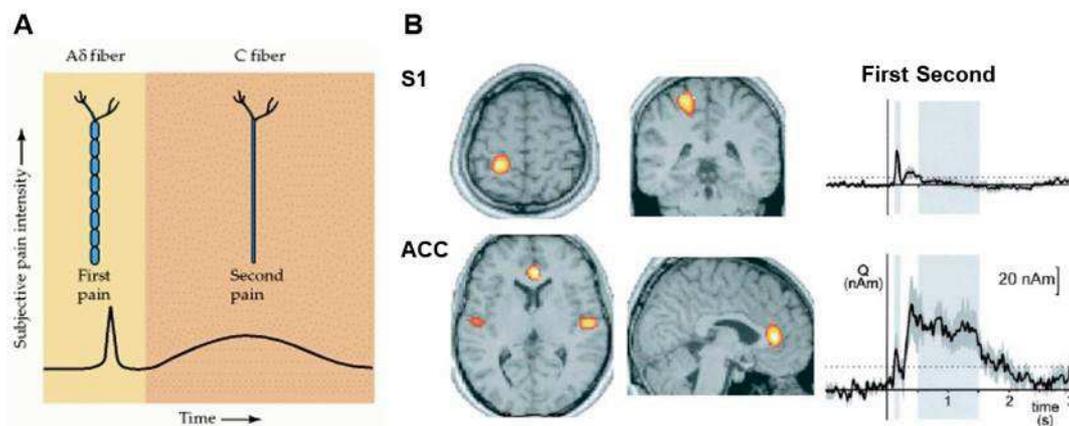


Figure 26. Types de douleur primaire et secondaire. (A). L'activation des fibres A δ provoque une sensation de douleur rapide (primaire) alors que l'activation des fibres C provoque une sensation

douloureuse lente (secondaire). **(B)**. La douleur primaire active préférentiellement le cortex somatosensoriel primaire (S1), alors que la douleur secondaire active plus fortement le cortex cingulaire (ACC). D'après (Ploner, Gross et al. 2002).

2.1.-Nocicepteurs : neurones sensoriels

Le terme nociception fait appel à l'encodage des stimuli nociceptifs. Ces stimuli peuvent être mécaniques, chimiques ou thermiques. Il y a des récepteurs ou canaux ioniques spécifiques pour sa détection, qui transforment la stimulation nociceptive en activité électrique. Ils s'expriment avec un certain degré de spécificité dans les fibres sensorielles (voir partie I). Comme décrit précédemment, les fibres nociceptives sont principalement des fibres non-myélinisées, de type C, mais aussi des fibres myélinisées A δ et A β . Ces fibres forment des terminaisons libres qui innervent la peau et les organes à l'exception du cerveau. Elles projettent principalement dans la partie la plus superficielle de la moelle épinière (I-IIo) et dans les couches plus profondes (III-IV).

Ces fibres sont toutes glutamatergiques, mais peuvent aussi libérer d'autres neuromodulateurs tels que la substance P, somatostatine, GCPR, etc. Ces molécules participent aussi aux processus nociceptifs.

2.2.-Réseaux de la moelle épinière

Les fibres nociceptives des neurones de premier ordre contactent des neurones de projection ou des interneurons dans la moelle épinière. Les interneurons ont une certaine spécificité sensorielle puisqu'ils envoient l'information vers les neurones de projection avec des contacts mono- ou poly-synaptiques et participent aussi aux réflexes spinaux envoyant l'information vers les motoneurons (Lu and Perl 2005). De plus, dès 1965, Melzack et Wall ont proposé la théorie du portillon (*gate control*) suggérant que les interneurons de la lamina II puissent agir comme modulateurs des interactions entre l'information nociceptive et non nociceptive (Melzack and Wall 1965). Dans les conditions physiologiques, les voies somatosensorielles et nociceptives restent séparées tout au long du réseau spinal. Par contre, dans des conditions pathophysiologiques telles que l'allodynie, les stimuli tactiles évoquent des comportements douloureux (voir le chapitre précédent), ce qui suggère des interactions latentes pré-existantes entre ces voies, ou des remodelages anatomo-fonctionnels (fig.27).

D'autres évidences d'interaction entre ces circuits sont les observations cliniques que la douleur peut être inhibée par des informations sensorielles non douloureuses (Arcourt, Gorham et al.

2017). Ce phénomène met en jeu des fibres tactiles qui envoient des axones collatéraux sur des neurones nociceptifs qui participent à l'inhibition de la douleur. De même, la démangeaison peut être inhibée par des stimuli nociceptifs (Ward, Wright et al. 1996). Ces observations cliniques ainsi que les travaux sur les réseaux de la moelle épinière suggèrent que les interneurons ont un rôle essentiel dans la modulation de l'information nociceptive et l'interaction entre différentes modalités sensorielles.

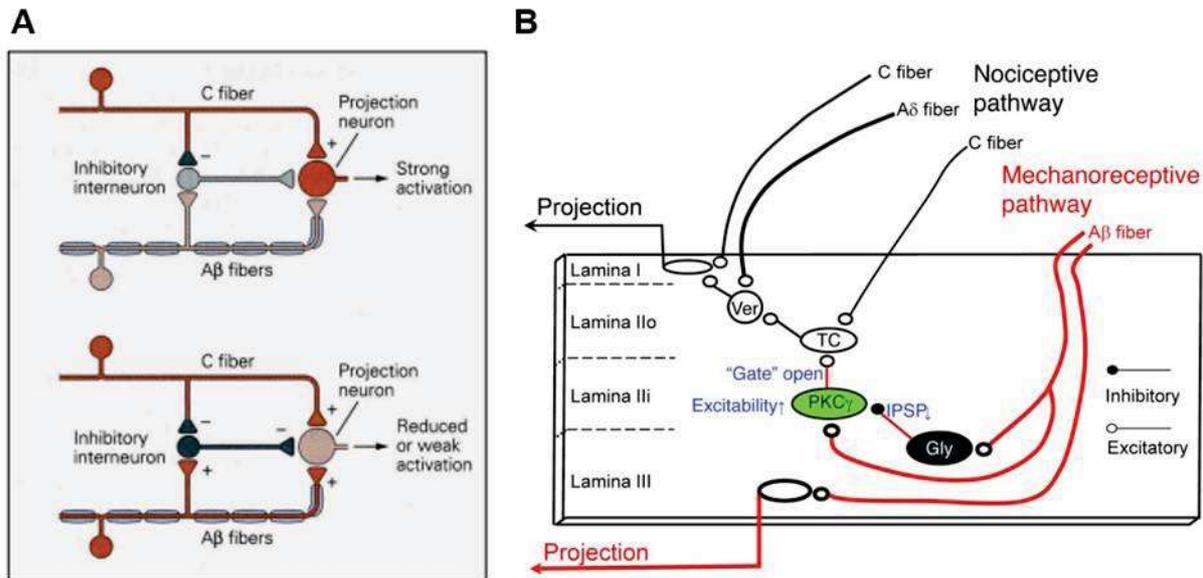


Figure 27. Circuits dans la corne dorsale de la moelle épinière. (A). Schéma illustrant la théorie du portillon où les interneurons spinaux modulent les interactions entre les informations douloureuses (fibres C) et non douloureuses (fibres Aβ). L'activation des fibres C provoque une forte activation des neurones de projection nociceptifs. L'activation simultanée des fibres Aβ et C provoque une faible activation du neurone de projection via l'inhibition par un interneurone activé par les fibres Aβ. **(B).** Schéma montrant un circuit préexistant entre les neurones PKC γ + et des neurones TC (*transient central*). Cette connexion est normalement inhibée fortement par des interneurons inhibiteurs glycinergiques. Après lésion nerveuse il y a une diminution de l'inhibition des neurones PKC γ +, ce qui permet aux stimuli des fibres Aβ d'activer une voie nociceptive. D'après (Lu, Dong et al. 2013).

Les neurones de projection sont distribués dans la lamina I et les *laminae* III, IV et V. Selon leur réponse aux stimuli nociceptifs dans des études *in vivo*, ils sont ou non mobilisés spécifiquement par la modalité nociceptive. Les neurones de projection de la lamina I présentent 3 types de morphologies : multipolaire, fusiforme ou pyramidale. Les deux premières expriment le récepteur de la substance P, NK1, et sont considérés comme spécifiquement nociceptifs. Les neurones pyramidaux n'expriment pas le récepteur NK1 et paraissent non nociceptifs, répondant principalement aux stimuli inoffensifs froids (Polgar, Al-Khater et al. 2008). Par contre, ces neurones expriment le récepteur NK1 *de novo* suite à une inflammation périphérique, ce qui suggère qu'ils peuvent aussi répondre aux stimuli nociceptifs. Des études

sur les neurones de projection de la lamina I chez le chat ou le primate ont montré que des neurones de projection de la lamina I projettent dans différents noyaux du thalamus selon leur modalité sensorielle (Perl 1998, Craig and Dostrovsky 2001).

Les neurones de projection de la lamina III exprimant le récepteur NK1, ainsi que celles de la lamina V sont stimulés par des stimuli nociceptifs et non nociceptifs. Ces neurones sont appelés neurones à large gamme dynamique (WDR : *wide dynamic range*) ou neurones de convergence. Leur répartition suit une organisation somatotopique (Price, Dubner et al. 1976). Dû aux propriétés d'activation de ces neurones, il est suggéré qu'ils sont capables de coder l'intensité du stimulus (fig.28).

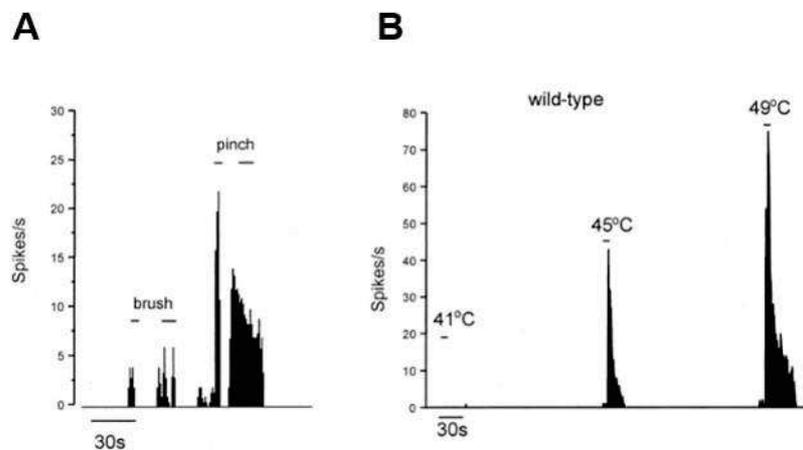


Figure 28. Propriétés de stimulation des neurones WDR. (A). Réponses évoquées par des stimuli mécaniques de brosse (non douloureux) ou pincement (douloureux) sur des neurones WDR enregistrés *in vivo*. (B). Réponses évoquées par stimulations thermiques douloureuses sur des neurones WDR enregistrés *in vivo*. Notez que l'intensité de la réponse augmente avec la température du stimulus. D'après (Martin, Cao et al. 2004).

2.3.-Voies ascendantes

Les voies nociceptives sont différentes de celles qui transmettent la sensation thermique non douloureuse, le toucher léger ou la proprioception. Les afférences sensorielles provenant du côté gauche du corps aboutissent dans le côté droite du cerveau. De ce fait les fibres croisent la ligne médiane de la moelle épinière. Il existe aussi un contingent de fibres ipsilatérales. Les différentes composantes de la douleur sont reflétées par les voies ascendantes. Ainsi, des voies provenant des neurones de projection des différentes *laminae* de la moelle épinière vont projeter vers des régions du cerveau qui traitent les aspects discriminatifs, émotionnels, cognitifs et neurovégétatifs de la douleur. On distingue trois principales voies ou faisceaux qui montent vers le cerveau utilisant le tract antérolatéral (fig.29) :

- **Faisceau spinothalamique** : ces fibres proviennent de neurones de projection des laminae I, III et V (WDR) qui décussent dans la commissure ventrale de la moelle épinière (Almeida, Roizenblatt et al. 2004). Ils montent vers le cerveau empruntant le tractus antéro-latéral de la moelle. Ces fibres contactent différents noyaux du thalamus impliqués dans différents aspects de la douleur. Les fibres projetant sur le noyau ventral postérieur-latéral (VPL) ont une organisation somatotopique. Ce noyau est connecté avec le cortex somatosensoriel, qui conserve aussi cette somatotopie. Ainsi, cette voie participe aux aspects discriminatifs de la douleur et elle est responsable de la douleur primaire provenant de la stimulation des fibres A δ . D'autres cibles sont les noyaux thalamiques de la ligne médiane (postérieur médial, intralaminaires et médial centraux) qui ne présentent pas une organisation somatotopique et projettent vers le cortex cingulaire antérieur et l'insula, participant ainsi aux aspects affectivo-motivationnels de la douleur (Almeida, Roizenblatt et al. 2004).
- **Faisceau spino-réticulaire** : ces fibres cheminent dans le cordon antéro-latéral. La plupart des axones décussent au niveau médian, mais une partie monte de façon ipsilatérale. Ces fibres innervent la formation réticulaire au niveau du bulbe et du pont. La partie latérale de cette structure est impliquée dans le control moteur et la partie médiane est impliquée dans les aspects nociceptifs et affectifs (Almeida, Roizenblatt et al. 2004). Ces régions contiennent des noyaux tels que le noyau caudal ventro-latéral du bulbe (CVLM) qui intègrent aussi l'information cardiovasculaire et conditionnent donc les réponses végétatives de la douleur. D'autres régions de la formation réticulée sont connectées aux voies descendantes, tels que le locus coeruleus, participant ainsi la modulation de la douleur.
- **Faisceau spino-(ponto) mésencéphalique** : ces fibres proviennent des laminae I-V et sont organisées de manière somatotopique. Elles projettent principalement dans la substance grise périaqueducale (PAG) et l'aire parabrachiale (PB) (Almeida, Roizenblatt et al. 2004). Cette dernière projette ensuite vers l'amygdale et l'hypothalamus, ainsi que le noyau accumbens et les cortex cingulaire et frontal. De ce fait, la voie spinoparabrachiale est impliquée dans les aspects émotionnels et autonomes de la douleur. La PAG est une région qui organise des stratégies pour s'adapter au stress et est un de principaux sites d'action des analgésiques.

En plus de ces voies, il existe d'autres faisceaux des neurones de projection de la moelle épinière qui projettent vers l'hypothalamus (faisceau spinothalamique) et vers le noyau du tractus solitaire (NTS) et le noyau cervical latéral (faisceau spinocervical) (Almeida, Roizenblatt et al. 2004). Le faisceau spinothalamique participe aux réponses neuroendocrines, motivationnelles et d'alerte des expériences douloureuses. Le faisceau spinocervical participe à l'intégration des stimuli somatiques et viscéraux.

Il est fréquent que les neurones de projection fassent synapses dans plusieurs structures de projection (PB, PAG et thalamus) (Al-Khater and Todd 2009). Chez les rongeurs, le noyau PB est la principale cible de la lamina I puisque 80% des neurones de projection y envoient un axone (Todd 2010). Chez le rat, dans la partie lombaire, 95% des neurones de projection de la lamina I projettent dans l'aire PB, un tiers dans la PAG et un quart dans le NTS, et moins du 5% dans le thalamus. Le noyau PB projette ensuite vers des régions limbiques telles que l'amygdale et l'hypothalamus. Pour comparaison, le thalamus est la principale cible des neurones de projection de la lamina I chez le primate, suggérant que la « matrice de la douleur » puisse être organisée bien différemment des rongeurs.

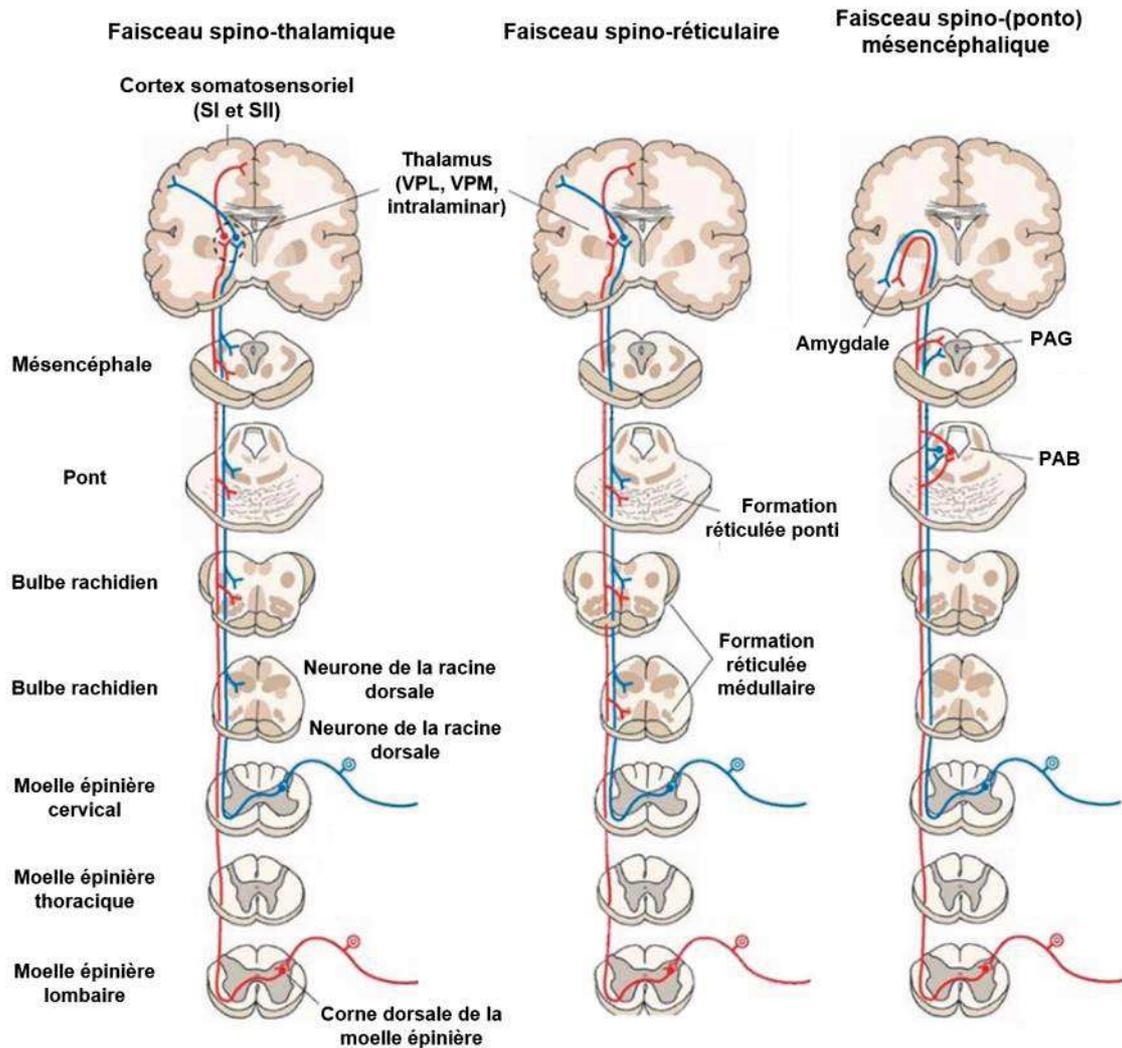


Figure 29. Schéma sur les principales voies ascendantes.

2.4.-Régions supérieures

Des études d'imagerie fonctionnelle ont permis de connaître les régions cérébrales activées par des comportements douloureux, appelées '*pain matrix*' (Ingvar 1999) (fig.30). Ces études ont été faites chez l'humain avec des stimulations nociceptives ainsi que des patients atteints de douleurs chroniques. Parmi ces régions on trouve le cortex antérieur cingulaire (ACC), l'insula, le cortex préfrontal (PFC), le cortex somatosensoriel primaire (SI) et secondaire (SII), l'amygdale, le cervelet et des régions limbiques telles que l'aire tegmentale ventrale (VTA) (Ossipov, Morimura et al. 2014). Le grand nombre de régions impliquées est cohérent avec la complexité et la « subjectivité » des comportements douloureux. Le cortex somatosensoriel et l'insula participent à l'encodage des aspects discriminatifs de la douleur, comme la qualité, la localisation et la durée. Le cortex préfrontal et le système limbique (ACC, amygdale, VTA) sont impliqués dans les aspects émotionnels, affectifs et cognitifs de la douleur. Par contre, la

plupart de ces régions ne sont pas spécifiques pour la douleur. Par exemple l'insula code l'intensité de la douleur mais aussi d'autres modalités sensorielles. L'implication des nombreuses régions liés par de fortes interactions explique la grande variabilité dans l'expression de douleurs chroniques. Ainsi, les aspects émotionnels peuvent modifier la perception de la douleur grâce aux interactions avec les voies descendantes. Des études ont montré que des facteurs exogènes, comment la distraction, peuvent moduler la sensation douloureuse (Valet, Sprenger et al. 2004). Ces études ont aussi montré, et c'est important, que les régions activées chez les humains correspondent à celles de l'animal.

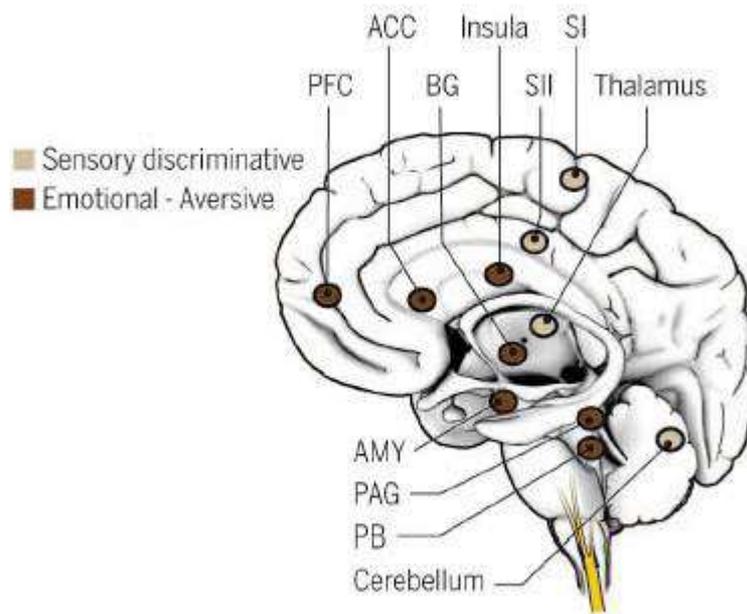


Figure 30. Régions cérébrales impliquées dans la perception douloureuse. Les aires discriminatives sont le thalamus et les cortex somatosensoriels primaires et secondaires (SI, SII). Les aires impliquées dans les aspects émotionnels et aversifs sont le noyau parabraquial (PB), la substance grise périaqueducale (PAG), l'amygdale (AMY), les ganglions de la base (BG), l'insula, le cortex antérieur cingulaire (ACC) et le cortex préfrontal (PFC). D'après (Peirs and Seal 2016).

2.5.-Voies descendantes

L'information nociceptive au niveau de la moelle subit aussi une régulation descendante issue principalement du tronc cérébral. D'autres régions telles que le thalamus, l'hypothalamus et le cortex projettent aussi dans la moelle épinière (Fields 1994). Les contrôles descendants peuvent avoir un rôle facilitateur ou inhibiteur de la nociception, jouant ainsi un rôle de filtre ou d'amplificateur. Ces régions sont aussi connectées avec des centres corticaux et sous-corticaux qui régulent les processus émotionnels, motivationnels et cognitifs.

Parmi les systèmes descendants, on distingue (Millan 2002) (fig.31) :

- **Système sérotoninergique** du noyau *raphe magnus*. Il y a beaucoup de récepteurs à la sérotonine dans la moelle épinière, avec des effets facilitateurs et inhibiteurs.

- **Système noradrénergique** dont les fibres proviennent principalement du locus cœruleus et d'autres régions pontines. La libération de noradrénaline provoque des inhibitions via les récepteurs présynaptiques α_2 .
- **Système GABAergique** depuis la partie rostrale ventro-médiale (RVM) du bulbe.
- **Système dopaminergique** du noyau aminergique A11.
- **Système opioïde** de la substance grise périaqueducule (PAG) et noyau rostral ventro-médial (RVM). Ils libèrent des opioïdes endogènes tels que les enképhalines, endorphines et dynorphines qui agissent sur des récepteurs dans la partie dorsale de la moelle épinière (afférences primaires y compris) et la PAG. La stimulation de la PAG provoque une forte analgésie et inhibe l'activité des neurones de projection de la corne dorsale.

Les contrôles descendants ont des effets différents selon le type neuronal, dû aux différentes expressions des récepteurs. Par exemple la plupart des neurones sont hyperpolarisés sous l'action de la sérotonine et de la noradrénaline, à l'exception de quelques neurones inhibiteurs type île (Lu and Perl 2007). Les voies descendantes peuvent aussi réprimer les inputs des afférences primaires vers la moelle épinière en agissant sur des récepteurs présynaptiques.

La perte de voies descendantes est un des mécanismes qui provoque des douleurs chroniques, alors que l'engagement des voies d'inhibition protège contre ces douleurs (Ossipov, Morimura et al. 2014). Des études montrent que chez les rats SNL qui ne développent pas une allodynie mécanique, le blocage du noyau rostro ventro-médial du bulbe (RVM) avec la lidocaïne provoque une allodynie mécanique (De Felice, Sanoja et al. 2011). D'autres travaux montrent que le blocage des récepteurs α_2 -adrénergiques provoque des allodynies tactiles et au froid chez des rats non douloureux ayant subi une chirurgie SNL (Xu, Kontinen et al. 1999). Ces résultats suggèrent que ces rats sans comportement douloureux ont une augmentation de l'activité des voies descendantes inhibitrices opioïdiques et/ou noradrénergiques, qui masquent une hypersensibilité douloureuse.

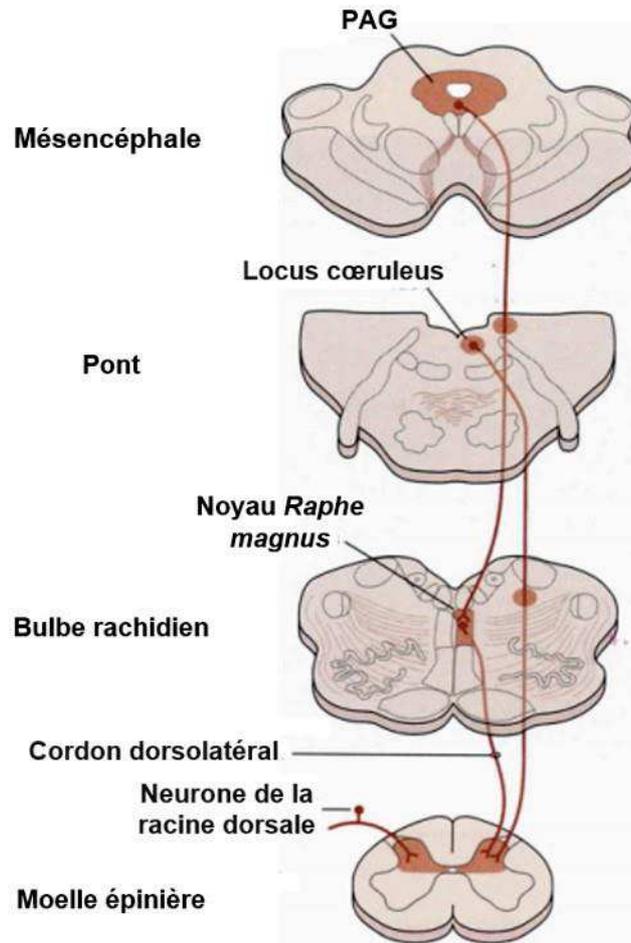


Figure 31. Voies descendantes du contrôle de la nociception. Les principales régions avec des projections descendantes sont la PAG (substance grise périaqueducale) (opioïdergique), le locus cœruleus (noradrénergique) et le noyau raphe magnus (sérotoninergique).

3. Modèles animaux de douleurs chroniques

3.1.-La douleur chez l'animal

La douleur est une expérience complexe et fortement subjective chez l'humain. Cette vaste dimension cognitive est difficile à produire et à évaluer de manière reproductible et finement quantifiable chez l'animal. Chez l'animal, la douleur est résumée comme *'une expérience sensorielle aversive, qui évoque dans la conscience de l'animal, le danger ou la menace de l'intégrité de ses tissus'* (Molony and Kent 1997). Il a donc été nécessaire d'identifier et d'analyser des aspects comportementaux, plus ou moins intégrés, ou des aspects physiologiques, plus proches de la nociception, pour obtenir des index objectifs et mesurables d'un comportement spontané douloureux (Carstens and Moberg 2000).

- **Signes physiologiques** : dilatation de pupilles, changements de la fréquence cardiaque, respiratoire et de la température corporelle, pilo-érection, etc.

- **Signes comportementaux associés à la douleur** : animal sur ses gardes, vocalisations, mutilation, prostration, position anormale, perte de l'appétit, diminution du toilettage, de l'activité locomotrice et d'exploration, etc.

Ces paramètres ne sont pas toujours faciles à observer et à mesurer. Par conséquent, des tests mesurent des réponses pathophysiologiques évoquées par des stimuli pour différentes modalités sensorielles, telles que nociceptive, mais aussi mécanique, thermique ou chimique. Parmi les paramètres mesurés on trouve la latence pour obtenir une réponse, le seuil pour déclencher une réponse ou le nombre de comportements évoqués (léchage des pattes, etc.).

3.2.-Modèles animaux

Ils peuvent être induits chez l'animal sain par lésion chirurgicale, injection de substances pharmacologiques dont les procédures doivent être précises, fiables et reproductibles. Le recours aux primates est inenvisageable et toute autre solution doit être envisagée. Ils peuvent aussi être créés par modification génétique de type transgène ou recombinaison homologue dans les espèces où cela est possible.

3.2.1.-Modèles de douleur neuropathique

Une grande partie de modèles de douleur neuropathique ciblent le nerf sciatique chez le rongeur. La plupart de modèles se basent sur des lésions partielles, car elles sont plus fréquentes que les lésions complètes chez l'humain. Parmi ces lésions partielles on trouve des constrictions, des ligatures et des sections du nerf sciatique (fig.32).

- **Constriction chronique (CCI : *chronic constriction injury*)** : c'est une ligature lâche du nerf sciatique (Bennett and Xie 1988). Elle produit une modification des réponses évoquées: hyperalgésie thermique et mécanique, signes d'allodynie tactile et au froid dans la patte ipsilatérale. Ces symptômes transitoires se développent dès la première semaine après la chirurgie, avec des réponses maximales pendant la deuxième semaine. Les symptômes disparaissent au bout de 8 semaines (Bennett and Xie 1988). Anatomiquement, la ligature lâche entraîne une perte des fibres myélinisées A β et des fibres C non-myélinisées (Gabay and Tal 2004), mais il est difficile de contrôler le nombre, la proportion et le type de fibres affectées dans ce modèle. D'ailleurs, des douleurs spontanées ainsi que des automutilations peuvent être observées (Bennett and Xie 1988).

- **Ligature des nerfs spinaux** (SNL : *spinal nerve ligation*) : le modèle consiste à lier de façon étroite les nerfs spinaux L5 et L6 avant le plexus lombosacré. Ce modèle provoque une allodynie tactile et une hyperalgésie thermique dans la patte ipsilatérale, dès la première semaine et qui peut durer plusieurs mois (Kim and Chung 1992). Par contre, un pourcentage d'animaux peut ne pas développer de changements de perception douloureuse évoquée (Xu, Kontinen et al. 1999, De Felice, Sanoja et al. 2011).
- ***Spared nerve injury*** (SNI) : le modèle consiste en une transection de deux des trois branches du nerf sciatique, la tibiale et péronéale commune, en épargnant la branche surale (Decosterd and Woolf 2000). Cette déafférentation partielle provoque la désensibilisation des territoires innervés par ces branches tibiale et péronéale. A l'inverse, la partie latérale de la patte ipsilatérale (normalement innervée par la branche surale) et, d'une façon moins importante, sa partie médiale (innervée par le nerf saphène) développent une hyperalgésie et des allodynies mécanique et thermique. Les changements de sensibilité apparaissent le jour de la chirurgie et atteignent des valeurs maximales après deux semaines. Ces douleurs persistent et sont encore présentes 6 mois après la chirurgie (Smith, O'Hara et al. 2013).

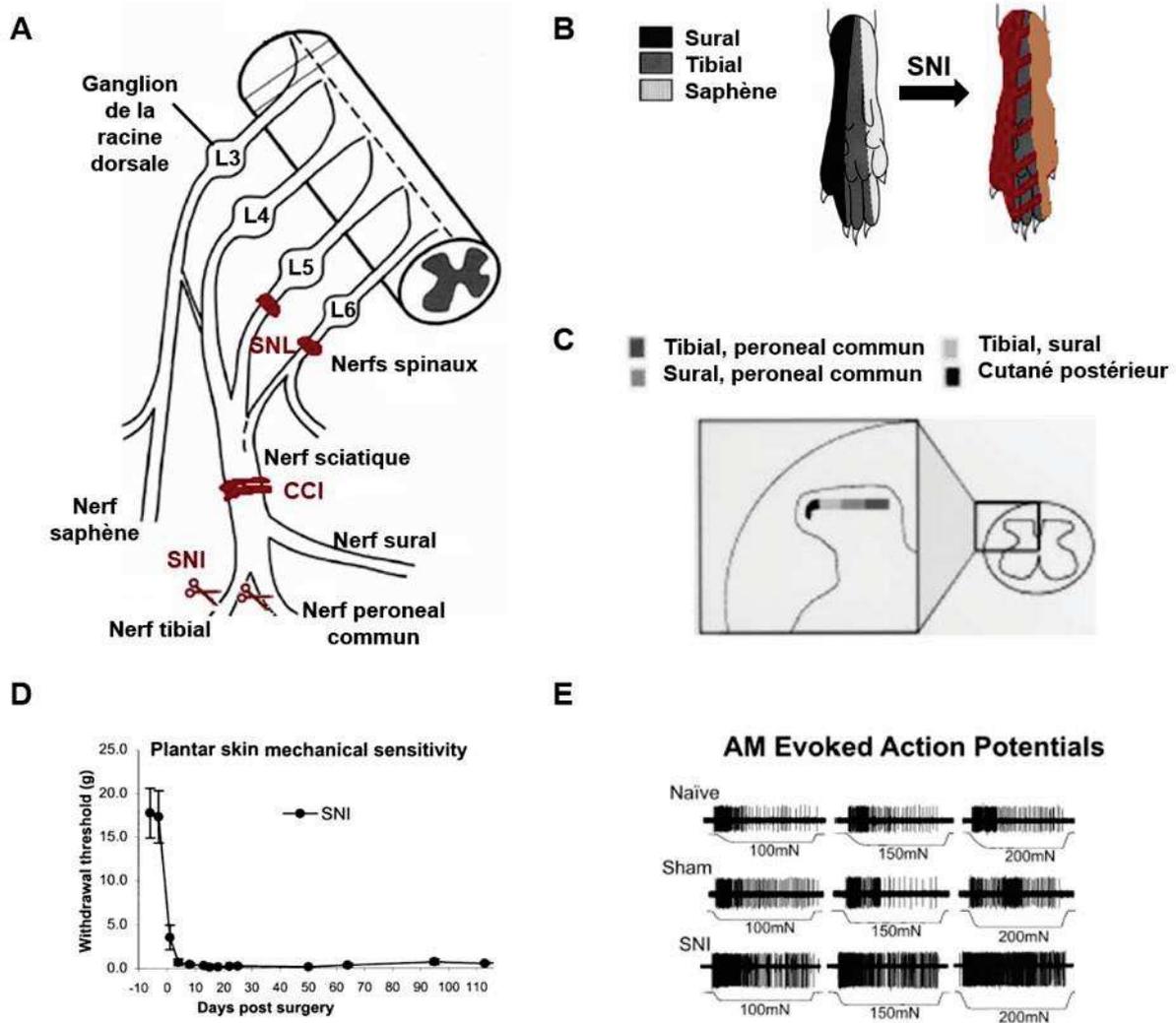


Figure 32. Modèles de douleur neuropathique. (A). Schéma montrant les différents modèles neuropathiques. Le modèle SNI (*Spared Nerve Injury*) est produit par la section des branches tibiale et péronéale du sciatique ; le modèle CCI (*Chronic Constriction Injury*) par la constriction du nerf sciatique, et le modèle SNL (*Spinal Nerve Ligation*) par la ligature des racines pré-ganglionnaires L5 et L6. (B). Répartition des prises en charge des territoires cutanés plantaires par les différentes branches du nerf sciatique chez la souris. Suite au modèle de SNI, la surface innervée par les branches tibiale et péronéale sont désensibilisées et la partie innervée par la branche surale (rouge) et le nerf saphène (saumon) développent une hypersensibilité. (C). Projections des subdivisions du nerf sciatique dans la corne dorsale de la moelle épinière. D'après (Shields, Eckert et al. 2003). (D). Diminution des seuils de nociception mécanique après SNI. D'après (Decosterd and Woolf 2000). (E). Enregistrements *in vitro* de la propagation des potentiels d'action déclenchés par la stimulation mécanique (5-200mN) de mécanorécepteurs A δ (AM) localisés dans la région surale d'une préparation peau-nerf. Les réponses évoquées sont potentialisées chez les souris SNI par comparaison avec les témoins et les animaux sham. D'après (Smith, O'Hara et al. 2013).

3.3.- Limites de modèles animaux

Une des limites les plus importantes reste l'évaluation de la douleur, comme des aspects tels que l'intensité et le type de douleur. Dans la plupart des cas, l'analyse de la douleur se réalise avec des stimulations évoquées et le caractère spontané de la douleur est rarement exploré.

Ainsi, les aspects émotionnels et cognitifs restent souvent sous-évalués (Mogil 2009). D'autre part, pour des raisons éthiques, la durée des études est souvent réduite à quelques semaines, ce qui empêche l'analyse à long terme de douleurs chroniques. Ceci n'est pas le cas chez l'humain, qui est souvent confronté aux douleurs chroniques pendant plusieurs années.

Les limites de ces modèles freinent la découverte de nouveaux traitements contre la douleur chronique. Beaucoup d'études ont montré des effets analgésiques chez l'animal, mais pas chez l'humain (Mao 2012). Une des solutions est l'utilisation de modèles plus proches de maladies ou causes de douleurs chroniques chez l'humain. Parmi ces modèles, on trouve l'injection d'agents anti-cancéreux qui provoquent des neuropathies, tels que l'oxalyplatine.

De manière plus générale, on pourrait préférer intensifier la recherche dans le sens d'analyses plus fonctionnelles (fMRI pour l'activité cérébrale par exemple), ou à une échelle encore plus moléculaire chez l'humain. Ce phénotypage serait donc associé au comportement, à l'histoire, et aux traitements en cours chez chaque patient.

4. Physiopathologie des douleurs chroniques

Les mécanismes qui provoquent le développement des douleurs chroniques sont très variés et complexes. D'une part, il existe une grande variabilité dans la mise en place de ces douleurs chez les patients atteints d'une même pathologie. Par exemple, un tiers des patients diabétiques développe une neuropathie sans qu'un marqueur prédictif soit disponible (Ossipov, Morimura et al. 2014). Comme décrit précédemment, la douleur est un comportement complexe, qui implique de nombreuses régions cérébrales et qui est modulé par beaucoup de systèmes.

Les états de douleurs chroniques sont caractérisés par la présence de douleurs spontanées (douleur en absence de stimuli), hyperpathie (augmentation de la durée de la douleur suite à la stimulation nociceptive), hyperalgésie, hyperalgésie secondaire (sensation de douleur dans les régions sans lésion) et allodynie. Lors des dernières années, on a fait de grandes avancées sur le rôle du système nerveux dans l'initiation et le maintien de ces sensations pathologiques. Par contre, les mécanismes causaux sont toujours non résolus. Il y a aussi de plus en plus d'évidences qui montrent que toutes les régions sont importantes dans l'initiation et/ou maintenance de l'état de la douleur, et que les mécanismes périphériques et centraux ne s'excluent pas mutuellement. Ainsi, des modifications plus au moins durables ont lieu suite aux

stimulations douloureuses intenses tout le long des voies douloureuses, depuis les neurones sensoriels jusqu'aux régions cérébrales en passant par la moelle épinière.

Par la suite, on décrira les principaux changements ayant lieu dans la moelle épinière lors de douleurs neuropathiques. Ces changements affectent la sensibilité des neurones périphériques et spinaux, ainsi que leur excitabilité, les potentialisations des voies descendantes facilitatrices et inhibitions des voies descendantes inhibitrices, l'augmentation de la transmission excitatrice et la diminution de la transmission inhibitrice. Ces phénomènes ont lieu suite aux modifications d'expression de gènes, d'expression de protéines telles que les canaux ioniques et récepteurs, de mécanismes de LTP, de changements structuraux / morphologiques, etc.

4.1.- Contributions périphériques

A. Décharges ectopiques et spontanées

Dans les conditions physiologiques les neurones primaires déchargent très rarement sans stimulation (Tal and Eliav 1996). Par contre, suite aux lésions nerveuses, il y a une augmentation des potentiels d'action spontanés dans les neurones innervant la région douloureuse (Wall and Gutnick 1974). Ces décharges sont considérées ectopiques car elles ne proviennent pas de la stimulation de nocicepteurs. Elles ont aussi été observées dans des modèles animaux de douleurs neuropathiques (Ali, Ringkamp et al. 1999, Amir, Michaelis et al. 1999, Smith, O'Hara et al. 2013, Tal and Eliav 1996). Ces décharges semblent être responsables des douleurs spontanées. Parmi les mécanismes à l'origine de ces décharges, on trouve une augmentation et une redistribution de canaux ioniques tels que les canaux sodiques résistants à la TTX Nav1.8/1.9 dans le site de la lésion. Ainsi, ces canaux baissent le seuil de décharge de potentiel d'action (Boudes and Scamps 2012).

B. Sensibilisation des fibres primaires

La sensibilisation des fibres primaires est provoquée par une diminution du seuil d'activation de récepteurs ainsi qu'une augmentation de réponses aux stimulations supraliminaires (fig.33). Les molécules qui font partie de la soupe inflammatoire, libérées suite aux lésions, participent aux changements des propriétés des récepteurs et des canaux ioniques. On distingue des mécanismes directs, quand les molécules interagissent avec le récepteur ou canal spécifiques. Par exemple, la sérotonine ou l'ATP peuvent moduler directement des récepteurs tels que TRPV1. D'autres molécules telles que le NGF ou la bradykinine activent des récepteurs métabotropiques dont les voies des signalisations impliquant entre autres des protéines kinases

ou phospholipases, modulent les canaux Nav1.8/1.9. Cela provoque secondairement des augmentations dans l'excitabilité des nocicepteurs (Burgess, Mullaney et al. 1989, Shu and Mendell 1999).

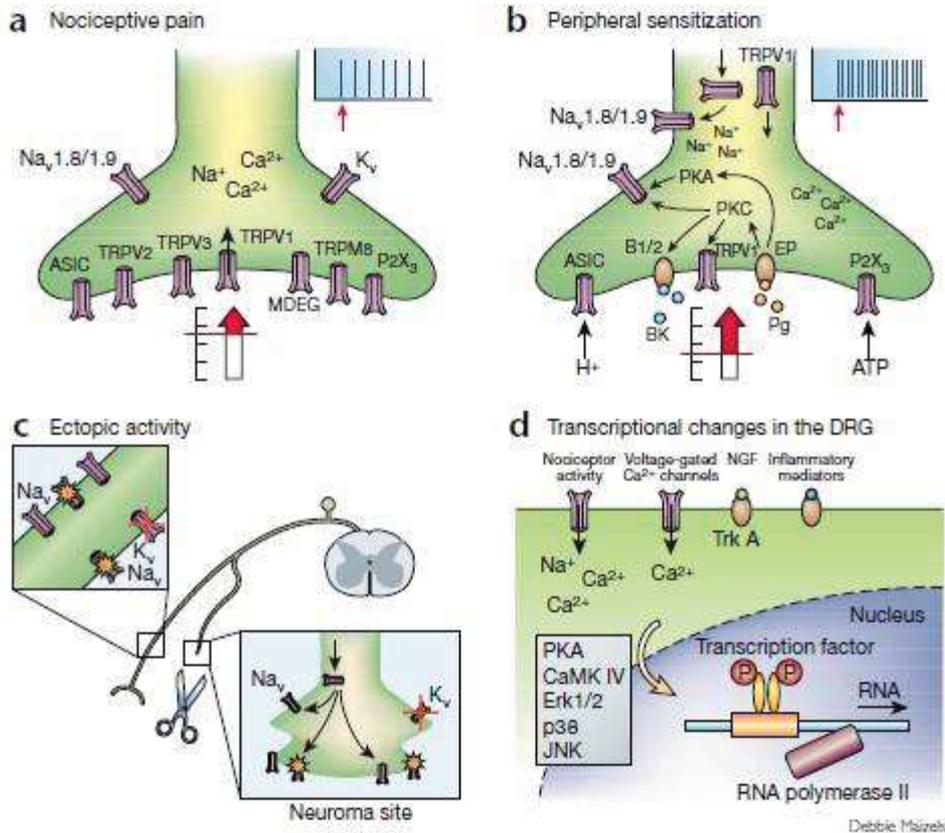


Figure 33. Mécanismes de la transmission nociceptive. (A). Nociception. Dans les conditions physiologiques, seuls les stimuli nociceptifs activent les nocicepteurs. **(B) Sensibilisation périphérique.** Au cours de l'inflammation, des messagers extracellulaires tels la bradykinine (BK) et les prostaglandines (Pg) se lient à leurs récepteurs, couplés aux protéines G, dans les terminaisons périphériques des nocicepteurs et activent des protéines kinase A et C qui phosphorylent des canaux ioniques (Nav1.8/1.9) et des récepteurs (TRPV1). Ceci provoque la diminution du seuil d'activation des nocicepteurs et l'augmentation de leur excitabilité. **(C). Activité électrique ectopique.** Après lésion axonale, l'augmentation conjointe de la transcription et du trafic des canaux sodiques et la diminution de canaux potassiques provoquent une augmentation de l'excitabilité de la membrane suffisante pour déclencher des potentiels d'action spontanés. **(D). Remodelage dans les neurones sensoriels de la racine dorsale.** Les changements d'activité des canaux ioniques et/ou des récepteurs transmembranaires bouleversent les voies de transduction et coordonne un remodelage de la transcription dans les nocicepteurs (TrkA). Ceci modifie durablement le phénotype des neurones nociceptifs et/ou non-nociceptifs. D'après (Scholz and Woolf 2002).

4.2.-Contributions spinales

A. Changements de l'inhibition

Des interneurons inhibiteurs de la moelle épinière réalisent l'inhibition présynaptique de fibres primaires, ainsi que des interneurons spinaux, pour maintenir au silence certaines voies de

transmission. La diminution ou la perte de ces modulations provoque une augmentation de la transmission des messages nociceptifs (Baba, Ji et al. 2003).

- **GABA**

Le GABA est le principal neurotransmetteur inhibiteur rapide dans la moelle épinière. Plusieurs études ont montré que la transmission GABAergique est diminuée dans des modèles de lésion de nerfs. D'une part, l'inhibition de voies GABAergiques (par des antagonistes de GABA_A ou autres) provoque des comportements douloureux (Kaneko and Hammond 1997). D'autre part, la stimulation des voies GABAergiques réduit les douleurs (Petitjean, Pawlowski et al. 2015). Les mécanismes qui aboutissent à cette diminution sont multiples. D'abord, il existe une variabilité des résultats selon le modèle neuropathique utilisé (CCI, SNL, SNI, etc.). Cette réduction peut avoir lieu dans le compartiment présynaptique, comme une réduction de la synthèse de neurotransmetteur ou réduction de la probabilité de libération, ou dans le compartiment postsynaptique, par une réduction de l'effet du neurotransmetteur (réduction du nombre de récepteurs, phosphorylations, etc.), changement d'équilibre pour le chlore, etc.

La perte d'inhibition ne serait pas expliquée par une diminution du nombre de neurones GABAergiques (Polgar, Hughes et al. 2005). D'autres auteurs ont proposé qu'une déplétion de GABA joue un rôle, car ils observaient une diminution d'un immunomarquage GABA (Moore, Kohno et al. 2002). A l'inverse, une étude plus récente ne confirme pas cette diminution de GABA, ni des transporteurs vésiculaires du GABA, vGAT, ni des récepteurs GABA_A dans la moelle épinière (Polgar and Todd, 2008). Une autre étude montre une diminution des contacts synaptiques des neurones inhibiteurs sur une population de neurones PKC γ , impliqués dans l'allodynie mécanique (Petitjean, Pawlowski et al. 2015).

Les propriétés intrinsèques d'une population de neurones inhibiteurs ne sont pas modifiées (Schoffnegger, Heinke et al. 2006). Des études des courants synaptiques excitateurs (sEPSC et mEPSC) des interneurons de la lamina II montrent des modifications différentes selon le type neuronal. Ainsi, dans un modèle de CCI, les neurones avec motif de décharge tonique ont une diminution de la fréquence et de l'amplitude des mEPSC, suggérant des altérations post-synaptiques, au moins (Balasubramanian, Stemkowski et al. 2006). Par contre, les neurones avec motifs de décharge retardée et transitoire ont une augmentation des mEPSC. Ces résultats furent étendus à un modèle d'axotomie du nerf sciatique (Chen, Balasubramanian et al. 2009). Ces travaux, et l'approximation suggérant qu'un profil de décharge tonique est une propriété

d'interneurone inhibiteur, a suggéré que ces neurones recevaient moins d'excitations pendant les douleurs chroniques. La diminution des courants synaptiques excitateurs mEPSC a été retrouvée dans des neurones inhibiteurs identifiés par l'expression de GAD67 (Leitner, Westerholz et al. 2013). Cette diminution ne résulte pas du changement de contacts synaptiques (densité, morphologie et contacts), mais d'une réduction présynaptique de la libération du neurotransmetteur. Ils observent une augmentation du *paired-pulse* dans des réponses des fibres A δ et C. Ce mécanisme, la diminution de recrutement des interneurons inhibiteurs apparaît donc secondaire à un défaut d'activité de synapses glutamatergiques (Leitner, Westerholz et al. 2013).

D'autres auteurs ont proposé un changement dans l'équilibre du chlore. Les récepteurs GABA_A provoquent l'ouverture de canaux chlore. L'effet inhibiteur ou excitateur dépendra du gradient électrochimique du chlore dans ces neurones. Des études ont suggéré des diminutions d'expression des cotransporteurs KCC2 provoqués par le BDNF libéré par la microglie (Coull, Beggs et al. 2005), ce qui diminuerait le gradient pour le chlore et donc la force de l'inhibition. Il a aussi été montré un changement du gradient du chlore dans les neurones de la lamina I (Coull, Boudreau et al. 2003).

- **Autres neurotransmetteurs**

En plus du système GABAergique, il existe d'autres systèmes d'inhibition tels que le système glycinergique. Comme décrit précédemment, ce système joue un rôle essentiel dans le contrôle de l'établissement de l'allodynie mécanique (Lu, Dong et al. 2013)(fig.34).

En plus des neurotransmetteurs inhibiteurs, des neuropeptides, tels le NPY, la somatostatine ou les opioïdes endogènes, agissent comme freins des symptômes des douleurs chroniques comme l'allodynie et l'hyperalgésie chez l'animal (Taylor 2009). Ces peptides sont exprimés soit par les neurones sensoriels, soit par des interneurons spinaux, voire par des neurones suprasgmentaires des voies descendantes. Les lésions neuropathiques modifient leur efficacité, et diminuent leur pouvoir de frein.

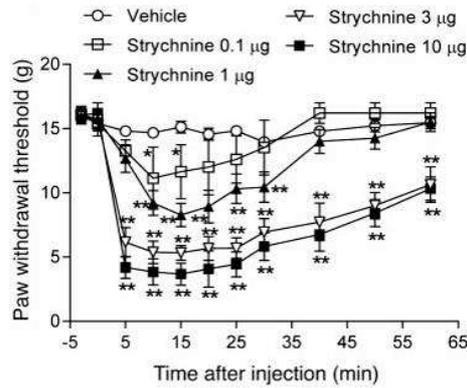


Figure 34. La perte d'inhibition diminue le seuil douloureux. L'injection intrathécale de strychnine, un antagoniste des récepteurs ionotropiques glycinergiques, provoque une allodynie mécanique. D'après (Lu, Dong et al. 2013).

B. Sensibilisation centrale

C'est une forme de plasticité synaptique qui provoque l'augmentation de la sensibilité de la moelle épinière générée par des stimulations répétées (Woolf 1983)(fig.35). C'est une augmentation de l'excitabilité due à une augmentation du champ récepteur, une diminution du seuil et/ou un recrutement de nouvelles entrées synaptiques, ou une perte des mécanismes d'inhibition. Les conséquences cliniques sont l'hyperalgésie secondaire et l'allodynie. Suite à l'établissement de la sensibilisation centrale, les stimulations infraliminaire sont capables d'activer les neurones des cornes dorsales.

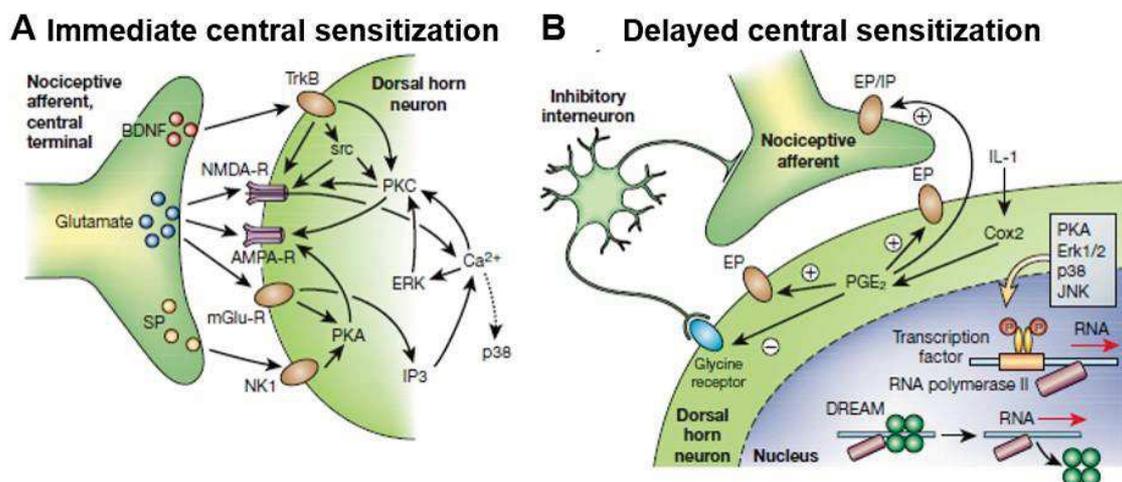


Figure 35. Sensibilisations centrales. (A). Sensibilisation dépendante de l'activité. C'est une augmentation de l'excitabilité et de la réactivité de la transmission nociceptive par les neurones de la moelle épinière. Parmi les mécanismes impliqués figurent des phosphorylations des canaux ioniques et des récepteurs suite à la libération de neurotransmetteurs nociceptifs contrôlant les activités de protéines kinases. **(B). Sensibilisation dépendante de la transcription.** L'expression génique est augmentée par le recrutement de facteurs de transcription et/ou la suppression de facteurs de répression (tels que DREAM). Cela provoque des changements phénotypiques à long terme dans la moelle épinière. D'après (Scholz and Woolf 2002).

- **Wind up**

Le phénomène de *wind-up* permet à certains neurones nociceptifs de la corne dorsale de la moelle d'augmenter la décharge de potentiels d'actions suite à une stimulation répétée des fibres C. Ce phénomène physiologique est un mécanisme de plasticité homo-synaptique de courte durée par lequel la stimulation répétée à basse fréquence (0.3-5Hz) de fibres C induit une augmentation de la sensibilité des interneurons postsynaptiques. Il est dû à la sommation temporelle des potentiels postsynaptiques excitateurs, quand la durée de ces potentiels est plus grande que l'intervalle entre deux décharges présynaptiques des fibres C. Ce mécanisme dépend de l'activation de récepteurs NMDA, qui provoquent des potentiels postsynaptiques longs (quelques ms), ainsi que d'autres peptides libérés par les fibres C tels que la substance P (Sandkuhler 2009). C'est un phénomène physiologique, mais qui peut être affecté lors de douleurs chroniques par des mécanismes d'amplification tels que la LTP ou l'augmentation d'excitabilité. Par exemple chez les patients atteints de fibromyalgie, les phénomènes de *wind-up* sont augmentés (Price, Staud et al. 2002).

- **LTP**

C'est un modèle de plasticité synaptique qui provoque l'augmentation à long terme, réversible, du rendement d'une synapse (fig.35). Ainsi, ce phénomène pourrait participer à l'amplification des messages douloureux, par exemple par une augmentation du déclenchement de potentiels d'action. Dans la moelle épinière, la LTP a été largement décrite entre les fibres C et les neurones de projection de la lamina I (Sandkuhler 2009). Ce phénomène participe à l'hyperalgésie.

Les stimulations à haut fréquence (100Hz *burst* pendant 1s) des racines dorsales recrutant les fibres C provoquent la LTP des synapses glutamatergiques des neurones de projection NK1R de la lamina I (Ikeda, Heinke et al. 2003). De manière intéressante, cette LTP est calcium dépendante, puisqu'elle impliquerait des canaux calciques sensibles à l'inhibition par les ions nickel. Toutefois, les fibres C ne déchargent pas à ces fréquences élevées, puisque dans des modèles de douleur inflammatoire ou neuropathiques, leur fréquence de décharges oscille entre 1-10Hz. Les stimulations à basse fréquence (2Hz) des fibres afférentes C provoquent aussi la LTP, mais seulement dans les synapses glutamatergiques des neurones NK1R+ de la lamina I (Ikeda, Heinke et al. 2003) projetant vers la PAG et pas vers le noyau PB (Ikeda, Stark et al. 2006, Drdla and Sandkuhler 2008). Ces neurones de projection sont aussi la cible d'une forme de LTP chimique, calcium dépendante, provoquée par la cessation d'une stimulation par un

agoniste μ , *in vitro* et *in vivo* (Drdla, Gassner et al. 2009). Des mécanismes antagonistes ont été mis en évidence. Dès 1998, il était clair que la stimulation à haute fréquence du nerf sciatique recrutant les fibres A δ provoquait une LTD de la transmission glutamatergique des fibres C dans la lamina I (Liu, Morton et al. 1998). Par ailleurs, les stimulations à haute fréquence des racines dorsales provoquent une LTP hétérosynaptique des synapses GABAergiques des neurones de projection de la lamina I (Fenselau, Heinke et al. 2011). Plus intéressant au plan clinique, de courtes applications d'agonistes μ provoquent une dépotentiation, calcium dépendante, GABA indépendante, des synapses glutamatergiques des neurones de projection renforcée par stimulation haute fréquence des fibres C, *in vitro* et *in vivo* (Drdla-Schutting, Benrath et al. 2012). On peut faire l'hypothèse que la transmission nociceptive aigüe, fidèle en amplitude et en durée, repose sur le fonctionnement équilibré de ces différents mécanismes. Il n'existe pas de descriptions aussi précises concernant les interneurons de la lamina II. Néanmoins, une dépression de longue durée peut être provoquée par l'activation de fibres afférentes primaires à bas seuil sur la transmission glutamatergique de fibres C sur des neurones de la lamina II (Sdrulla, Xu et al. 2015). Cette dépression est observée après des conditionnements à haute fréquence, et pas à basse fréquence, ce qui suggère que des mécanismes de régulation sont en place, peut-être activés conjointement, qui régulent le seuil de cette dépression synaptique.

En plus des stimulations électriques, des LTP ont été aussi décrites suite aux transections aigües du nerf sciatique dans les fibres C (Zhang, Zhou et al. 2004), à des injections sous-cutanées de capsaïcine, provoquant la douleur (Ikeda, Stark et al. 2006) ou à des applications spinales de molécules, telles que le BDNF dont les niveaux sont augmentés durant la douleur chronique. Ainsi, les lésions nerveuses ou la libération de facteurs neurotrophiques sont capables de renforcer l'efficacité synaptique à long terme, suggérant bien que la LTP serait un mécanisme crucial dans la mise en place et/ou la maintenance des douleurs chroniques.

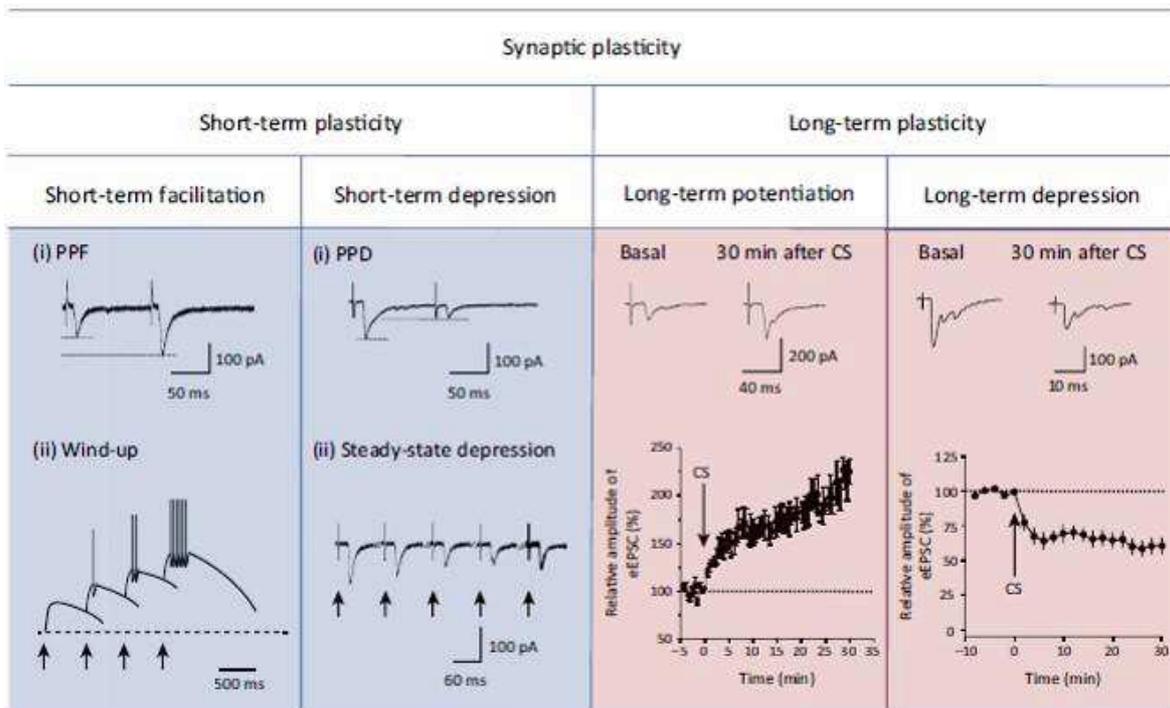


Figure 36. Types de plasticité synaptique. Les voies nociceptives subissent différents types de plasticité synaptique à court ou long terme selon l'intensité, la fréquence et la durée de l'activité. Parmi les mécanismes de facilitation à court terme, on trouve la PPF (*Paired-pulse facilitation*) et le phénomène de *wind-up*. Parmi les phénomènes de dépression, on trouve la PPD (*Paired-pulse depression*) et *steady-state* dépression, provoqué par des stimulations à fréquence constante. D'après (Luo, Kuner et al. 2014).

C. Plasticité intrinsèque des neurones spinaux

Les propriétés passives des neurones participent à la transmission de l'excitation par les neurones, et peuvent changer lors de douleurs chroniques. Les changements à long terme de l'excitabilité de la membrane sont appelés plasticité intrinsèque. Parmi les mécanismes impliqués, on trouve des changements de seuil pour le potentiel d'action et des changements des motifs de décharge. Ces changements, provoqués par des augmentations d'expression de canaux sodiques et/ou des diminutions de canaux potassiques, ont été observés dans différents modèles de neuropathies (Hu, Glauner et al. 2003). Par contre, ces changements ne sont pas systématiquement mis en évidence (Balasubramanyan, Stemkowski et al. 2006).

D. Modifications de fibres sensorielles non nociceptives

L'activation et la stimulation des fibres A β non nociceptives peuvent provoquer des sensations de douleur dans des conditions pathologiques. Ce phénomène est très caractéristique de douleurs neuropathiques et contribue à l'allodynie mécanique, dont les causes sont variées.

Des études de marquages avec la toxine botulinique suggéraient que, dans des conditions pathologiques, les fibres A β peuvent développer de nouvelles collatérales d'axone faisant synapse avec les neurones des lamina I et II (Mannion, Doubell et al. 1996). Parmi les mécanismes inducteurs à l'origine de ces remodelages, on trouve l'action des cytokines libérées par la microglie et les astrocytes, ainsi que le BDNF libéré par les neurones NGF+ (Soril, Ramer et al. 2008). Par contre, des études plus récentes affirment que ce phénomène est très limité (Bao, Wang et al. 2002, Hughes, Scott et al. 2003). Un autre mécanisme peut impliquer un changement de phénotype des fibres A β . Des études montrent qu'elles exprimeraient la substance P (pro-nociceptive) dans différents modèles de neuropathie (Marchand, Wurm et al. 1994, Noguchi, Dubner et al. 1994), mais pas dans tous (Hughes, Scott et al. 2007). Une autre explication propose le démasquage de circuits poly-synaptiques préexistants qui connectent les fibres A β et les neurones nociceptifs des laminae I et II (Baba, Doubell et al. 1999). Ces circuits ont été décrits récemment (Lu, Dong et al. 2013).

Des études récentes ont montré que les fibres sensorielles de type C-LTMR provoquent également des douleurs en condition pathologique (Seal, Wang et al. 2009, Delfini, Mantilleri et al. 2013).

E. Glie

Suite aux lésions nerveuses, la microglie s'active ainsi que les astrocytes. Des nombreux travaux ont montré son implication dans les douleurs chroniques. L'activation de la microglie suite aux neuropathies provoque l'altération d'expression de récepteurs tels que le P2X4R, qui est impliqué dans l'allodynie mécanique (Tsuda 2017). La microglie libère aussi des chemokines telles que la fractalkine pouvant induire des comportements d'hyperalgésie mécanique et thermique (Milligan, Zapata et al. 2004).

F. Autres

Les lésions qui amènent aux douleurs chroniques provoquent des changements épigénétiques, tels que l'acétylation et la méthylation d'histones. Ces modifications provoquent des changements d'expression de gènes et de la fonction neurale qui pourraient causer les symptômes observés chez les patients (Descalzi, Ikegami et al. 2015). Toutefois, ces remodelages sont probablement secondaires aux mécanismes évoqués ci-dessus. Par contre, des marques épigénétiques préalables pourraient expliquer certaines prédispositions à la douleur chronique, en potentialisant certains des mécanismes évoqués ci-dessus.

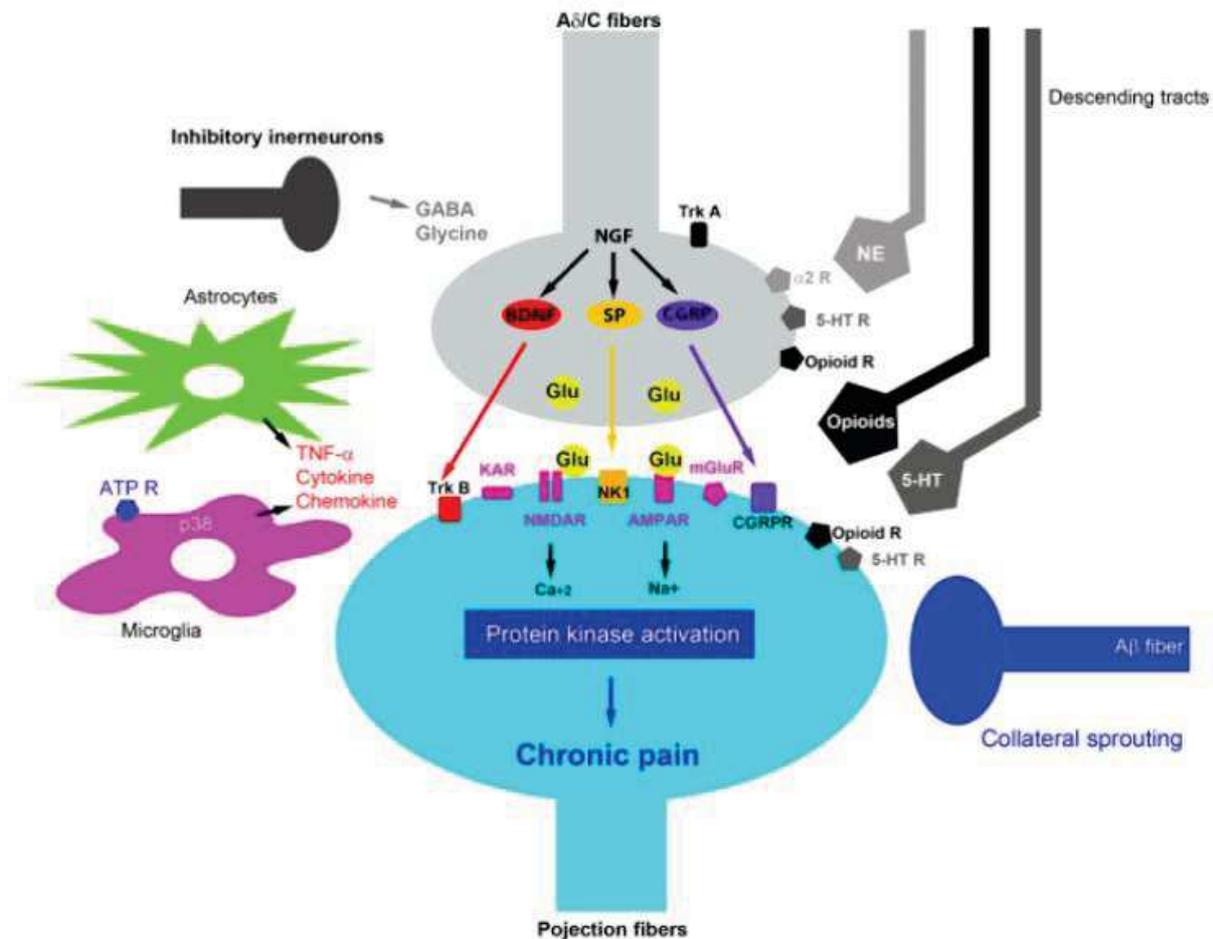


Figure 37. Schéma des principaux mécanismes impliqués dans l'établissement de douleurs chroniques dans la moelle épinière. Les projections descendantes noradrénergique, sérotoninergique et opioïdérique agissent sur les afférences primaires et sur les interneurones. L'activation des astrocytes et de la microglie provoque une libération de chemokines. Les fibres sensorielles libèrent des neuropeptides (SP et CGRP) et des facteurs « de croissance », tels le BDNF, qui agissent sur des récepteurs présents sur les interneurones et les neurones de projection. Les voies de signalisation de différents récepteurs sur les neurones de la moelle épinière provoquent l'activation de protéines kinases qui participent à l'établissement de douleurs chroniques. D'après (Thomas Cheng 2010).

5. Traitements

La prise en charge des douleurs chroniques est très compliquée. Actuellement, il existe un déficit de traitements efficaces pour un grand nombre de patients. Ceci est dû, en partie, aux différentes étiologies: la douleur peut être une conséquence d'autres maladies comme le cancer, ou bien être un dysfonctionnement des voies nociceptives, ou de réseaux impliqués dans la cognition au sens large. D'autre part l'évaluation de l'intensité des douleurs reste encore très subjective. Dans la plupart des cas, le ressenti du patient est le principal aspect pris en compte. Des méthodes plus objectives se développent pour mieux caractériser les douleurs, comme par

exemple des enregistrements électrophysiologiques qui corrélient les décharges des neurones avec la sensation subjective des douleurs.

5.1- Traitements pharmacologiques

La pharmacopée pour traiter les douleurs est très ancienne. La plupart des cultures antiques traitaient déjà la douleur avec de substances telles que les opiacées. Il est paradoxal que les antalgiques les plus efficaces de nos jours soient des dérivés de ces molécules utilisées depuis des siècles. Malgré les efforts des dernières années, peu de nouvelles molécules ont émergé (fig.39). Dans la plupart de cas, il y a eu des reformulations de médicaments existants ou des réutilisations. Les principales limitations des traitements chroniques restent néanmoins : la faible efficacité, avec le développement de résistances aux traitements, et les effets indésirables. Les antalgiques sont spécialement insuffisants pour les douleurs dysfonctionnelles et certaines neuropathies.

Parmi les principaux antalgiques des douleurs chroniques on trouve (fig.38) :

A. Morphine et dérivés

Ce sont les plus anciens analgésiques, et les plus utilisés pour les douleurs fortes. Ils agissent sur des récepteur opioïdes Mu1, Mu2, Kappa et Delta qui se trouvent tout le long du système nerveux. Les effets analgésiques sont dus au blocage du passage de l'influx du neurone de premier ordre aux neurones de second ordre, au renforcement des influences suprasegmentaires descendantes ou à une modulation de l'intégration au niveau thalamique (Burgess and Williams 2010). Ils présentent des effets analgésiques très forts, mais aussi beaucoup d'effets indésirables, parmi lesquels la constipation, le risque d'addiction et la dépression respiratoire. Les agonistes des récepteurs Mu provoquent les meilleurs effets analgésiques, mais ces effets sont inséparables des effets de dépression respiratoire. On trouve des opioïdes forts : les agonistes « purs » Mu (morphine, fentanyl, hydromorphone) et des agonistes modérés avec actions analgésiques moins fortes que la morphine (codéine ou tramadol).

B. Antidépresseurs

Ils modulent les voies descendantes noradrénergique et sérotoninergique qui contrôlent les mécanismes d'inhibition de la douleur. Ils sont efficaces pour des pathologies douloureuses qui affectent le système nerveux central telles que la fibromyalgie (Lee, Nassikas et al. 2011). On trouve des inhibiteurs de la recapture de la sérotonine et de la noradrénaline (SNRI : *Serotonin*

Norepinephrine Reuptake Inhibitors), qui augmentent la quantité d'amines endogènes présentes à la synapse.

C. Antiépileptiques

La pregabalin (Lyrica) et son prédécesseur la gabapentin se lient à la sous-unité $\alpha 2\delta$ des canaux calciques à haut seuil. De ce fait, ils diminuent l'excitabilité des fibres nerveuses. Ces médicaments sont efficaces dans certaines douleurs neuropathiques et dans la fibromyalgie, mais seulement avec une diminution partielle des douleurs (Moore, Wiffen et al. 2014).

D. NSAID (Non-steroidal antiinflammatoires)

On trouve l'ibuprofène et l'aspirine. Ces molécules sont des anti-inflammatoires qui agissent bloquant l'enzyme cyclooxygénase (COX), qui est impliquée dans la production de molécules proinflammatoires tels que la prostaglandine E2 (PGE2).

E. Autres

Les blocs anesthésiques avec la lidocaïne, un bloqueur des canaux sodiques, sont aussi utilisés pour traiter les douleurs. Des analgésiques impliquant le système canabinoïde tels que Sativex, qui contient du THC et du cannabidiol, semblent être efficaces pour traiter les douleurs neuropathiques (Nurmikko, Serpell et al. 2007).

Les nouveautés en ce qui concerne le mécanisme d'action impliquent les récepteurs TRPV1 et les canaux calciques de type N. Ainsi, des crèmes cutanées avec 8% de capsaïcine, un agoniste de récepteurs TRPV1, sont utilisées pour soulager par désensibilisation, les douleurs périphériques (Irving, Backonja et al. 2011). Le Prialt contient le ziconotide, un peptide synthétique provenant du *Conus magus*, qui bloque les canaux calciques de type N et donc la transmission à la première synapse de la voie douloureuse. Il est pourtant un analgésique très efficace. Par contre, il doit être injecté de façon intrathécale, ce qui limite son utilisation. D'autres pistes thérapeutiques concernent des molécules mixtes, telles que le tramadol qui a un effet sur les récepteurs opioïdes Mu et un effet inhibiteur sur la recapture de la noradrénaline et de la sérotonine.

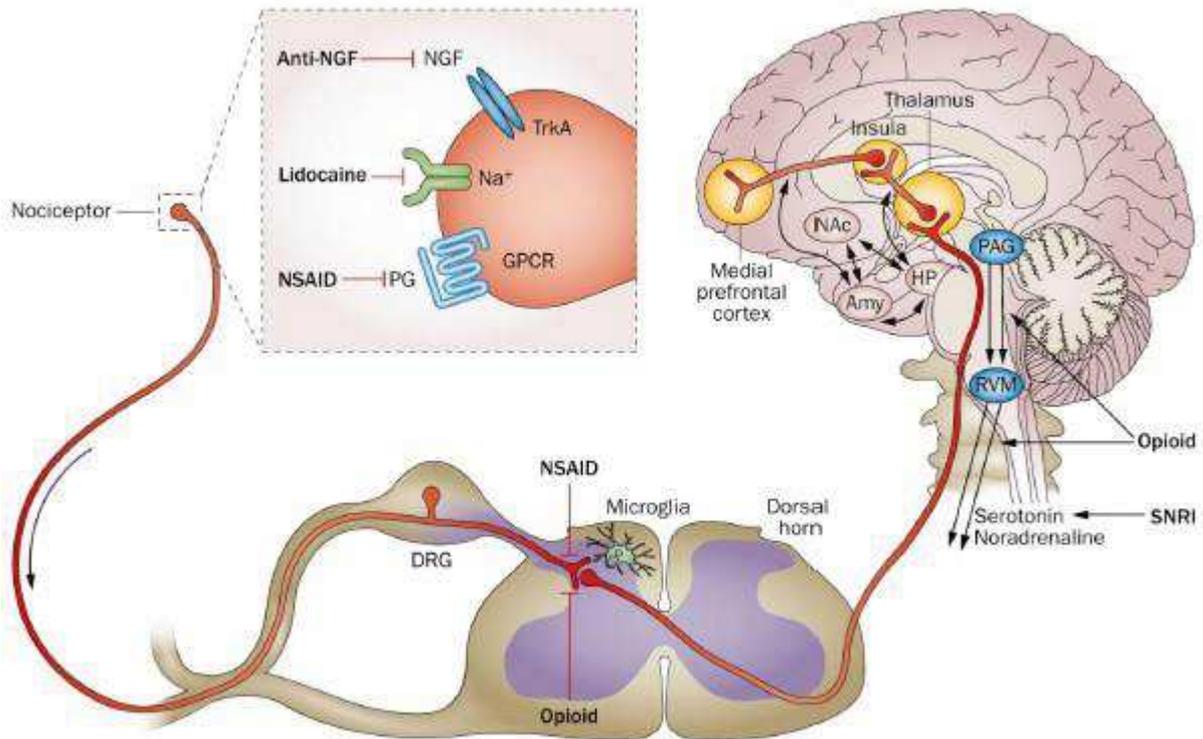


Figure 38. Site d'action des principaux analgésiques. Certains analgésiques tels que la lidocaïne, NSAID et anti-NGF, agissent dans la périphérie sur des récepteurs ou canaux ioniques exprimés dans les nocicepteurs. Les prostaglandines participent aussi à la sensibilisation centrale, et donc les NSAID ont aussi un rôle au niveau central. Les opioïdes agissent au niveau spinal entre les synapses des afférences primaires et neurones spinaux et en recrutant des voies descendantes inhibiteuses. Les inhibiteurs de la recapture de la sérotonine et la noradrénaline (SNRI) agissent sur les voies descendantes inhibitrices. Amy : amygdale, RVM : rostral ventromedial medulla, PAG : peri-aqueductal grey, PG : prostaglandines, SNRI : serotonin-noradrenaline reuptake inhibitor, NGF : nerve growth factor, HP : hippocampe ; NAc : noyau accumbens, GPCR : G-protein-coupled receptor. D'après (Malfait and Schnitzer 2013).

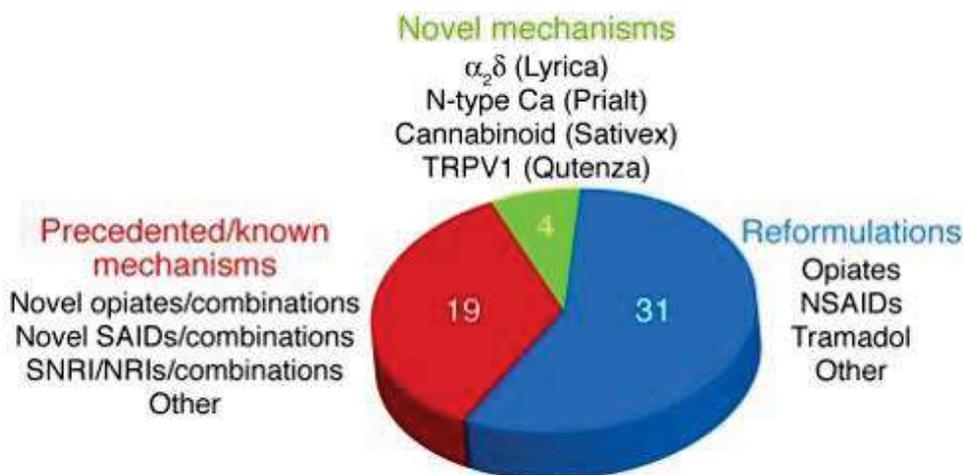


Figure 39. Nouveaux analgésiques commercialisés depuis 1990. La plupart des nouveaux analgésiques sont des reformulations de médicaments existants (bleu) et des réutilisations de médicaments (rouge). SAID : Steroidal antiinflammatory, NRI : norepinephrine reuptake inhibitor. D'après (Burgess and Williams 2010).

5.2.-Traitements non pharmacologiques

Il existe aussi des nombreux traitements non médicamenteux. On trouve des approches chirurgicales pour traiter des pathologies comme la névralgie du trijumeau par électrocoagulation. Il existe aussi des techniques de stimulation des nerfs périphériques, médullaires, du thalamus ou du cortex cérébral. Ces méthodes sont efficaces seulement si la structure ciblée n'est pas détruite. Ces techniques sont variées, allant des neurostimulations transcutanées, aux implantations d'électrodes, en passant par les thérapies psychologiques, qui s'appuient sur l'aspect émotionnel ou affectif de la douleur.

5.3.-Avenir

Les avancées dans la compréhension des mécanismes et changements produits lors de l'installation des douleurs chroniques ont permis de suggérer de nouvelles cibles thérapeutiques. Parmi ces cibles, on peut souligner les canaux ioniques tels que les sodiques Nav1.7 et les canaux T, et des facteurs neurotrophiques tels que NGF. Des anticorps monoclonaux dirigés contre le NGF (Tanezumab) semblent être efficaces pour des douleurs telles que l'osteoarthrite.

D'autres pistes cherchent des molécules activant des voies intracellulaires spécifiques. Cela impliquerait, des agonistes '*biased*' qui activent seulement les voies qui provoquent l'effet analgésique, et non celles responsables des effets indésirables.

Il est aussi important de promouvoir des études qui visent à mieux caractériser les patients ainsi que leur environnement et leur histoire individuelle.

INTRODUCTION

Troisième partie :

Canaux calciques à bas seuil

1. Découverte des canaux calciques dépendants du voltage

Le potentiel d'action fut décrit dans l'axone géant de calamar (Hodgkin and Huxley 1952)(fig.40). Leur modèle proposait que l'excitation de la membrane génère une entrée des ions sodium (Na^+), qui rend positif le potentiel de membrane. Des ions potassiques (K^+) sortent ensuite de la cellule, permettant au potentiel de redevenir négatif. Ce processus long de quelques millisecondes se propage tout le long de l'axone. Ces travaux ont permis aussi la description de la perméabilité et des dynamiques de ces différentes conductances et de conclure que les canaux sodiques devaient s'activer et s'inactiver rapidement, alors que les canaux potassiques s'activaient lentement et ne s'inactivent pas de manière significative.

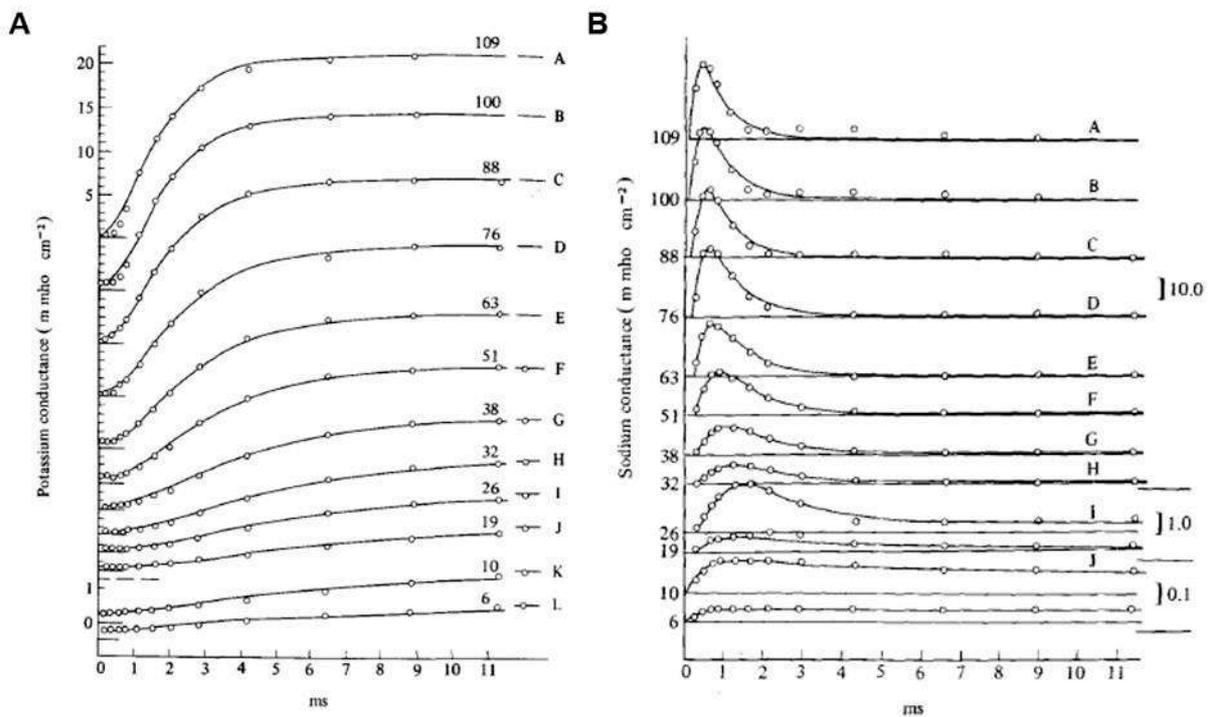


Figure 40. Activation des conductances potassiques et sodiques selon la dépolarisation. (A-B). Enregistrements de courants potassiques (A) et sodiques (B) dans un axone évoqués avec différents niveaux de dépolarisation (numéro de mV sur chaque courbe). Notez que les conductances potassiques s'activent plus tard que les sodiques. Les conductances sodiques sont transitoires, avec une inactivation rapide alors que les conductances potassiques ne s'inactivent pas. D'après (Hodgkin and Huxley 1952).

Peu de temps après, une autre équipe décrivait un potentiel d'action dans le muscle de crabe qui ne dépendait pas du sodium (Fatt and Katz 1953). Ils proposèrent alors que le calcium soit l'ion responsable de la dépolarisation (Fatt and Ginsborg 1958). En effet, la perméabilité au calcium augmente pendant le potentiel d'action dans le muscle de *barnacle* (Hagiwara and Naka 1964). Ces mêmes auteurs distinguèrent deux courants calciques selon leur sensibilité au potentiel sur l'œuf d'étoile de mer (Hagiwara, Ozawa et al. 1975) : un courant de type I activé à des potentiels proches du potentiel de repos et un courant de type II activé par de plus fortes

dépolarisations. L'identification de deux courants dans le système nerveux central fut réalisée avec la technique de patch clamp en cellule entière sur des neurones sensoriels de poulet et de rat, (Carbone and Lux 1984, Carbone and Lux 1984)(fig.41). Ces auteurs proposèrent d'appeler ces courants selon leur potentiel d'ouverture : courants activés à haut seuil (HVA : *High Voltage Activated*) ou activés à bas seuil (LVA : *Low Voltage Activated*).

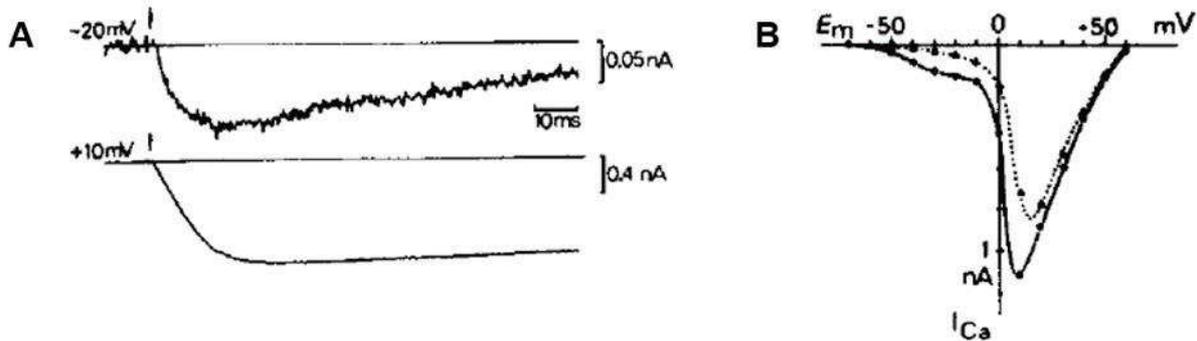


Figure 41. Courants calciques à bas et haut seuil. Enregistrement de patch clamp en cellule entière des neurones de la racine dorsale de poulet. **(A).** Traces de courants calciques dans la même cellule suite à une stimulation depuis -90mV jusqu'à -20mV ou $+10\text{mV}$. La trace d'en haut correspond aux courants calciques à bas seuil et celle d'en bas aux courants à haut seuil. Notez l'inactivation de ce courant à bas seuil. **(B).** Courbe de la relation courant-potentiel à partir d'un potentiel de repos de -90mV (ligne noire) ou -60mV (ligne pointillée) des courants calciques. Les courants LVA sont inactivés par le potentiel de repos de -60mV . Avec un potentiel de repos de -90mV , les courants LVA et HVA se superposent (Carbone and Lux 1984).

2. Diversité des canaux calciques voltages dépendants

Les techniques de patch clamp couplées à l'utilisation de bloqueurs spécifiques, notamment de toxines, permirent l'isolement de nombreuses conductances calciques. Ainsi, on distingue des courants à haut seuil de type L, P, Q, R et N et des courants à bas seuils de type T. Les courants de type L pour ses grandes conductances (*Large*) de longue inactivation (*Long Lasting*), s'expriment principalement dans les cellules musculaires et endocrines. Ils sont bloqués par les dihydropyridines (DHP), benzothiazépines et phénylalkilamines. Les courants de type P/Q furent découverts dans les cellules de Purkinje du cervelet et sont bloqués par de ω -agatoxines. Les courants de type N présentent des courants intermédiaires entre les types L et T (*Neither T nor L*). Ils sont bloqués par des ω -conotoxines. Les courants de type R sont résistants (*Resistant*) à l'inhibition par la première génération de toxines connues. Les courants N, P/Q et R sont exprimés majoritairement dans les neurones, où ils participent notamment à la neurotransmission. Les courants de type T ont de petites conductances et une inactivation rapide (*Tiny and Transient*).

Type de courant	L	N	P	Q	R
Seuil d'activation	-30mV	-30mV	-40mV	-40mV	-40mV
Inactivation	-60 à -10mV	-120 à -30mV			-100 à -40mV
Taux d'inactivation	>500ms	50-500ms	>500ms	50-500ms	20-40ms
Durée d'ouverture	0.5-10ms	0.5-0.7ms	<1ms		
Bloqueurs	DHP, PAA, BTZ	ω -conotoxine GVIA	ω -agatoxine IVA	ω -agatoxine IVA	SNT-482, Nickel

Table 1. Propriétés électrophysiologiques et pharmacologiques des différents courants calciques à haut seuil. DHP : dihydropyridines, PAA : phénylalkylamines, BTZ : benzothiazépines

La définition pharmacologique a cependant ses limites. Par exemple, pour isoler les courants de type Q, il est nécessaire de bloquer au préalable les courants de type P et N. De plus, la sélectivité des toxines n'est plus assurée quand des concentrations élevées doivent être utilisées. D'autre part, la variabilité de propriétés des courants enregistrés suggérait l'existence d'une diversité bien supérieure de canaux ioniques. Effectivement, les travaux de biologie moléculaire ont montré l'existence de 10 gènes codant pour la sous-unité principale des canaux calciques dépendants du voltage α_1 . Ces gènes sont appelées CACNA1x. Ainsi, les gènes CACNA1S, C, D et F codent pour les canaux Cav1.1-1.4 qui appartiennent à la famille de type L. Les gènes CACNA1A, B et E codent les canaux Cav2.1 (P/Q), Cav2.2 (N) et Cav2.3 (R). Le fait que la même sous-unité Cav2.1 code pour deux types de courants (P et Q) résulte d'un épissage alternatif (Bourinet, Soong et al. 1999). Finalement, les gènes CACNA1G, H et I codent les canaux de type T Cav3.1, Cav3.2 et Cav3.3 respectivement (Cribbs, Lee et al. 1998, Perez-Reyes, Cribbs et al. 1998). Ces études montrent aussi que les canaux activés à bas seuils (type T) sont très éloignés des canaux HVA (fig.42).

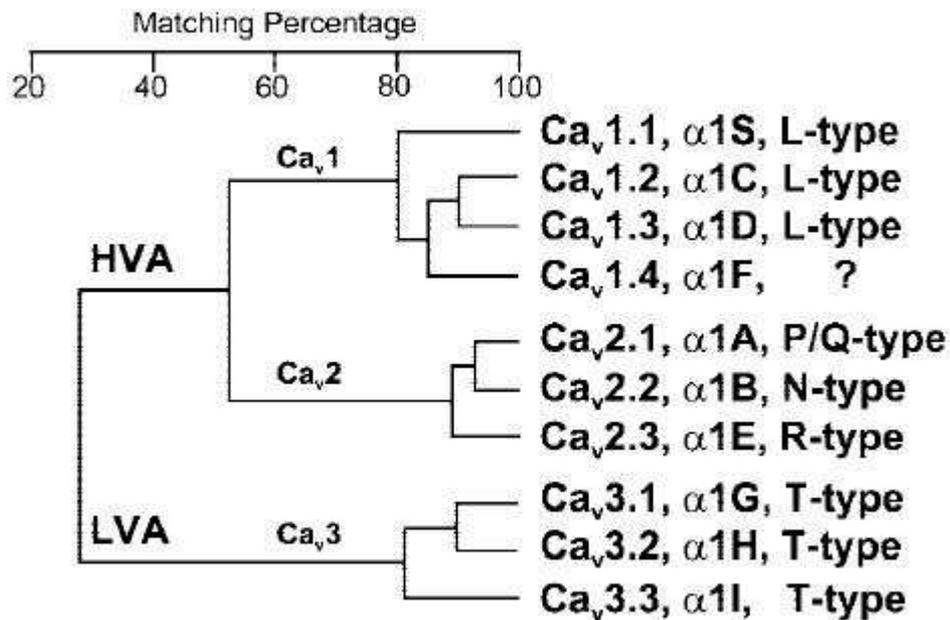


Figure 42. Similarité de séquences des sous-unités $\alpha 1$ des canaux calciques dépendants du potentiel. Alignement de séquences d'acides aminés des segments transmembranaires des canaux calciques humains dépendants du voltage. Les canaux calciques à bas seuil auraient divergé d'un canal calcique ancestral avant la bifurcation des canaux haut seuil en Cav1x et Cav2x. D'après (Perez-Reyes 2003).

La variabilité de ces canaux est aussi augmentée par l'épissage alternatif. Ces variantes peuvent par exemple augmenter l'expression à la membrane avec l'augmentation conséquente de conductance ou provoquer des changements dans la perméabilité, altération des cinétiques d'activation et d'inactivation (Zamponi, Striessnig et al. 2015). Ces variants d'épissage peuvent être spécifiques de types cellulaires, de régions anatomiques, et être régulés lors du développement.

3. Structure des canaux calciques dépendants du potentiel

L'isolement biochimique de canaux de type L à partir du muscle squelettique permis la découverte de 4 protéines : $\alpha 1$, $\alpha 2\delta$, β et γ . (Borsotto, Barhanin et al. 1984). La sous unité $\alpha 1$ fut considérée comme responsable du pore car elle est le site de liaison des DHP, inhibiteurs des courants de type L. Les autres sous-unités sont considérées auxiliaires. De même que pour les sous-unités $\alpha 1$, de nombreux gènes codant pour différentes sous-unités auxiliaires ont été identifiés.

Les sous-unités auxiliaires interagissent directement et de façon stable avec la sous-unité $\alpha 1$ de canaux HVA. Ces sous-unités modulent entre autre les propriétés biophysiques et/ou le trafic

de la sous-unité α_1 . Ainsi, les canaux à haut seuil ont besoin des sous-unités $\alpha_2\delta$ et β pour s'exprimer à la membrane et former des canaux fonctionnels. Des études plus récentes ont montré que ces sous-unités interagissent avec d'autres partenaires tels que des protéines régulant des processus cellulaires. Des dysfonctionnements, ou des mutations de ces sous-unités sont impliqués dans plusieurs pathologies comme la migraine et l'épilepsie.

La sous-unité principale α_1 est formée par quatre domaines transmembranaires de six segments transmembranaires chacun, reliés entre eux par des boucles intracellulaires (fig.43). Les extrémités amino- et carboxy-terminales sont intracellulaires. Le pore est formé par les boucles entre les segments S5 et S6 de chaque domaine. La sensibilité au voltage se situe dans les segments S1 à S4, grâce à une séquence d'acides aminés chargés positivement alternés avec des acides aminés hydrophobes. La présence de résidus glutamate (EEEE) dans les segments S5 et S6 représente le filtre de sélectivité au calcium pour les canaux HVA. Les canaux LVA ont 2 résidus glutamate et 2 résidus aspartate (EEDD). Cette sous-unité a une homologie d'environ 30% avec les sous-unités α_1 de canaux sodiques. L'analyse d'homologie de séquences entre les différences canaux calciques montre des fortes homologies entre les segments transmembranaires, mais faibles au niveau des régions intracellulaires. Ceci suggère que ces canaux subissent des régulation/modulations intracellulaires sélectives.

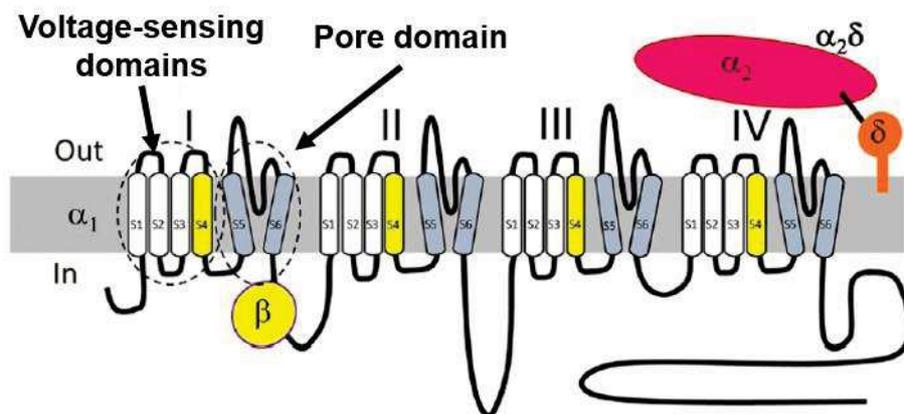


Figure 43. Schéma de la structure de la sous-unité α_1 du canal calcique dépendant du potentiel. Les segments S5-S6 forment le pore du canal et les segments S1-S4 forment le domaine sensible au voltage. Les sous-unités auxiliaires β et $\alpha_2\delta$ se lient à la sous-unité principale α_1 et participent à l'adressage à la membrane des canaux HVA. D'après (Zamponi et al 2015).

A la différence des canaux HVA, les sous-unités α_1 des canaux LVA n'ont pas besoin de sous-unités auxiliaires pour leur adressage à la membrane. Ils ne présentent pas le site BID (BID : *Beta subunit Interacting Domain*) pour lier la sous-unité régulatrice β (Perez-Reyes 2003). Par

contre, des études *in vitro* montrent que leur coexpression avec des sous-unités auxiliaires peuvent modifier les propriétés du courant T. Par exemple, la coexpression de sous-unités $\alpha 1$ du canal Cav3.1 avec la sous-unité γ_6 diminue la densité du courant T (Hansen, Chen et al. 2004), alors que la coexpression avec $\alpha 2\delta$ provoque une augmentation du courant Cav3.1 (Dolphin, Wyatt et al. 1999).

4. Propriétés biophysiques des canaux T

Les canaux LVA se différencient des canaux HVA par leur activation à des potentiels plus négatifs. Leur nom « type T » fait aussi référence à deux caractéristiques qui les différencient des autres : une faible conductance unitaire (*Tiny*) et une inactivation rapide (*Transitoire*). Le clonage de trois canaux appartenant à cette famille (Cav3.1, Cav3.2 et Cav3.3) a permis d'étudier plus en détail les propriétés biophysiques de chaque sous-type, *in vitro*. En général, ces études menées dans des systèmes d'expression hétérologue confirment les résultats obtenus sur des canaux natifs (Perez-Reyes 2003)(fig.44).

A. Activation

Leur seuil d'activation se situe entre -75 et -60mV. Des potentiels plus négatifs sont retrouvés dans des enregistrements en tranche de tissus, où le contrôle du voltage membranaire est généralement imprécis (Perez-Reyes 2003). Les potentiels de demi-activation (V_{50}) se situent à -60 et -40mV selon le type d'enregistrement, avec peu de variations entre les trois sous-types. La cinétique d'activation dépend du voltage, avec des constantes de temps (τ_{act}) qui diminuent avec les dépolarisations. Ainsi, pour des potentiels proches du seuil d'activation, $\tau_{act} = 8-15ms$, alors qu'au potentiel d'activation maximale (-20mV), $\tau_{act} = 1-2ms$. De manière intéressante, les canaux Cav3.1 et Cav3.2 présentent des cinétiques d'activation plus rapides que les canaux Cav3.3, *in vitro*.

B. Inactivation

Le potentiel de demi-inactivation se situe entre -80 et -60mV. La constante de temps d'inactivation (τ_{inact}) diminue aussi avec la dépolarisation. Ainsi, l'inactivation est lente aux potentiels proches du potentiel de repos (-60mV), avec des constantes $\tau_{inact} \approx 50-100ms$. Pour des potentiels où l'activation est maximale (-40mV), ces valeurs diminuent à $\tau_{inact} \approx 10-20ms$. Les canaux Cav3.1 et Cav3.2 présentent aussi des cinétiques d'inactivation plus rapides que les canaux Cav3.3, qui peuvent être 6 fois plus importantes. Il a aussi été décrit que les canaux

Cav3.1 peuvent avoir des inactivations plus lentes suite aux longues périodes de dépolarisation (1min) (Hering, Feltz et al. 2004). Elle est due à une réactivation plus lente et à sa sensibilité par le calcium. Ce phénomène est observé pendant l'activité neuronale et illustre l'effet que l'histoire récente du potentiel de membrane peut avoir sur les propriétés des canaux calciques.

C. Réactivation et déactivation

La réactivation est le passage de l'état inactivé à fermé et se distingue de la déactivation, qui est le passage de l'état ouvert à l'état fermé. Les canaux T s'inactivent lors de dépolarisations et se réactivent grâce aux repolarisations de la membrane. Les canaux Cav3.1 ont des cinétiques de récupération plus rapides (~120ms), suivis par les canaux Cav3.3 (~260ms) et Cav3.2 (~450ms). Les cinétiques de fermeture (déactivation) étudiées grâce au protocole de « queue de courant » sont plus lentes que pour les canaux HVA, 2 à 30 fois plus rapides. Ainsi, ces cinétiques de déactivation suggèrent que les canaux T puissent générer des influx calciques significatifs lors de dépolarisations brèves telles que celles provoquées par les événements synaptiques ou des potentiels d'action.

	α_{IG}	α_{IH}	α_{II}	G vs. H	G vs. I	H vs. I
Activation						
$V_{0.5}$ (mV)	-49.3 ± 0.7 (26)	-48.4 ± 1.2 (10)	-41.5 ± 1.1 (17)	n.s.	***	***
Slope (mV)	4.6 ± 0.1 (26)	5.2 ± 0.4 (10)	6.2 ± 0.2 (17)	n.s.	***	*
Inactivation						
$V_{0.5}$ (mV)	-74.2 ± 1.1 (8)	-75.6 ± 0.7 (19)	-69.8 ± 0.9 (17)	n.s.	**	***
Slope (mV)	5.5 ± 0.3 (8)	6.2 ± 0.2 (19)	6.1 ± 0.1 (17)	***	***	n.s.
Activation kinetics						
Rise -40 mV (ms)	4.4 ± 0.2 (20)	5.7 ± 0.2 (9)	33.9 ± 1.4 (31)	*	***	***
Rise +10 mV (ms)	1.2 ± 0.1 (18)	2.1 ± 0.1 (8)	10.5 ± 1.3 (18)	*	***	***
e-fold	14.5 ± 1.2 (17)	11.8 ± 0.8 (9)	14.7 ± 0.8 (29)	n.s.	n.s.	n.s.
Inactivation kinetics						
τ -40 mV (ms)	18.8 ± 1.6 (15)	23.4 ± 0.3 (22)	122 ± 5 (30)	*	***	***
τ +10 mV (ms)	12.6 ± 0.6 (16)	18.2 ± 0.4 (20)	84 ± 3 (32)	*	***	***
e-fold (mV)	10.8 ± 0.9 (16)	6.2 ± 0.6 (11)	9.3 ± 0.6 (26)	**	n.s.	**
Deactivation kinetics						
τ -100 mV (ms)	2.6 ± 0.2 (9)	3.6 ± 0.4 (14)	1.12 ± 0.1 (31)	*	***	***
τ -70 mV (ms)	6.2 ± 0.4 (9)	8.5 ± 1.1 (14)	2.1 ± 0.1 (30)	*	***	***
e-fold (mV)	32.4 ± 2.6 (9)	24.1 ± 1.6 (11)	41 ± 2.6 (30)	n.s.	n.s.	***
τ recovery (ms)	137 ± 5 (12)	448 ± 36 (7)	260 ± 30 (18)	***	**	**

Table 2. Propriétés électrophysiologiques des canaux de type T. Comparaison des paramètres électrophysiologiques des courants calciques des canaux humains Cav3.1, Cav3.2 et Cav3.3 exprimés dans des cellules HEK293. D'après (Chemin, Monteil et al. 2002).

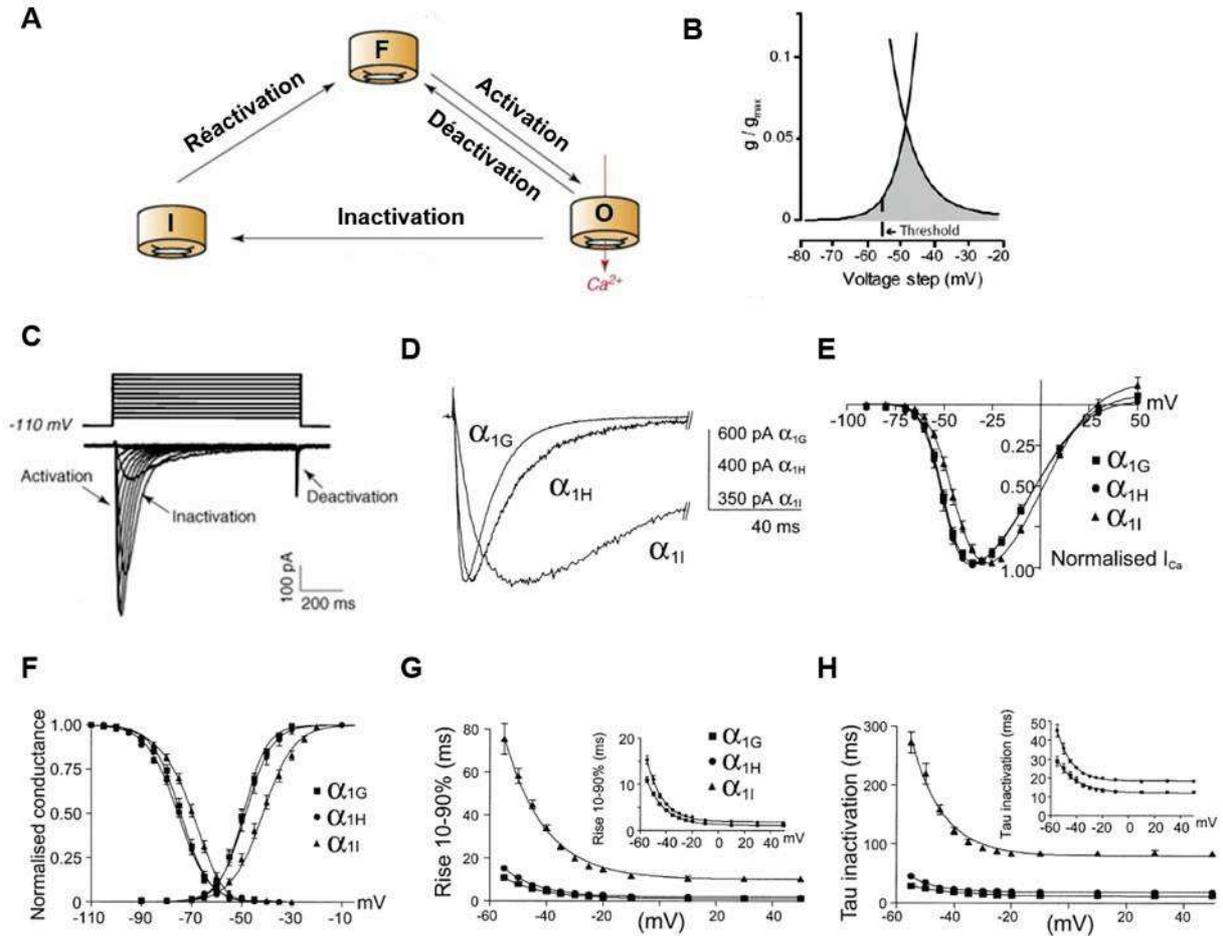


Figure 44. Propriétés électrophysiologiques des canaux T. (A). Schéma des différents états d'un canal calcique: F (fermé), O (ouvert), I (inactivé). (B). Potentiels auxquels les courbes d'activation et inactivation se croisent et provoquent un courant « de fenêtre » (gris). La flèche indique le seuil de déclenchement du potentiel d'action. (C). Courants calciques à bas seuil évoqués depuis -110 mV . (D). Traces de courants maximaux générés par les sous-types humains Cav3.1 (α_{1G}), Cav3.2 (α_{1H}) et Cav3.3 (α_{1I}) à partir d'un potentiel de repos de -110 mV . (E). Courbe courant-voltage pour les trois sous-types de canaux T. Les amplitudes obtenues à chaque voltage sont normalisées par rapport à l'amplitude maximale (environ -35 mV pour α_{1G} et α_{1H} , et -25 mV pour α_{1I}). (F). Courbes d'activation et d'inactivation à l'état stable des trois canaux T. Le croisement des courbes suggère l'existence d'un courant de fenêtre pour chacun des trois. (G). Cinétiques d'activation et (H) d'inactivation des trois canaux T. D'après (Chemin, Monteil et al. 2002).

D. Courant de fenêtre

C'est une propriété singulière des canaux T. Pour une petite gamme de potentiels proche du potentiel de repos, une faible fraction des canaux ouverts ne s'inactive pas, à l'origine d'un courant de fond, le courant de fenêtre (fig.45). Des estimations proposent que moins de 1% des canaux participent à ce courant tonique, et qu'il modifierait l'excitabilité cellulaire en générant une entrée tonique de calcium. Effectivement, la surexpression de canaux Cav3.3 dans une lignée NG108x15 est à l'origine de courants de fenêtre significatifs participant à des activités membranaires oscillatoires et à des variations dynamiques des niveaux calciques

intracellulaires (Chevalier, Lory et al. 2006). Ce courant soutenu pourrait participer à l'excitabilité des neurones, dans le thalamus (Dreyfus, Tscherter et al. 2010) et dans la corne dorsale de la moelle (Prescott and De Koninck 2005). Une modélisation obtenue à partir de propriétés électrophysiologiques d'interneurones spinaux indique aussi que ce courant de fenêtre pourrait prolonger des événements synaptiques excitateurs, et ce, d'autant plus qu'il serait associé à un courant de fenêtre sodique (Prescott and De Koninck 2005).

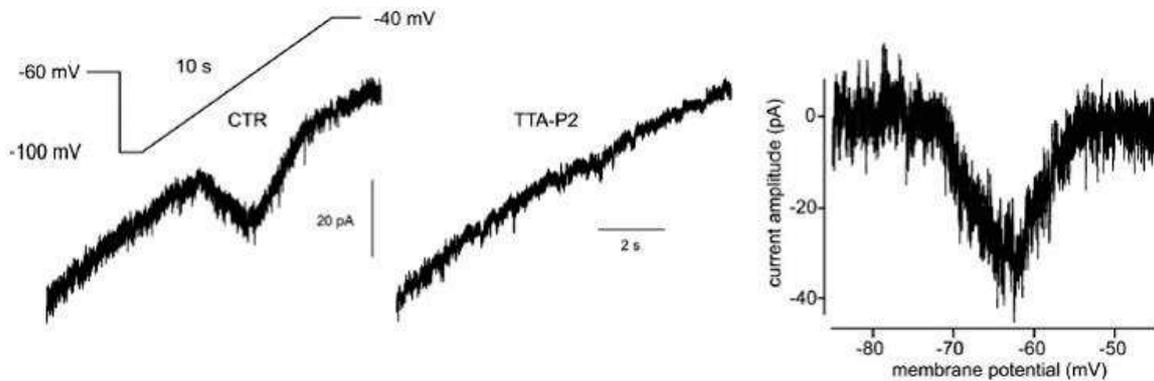


Figure 45. Courant de fenêtre dans un neurone du thalamus. Une dépolarisation en rampe lente depuis -100mV jusqu'à -40mV évoque un courant calcique entrant bloqué par un bloqueur spécifique des canaux T, le TTA-P2. Le courant est observé dans une plage de -70mV à -55 mV, proche du potentiel de repos. D'après (Dreyfus, Tscherter et al. 2010).

E. Rebond

Les propriétés biophysiques des canaux T leur permettent de participer à des dépolarisations rapides et transitoires, appelées « rebond », consécutives à des hyperpolarisations (fig.46). En effet, des inhibitions synaptiques, des activations de canaux potassiques ou de canaux chlorures (éventuellement calcium dépendant) peuvent amener le potentiel de membrane dans des zones où la réactivation des canaux T rendrait ces canaux très susceptibles de participer de manière synchronisée à une dépolarisation ultérieure. L'ouverture transitoire des canaux T, à cause de leur inactivation, provoquerait donc une dépolarisation en rebond, éventuellement suffisante pour provoquer le déclenchement de potentiels d'action en bouffée (décharge à haut fréquence). Les rebonds avec une composante T ont été décrits dans nombreuses structures telles que le thalamus, la moelle épinière et le cervelet (Molineux, McRory et al. 2006, Dreyfus, Tscherter et al. 2010, Ku and Schneider 2011, Deleuze, David et al. 2012, Rivera-Arconada and Lopez-Garcia 2015). Leur implication fonctionnelle sera discutée dans le prochain chapitre.

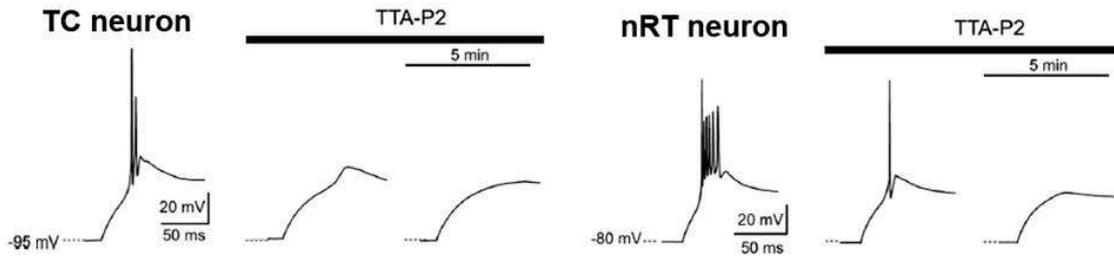


Figure 46. Décharges en rebond de neurones thalamiques. Les neurones TC et nRT du thalamus présentent des décharges en bouffée et des dépolarisations en rebond après une hyperpolarisation de la membrane sensibles aux bloqueurs des canaux LVA le TTA-P2. D'après (Dreyfus, Tscherter et al. 2010).

F. Ouverture des canaux T lors du potentiel d'action

Les premières études furent faites dans des systèmes d'expression hétérologue exprimant des clones de trois sous-types. Ces études ont permis de connaître la participation différentielle de chaque sous-type lors d'un potentiel d'action (fig.47). On observe des courants calciques à partir de la phase de repolarisation pour les trois canaux (Kozlov, McKenna et al. 1999, Chemin, Monteil et al. 2002). Ceci est en relation avec ses cinétiques d'ouverture, plus lentes que celle du potentiel d'action. Les canaux Cav3.3 génèrent des courants qui s'inactivent rapidement et de petite amplitude comparée aux courants induits par les canaux Cav3.1 et Cav3.2. L'amplitude de ces courants diminue avec des potentiels de repos plus dépolarisés, car ils provoquent son inactivation (Kozlov, McKenna et al. 1999). Des études sur la durée de la repolarisation du potentiel d'action montrent que les canaux Cav3.3 sont plus sensibles que les canaux Cav3.1/3.2, avec des courants plus importants et des repolarisations plus longues. Cela est dû probablement à la cinétique d'ouverture plus lente des canaux Cav3.3. Lors d'un potentiel d'action, l'entrée de calcium est plus importante à travers les canaux à bas seuils que celle à travers les canaux hauts seuils (McCobb and Beam 1991). Cela peut s'expliquer par leur ouverture plus rapide, quand la force électrochimique du calcium est plus importante, et aussi par sa déactivation plus lente provoquant de grands courants de queue.

Lors d'une décharge tonique à fréquences $<1\text{Hz}$, les canaux T se mobilisent de façon similaire que lors d'un potentiel d'action unique. Pour des décharges à fréquences $>10\text{Hz}$, les canaux Cav3.1 s'inactivent rapidement provoquant une atténuation des courant entrant. Les courants des canaux Cav3.2 s'amortissent plus lentement. Par contre, les canaux Cav3.3 ont besoin de fréquences $>50\text{Hz}$ pour diminuer. De plus, pour des fréquences entre 50-100Hz, les canaux Cav3.3 génèrent des courants petits et transitoires au début, et puis présentent un processus de

facilitation à partir des 2-3^{ème} potentiels d'action. Les cinétiques de réactivation expliquent ces phénomènes.

Pour résumer, les canaux Cav3.1 et Cav3.2 sont inhibés progressivement par des déclenchements de potentiels d'action à des fréquences supérieures à quelques Hz, et majoritairement inactifs à des fréquences de 20-50Hz. Les Cav3.2 sont plus sensibles aux cadences basses et les Cav3.1 s'inactivent plus rapidement aux rythmes plus élevés. Ainsi, grâce à leurs différences de propriétés biophysiques, chaque canal T participerait de manière originale au profil de décharge.

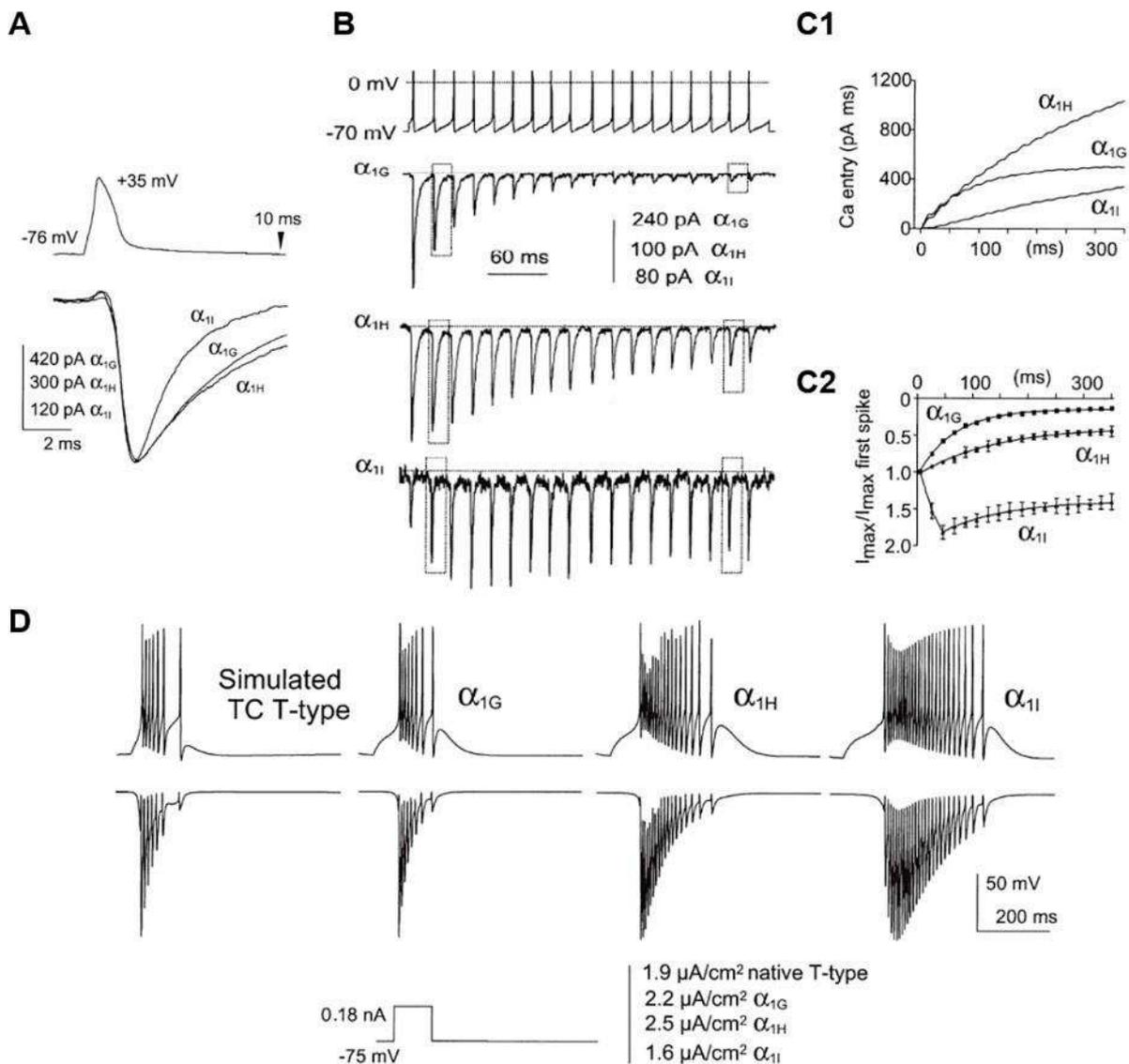


Figure 47. Participation des canaux T aux décharges de potentiels d'action. (A). Courants normalisés des canaux T lors d'un potentiel d'action. Notez que les courants commencent dans la phase de repolarisation du potentiel d'action. **(B).** Courants calciques des canaux T lors d'une décharge

tonique. **(C1)**. Influx calcique initial selon le sous-type de canal T. **(C2)**. Graphe de l'amplitude normalisée de chaque canal T pour chaque potentiel d'action. Notez l'augmentation de courant pour le deuxième et troisième potentiel d'action pour les canaux $\alpha 1H$. **(D)**. Simulations de potentiels membranaires (traces du haut) et de courants d'action (traces du bas) pour un neurone thalamocortical (TC), en remplaçant les paramètres des canaux T natifs par les paramètres de trois canaux T clonés. Les potentiels d'action furent évoqués par une stimulation de 0.18nA de 100ms. Traces de gauche: simulation avec les paramètres des courants T natifs. Les autres sont le résultat des simulations avec les paramètres de chaque canal T. Notez que la superposition des simulations obtenues pour $\alpha 1G$ et celle du canal natif, ce qui valide le modèle puisque les neurones TC expriment seulement les canaux $\alpha 1G$. D'après (Chemin, Monteil et al. 2002).

5. Régulation de canaux T

L'activité des canaux T est régulée par plusieurs mécanismes variés tels que les voies intracellulaires, des modulations d'oxydation-réduction ou la température.

A. Ions divalents

Les ions métalliques divalents inhibent avec une certaine spécificité les canaux T. Les canaux Cav3.2 présentent un résidu histidine H191 dans le domaine I entre les segments S3-S4 qui est modulé par les ions inorganiques comme le nickel et le zinc. Ainsi, grâce à ce résidu, les canaux Cav3.2 sont plus affins pour ces ions que les canaux Cav3.1 ou Cav3.3, et donc inhibés plus fortement (Lee, Gomora et al. 1999). L'ion zinc peut diminuer le pic mais augmenter la densité des courants Cav3.3, car il en ralentit la désactivation (Traboulsie, Chemin et al. 2007).

B. Modulation redox

Les canaux T sont la cible des modulations redox. Des agents réducteurs-chélateurs tels que l'acide aminé endogène L-cystéine, peuvent augmenter l'activité de courants Cav3.2 (Nelson, Joksovic et al. 2005). Par contre, l'effet n'est pas dû à un mécanisme redox classique, mais à la chélation d'ions métalliques capables d'inhiber ces canaux (Nelson, Joksovic et al. 2007). D'autres agents endogènes tels que l'acide ascorbique sont capables d'inhiber les canaux Cav3.2 (Nelson, Joksovic et al. 2007). L'acide ascorbique produit une modification covalente du résidu H191.

C. Neurotransmetteurs : voies de transduction

Beaucoup de neurotransmetteurs et d'hormones sont capables de moduler l'activité des canaux T (fig.48). Dans la plupart de cas, cet effet implique des récepteurs couplés aux protéines G (RCPG). On distingue des effets inhibiteurs des courants T, par la dopamine, les opioïdes, la

neurotensine ou le NPY. D'autres agonistes des RCPG comme l'ATP ou l'endotheline ont des effets activateurs. On trouve également des agonistes tels que l'adrénaline, la sérotonine, la substance P et le GABA qui ont un rôle activateur ou inhibiteur selon le type cellulaire ou espèce étudié (Chemin, Trouboulis et al. 2006). Ces effets sont présents dans les tissus natifs et dans les préparations multicellulaires, ce qui pénalise la dissection des voies moléculaires impliquées. Ils ont été étudiés dans des systèmes d'expression hétérologue. Ainsi, en aval du RCPG, le dimère $G_{\beta\gamma}$ peut inhiber les courants T suite à une interaction directe (DePuy, Yao et al. 2006). Plus en aval encore, les modulations impliquent des protéines kinases, telles que PKA et PKC (Chemin, Mezghrani et al. 2007) ou la PK CamKII (*protein kinase dépendante du complexe Ca/calmodulin II*) (Welsby, Wang et al. 2003).

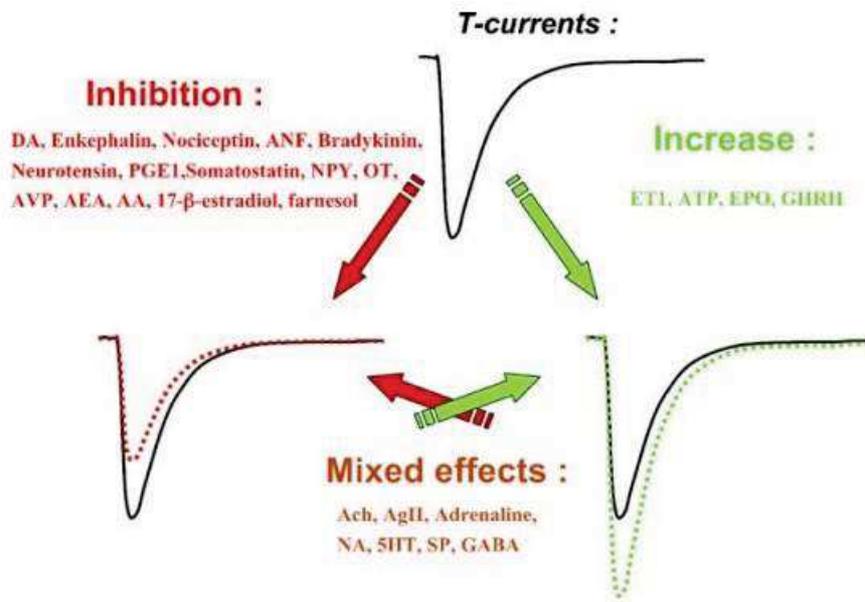


Figure 48. Neurotransmetteurs et hormones modulant les courant T. D'après (Chemin, Trouboulis et al. 2006).

D. Autres modifications

Les canaux T sont sensibles à la température, avec une diminution des constantes d'activation, inactivation et réactivation aux températures physiologiques (Iftinca, McKay et al. 2006). Les canaux T peuvent aussi être inhibés par les acides gras, tels que l'anandamide (Chemin, Nargeot et al. 2007).

Ces canaux subissent aussi des modifications post-traductionnelles dans le réticulum endoplasmique ou dans l'appareil de Golgi. Parmi les mécanismes on trouve des glycosylations qui participent à la variabilité des canaux T. Ainsi, ces modifications peuvent par exemple

modifier le trafic intracellulaire (Weiss, Black et al. 2013). Un autre mécanisme affectant la fonction de canaux T est l'ubiquitination, impliquée dans les processus de dégradation (Garcia-Caballero, Gadotti et al. 2014).

E. Pharmacologie

Les canaux T sont inhibés par beaucoup de molécules organiques de structures différentes et souvent utilisées comme agents pharmacologiques d'autres cibles (fig.49).

Inhibiteurs non spécifiques

Parmi les bloqueurs non spécifiques, on trouve des neuroleptiques comme le Diphenyl-butyl piperidines, un antagoniste des récepteurs D2 dopaminergiques. Il existe aussi des antiépileptiques comment l'éthosuximide, qui bloquent partiellement les canaux T (Perez-Reyes 2003). On retrouve également des agonistes de cannabinoïdes endogènes comme l'anandamide ou artificiels comment le NMP-7 qui modulent les canaux T. Certaines dyhydropyridines comme la nifédipine ou l'énantiomère R(-)flébépidine, connues au début pour leur blocage des canaux L, peuvent aussi inhiber les canaux T.

Le mifépradil était un médicament contre l'hypertension qui bloque les canaux T à des concentrations sous-micromolaires. Il fut retiré pour son interaction avec le cytochrome P450. Par contre, son métabolite actif inhibe aussi d'autres canaux ioniques dont les canaux calciques à haut seuil.

Inhibiteurs spécifiques

Les TTAs sont dérivés des pipéridines, et deux d'entre elles, le TTA-A2 et TTA-P2 sont des forts inhibiteurs à des concentrations de l'ordre nM. Le mode d'action de ces molécules diffère car le TTA-A2 stabilise l'état inactivé, alors que le TTA-P2 inhibe le canal indépendamment de son état (Choe, Messinger et al. 2011, Francois, Kerckhove et al. 2013). Ces drogues sont administrables par voie orale, ce qui a permis leur utilisation pour des études fonctionnelles proches des études chez l'humain.

Le Z944 est un autre bloqueur de canaux T avec un IC₅₀ d'environ 100nM, avec une bonne spécificité (Tringham, Powell et al. 2012).

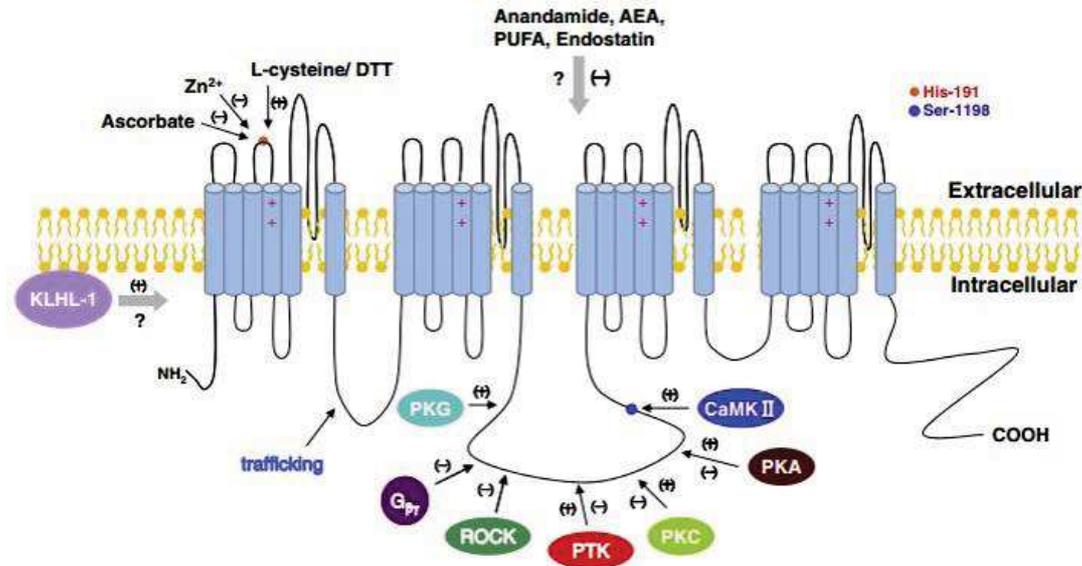


Figure 49. Sites et molécules de régulation des canaux T. L'acide ascorbique, le zinc et la L-cystéine agissent sur l'histidine H191. Les protéines kinases (PKC, PKA, PKG), CamKII (*calmodulin-dependent protein kinase*), protéines $G_{\beta\gamma}$, phospholipase (PLC) et protéine tyrosine kinase (PTK) agissent sur les boucles intracellulaires. D'après (Zhang, Jiang et al. 2013).

F. Interactions avec d'autres canaux

Les canaux sont rarement exprimés de façon isolée. Dans la plupart des cas, il y a plusieurs types de canaux dans un même domaine sous-cellulaire, souvent y formant des complexes. Ci-dessous, quelques exemples d'interactions entre les canaux T et d'autres canaux exprimés dans des mêmes domaines (fig.50).

• Canaux T et HCN

Les canaux HCN (HCN : *Hyperpolarisation-activated Cyclic-Nucleotid modulated Cation Non-selective Channel*) sont responsables d'un courant I_h dépolarisant qui s'active à des potentiels très négatifs. Ces canaux sont souvent exprimés dans les mêmes régions que les canaux T, et différents types d'interaction ont été décrits.

Dans les neurones du noyau profond du cervelet DCN (DCN : *Deep Cerebellar Nuclear*), il a été décrit une synergie entre les courants T et I_h (Engbers, Anderson et al. 2011, Engbers, Anderson et al. 2013). Ces neurones reçoivent des inhibitions des neurones de Purkinje, qui provoquent des décharges en rebonds. Suite à une inhibition, la repolarisation déclenche l'ouverture de canaux HCN, qui accélèrent la dépolarisation et permettent ainsi l'activation rapide et synchronisée des canaux T (Engbers, Anderson et al. 2013). Dans cet exemple, la

synergie d'activation des deux canaux est importante pour relancer l'activité des neurones après inhibition.

Une autre interaction a été étudiée dans le cortex, où les canaux HCN1 et les canaux Cav3.2 sont présents dans les mêmes terminaisons synaptiques, donc du côté présynaptique (Huang, Lujan et al. 2011). Dans ce cas, le courant dépolarisant tonique provoqué par les canaux Ih inhibe l'activité des canaux T en provoquant leur inactivation. Ainsi, cela provoque une diminution de la fréquence des mEPSC, qui est levée seulement avec des hyperpolarisations, qui permettent la fermeture des canaux T et augmentent leur disponibilité d'ouverture lors d'une prochaine dépolarisation.

Il existe plusieurs types de canaux HCN et de canaux T. On peut donc imaginer que selon la combinaison de ces canaux ainsi que selon leur localisation subcellulaire précise, différents types d'interaction peuvent survenir. Des interactions directes entre ces canaux formant des complexes restent encore à découvrir. Toutefois, une étude récente a montré que les canaux HCN1 et Cav3.2 peuvent être immunoprécipités ensemble, *in vitro* (Fan, Gandini et al. 2017).

- **Canaux T et canaux potassiques activés par le calcium (K_{Ca})**

Les canaux K_{Ca} sont des canaux potassiques activés par le calcium. Les interactions entre ces types de canaux peuvent aussi participer aux différents comportements cellulaires.

Dans les neurones TC du thalamus les canaux T et SK (un type de canal K_{Ca} de faible conductance) sont exprimés dans les dendrites. Ainsi, le calcium qui rentre via les canaux T active les canaux SK qui repolarisent la membrane provoquant l'arrêt de la décharge en bouffée (Cueni, Canepari et al. 2008). Ce mécanisme sert à contrôler la fréquence de potentiels d'action.

Dans les neurones de Purkinje du cervelet, les canaux T interagissent avec les canaux IK_{Ca} pour configurer la forme des potentiels excitateurs post-synaptiques (EPSP : *Excitatory postsynaptic potential*) évoqués par les fibres parallèles. Ainsi, l'activation des canaux T lors de la dépolarisation provoque une entrée de calcium qui active les canaux IK_{Ca} , qui provoquent une forte hyperpolarisation après le EPSP (AHP : *Afterhyperpolarisation*) (Engbers, Anderson et al. 2012, Engbers, Anderson et al. 2013). Ce phénomène a un rôle important pour contrôler l'intégration synaptique au niveau temporel.

On peut donc conclure que, au-delà de leurs propriétés intrinsèques, les canaux ioniques n'agissent pas de façon isolée, et que la présence de différentes combinaisons de canaux conditionne la fonction finale de chaque canal dans un type cellulaire donné, voir dans un domaine subcellulaire donné.

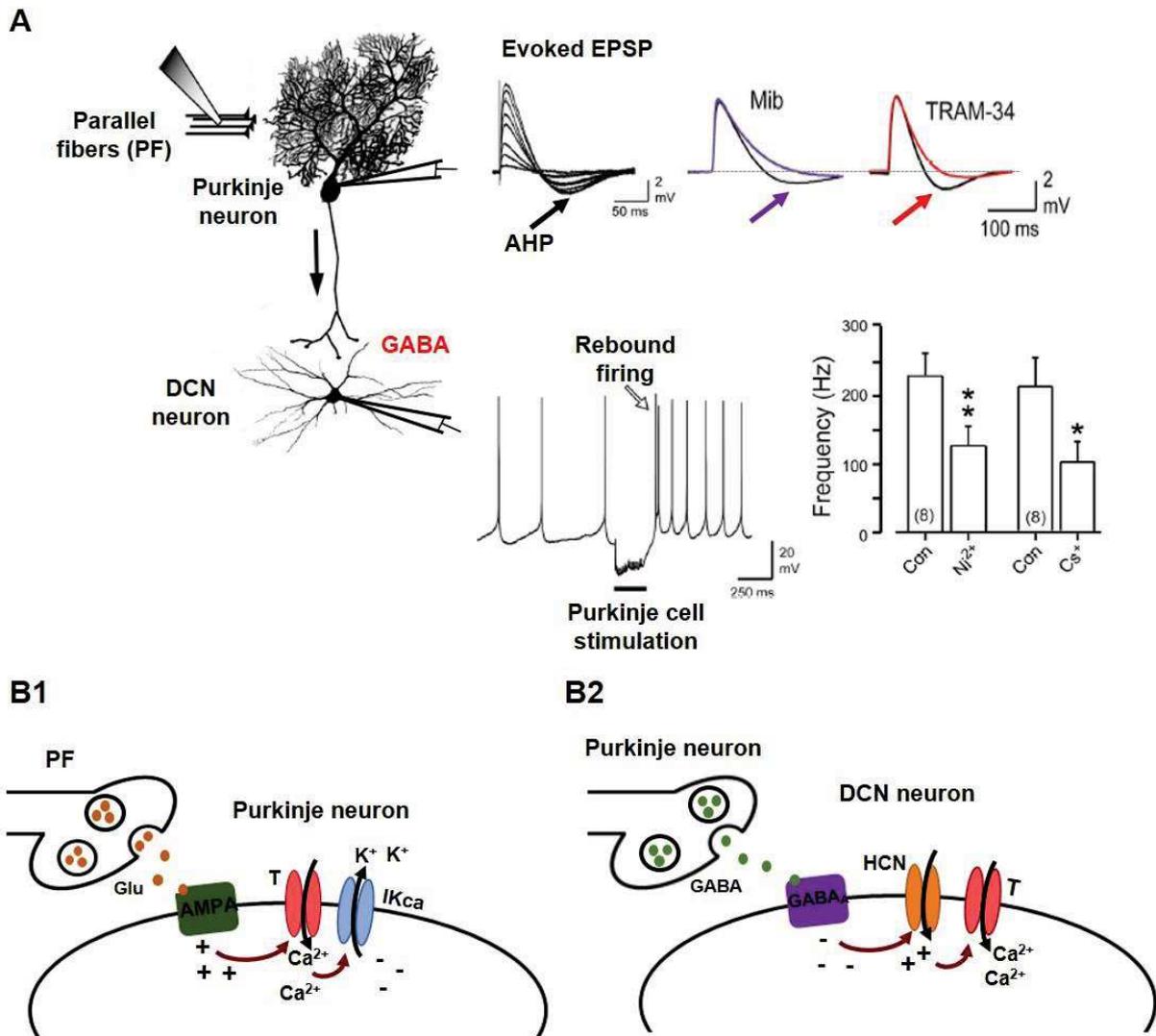


Figure 50. Interaction des canaux T avec d'autres canaux dans deux types de synapses dans le cervelet. (A). La stimulation des fibres parallèles provoque des potentiels excitateurs postsynaptiques (EPSP) suivis de grandes et longues hyperpolarisations (AHP : *afterhyperpolarisation*). Le blocage des canaux T avec mibefradil (Mib) (1 μM) ou des canaux potassiques activés par le calcium IK_{Ca} avec TRAM-34 (100 nM) supprime l'AHP (flèches en violet et rouge). La stimulation des neurones de Purkinje provoque un rebond et des potentiels d'action à haute fréquence, après l'hyperpolarisation GABAergique évoquée par stimulation des cellules de Purkinje. Le blocage des canaux T par le nickel ou des canaux HCN par le CsCl₂ diminue cette fréquence. **(B1).** Le décours de l'AHP post-EPSP (stimulation des fibres parallèles, enregistrement du neurone de Purkinje) est dû à l'activation des canaux T, puis des canaux IK_{Ca}. L'influx calcique dépendant des canaux T, consécutif à la dépolarisation par le glutamate, active les canaux IK_{Ca} qui hyperpolarisent la cellule. **(B2).** Les décharges à haute fréquence associées au rebond dans les neurones du noyau profond du cervelet (DCN : *Deep Cerebellar Nuclear*) résultent de la coopération entre les canaux HCN et les canaux T. Les canaux HCN sont activés

lors de la repolarisation de la membrane après des inhibitions provoquées par le GABA, et provoque une dépolarisation rapide qui active les canaux T. Adapté d'après (Engbers, Anderson et al. 2013).

6. Localisation des canaux T

Le clonage des sous-unités Cav3.x a permis d'analyser plus en détail la localisation de ces canaux (fig.52). Des études électrophysiologiques suggéraient une expression extensive. Ce fut confirmé par des études d'analyse d'ARNm. Ainsi, les canaux T sont exprimés dans le cœur, le muscle, le rein et les tissus endocrines (Perez-Reyes 2003). Ils sont aussi largement exprimés dans le système nerveux. Des études d'hybridation *in situ* (ISH : *in situ hybridization*) chez le rat montrent l'expression de ces canaux dans la plupart des structures, telles que le thalamus, cortex, hippocampe, neurones sensoriels, etc (Talley, Cribbs et al. 1999). Ces résultats furent confirmés chez l'humain par l'analyse d'ARN par *Northern Blot* (Williams, Washburn et al. 1999) et chez la souris (McCarthy 2006).

De nombreux types cellulaires expriment plusieurs types de canaux T, dans le thalamus ou le cervelet, par exemple (Molineux, McRory et al. 2006). Ils sont observés dans le soma, les dendrites (Hildebrand, Isope et al. 2009), et dans les terminaisons synaptiques (Francois, Schuetter et al. 2015)(fig.51). Les mécanismes qui sous-tendent ces distributions différentielles sont encore inconnus.

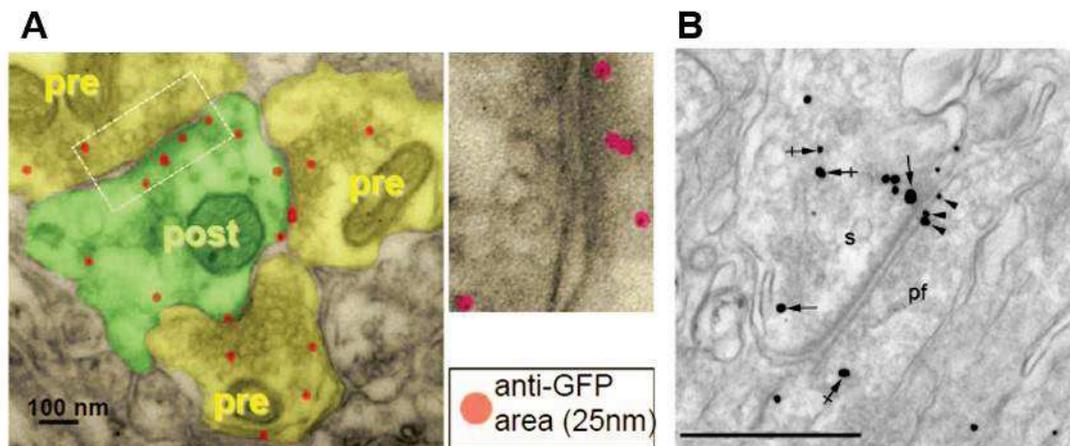


Figure 51. Localisation subcellulaire des canaux Cav3.2. (A). Image de microscopie électronique de la moelle épinière. Notez que le canal Cav3.2 est présent aux niveaux pré- et post-synaptique. D'après (Francois, Schuetter et al. 2015). (B). Image de microscopie électronique d'un neurone de Purkinje du cervelet. Notez que le canal Cav3.2 est exprimé dans les épines dendritique (s : *spine*) contactées par les fibres parallèles (pf : *parallel fibers*) principalement au niveau de la membrane extra-synaptique (flèche) et moins au niveau intracellulaire (flèche avec croix). Le canal est aussi présent au niveau présynaptique dans les fibres parallèles (tête de flèche). D'après (Aguado, Garcia-Madrona et al. 2016).

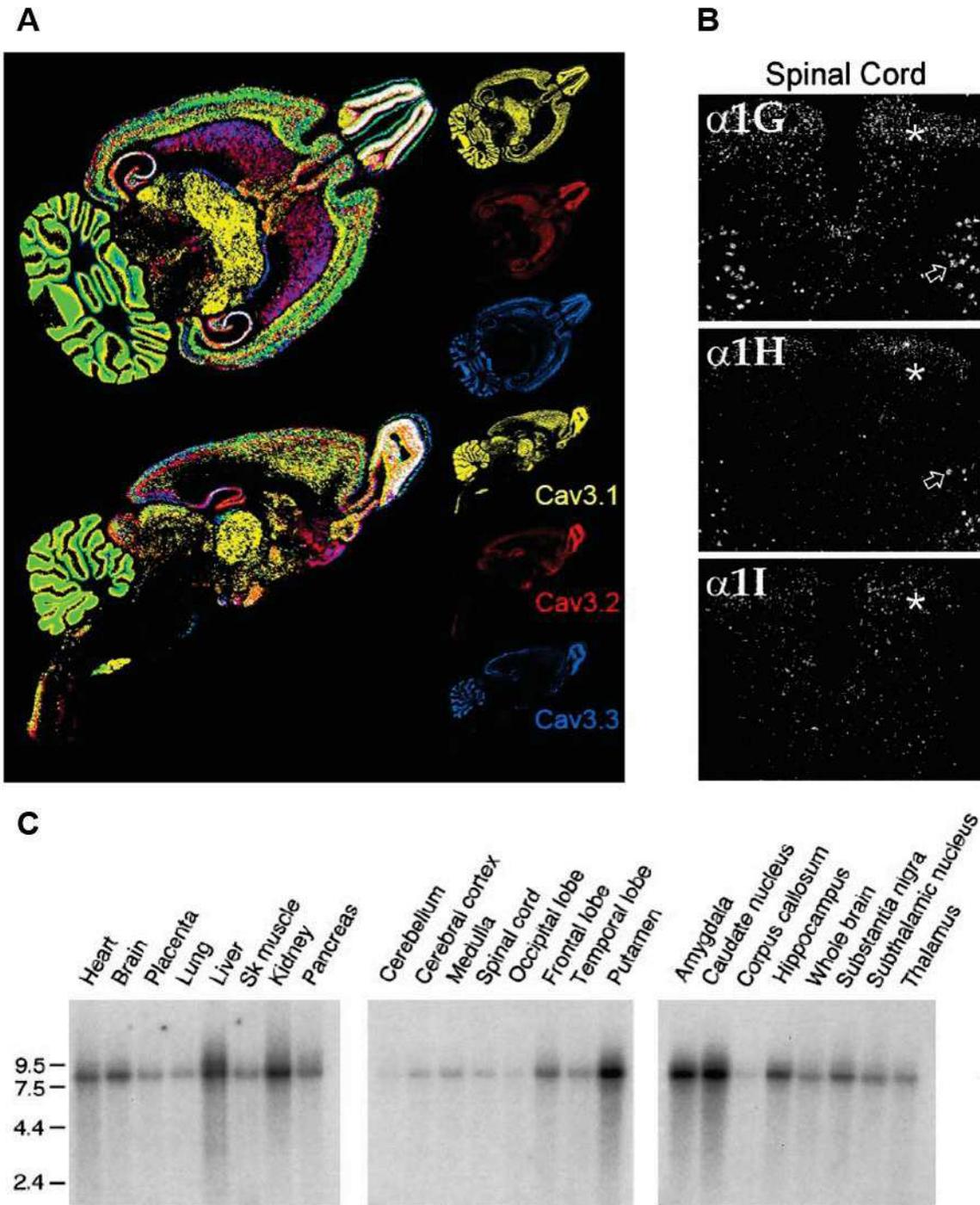


Figure 52. Localisation des canaux T dans le système nerveux. (A). Hybridation *in-situ* des canaux T dans le cerveau de rat (Cav3.1 en jaune, Cav3.2 en rouge, Cav3.3 en bleu). **(B).** Hybridation *in-situ* des canaux T dans la moelle épinière. **(C).** Distribution des canaux Cav3.2 par analyse des RNA humains par Northern blot. (A-B) D'après (Talley, Cribbs et al. 1999). (C) D'après (Williams, Washburn et al. 1999).

6.1.-Régulation de l'expression

Les mécanismes qui contrôlent l'expression des canaux T dans la membrane sont largement méconnus. Une étude a montré que la boucle I-II de la sous-unité $\alpha 1$ est importante pour la

régulation de l'expression (Vitko, Bidaud et al. 2007). Parmi les mécanismes influençant le niveau d'expression des canaux T, on trouve le 17β -estradiol à travers les récepteurs à l'estrogène (Qiu, Bosch et al. 2006). Ce mécanisme pourrait contrôler l'excitabilité de ces neurones de l'hypothalamus et la sécrétion par l'hypophyse grâce au contrôle de l'expression de canaux T par le 17β -estradiol via les récepteurs $ER\alpha$ (Bosch, Hou et al. 2009). D'autres études ont montré que les variants d'épissage permettent de réguler l'expression des canaux T ainsi que leurs propriétés biophysiques (Senatore and Spafford 2012).

7. Fonction des canaux T dans le système nerveux

Les canaux calciques à bas seuil participent à une large variété de fonctions cellulaires. Leurs propriétés biophysiques leur permettent de contrôler des fonctions telles que l'excitabilité et l'intégration synaptique. Grâce à leur perméabilité au calcium, un messager intracellulaire secondaire, ils peuvent aussi contrôler différentes fonctions cellulaires comme la transcription de gènes. La fonction des canaux T dépendra aussi de leur localisation subcellulaire, et des autres canaux présents.

7.1.-Transmission synaptique

La neurosécrétion nécessite une entrée de calcium dans la terminaison synaptique pour déclencher la libération de vésicules synaptiques. La libération rapide de neurotransmetteurs suite au potentiel d'action dépend de canaux HVA, qui forment des complexes avec les protéines synaptiques d'ancrage des vésicules. Il existe d'autres types de libération de neurotransmetteurs qui sont indépendants du potentiel d'action, à bas seuil. Un des potentiels candidats responsables de cette libération est le canal LVA. Grâce à ses propriétés d'activation, il peut provoquer des entrées de calcium à des potentiels plus bas que le potentiel d'action et déclencher la libération de vésicules.

Les premières études impliquant les canaux T dans la libération des vésicules mesuraient les changements de capacitance comme index de la libération de vésicules, car le saut en capacitance est proportionnel à la surface des vésicules fusionnées à la membrane plasmique. Les premières études furent faites dans des cellules neuro-sécrétrices. Ainsi, des augmentations de capacitance furent observées quand les canaux Cav3.2 furent exprimés dans des cellules neurosécrétrices telles que les cellules chromaffines (Carbone, Calorio et al. 2014).

La présence de canaux T dans les terminaisons synaptiques a été décrite dans plusieurs structures. Des travaux d'imagerie calcique ont montré la présence de courants calciques sensibles aux bloqueurs de canaux T (mibéfradil) dans les terminaisons synaptiques des neurones de la rétine (Pan, Hu et al. 2001). D'autres travaux ont montré la présence de canaux Cav3.2 dans les terminaisons synaptiques à l'aide de techniques de microscopie électronique dans le cortex ou la moelle épinière (Huang, Lujan et al. 2011, Francois, Schuetter et al. 2015).

Pour étudier la participation des canaux T dans la transmission synaptique indépendante du potentiel d'action, des courants postsynaptiques miniatures (mPSC) sont enregistrés en présence d'un bloqueur des canaux sodiques du potentiel d'action, la TTX (fig.53). Ainsi, des études dans le cortex ont montré l'implication de ces canaux dans la transmission glutamatergique suite à des hyperpolarisations, par un effet type « rebond » (Huang, Lujan et al. 2011). Dans l'hippocampe, les canaux T participent à la transmission GABAergique reçue par les interneurons du gyrus denté (Grauert, Engel et al. 2014). Ici, l'implication de canaux T est modulée par le zinc, un inhibiteur. Ainsi, en présence de fortes concentrations de zinc, les canaux T sont inhibés provoquant une diminution de la fréquence des mIPSC (mIPSC : *miniature Inhibitory postsynaptic currents*) dans les cellules granulaires. Des études de courants miniatures ont aussi suggéré une modulation par les canaux T dans la moelle épinière (Bao, Li et al. 1998, Jacus, Uebele et al. 2012). L'implication des canaux Cav3.2 est appuyée par l'observation d'une diminution de la fréquence de mEPSC dans une souris Cav3.2 KO (délétion génomique constitutive du canal), ainsi que l'absence d'effet du bloqueur des canaux T pour diminuer la fréquence de mEPSC (Jacus, Uebele et al. 2012). Il a aussi été décrit l'implication de canaux Cav3.2 dans une synapse appelé sandwich entre deux somas de neurones DRG dans les ganglions de la racine dorsale à travers des cellules gliales (Rozanski, Nath et al. 2013).

Récemment, une étude a montré la première évidence d'une interaction entre la protéine présynaptique Syntaxin-1A et les canaux Cav3.2, dans le cerveau de rat (Weiss, Hameed et al. 2012).

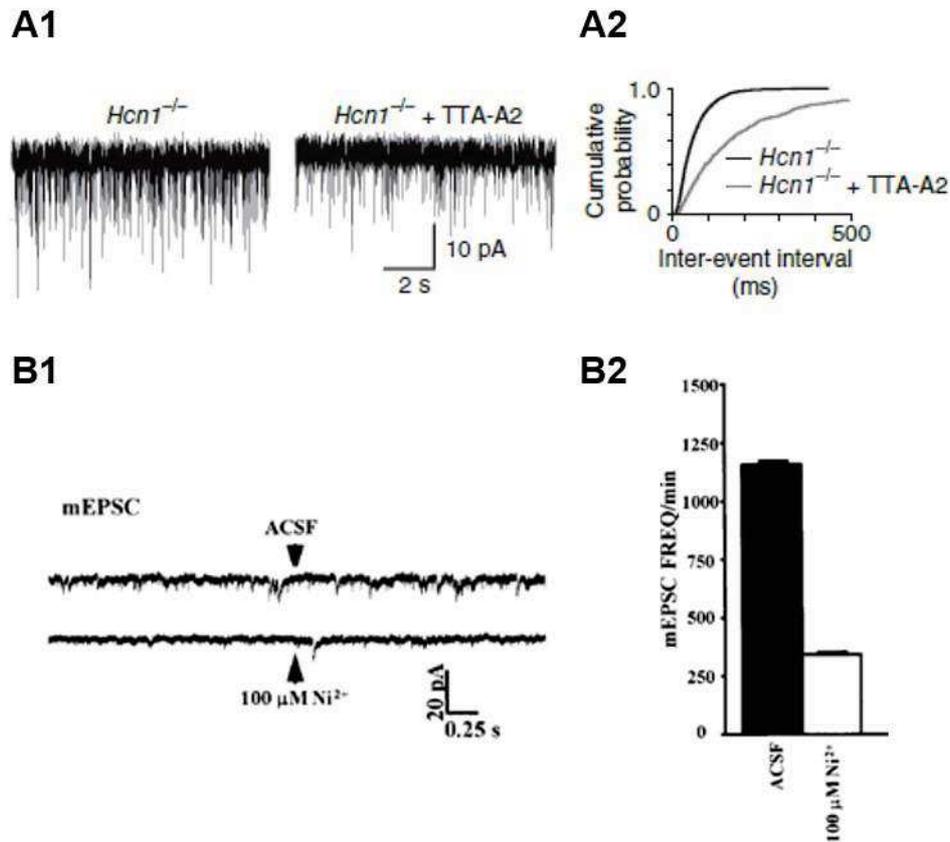


Figure 53. Participation des canaux T à la transmission synaptique. (A). Chez une souris KO pour le canal HCN1, l'inhibition pharmacologique de courants T provoque une forte augmentation des intervalles des mEPSC dans le cortex. D'après (Huang, Lujan et al. 2011). (B). Le nickel (100µM) provoque une forte diminution de la fréquence des mEPSP dans la moelle épinière. D'après (Bao, Li et al. 1998).

L'implication présynaptique n'est pas sélective de Cav3.2. En effet, Cav3.3 participe à la transmission dendro-dendritique entre neurones mitrales ou la transmission mitral-periglomerulaire dans le bulbe olfactive (Fekete, Johnston et al. 2014). Ce canal s'exprime dans les dendrites apicales des cellules mitrales, où il provoque un influx calcique aux potentiels de repos de cellules, qui module la libération de GABA suite au potentiel d'action.

7.2.-Profil de décharge

Les seuils d'activation et d'inactivation des canaux T, proches du potentiel de repos leur permettent de jouer un rôle essentiel dans l'excitabilité neuronale. Ils peuvent participer à différents aspects comme l'initiation du potentiel d'action à bas seuil (LTS : *Low Threshold Spike*) ou moduler le profil de décharge (tonique, phasique, en bouffée). Les sous-types participent de façon différente selon leurs propriétés biophysiques.

- **Décharge en bouffée**

Comme décrit précédemment, le phénomène de rebond réalisé par l'activation des canaux T provoque une dépolarisation rapide jusqu'au seuil d'activation des canaux sodiques. L'activation des canaux sodiques provoque alors une décharge à haute fréquence, et le nombre de potentiels d'action peut être corrélé avec l'amplitude du rebond à bas seuil induit par les canaux T (Cain and Snutch 2010) (fig.54). Comme décrit précédemment, les différents canaux T se comportent différemment. Ainsi, les neurones thalamo-corticaux (TC), qui expriment seulement le canal Cav3.1, présentent des décharges en bouffée rapides et brèves (Kim, Song et al. 2001, Anderson, Mochizuki et al. 2005). Ceci s'explique par l'inactivation rapide des canaux Cav3.1. Par contre, les neurones RT présentent des décharges en bouffée lentes et prolongées, grâce aux cinétiques d'inactivation plus lentes des canaux Cav3.3 et Cav3.2 exprimés dans ces neurones (Huguenard and Prince 1992).

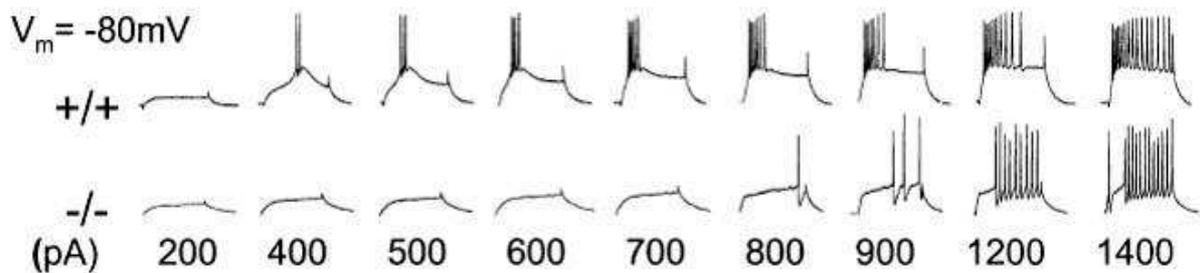


Figure 54. Les décharges en bouffée des neurones TC du thalamus dépendent du canal Cav3.1. En haut, activité évoquée d'un neurone TC depuis un potentiel de -80mV. En bas, même protocole qu'en haut, dans un neurone TC d'une souris KO Cav3.1 (déletion génomique constitutive). Noter l'absence de bouffée initiale d'activité en absence des canaux Cav3.1. D'après (Kim, Song et al. 2001).

- **Oscillations**

En participant à une activité « rebond » ample et répétitive (mais qui s'amortit dans les conditions du patch-clamp), les canaux T contribuent à l'EEG au cours du sommeil (Cueni, Canepari et al. 2008). En effet, à l'échelle cellulaire dans les neurones RT du thalamus, la mobilisation des canaux T provoque un influx calcique suffisant pour activer localement, dans les dendrites, un courant potassique activé par le calcium généré par le canal Kccn2 (Cueni, Canepari et al. 2008). Ce couplage est amorti par l'activité de la Ca²⁺-ATPase, SERCA, probablement localisée dans les organites intracellulaires. Les oscillations seraient initiées par des hyperpolarisations transitoires qui activent le canal HCN responsable d'un courant cationique dépolarisant (Cueni, Canepari et al. 2009). A l'échelle de l'organisme, les neurones RT accompagnent les ondes lentes de l'EEG pendant le sommeil lent. La suppression des

canaux Cav3.1 provoque la suppression de ces ondes (Lee, Kim et al. 2004). De manière intéressante, les souris KO *Kccn2* (délétion génomique constitutive) ont des altérations de l'EEG dans la bande de fréquences delta (1-4Hz) lors du sommeil lent, et dans une bande un peu plus élevée (10-15Hz), celle des ondes en fuseau du sommeil (Cueni, Canepari et al. 2008). En parallèle de ces altérations, les souris KO *Kccn2* ont d'autres modifications de l'EEG qui n'impliquent pas le thalamus de manière prédominante.

Les canaux T participent au rythme de l'EEG dans une autre bande (<1Hz), par l'intermédiaire du courant de fenêtre (fig.55). Ces oscillations sont présentes dans les neurones TC du thalamus, grâce à l'état bi-stable de ces neurones (Williams, Toth et al. 1997, Crunelli, Toth et al. 2005, Dreyfus, Tscherter et al. 2010). Ces neurones déchargent de façon tonique pendant les états éveillés, et présentent des décharges rythmiques à basse fréquence pendant le sommeil (Deleuze, David et al. 2012). Les canaux T jouent un rôle important dans la transition du mode tonique au mode phasique dans ces neurones (Suzuki and Rogawski 1989). En effet, une simple hyperpolarisation transforme l'activité tonique de ces neurones en une activité type bouffée, phasique. Cela s'explique par la réactivation des canaux T, provoquée par l'hyperpolarisation. Les canaux T participent aussi à la génération des décharges rythmiques à basse fréquence, en bouffée. Ainsi, le blocage des canaux T provoque la disparition des ondes lentes (Dreyfus, Tscherter et al. 2010). Ces décharges sont aussi le résultat de l'interaction entre plusieurs types de conductances (fig.55).

Enfin, les canaux T sont impliqués dans des activités oscillantes, rythmiques dans le locus *cœuruleus*. L'analyse d'ARNm a permis de démontrer la présence des trois canaux T ($Cav3.3 > Cav3.2 = Cav3.1$). Ils participent, avec les canaux calciques de type L à ces vagues régulières d'activité, où les canaux bas seuil sont particulièrement impliqués dans le maintien de l'activité (Matschke, Bertoune et al. 2015).

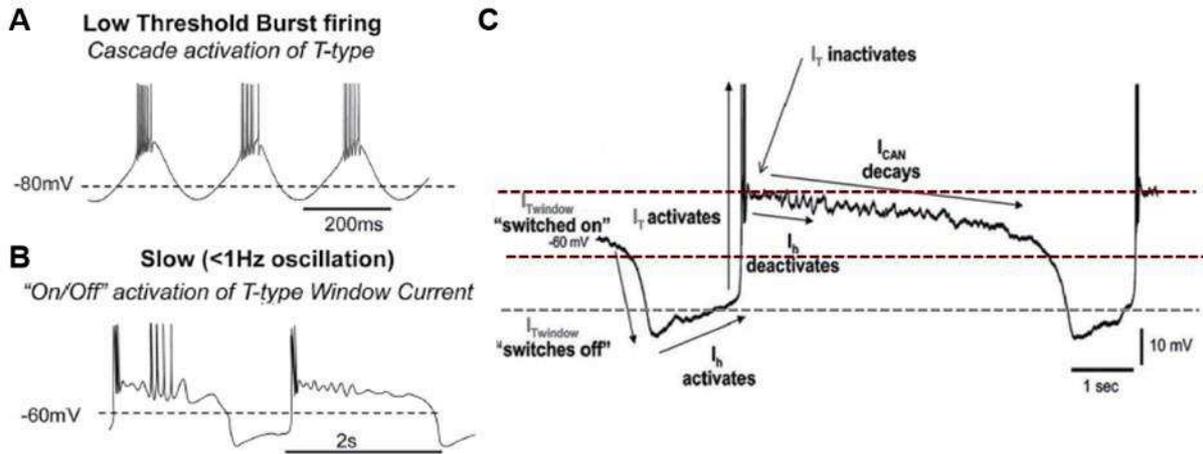


Figure 55. Participation des canaux T aux oscillations. (A). Décharge rythmique de bouffées de potentiel d'action d'un neurone RT du thalamus. (B). Décharge rythmique à basse fréquence (<1Hz) d'un neurone TC du thalamus. (C). Les canaux HCN (I_h) dépolarisent la membrane depuis des potentiels hyperpolarisés, où le courant de fenêtre est éteint ($I_{Twindow}$, off), et permettent ainsi l'activation des canaux T (I_T) qui provoquent des décharges en bouffée. L'entrée de calcium active des canaux I_{CAN} , qui maintiennent la dépolarisation pendant que la plupart des canaux T s'inactivent. A ces potentiels, les canaux T participent encore à l'activité par le biais du mécanisme de «fenêtre». Pendant cette étape, le déclenchement tonique de potentiels d'action est grandement favorisé. La repolarisation commence quand les conductances I_{CAN} diminuent et que des courants potassiques « de fuite » s'activent, ce qui ferme provisoirement les canaux T. D'après (Cain and Snutch 2010).

- **Décharge tonique**

Les canaux T participent aussi au profil de décharge tonique des neurones (Liao, Tsai et al. 2011, Deleuze, David et al. 2012)(fig.56). Lors de l'activité tonique des neurones RT du thalamus, les intervalles entre les potentiels d'action sont plus petits au début et augmentent progressivement, diminuant ainsi la fréquence de décharge. Dans les souris KO Cav3.2 (délétion génomique constitutive), l'activité devient homogène, avec des intervalles constants (Liao, Tsai et al. 2011). Dans les neurones TC du thalamus, la suppression de canaux Cav3.1 provoque une diminution du nombre de potentiels d'action évoqués par des potentiels d'action négatifs (-80mV) (Kim, Song et al. 2001).

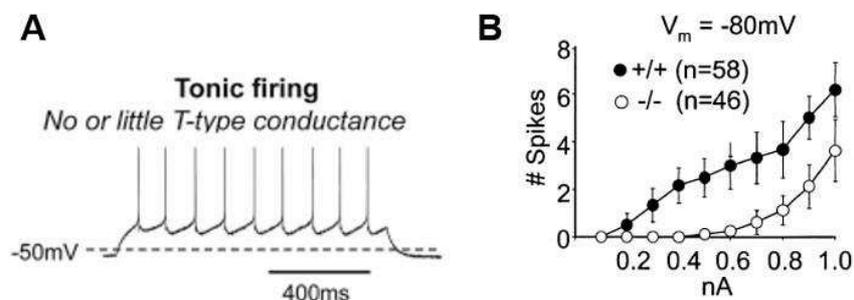


Figure 56. Participation des canaux T aux décharges toniques. (A). Profil de décharge tonique d'un neurone RT du thalamus. (B). Graphique montrant le nombre de potentiels d'action en fonction du courant injecté, depuis un potentiel de repos de -80mV dans des neurones TC du thalamus. Notez une

forte diminution du nombre de potentiels d'action dans les souris KO pour Cav3.1 (-/-). D'après (Kim, Song et al. 2001).

7.3.-Intégration synaptique

Les canaux T sont très exprimés dans les dendrites de différentes structures telles que l'hippocampe, le thalamus ou le cervelet (Hildebrand, Isope et al. 2009, Deleuze, David et al. 2012). Leur ouverture suite aux faibles dépolarisations provoque des entrées de calcium qui dépolarisent davantage la dendrite, ce qui peut augmenter ou consolider les courants postsynaptiques et ainsi participer à l'intégration synaptique (fig.57). De plus, leur implication dans les dépolarisations en rebond suite aux hyperpolarisations, peut aussi jouer un rôle essentiel dans la récupération suite aux inhibitions. Le poids de sa participation à l'intégration synaptique dépendra de la quantité de canaux T exprimés, leur localisation subcellulaire et des autres courants.

Des études dans les neurones TC du thalamus ont montré que les canaux Cav3.1 sont exprimés fortement dans les dendrites (Cueni, Canepari et al. 2008). Il a été montré que les canaux augmentent la probabilité de déclencher un potentiel d'action en réponse aux stimuli synaptiques (Deleuze, David et al. 2012). Ces études montrent une diminution des potentiels d'action évoqués, en présence d'un bloqueur de canaux T (TTA-P2). Les canaux Cav3.1 sont aussi exprimés dans les épines et les dendrites des neurones de Purkinje, où ils contribuent à l'influx calcique provoqué par la stimulation des fibres parallèles (Hildebrand, Isope et al. 2009). Les canaux T participeraient pour ~20% aux courants postsynaptiques excitateurs de ces neurones (Ly, Bouvier et al. 2016).

Dans la substance noire (SN), l'hyperpolarisation générée par l'activation des récepteurs dopaminergiques D2, provoque des effets différents sur l'excitabilité selon le type de neurone (Evans, Zhu et al. 2017). Ainsi dans les neurones Calbindine -, et non dans les neurones Calbindine+, cette hyperpolarisation provoque une augmentation de l'excitabilité dendritique grâce à la densité de canaux T. L'activation des récepteurs D2 génère une hyperpolarisation assez forte pour réactiver les canaux T, qui génèrent des dépolarisations en rebond capables d'augmenter le signal.

Dans les neurones olfactifs, les canaux T sont responsables de la propagation des excitations depuis les dendrites distaux jusqu'au soma pour générer des potentiels d'action (Kawai and Miyachi 2001, Gautam, Otsuguro et al. 2007).

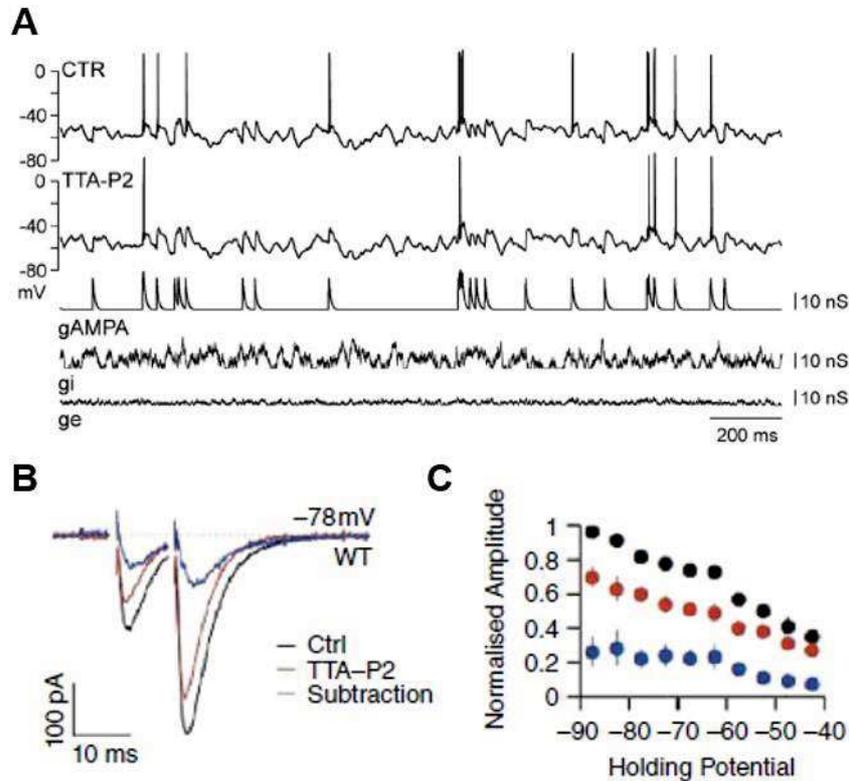


Figure 57. Participation des canaux T à l'intégration synaptique. (A). Enregistrements de potentiels d'action évoqués par des stimulations AMPA (gAMPA). Notez que le blocage de canaux T (TTA-P2) provoque une diminution du nombre de potentiels d'action évoqués par les courants AMPA. D'après (Deleuze, David et al. 2012). (B) Courants excitateurs postsynaptiques de neurones de Purkinje évoqués par la stimulation des fibres parallèles. Notez que l'inhibiteur du canal T (TTA-P2), provoque une inhibition de 20% des courants postsynaptiques évoqués (eEPSC). (C). Amplitudes normalisées des eEPSC selon le potentiel de repos. Les potentiels plus hyperpolarisés provoquent les plus grandes réponses, qui sont aussi les plus sensibles au TTA-P2 (même code couleur qu'en B). Ces résultats indiquent la disponibilité des canaux T aux potentiels plus négatifs. D'après (Ly, Bouvier et al. 2016).

7.4.-Plasticité synaptique

Les canaux T sont aussi impliqués dans des phénomènes de plasticité synaptique (fig.58). Les dépolarisations qu'ils provoquent peuvent être suffisantes pour recruter des messagers secondaires (calcineurine, calmoduline, etc.) ou conduire à une mobilisation du calcium via des stocks intracellulaires (Rya) ou l'activation de canaux HVA. Ils participent aux différents types de plasticité, tels que LTD ou LTP.

Dans les neurones pyramidaux du cortex somatosensoriel, l'entrée du calcium via les canaux T est impliquée dans un type de plasticité synaptique associative. Ainsi, la décharge postsynaptique en bouffée (150-300Hz) couplée aux EPSC évoqués provoque une dépression à long terme (LTD : *long terme depression*) qui dépend des canaux T (Birtoli and Ulrich 2004). D'autres études montrent sa participation à une LTD dans une synapse GABAergique sur des neurones thalamo-corticaux (Pigeat, Chausson et al. 2015). Comme décrit précédemment, les canaux Cav3.1 jouent un rôle important dans l'intégration synaptique entre les fibres parallèles et les cellules de Purkinje. Une étude récente montre l'implication de ces canaux dans la LTP dans cette synapse (Ly, Bouvier et al. 2013). Ils sont aussi impliqués dans un type de LTP dans la moelle épinière (Drdla and Sandkuhler 2008, Ikeda, Heinke et al. 2003).

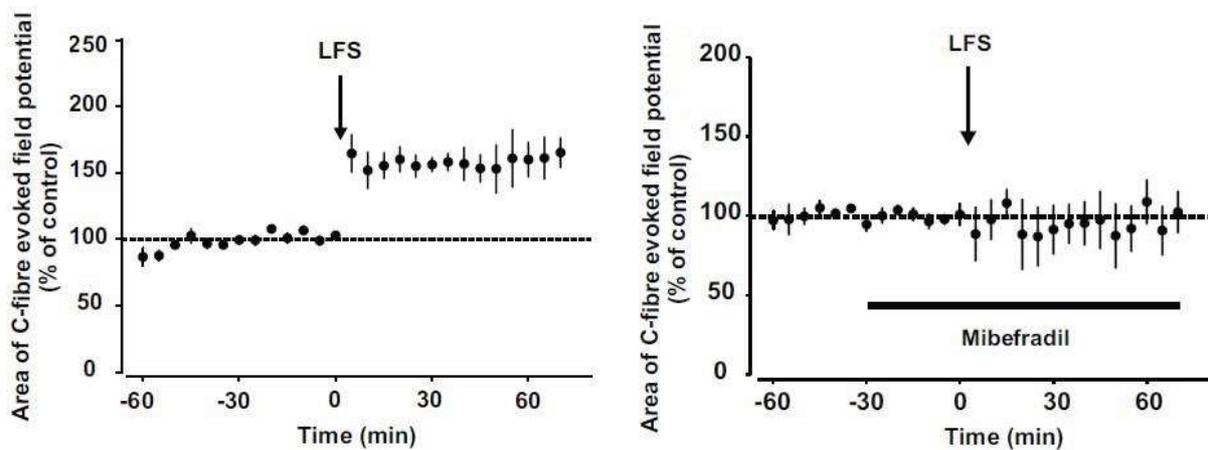


Figure 58. Participation des canaux T à la plasticité synaptique. L'induction d'une LTP par des stimulations à basses fréquences des fibres C (LFS : *Low Frequency Stimulation*) est bloquée par le blocage des canaux T (mibefradil, 5mM). D'après (Drdla and Sandkuhler 2008).

7.5.-Segment initial de l'axone

Le segment initial de l'axone (AIS : *axone initial segment*) est une région très spécialisée entre l'axone et le soma, jouant un rôle essentiel pour l'initiation du potentiel d'action. C'est une région très enrichie en canaux sodiques, potassiques et calciques (Grubb, Shu et al. 2011). Cette région est responsable de la sommation des informations reçues dans les dendrites et soma pour déclencher des potentiels d'action. C'est une région très régulée par une multitude de mécanismes, y compris les influences d'autres neurones. La composition de canaux ioniques ainsi que la position et largeur de l'IAS est très spécifique du type neuronal et sous-tend des propriétés du profil de décharge (Grubb, Shu et al. 2011). Des études d'imagerie calcique ont montré des entrées calciques dépendantes des canaux T dans les neurones de la racine dorsale, du tronc cérébrale et pyramidaux (Grubb, Shu et al. 2011).

Dans les interneurons du tronc cérébral, une étude a montré la modulation de canaux T présents dans l'IAS par l'activation de récepteurs dopaminergiques (Bender, Ford et al. 2010). Cette étude montre que l'activation des récepteurs dopaminergiques D3 par le quinipirole via la kinase PKC diminue les courants calciques de type T dans l'IAS mais pas dans les dendrites.

Dans les neurones sensoriels, il a été montré que Cav3.2 facilite l'initiation du potentiel d'action et sa conduction (Francois, Schuetter et al. 2015). Ce canal est exprimé tout le long de l'axone des fibres C-LTMR et dans les nœuds de Ranvier des fibres A δ -LTMR. Cette étude montre que le blocage des courants T avec TTA-A2 diminue la vitesse de conduction du potentiel d'action.

L'ensemble de ces études montrent que les canaux T ne sont pas impliqués dans la forme du potentiel d'action (Francois, Schuetter et al. 2015, Bender, Ford et al. 2010) à la différence des canaux sodiques qui la modifient. Les canaux T semblent intervenir dans la potentialisation d'autres stimuli sous liminaires, et donc, dans l'initiation du potentiel d'action.

Une autre étude sur des neurones de l'hippocampe en culture, montre que les canaux T participent à la redistribution de l'IAS dépendante de l'excitabilité neuronale (Grubb and Burrone 2010). Ainsi, le blocage des courants T avec le mibéfradil bloque l'éloignement de l'IAS suite à une stimulation à haute fréquence des neurones. Les canaux T peuvent ainsi participer à la réorganisation de l'IAS.

8. Canaux Cav3.2 et douleur

Il existe de nombreuses évidences qui montrent l'implication des canaux Cav3.2 dans la douleur (fig.59). Tout d'abord, les canaux Cav3.2 sont exprimés tout le long des voies nociceptives. La présence de courants T dans les neurones sensoriels de la racine dorsale fut découverte lors des premières études sur les canaux à bas seuil (Carbone and Lux 1984). Récemment, le profil d'expression de ce canal dans les neurones sensoriels a été décrit. Ainsi, Cav3.2 s'exprime dans deux populations de mécanorécepteurs à bas seuil (LTMR), les fibres C- et A δ -LTMR, et dans une population de neurones Ret⁺ non encore identifiée (Francois, Schuetter et al. 2015). Ce canal se localise aussi dans d'autres régions importantes pour le traitement de l'information douloureuse, telles que la moelle épinière, le thalamus et le cortex (Talley, Cribbs et al. 1999).

Une des premières études qui montrait l'implication des canaux T dans la nociception fut l'effet provoqué par l'injection périphérique de la L-cystéine. Cette injection provoque une hyperalgésie thermique dans le champ récepteur (Todorovic, Jevtovic-Todorovic et al. 2001). La réponse hyperalgique, mesurée par la diminution de la latence de retrait aux stimuli thermiques, est bloquée par la co-injection d'un inhibiteur des canaux T (mibéfradil). Ces résultats suggèrent une implication des canaux T, et peut-être des canaux Cav3.2, plus sensibles à l'action de la L-cystéine, sur la nociception périphérique. D'autres études ont confirmé que ces agents peuvent augmenter l'excitabilité des neurones sensoriels en agissant sur les canaux Cav3.2 (Nelson, Joksovic et al. 2005, Nelson, Joksovic et al. 2007). Depuis, différentes études ont montré l'implication des canaux Cav3.2 dans la douleur.

D'une part, le blocage des canaux T par des approches pharmacologiques ou génétiques a des effets analgésiques dans différents modèles de douleur. Ainsi, des stratégies avec des antisens dirigés contre l'ARNm du canal Cav3.2 injectés par voie intrathécale, ont montré des effets analgésiques dans des modèles de neuropathie (Bourinet, Alloui et al. 2005), de diabète (Messinger, Naik et al. 2009) ou d'hyperalgésies induites par l'hydrogène sulfite (HS : *Hydrogen sulfide*) (Okubo, Matsumura et al. 2012). Une étude sur une souris KO Cav3.2 (délétion génomique constitutive) montre une diminution des réponses nociceptives mécaniques, thermiques et chimiques (Choi, Na et al. 2007). Par contre, ces souris n'ont pas de changement des perceptions douloureuses dans un modèle de neuropathie (SNL), en contradiction avec les autres études citées ci-dessus. Cette différence pourrait s'expliquer par une intervention de Cav3.2 au cours du développement soit au niveau de la moelle épinière, soit au niveau d'autres structures supra-spinales.

La plupart des inhibiteurs des canaux T ont aussi des effets analgésiques dans différents modèles douloureux : l'éthosuximide réduit l'allodynie et l'hyperalgésie dans un modèle neuropathique (CCI) (Hamidi, Ramezani et al. 2012), le KST5468 sur des modèles inflammatoires et neuropathiques (SNI et CCI) (Lee, Shin et al. 2010), l'ECN (3 β ,5 α ,17 β)-17-hydroxyestrane-3-carbonitrile) soulage l'hyperalgésie dans un modèle d'obésité (Latham, Pathirathna et al. 2009) et l'administration systémique de mibéfradil a des effets antinociceptifs mécaniques et thermiques (Todorovic, Meyenburg et al. 2002). Dans un modèle de douleur viscérale mimant le syndrome du côlon irritable (IBS : *Irritable Bowel Syndrome*), le blocage pharmacologique

(mibefradil) des canaux T ou la diminution des canaux Cav3.2 par des antisens diminuent la perception douloureuse (Marger, Gelot et al. 2011).

Dans le modèle de diabète induit par traitement avec la streptozocine, l'injection intrapéritonéale de TTA-P2 reverse l'hyperalgésie thermique mais n'affecte pas les seuils de douleur aiguë (Choe, Messinger et al. 2011). De même, l'injection d'antisens contre Cav3.2 reverse l'hyperalgésie thermique, suggérant que ces canaux sont responsables de l'effet analgésique du TTA-P2 dans un modèle neuropathique.

De façon complémentaire, des augmentations de l'expression des canaux Cav3.2 ont été souvent observées dans ces modèles de douleur où l'inhibition de canaux T a provoqué des effets analgésiques. Ainsi, des études ont montré l'augmentation de l'expression des Cav3.2 dans les neurones sensoriels, dans le diabète (Jagodic, Pathirathna et al. 2008), d'hyperalgésie induite par l'hydrogène sulfite (Takahashi, Aoki et al. 2010) et d'obésité (Latham, Pathirathna et al. 2009). Une augmentation de l'expression des canaux Cav3.2 provoque des augmentations de courants T, qui pourraient participer à l'hyperexcitabilité des neurones sensoriels. Ceci pourrait expliquer en partie le rôle de ces canaux dans la douleur.

L'ensemble de ces résultats confirment un rôle pro-nociceptif des canaux Cav3.2 dans la douleur. Par contre, les neurones exprimant Cav3.2 et qui participent à ces comportements reste inconnus. Une partie des effets observés suggère l'implication des neurones sensoriels (Todorovic, Jevtovic-Todorovic et al. 2001, Nelson, Joksovic et al. 2005, Jagodic, Pathirathna et al. 2008). Des résultats précédents dans notre laboratoire ont permis de confirmer l'implication des canaux Cav3.2 des fibres C-LTMR dans les nociceptions mécanique, thermique et chimique aiguës et dans un modèle de neuropathie (Francois, Schuetter et al. 2015). D'autres études pharmacologiques et génétiques avec effets analgésiques n'excluent pas un effet central (Todorovic, Meyenburg et al. 2002, Choi, Na et al. 2007, Choe, Messinger et al. 2011). Une étude récente a montré l'augmentation des ARNm du canal Cav3.2 dans les cortex antérieur cingulaire (ACC) dans un modèle neuropathique de CCI (Shen, Chen et al. 2015). Cette étude montre aussi que l'inhibition sélective de canaux T, par microinjection de NNC 55-0396 dans l'ACC, inhibe l'allodynie mécanique et thermique. De plus, les courants mEPSC augmentent dans ce modèle de neuropathie, et ils peuvent être diminués par le NNC 55-0396. Ces résultats suggèrent que les canaux T dans l'ACC participent au maintien des

douleurs neuropathiques et que la douleur peut être inhibée en réduisant l'activité neuronale dans l'ACC. Une autre étude a montré que la souris KO Cav3.2 possède moins de neurones nociceptifs dans les noyaux RT et VP du thalamus (Liao, Tsai et al. 2011).

Des études préliminaires dans le laboratoire montrent un rôle majeur des canaux Cav3.2 dans la corne dorsale de la moelle. Les études d'ISH montraient une expression importante de canaux Cav3.2 notamment dans la lamina II (Talley, Cribbs et al. 1999). L'ablation de ces canaux dans les neurones de la corne dorsale de la moelle empêche l'apparition des symptômes d'hyperalgésie et d'allodynies mécanique et thermique dans un modèle de neuropathie (SNI). Par contre, le rôle du canal dans ces neurones est encore inconnu. Le but de ma thèse a été d'étudier le rôle de ce canal dans les neurones de la corne dorsale de la moelle épinière, notamment dans la lamina II.

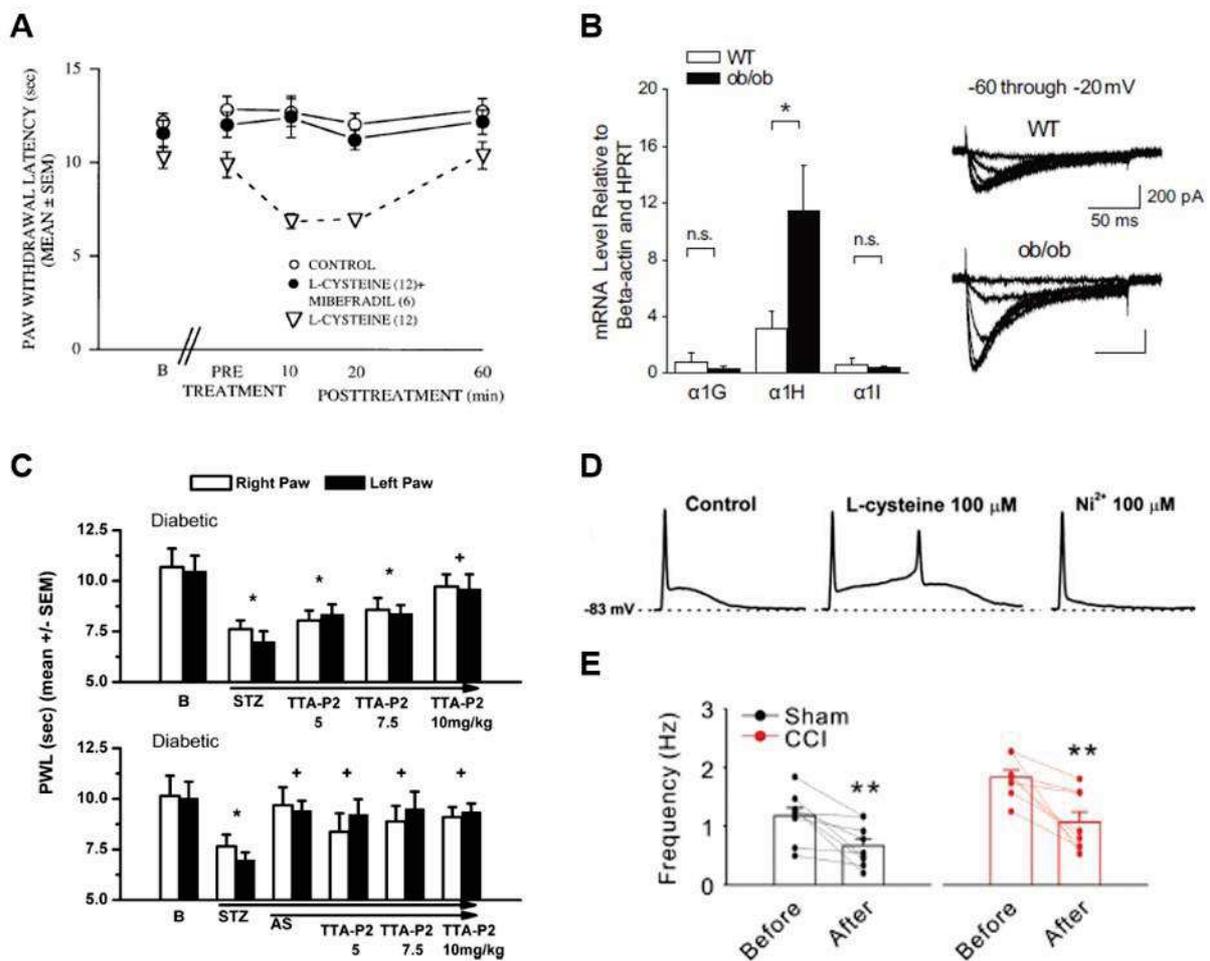


Figure 59. Rôle des canaux T dans la douleur. (A). L'injection dans le champ récepteur de la L-cystéine provoque une diminution du seuil pour la perception mécanique. Le blocage de canaux T avec le mibefradil reverse cet effet. D'après (Todorovic, Jevtovic-Todorovic et al. 2001). (B). Dans un modèle d'obésité qui provoque une hyperalgésie mécanique il y a une augmentation de l'expression des

canaux Cav3.2 dans les neurones sensoriels ainsi qu'une augmentation des courants T. D'après (Latham, Pathirathna et al. 2009). **(C)**. Dans un modèle neuropathique de diabète, l'administration systémique de TTA-P2 ou l'injection intrathécale d'antisens contre Cav3.2 reverse la diminution du seuil pour des stimuli thermiques. D'après (Choe, Messinger et al. 2011). **(D)**. La L-cystéine provoque une augmentation du nombre de potentiels d'action des neurones sensoriels. Cette augmentation est bloquée par le Nickel. D'après (Nelson, Joksovic et al. 2005). **(E)**. L'induction d'un modèle neuropathique (CCI) provoque une augmentation de la fréquence des mEPSC dans le cortex antérieur cingulaire. Un inhibiteur des canaux T diminue la fréquence des mEPSC. D'après (Shen, Chen et al. 2015).

OBJECTIFS

L'implication des canaux Cav3.2 dans la douleur aigüe ou pathologique a été découverte récemment (Bourinet, Alloui et al. 2005, Choi, Na et al. 2007, Messinger, Naik et al. 2009). Ainsi, le canal Cav3.2 émerge comme un candidat intéressant pour le développement de nouveaux analgésiques. Puisque ce canal est exprimé à différents niveaux de la voie nociceptive (Talley, Cribbs et al. 1999), notre laboratoire cherche à déchiffrer l'implication de Cav3.2 dans des structures importantes pour les perceptions douloureuses. Ainsi, des travaux précédents ont montré la participation de Cav3.2 des neurones afférents primaires C-LTMR dans la nociception aigüe et dans la douleur neuropathique (Francois, Schuetter et al. 2015). De plus, la présence de Cav3.2 dans les neurones de la corne dorsale de la moelle épinière a suggéré son intervention dans la modulation et le transfert d'informations sensorielles, notamment nociceptives, vers les régions suprasegmentaires.

La corne dorsale de la moelle épinière est très hétérogène, aux points de vue morphologique, neurochimique et électrophysiologique (Todd 2017, Cordero-Erausquin, Inquimbert et al. 2016). Dans un premier temps, j'ai donc étudié la distribution de Cav3.2 dans ce réseau d'interneurones.

Comme décrit dans la troisième partie de l'introduction, les canaux Cav3.2 peuvent participer à de nombreuses fonctions neuronales, depuis la transmission et l'intégration synaptique, jusqu'à l'organisation du profil de l'activité électrique (Huang, Lujan et al. 2011, Ly, Bouvier et al. 2013, Liao, Tsai et al. 2011). Dans un deuxième temps, j'ai donc étudié la fonction de ces canaux dans la transmission synaptique ainsi que l'excitabilité neuronale, des mécanismes altérés au cours des douleurs chroniques.

MATERIEL ET METHODES

1. Modèle animal

Nos expériences ont été réalisées sur la souris en accord avec la directive 2010/63/UE. Différentes lignées ont été utilisées: souris knock-in floxed-Cav3.2-eGFP, souris knock-out pour le gène $\alpha 1G$ (Cav3.1), souris knock-in pour le récepteur 1 à la chimiokine fractalkine CX3CR1-GFP et des souris sauvages C57BL/6J. Les animaux ont été hébergés avec un cycle de 12h de lumière/12h d'obscurité, à température constante de 22°C et ont été nourris *ad libitum* (alimentation A4) avec libre accès à l'eau. Des mâles et des femelles ont été inclus dans les travaux.

2. Enregistrements en patch clamp

2.1.-Préparation des tranches

Des souris âgées de 6 à 12 semaines ont été utilisées pour la préparation de tranches de moelle épinière. Après anesthésie des souris avec un mélange Kétamine (10mg/ml) et Xylazine (1mg/ml) injecté à 0.1ml/10mg, une brève perfusion intracardiaque (<1.5 min) avec de la solution de coupe (table 1) à 0-4°C a été réalisée. Puis rapidement la colonne vertébrale a été extraite et placée dans une boîte de Petri (diamètre 10cm) avec de la solution de coupe froide équilibrée avec 100% O₂, pour disséquer la moelle épinière. La moelle épinière ainsi extraite, et limitée à sa partie lombaire, a été immergée dans l'agarose '*basse fusion*' à 38°C. Environ une minute après, ce bloc d'agarose a été collé sur la platine du vibratome (Leica VT12000S) et des tranches transversales de 300µm ont été préparées en moins de 15 minutes. Les tranches ont été gardées 1 heure dans la solution de récupération (table 3) à 32°C avant enregistrements.

2.2.-Enregistrements en patch clamp

La technique de *Patch Clamp* en configuration cellule entière en mode *Voltage* ou *Current clamp* a été utilisée pour enregistrer l'activité des neurones. L'équipement a consisté en un microscope droit (Olympus BX51WIF) équipé de deux objectifs (grossissements 5x et 40x, et une bague à gains multiples 1x-2x), d'une source de fluorescence (Leica HBO 100), d'une source de lumière visible (Olympus TH4-200), et d'une caméra compatible avec l'acquisition de l'infrarouge (Jenoptik ProgRes MF). Les interneurons de la couche II interne, ou lamina II interne, ont été identifiés dans l'infrarouge (filtre >750nm) par contraste Nomarski grâce au logiciel ProgRes Capture Pro 2.8.8. Les émissions de fluorescence ont été provoquées par différents cubes dans le bleu lointain, le vert, le vert-jaune et un rouge intermédiaire. Les propriétés électriques des cellules ont été contrôlées par un amplificateur Multi Clamp 700B,

un digitaliseur Axon Digidata 550A contrôlé avec le logiciel pClamp10. Les pipettes de borosilicate (GC150TF-10) d'enregistrement possédant des résistances de 6 à 11 M Ω ont été remplies avec des milieux intracellulaires appropriés (table 4).

Les tranches ont été perfusées avec la solution d'enregistrement équilibrée avec un mélange 95% O₂, 5% CO₂ (table 3), renouvelée en permanence avec un débit de ~2ml/min (pompe péristaltique Gilson), à une température de 30-32°C (système non commercial). La composition de ce milieu a éventuellement varié en immergeant le tuyau d'alimentation de la cuve dans des solutions de compositions différentes. Dans d'autres expériences, des agonistes ou antagonistes ont été éjectés par pression, à proximité des interneurons étudiés d'une électrode de verre effilée (résistance 6-8 M Ω). Dans ce cas, les agonistes étaient dilués dans un milieu extracellulaire modifié (table 3).

- **Protocoles en *Voltage clamp***

Le mode *Voltage clamp* a été utilisé pour enregistrer des courants synaptiques excitateurs avec un potentiel imposé de -70mV. La tétródotoxine, TTX (300nM) a été ajoutée dans la solution d'enregistrement pour étudier les courants excitateurs miniatures (mEPSC), en bloquant les canaux sodiques (Narahashi, Moore et al. 1964). D'autres agents pharmacologiques ont été perfusés dans la solution d'enregistrement : TTA-A2 (500nM), NiCl₂ (100 μ M), NMDA (50 μ M), CNQX (10 μ M), DNQX (20 μ M), Gabazine (3 μ M), Strychnine (3 μ M), CdCl₂ (100 μ M) et Ivabradine (1 μ M) (Bois, Bescond et al. 1996).

Pour isoler les courants T, il fût nécessaire de compléter la solution d'enregistrement avec 10mM TEA, 1mM 4-AP (bloqueurs des canaux potassiques) (Yeh, Oxford et al. 1976, Kirsch, Tagliatela et al. 1991), 2mM CsCl₂ (bloqueur de canaux HCN) (Yu, Guo et al. 2006), 500nM TTX (bloqueur de canaux sodiques voltage dépendant), et 100 μ M CdCl₂ (bloqueur de canaux calciques à haut seuil). La solution interne fut aussi modifiée afin d'isoler l'activité des canaux T à bas seuil (table 4).

Les courants de type T ont été étudiés avec un protocole double pulse : un pré-pulse hyperpolarisant (1s à -90mV), suivi d'un test-pulse d'amplitude croissante (avec un pas de 5mV) depuis -70mV jusqu'à +10mV (Chemin, Monteil et al. 2002).

- **Protocoles en *Current clamp***

Le profil de décharge a été étudié avec une série de pulses d'amplitudes croissantes (durée 2s) depuis un potentiel -70mV (Grudt and Perl 2002). Une première classification des neurones a été obtenue en retenant le profil de décharge déclenché de manière répétitive par quelques stimulations successives d'amplitudes croissantes. Nous avons vu :

- des neurones *Single spiking* quand le nombre de potentiels d'action est resté inférieur ou égal à 2 au début du pulse,
- des neurones *Transitoires* présentant un intervalle supérieur ou égal à 600ms, entre le dernier potentiel d'action émis et la fin du pulse,
- des neurones *Delayed*, quand la latence du potentiel d'action initial fût supérieure à 95ms, associée à une fréquence initiale (des 5 premiers potentiels d'action) supérieure à 8Hz,
- des neurones *Gap*, quand la latence du potentiel d'action initial fût supérieure à 95ms, associée à une fréquence initiale (des 5 premiers potentiels d'action) inférieure à 8Hz,
- des neurones *Tonique*, quand les potentiels d'action sont présents tout le long du pulse (activité >1700ms). Une distinction supplémentaire a délimité des neurones *toniques réguliers* ayant une fréquence de déclenchement constante pendant le pulse, et des neurones *toniques irréguliers* ayant une activité plus intense en début de dépolarisation. Pour les différencier de façon quantitative, la SEM des intervalles des 4 premières potentiels d'action a été utilisée, avec des valeurs <2 pour les neurones toniques réguliers et >2 pour les toniques irréguliers.

Les propriétés électriques, proches du potentiel de repos, et conditionnant le déclenchement des potentiels d'action ont été étudiées avec un autre protocole double pulse (Tadros, Harris et al. 2012) : un pré-pulse hyperpolarisant (2s à -90mV), suivi d'un test-pulse d'amplitude croissante (avec un pas minimal de +1pA) jusqu'au seuil de déclenchement des potentiels d'action, et souvent au-delà. Trois classes ont été identifiées :

- neurones à rebond (du potentiel de membrane),
- neurones à pente de dépolarisation lente (*slow slope*),
- neurones passifs, en apparence, (*flat*).

Pour analyser la présence d'une composante de type T, le TTA-A2 (1µM) a été éjecté à proximité de l'interneurone (voir la description ci-dessus).

Table 3. Solutions pour les enregistrements de patch camp.

En mM	Solution de coupe (pH=7.4)	Solution de récupération (pH=7.4)	Solution d'enregistrement (pH=7.4)	Solution extracellulaire (pH=7.4)
NaCl	16	115	125	135
KCl	2.5	2.5	2.5	2.5
NaH ₂ PO ₄	1.5	1.25	1.25	1.25
NaHCO ₃	2.5	26	26	2.5
D-Glucose	25	25	11	
CaCl ₂	1	1	2	2
MgCl ₂	7	4	1	1
ThioUrée	5	0.2		
Acide ascorbique	5	0.2		
HEPES	10			10
NMDG+	122.5			
N-Acetyl-Cysteine	2			

Table 4. Solutions interne utilisées pour les enregistrements en patch clamp.

En mM	Solution interne (pH=7.3)	En mM	Solution interne courants T (pH=7.4)
K-Gluconate	130	Cs-MeSO ₃	125
MgCl ₂	1	MgCl ₂	1
EGTA Acide	0.1	EGTA Acide	5
HEPES	10	HEPES	10
Na pyruvate	2.5	Na pyruvate	2
Malate acid	2	Malate acid	2
GTP, Na ₂	0.5	GTP, Na ₂	0.5
ATP, Mg	2	ATP, Mg	2
Creatine-P (Na ₂)	5	Creatine-P (Na ₂)	5
		KCl	7

J'ai tenté la dialyse intracellulaire de différents composés tels que la leupeptine (Sigma), un inhibiteur de protéase; la neurobiotine (Vector biolabs), permettant la visualisation à posteriori des neurones dans une tranche fixée/perméabilisée après une expérience de patch-clamp; la sonde fluorescente ATTO-dye 550 (Invitrogen), permettant de visualiser la morphologie des neurones en cours d'expérience. Ces manipulations n'ont pas donné lieu à des analyses quantitatives.

J'ai utilisé les sondes fluorescentes ATTO-dye 550 ou ATTO-dye 488 (Invitrogen) ou SR-101 (Sigma Aldrich) afin de contrôler l'efficacité du système d'éjection quand cela a été nécessaire.

J'ai défini les paramètres d'éjection par une combinaison entre le diamètre des pipettes, la pression à la pointe de la pipette d'éjection et la distance entre la pipette et le neurone étudié. Je me suis basée sur les cinétiques d'action d'antagonistes connus, sur la visualisation d'un halo de marqueur fluorescent autour du neurone étudié, et sur la viabilité du neurone et la stabilité de son potentiel de repos.

2.3.-Analyse et statistique

L'analyse de courants synaptiques a été réalisée avec le logiciel AxoGraph 1.6.4. Les analyses de potentiels d'action et des rebonds ont été réalisées avec les logiciels IgorPro et Clampfit 10.6. Le test non paramétrique de Mann-Whitney a été utilisé pour comparer les mesures non répétées et le test de Wilcoxon pour les mesures répétées. Les différences ont été considérées significatives quand $p < 0.05$.

3. Production de virus

Lors de mon projet, plusieurs virus ont été préparés et deux virus adéno-associés recombinants (rAAV) ont été utilisés avec succès : l'un exprimant un plasmide AAV-Cav3.2-mCherry-WPRE et l'autre un plasmide AAV-Cav3.2-Cre-mCherry. La première étape fut le clonage du plasmide pAAV codant pour le transgène d'intérêt (pAAV-transgène). Ensuite, les virus ont été produits dans des cellules HEK, après transfection transitoire, et purifiés sur colonne d'héparine.

3.1.-Clonage

Le plasmide pAAV-Cav3.2-mCherry-WPRE a été cloné à partir du plasmide pAAV-Cav3.2-hChR2-mCherry-WPRE (plasmide 1) (fig.60-61). Le fragment mCherry-WPRE (1300pb) a été amplifié par polymérase-chain-reaction (PCR) à partir du plasmide 1 avec le primer *Forward* ATTCTAGAAAGACGAAGCCGAGGC (incluant le site de restriction XbaI) et le primer *Reverse* AAGAATACCAGTCAATCTTTCACAA (Figure X). Un autre aliquot du plasmide 1 a été digéré avec les enzymes de restriction XbaI et AfeI pour exciser le segment ChR2-mCherry-WPRE. Le vecteur ainsi obtenu, contenant le promoteur Cav3.2 (4896pb), et le fragment mCherry-WPRE amplifié par PCR, ont été purifiés sur gel d'agarose (0.8-1%) avec le système Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System. Finalement les deux fragments ont été ligués avec la T4 DNA ligase (NEB). Les produits de ligation ont été transformés dans des suspensions de bactéries compétentes GT116 par choc de température à 42°C, et un clone

a été sélectionné par résistance à l'ampicilline sur boîte d'Agar. L'ADN a finalement été purifié d'une culture (une nuit, 37°C) dans 200ml de LB-ampicilline (ou 200ml CircleGrow, MP biomedical). La séquence du plasmide obtenu a été validée par analyse de sites de restriction et séquençage.

Le plasmide pAAV-Cav3.2-Cre-mCherry a été obtenu par clonage de l'insert mcherry-IRES-Cre (contenu dans le plasmide addgene 55632) dans le vecteur pAAV-Cav3.2-mCherry-WPRE (après excision préalable de l'insert mCherry) (fig.62). Les sites uniques BamHI et EcoRI ont été utilisés pour obtenir le vecteur et l'insert, qui ont été purifiés sur gel d'agarose et circularisés comme indiqué dans le paragraphe précédent. De même, l'ADN obtenu a finalement été purifié d'une culture (une nuit, 37°C) dans 200ml LB-ampicilline (ou 200ml CircleGrow). La séquence du plasmide obtenu a été validée par analyse des sites de restriction et séquençage. Ce plasmide ne possède donc pas de séquence WPRE, et il est probable que cela ait minoré l'efficacité des particules virales générées ensuite (Zufferey, Donello et al. 1999). Une version identique avec WPRE avait été générée sans succès puisqu'elle ne permettait pas de générer des particules virales. Il est probable que cette difficulté ait été causée par la taille de l'insert, supérieur à 5.2kb (Choi, Yu et al. 2014).

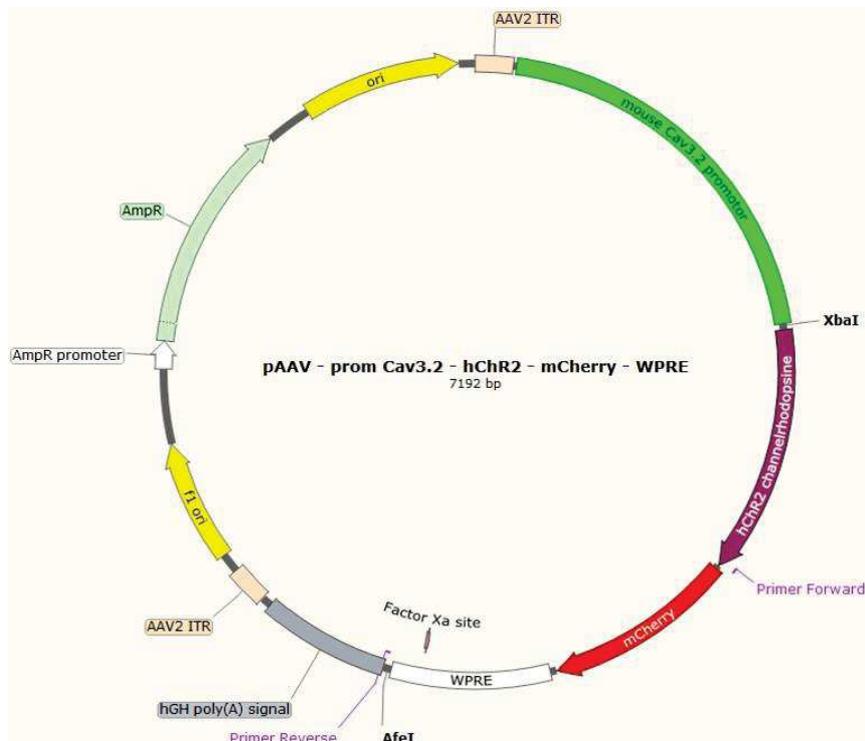


Figure 60. Plasmide 1 : pAAV-Cav3.2-hChR2-mCherry-WPRE. Plasmide pour la production de virus AAV. Le virus contiendra (encapsulera) le fragment d'ADN entre les deux séquences ITR : la channelrhodopsine (hChR2) fusionnée à la protéine fluorescente mCherry et la séquence WPRE sous le contrôle du promoteur de souris Cav3.2. La séquence WPRE augmente l'expression de gènes.

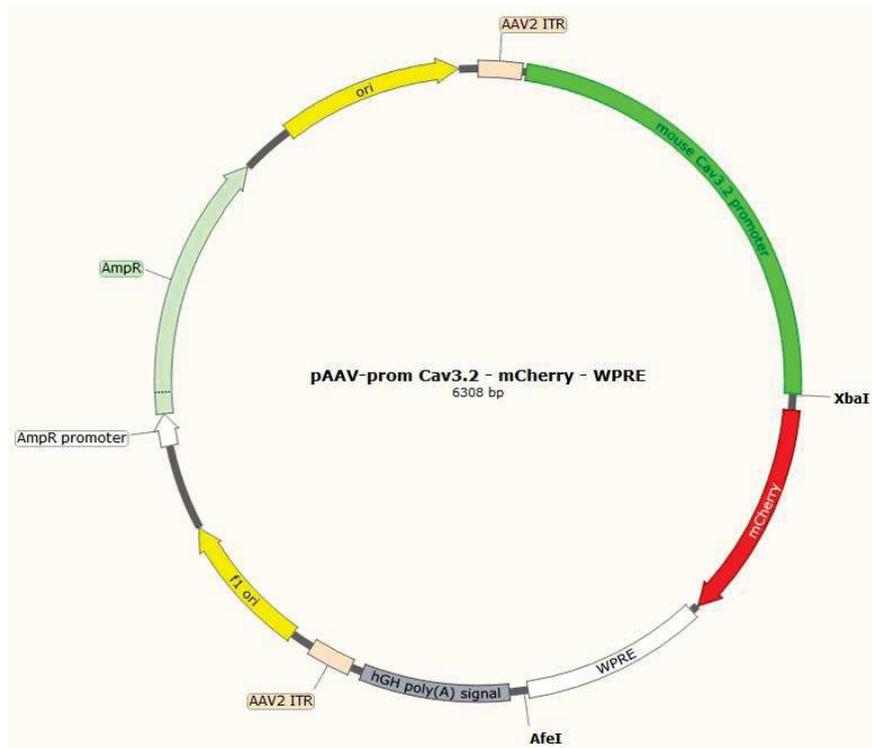


Figure 61. Plasmide pAAV-Cav3.2-mCherry-WPRE. Plasmide codant pour la protéine fluorescente mCherry et la séquence WPRE sous le contrôle du promoteur de souris Cav3.2.

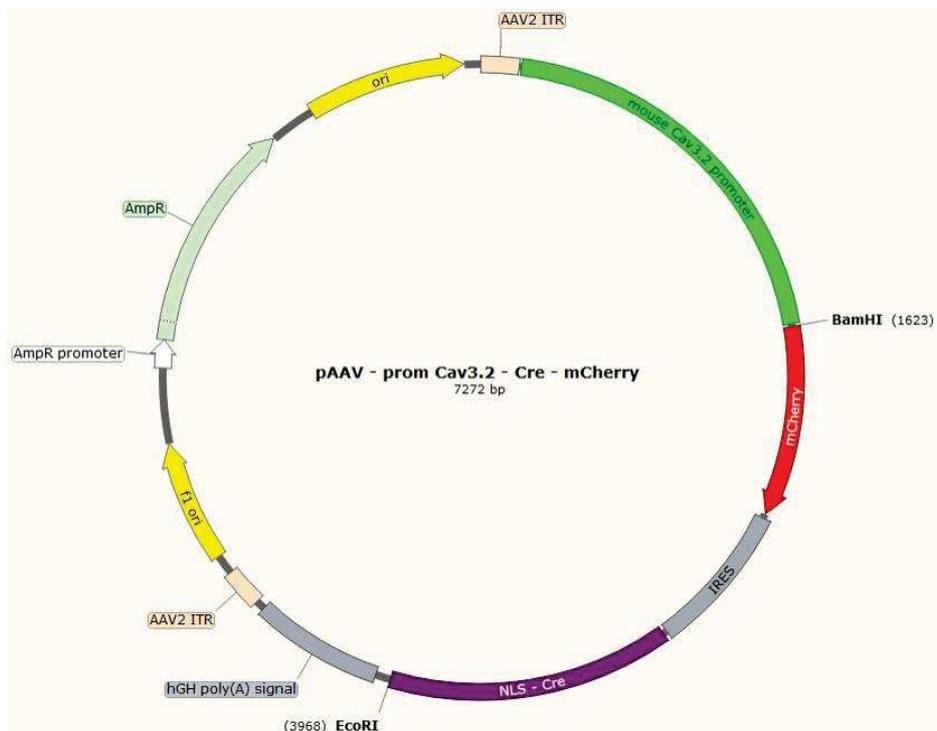


Figure 62. Plasmide pAAV-Cav3.2-Cre-mCherry. Plasmide codant pour la protéine fluorescente mCherry fusionnée à l'enzyme Cre recombinase sous le contrôle du promoteur de souris Cav3.2. La séquence NLS permet l'adressage de la Cre recombinase au noyau.

3.2.-Production de virus

La production de particules virales rAAV nécessite de co-transfecter de manière transitoire des cellules appropriées (lignée HEK293) avec le plasmide contenant le transgène d'intérêt et deux autres plasmides ; l'un codant pour les protéines de réplication et de la capsid (pAAV-Rep/Cap) et l'autre contenant des protéines d'origine adénovirale facilitant la réplication de l'AAV (pAAV-Helper) (fig.63). Pour cette étude, on a utilisé le « DJ-packaging system » (Cell Biolabs) permettant la production du sérotype DJ composé d'un mélange de protéines de capsides de plusieurs AAV (Morgenstern, Marongiu et al. 2011).

Une co-transfection au précipité de calcium-phosphate avec les trois plasmides en proportion équimolaire (jusqu'à 600µg d'ADN total) est réalisée sur des cellules HEK293 à confluence de 80%. Après 48h, les cellules sont décollées avec de l'EDTA et centrifugés à 1000g pendant 10min à 4°C pour les culoter et enlever le milieu de culture. Les culots sont suspendus avec une solution de TBS et soniqués pour faire éclater les cellules, afin de récupérer les particules virales contenus dans celles-ci. Ensuite un traitement avec de la benzoase (Sigma) pendant 45min à 37°C est réalisé pour digérer l'ADN ou l'ARN non encapsulé. Les échantillons sont ensuite centrifugés à 5000g à 4°C pendant 20min pour récupérer le surnageant. Finalement du Tris-HCl 200mM pH 8.0 avec 1mM CaCl₂ et 2mM MgCl₂ et de l'acide désoxycholéique 10% sont ajoutés.

Avant de commencer la purification de virus, il est nécessaire d'écarter le culot d'une centrifugation à 5000g à 4°C pendant 20min. La purification des AAV avec capsid DJ se fait sur colonne d'héparine (HiTrap GE Healthcare). Après équilibration de la colonne avec des solutions de NaCl 150mM, l'échantillon contenant les virus est chargé dans la colonne. Plusieurs éluions/lavages avec des solutions de NaCl 150mM et 250mM sont faits avant d'éluier les virus avec une solution NaCl 500mM, voire 1M. Finalement, les virus sont concentrés dans du PBS-Mg à l'aide des membranes 100K (Millipore AmiconUltra 15) et centrifugations à 2000g. Les virus sont gardés en aliquots à -80°C.

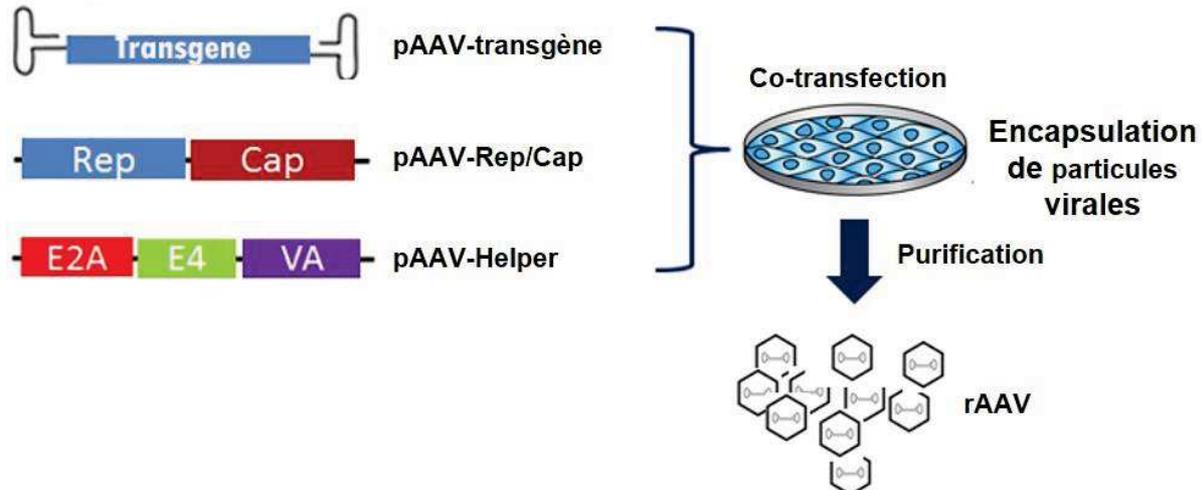


Figure 63. Schéma de la production du virus AAV. Des cellules HEK293 sont co-transfectées avec trois plasmides (pAAV-transgène, pAAV-Rep/Cap et pAAV-Helper) pour produire des particules virales contenant le transgène d'intérêt. Ensuite les particules sont purifiées jusqu'à l'obtention des rAAV. Schéma adapté du site web (<http://signagen.com/AAV-FAQs>).

3.3.-Titration des virus

Un aliquot de virus est utilisé pour une titration par qRT-PCR. Tout d'abord, un traitement à la DNase permet d'éliminer l'ADN non encapsulé. Les primers utilisés pour la titration sont localisés contre le promoteur Cav3.2 : primer *Forward* TTGTTCTCCACCTCCTTC et primer *Reverse* GCAACATAGCAACCTCAGACC et contre la séquence WPRE : primer *Forward* ACTGTGTTTGCTGACGCAAC et primer *Reverse* AGCGAAAGTCCCGGAAAG. Des standards sont préparés avec le transgène du virus linéarisé par digestion enzymatique (MluI ou HindIII suivant le cas) et purifiés sur gel avec le système Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System. Des dilutions contenant 10^4 , 10^5 , 10^6 et 10^7 copies du plasmide sont utilisées comme standards. La réaction de qRT-PCR est réalisée dans 20µl avec du SyberGreen HRM Dye avec un protocole 3-step de 45 cycles à 95°C.

- DJ-Cav3.2-mCherry-WPRE (8.8×10^{11})
- DJ-Cav3.2-mCherry-IRES-Cre (4.5×10^{10})

4. Chirurgie

4.1.-Injection intraspinale

Cette méthode est adaptée de celle (Inquimbert, Moll et al. 2013) :

Après l'anesthésie des souris avec un mélange Ketamine/Xylasine (voir plus haut), la peau du dos est rasée et les yeux sont protégés avec de l'onguent ophtalmique (Allergan). Les souris

sont ensuite placées sur un tapis chauffant, dos exposé vers le haut. Une incision de 2cm est réalisée sur la moitié du dos à hauteur des vertèbres les plus proches du segment L4. Ensuite les muscles sont enlevés des vertèbres à l'aide d'un scalpel. Une fois l'os rendu visible, la pince à laminectomie est introduite entre les vertèbres L4 et L5 pour casser une héli-vertèbre. Les souris sont ensuite placées sur un cadre stéréotaxique et la colonne vertébrale est tenue à l'aide d'une pince. Ensuite une pipette en verre (diamètre 8-10 μm) est chargée avec les virus et deux injections de 800nl à 100nl/min sont faites à 300 μm de profondeur et décalés latéralement de 300 μm vers la gauche par rapport au vaisseau central de la moelle épinière. Les deux sites d'injection sont le plus éloignés l'un de l'autre afin de couvrir un volume maximal. Finalement le muscle et la peau sont suturés et les souris placées dans une boîte de récupération à 37°C jusqu'au réveil. Les souris sont surveillées jusqu'à utilisation, 3 semaines après injection, durée nécessaire à l'expression du virus.

4.2.-SNI : *Spared Nerve Injury*

Cette méthode est adaptée de celle de (Decosterd and Woolf 2000) :

Les souris sont anesthésiées avec un mélange Ketamine/Xylazine (voir plus haut) et placées sur un tapis chauffant (37°C). La peau de la cuisse gauche est rasée et une incision de 1cm est réalisée au milieu de la cuisse dans le sens dorso-ventral. Les muscles sont écartés jusqu'à visibilité du nerf sciatique. Pour les animaux SHAM, la chirurgie s'arrête à cette étape. Pour induire le SNI, les deux branches, péronéale commune et tibiale, sont ligaturées avec un fil de soie, puis coupées. La branche surale est maintenue intacte. Les muscles sont alors remis en apposition et la peau est recousue. Les souris sont placées sur une boîte de récupération à 37°C jusqu'au réveil et surveillées pendant une semaine.

5. Immunohistochimie

5.1.-Préparation de coupes

Les souris sont anesthésiées avec un mélange Ketamine/Xylazine (voir plus haut). Ensuite une perfusion intracardiaque avec 10ml de PBS à 37°C suivi d'une perfusion avec 5ml de PFA 4% dans PBS sont réalisées. Lors de ces deux étapes, un milieu PB pH8.4 a aussi été utilisé dans le but de protéger la GFP contre la dénaturation spontanée provoquée par les pH acides. La colonne vertébrale est alors rapidement disséquée, puis la moelle épinière et les ganglions de la racine dorsale L3, L4 et L5 sont prélevés à froid (voir ci-dessus pour les détails de cette dissection) et incubées pour une étape de post-fixation dans une solution PFA 4% - PBS à 4°C

pendant 1h à 2h. Les tissus sont ensuite rincés trois fois avec du PBS et puis inclus dans de l'agarose 4%. Des coupes sériées d'épaisseur 35-45µm sont faites avec un microtome HM 650V (Thermo Scientific), à froid dans du PBS. Les coupes sont ensuite déposées sur lame « superfrost » ou incubées dans du PBS froid. Elles sont immédiatement utilisées pour les marquages immunohistochimiques ou éventuellement gardées sur lame à -80°C jusqu'à utilisation. Les immunomarquages anti-GFP ont été de meilleure qualité quand les tranches utilisées ont été utilisées sans étape de conservation.

5.2.-Protocole et anticorps

Les tissus sont d'abord rincés 2 fois avec une solution TBS (50 mM Tris-Cl, pH 7.6; 150 mM NaCl) à température ambiante et ensuite incubés avec la solution de blocage destinée à limiter le bruit de fond des émissions de fluorescence (TBS avec 0.05% Tween-20, 0.2% Triton-X100, 5% sérum de chèvre et 5% sérum d'âne) pendant une heure à température ambiante. Les anticorps primaires dilués dans la solution de blocage sont incubés pendant une nuit à 4°C pour les immunomarquages sur lames, et à température ambiante ou à 4°C pour les immunomarquages sur coupes flottantes. Ensuite les coupes sont rincées 3 fois avec la solution TBS et les anticorps secondaires dilués dans la solution de blocage sont incubés pendant 2h à température ambiante. Finalement les coupes sont rincées avec la solution TBS et montées sur lame avec du milieu DAKO.

Table 5. Liste d'anticorps primaires utilisés.

Antigène	Espèce	Dilution	Fournisseur
GFP	Poulet	1/250	Invitrogen
RFP-pAB	Lapin	1/500	MBL (Medical & Biological Laboratories)
Tlx3	Cobaye	1/20000	Dr. Muller (Muller, Anlag et al. 2005)
Pax2	Lapin	1/50	Invitrogen
NeuN	Lapin	1/1000	Millipore
Calbindin D-28k	Lapin	1/1000	Swant
Calretinin	Souris	1/1000	Swant
PKC γ	Lapin	1/1000	Santa Cruz Biotechnology
Parvalbumin	Lapin	1/1000	Swant
nNOS	Mouton	1/3000	Dr. Prevot (Herbison, Simonian et al. 1996)
GFAP	Lapin	1/3000	Sigma
Tlx3	Lapin	1/20000	Dr. Muller (Muller, Anlag et al. 2005)
NeuN	Souris	1/1000	Millipore

Ces marqueurs ont permis des identifications de sous-populations d'interneurones spinaux exprimant Cav3.2. D'autres marqueurs ont été utilisés mais ils n'ont pas donné de résultats pouvant amener à une analyse quantitative. Il s'agit du récepteur NK1, de la somatostatine, du CGRP, du canal calcique de type T Cav3.1, du canal cationique HCN1, de la sous-unité de canal potassique Kv1.1, de neuro D4, de PSD-95, de la synaptophysine, et de NFH.

Les anticorps produits chez la souris ont pu être utilisés dans nos expériences à la condition que la perfusion initiale de l'animal anesthésié rince de manière efficace le sang des vaisseaux sanguins. Dans le cas contraire, des signaux positifs sont générés par la paroi des vaisseaux et ces résultats ont été exclus des analyses.

Table 6. Liste d'anticorps secondaires utilisés.

Anticorps Secondaires- fluorochrome	Espèce	Dilution	Fournisseur
Anti poulet-CF488	Âne	1/500	Sigma
Anti cobaye-A647	Chèvre	1/500	Invitrogen
Anti lapin-Cy3	Chèvre	1/500	Jackson
Anti lapin-CF350	Âne	1/500	Biotum
Anti souris-A568	Chèvre	1/500	Invitrogen
Anti mouton-A647	Âne	1/500	Invitrogen

5.3.-Acquisition et quantification des images

L'acquisition d'images a été faite avec un microscope confocal Leica SP8-UV. La partie dorsale de la moelle a été imagée avec les objectifs x40 ou x60 en faisant des mosaïques. Le traitement des images a été réalisé avec les logiciels LAS AF et/ou FiJi/ImageJ. La quantification de co-expression des marquages a été réalisée sur des images mosaïques canal par canal. Le marquage des corps cellulaires avec le DAPI a été utilisé pour identifier les somas. Un minimum de 3 souris a été utilisé pour chaque condition. Les quantifications ont été normalisées par souris (et pas par lame observée).

6. ISH

6.1.-Préparation des coupes de moelle épinière

Les souris sont anesthésiées avec un mélange Ketamine/Xylasine puis perfusées avec 5ml de PBS froid suivi de 30ml d'une solution PFA4% dans du PBS. La moelle épinière est disséquée et post-fixée dans la solution PFA4% pendant 10-12h à 4°C. Les tissus sont ensuite rincés trois

fois avec du PBS et finalement mis dans une solution sucrose 30% (diluée dans du PBS 1X) pendant 24h à 4°C pour la cryoprotection. Le tissu est inclus dans du milieu de montage OCT et rapidement congelés sur un mélange éthanol/carboglace puis stockés à -80°C. Des coupes de moelle épinière de 16-18µm d'épaisseur ont été réalisées au cryostat et montées sur lames. Les coupes sont séchées pendant 2h et puis congelées à -80°C.

6.2.-Préparation des sondes ARN antisens

Les sondes ARN antisens permettant de détecter les transcrits codant pour *Cacna1g* (Cav3.1) *Cacna1h* (Cav3.2) et *Cacna1i* (Cav3.3) ont été créées comme suit. Une première réaction PCR a été réalisée à partir d'ADN complémentaire d'hippocampe de souris en utilisant des amorces « forward » et « reverse » spécifiques de chaque transcrit (F1 et R1, respectivement), afin d'amplifier un fragment de 800-1000 paires de bases de chaque gène (Table 7). Ces amorces ont été construites en utilisant le logiciel PrimerBlast (NIH). Pour chaque gène, une région unique, qui ne recouvre pas d'autre séquence d'ARN connue a été identifiée en utilisant le logiciel Blast (NIH). Le produit PCR obtenu a été vérifié sur gel et purifié (kit *NucleoSpin Gel and PCR clean-up* (Macherey-Nagel)) afin d'être utilisé dans une deuxième réaction de PCR réalisée avec des amorces « forward » (F2) et « reverse (R2) internes au premier produit PCR (table 7). La séquence de l'amorce R2 contient la séquence du promoteur T7 de l'ARN polymérase T7. Les deux PCR ont été exécutées comme suit : (i) 1 cycle à 95°C durant 5min, (ii) 35 cycles alternant à 95°C pendant 15 secondes, à 58°C pendant 15 secondes et à 72°C pendant une minute, et (iii) 1 cycle à 72°C durant 5min. Après vérification sur gel et purification (kit *NucleoSpin Gel and PCR clean-up* (Macherey-Nagel)), le deuxième produit PCR a été transcrit en ARN à l'aide de l'ARN polymérase T7 (Promega). Pour réaliser des sondes couplées soit à la digoxigénine (DIG) soit à la Fluorescéine (Fluo), un mélange de nucléotides dont l'uracile est respectivement couplé DIG ou Fluo (Roche) a été utilisé. Les sondes ont été purifiées sur une micro-colonne de gel d'exclusion de taille G50 (GE Healthcare Illustra™ ProbeQuant™).

Table 7. Sondes ARN antisens utilisées.

Gène	Amorce	Séquence (5' → 3')
<i>Cacna1i</i>	F1	AGCAGCCTGTCACTCACATC
	R1	GGTGTGAACTGTCCCCAAA
	F2	AGTTCAGCAGTACCAGCAGC
	R2	TAATACGACTCACTATAGGGGTCCCCCAAAGTG TTCACGA
<i>Cacna1g</i>	F1	GCCAAGGACCCTCAAGAGAC
	R1	TGTAATACACTCACGGCCCC
	F2	AAGGACCCTCAAGAGACCAGA
	R2	TAATACGACTCACTATAGGGCAGACGCTTTCGCCTCAAAA
<i>Cacna1h</i>	F1	GGAAGGGCAGATAGATGACG
	R1	GTCTTATTGCATGGGCCAGT
	F2	CGGAGCCTGCTGAAAATATC
	R2	TAATACGACTCACTATAGGGGAAGGATGCCGAGTGATGATT

* *en gras* : séquence du promoteur T7

6.3.-Protocole d'hybridation *in situ* et immunomarquage

Après décongélation et séchage (2h à température ambiante), les coupes de moelle épinière ont été perméabilisées pendant 8 min à 37°C dans une solution contenant 10µg/ml de protéinase K (Roche) diluée dans du Tris-HCl (50mM pH 7.5), et rincées 3 fois 5min dans du PBS. Les coupes ont été ensuite incubées dans une solution contenant 0.3% d'anhydride acétique (Sigma) dilué dans de la triéthanolamine (Sigma) à 0,1M pendant 10min à température ambiante et rincées 3 fois 5min dans du PBS. Les tissus ont été incubés dans du tampon d'hybridation (TH : ARNt de levure 250µg/ml (Roche), ADN de sperme de saumon 500µg/ml (Invitrogen), solution de Denhardt 5X (Gibco), SSC 5X, formamide (Sigma) 50%) pendant 3h à température ambiante pour saturer les sites de fixation d'ARN aspécifiques. Au bout de ce temps, les sondes ARN antisens spécifiques de 1) *Cacna1g* (Cav3.1) couplées DIG et de *Cacna1h* (Cav3.2) couplées Fluo et 2) *Cacna1i* (Cav3.3) couplées DIG et de *Cacna1h* (Cav3.2) couplées Fluo ont été diluées dans le TH et dénaturées 5 min à 80°C. Le TH utilisé pour la préhybridation a été enlevé des lames et remplacé par le TH contenant les sondes. L'hybridation des sondes ARN antisens sur les tissus de moelle épinière a été réalisée dans un four humidifié, à 55°C pendant 12-14h. Les lames ont été ensuite lavées 2x30min dans du SSC 0,2X à 65°C, rincées 5min dans TNT 1X (Tris-HCl 100mM pH7.5, NaCl 150mM, Tween-20 0.1%) et incubées 1h à température ambiante dans du tampon de saturation (TS : TNT + 1% *blocking reagent* (Roche) + 10% sérum d'âne (Invitrogen)). Pour révéler les sondes couplées DIG, les lames ont été incubées pendant 3h avec des anticorps anti-DIG couplés à la peroxydase (Roche), dilués 1:500 dans du TS.

Après 3 lavages de 5min dans TNT 1X, les lames ont été incubées pendant 10 min à température ambiante avec le substrat de la peroxydase (la tyramide) couplé à la cyanine 3, fourni par le kit Tyramide Signal Amplification-Cy3 (Perkin Elmer). Ensuite les lames ont été rincées 3x5min dans du TNT 1X et incubées pendant 30 minutes avec une solution contenant 2% H₂O₂ (Sigma) diluée dans du PBS, pour saturer l'excès éventuel de peroxydase. Après un rinçage de 5 min dans du TNT 1X, les lames ont été incubées 1h à température ambiante avec du TS. Pour révéler les sondes couplées Fluo, les coupes ont été incubées avec des anticorps anti-Fluo couplés à la peroxydase (Roche), dilués 1:1000 dans du TS, pendant 12-14h à 4°C, lavées 3x5min avec du TNT 1X, incubées pendant 10 min à température ambiante avec le substrat de la peroxydase couplé à la Fluorescéine pourvue par le kit Tyramide Signal Amplification-Fluo (Perkin Elmer) et lavées 3x5min avec du TNT 1X.

Après révélation des sondes, les tissus ont été incubés pendant 12-14h à 4°C avec des anticorps polyclonaux de lapin anti-PKCg murine (Santa Cruz) ou de lapin anti-RFP (*Red fluorescent protein*) (MBL) dilués 1 :500 dans du tampon BID (3% BSA, 0,4% Triton, 10% sérum d'âne, PBS). Les tissus ont été rincés 3 fois 10min avec PBS, incubés 1h à température ambiante avec des anticorps secondaires d'âne anti-lapin couplés Alexa 647 (Jackson Laboratory) dilués dans BID et rincés 3x10min avec PBS. Les noyaux ont été marqués avec de l'Hoescht (Invitrogen, dilution 1:5000 dans du PBS, incubation 5 minutes à température ambiante) et les lames ont été montées avec du milieu de montage ImmuMount (Thermo Scientific).

RESULTATS

Draft article

Cav3.2 T-type calcium channels shape electrical firing in mouse Lamina II neurons

Miriam Candelas ^{1,2,3,4}, Ana Reynders ⁵, Margarita Arango-Lievano ^{2,3,4}, Antoine Fruquière ^{1,2,3,4}, Elsa Demes ^{1,2,3,4}, Jawed Hamid ⁶, Céline Lemmers ^{1,2,3,7}, Claire Bernat ^{1,2,3,7}, Arnaud Monteil ^{1,2,3,4,7}, Vincent Compan ^{1,2,3,4}, Sophie Laffray ^{1,2,3,4}, Perrine Inquimbert ⁸, Yves Le Feuvre ⁹, Gerald W. Zamponi ⁶, Aziz Moqrich ⁵, Emmanuel Bourinet ^{1,2,3,4*}, Pierre-François Méry ^{1,2,3,4*}

Addresses: ¹ Laboratories of Excellence - Ion Channel Science and Therapeutics, Montpellier, France, ² Inserm U-1191, Montpellier, France; ³ CNRS UMR 5203, Institut de Génomique Fonctionnelle, Montpellier, France; ⁴ Université Montpellier, Montpellier, France; ⁵ Aix-Marseille-Université, CNRS, Institut de Biologie du Développement de Marseille, France; ⁶ Department of Physiology and Pharmacology, University of Calgary, Calgary, Canada; ⁷ Plateforme de Vectorologie, Biocampus Montpellier, CNRS UMS 3426, INSERM US009, Montpellier, France, ⁸ CNRS, Institut des Neurosciences Cellulaires et Intégratives, Strasbourg, France; ⁹ UMR 5297, Interdisciplinary Institute for Neuroscience, Bordeaux, France.

* Corresponding authors: emmanuel.bourinet@igf.cnrs.fr or pierre-francois.mery@igf.cnrs.fr

Running Head: Cav3.2-dependent firing in spinal cord neurons

Author contribution statement: MC, AR, AF, ED, CL, CB, SL, EB, PFM did the experiments; MC, CB, PFM analyzed the experiments; AM, VC, JH, and GWZ provided molecular biology resources, PI, YLF provided information and protocols for patch-clamp experiments; MC, AR, GWZ, EB, PFM wrote the article; AzM, EB, PFM directed the work.

Conflict of interests: The authors declare no conflict of interests.

ABSTRACT (190 words)

The Cav3.2 T-type calcium channel is necessary for acute pain perception, as well as mechanical and cold allodynia in mice. Being found throughout sensory pathways, from primary afferent neurons up to pain matrix structures, it is a promising target for analgesics. Here we show that Cav3.2 is detected in ~60% of the lamina II (LII) interneurons of the spinal cord, an integration level of sensory processing. It is co-expressed with Tlx3 and Pax2, markers of excitatory and inhibitory interneurons, as well as nNOS, calretinin, calbindin, PKC γ and not parvalbumin. TTA-A2, a T-type channel inhibitor, abolished rebound depolarizations that were associated with action potential pairing in unidentified as well as in Cav3.2-expressing LII neurons. Cav3.2 ablation in LII interneurons of Cav3.2-GFP KI^{fllox} mice 1) blunted the proportion of neurons with transient firing patterns; 2) blunted the amplitude of the rebound depolarization and the proportion of rebound-exhibiting neurons, and 3) amplified and accelerated action potentials. Overall, our data indicate that Cav3.2 plays several key roles in the excitability of LII neurons, and support the notion that Cav3.2 channels in the spinal cord may be an attractive target for interfering with chronic pain.

Keywords: T-type calcium channel, low threshold spike, Cav3.2, spinal cord, patch clamp, GABA, glutamate, synaptic transmission

INTRODUCTION (649 words)

Pain therapeutics act at various levels of the nociceptive pathway and of the pain matrix and often target ion channels, or receptors. The constitutive deletion of the Cav3.2 gene, encoding a T-type calcium channel, alleviates acute pain, inflammatory pain, and visceral pain in mice (Choi, Na et al. 2007), suggesting its utility as a therapeutic target. Accordingly, T-type calcium channels antagonists induce various forms of analgesia in animals and humans (Shen, Chen et al. 2015, Kerckhove, Mallet et al. 2014; Snutch and Zamponi, 2017). Thus, it is important to define 1) loci of action of Cav3.2 antagonists *in vivo*, and 2) the mechanism of action of Cav3.2 on cellular functions within these loci along the nociceptive tract.

The role of Cav3.2 in primary afferent neurons involved in sensory detection and discrimination has been extensively characterized (Liao, Tsai et al. 2011, Francois, Schuetter et al. 2015, Bernal Sierra, Haseleu et al. 2017). Indeed, Ni²⁺ inhibits miniature excitatory currents and dorsal root evoked glutamatergic neurotransmission in the dorsal horn of the spinal cord (Bao, Li et al. 1998, Garcia-Caballero, Gadotti et al. 2014). The intrathecal injection of Cav3.2 antisense shRNA blunts visceral pain (Marger, Gelot et al. 2011), has an anti-allodynic effect in a neuropathic pain model in rats (Bourinet, Alloui et al. 2005) and an anti-hyperalgesic effect in diabetic rats (Messinger, Naik et al. 2009). When restricted to Nav1.8-expressing primary afferent neurons, the conditional ablation of Cav3.2 also has a variety of effects, including a diminution in noxious cold perception, a reduction in chemical nociception and an anti-allodynic effect in chronic pain models (Francois, Schuetter et al. 2015). Of note, the anti-allodynic effect of Cav3.2 deletion in non-myelinated fibers involves C-LTMR afferent fibers that project to lamina II, LII (Antal, Polgar et al. 1991, Francois, Schuetter et al. 2015, Abraira, Kuehn et al. 2017). Hence, there is considerable evidence that Cav3.2 calcium channels are important for the function of peripheral sensory neurons. Much less information is available about the roles of T-type calcium channels in the spinal cord where pain related information is first processed. Expression of Cav3.2 was observed in lamina II-IV interneurons (Liao, Tsai et al. 2011, Francois, Schuetter et al. 2015, Bernal Sierra, Haseleu et al. 2017). This region is well-known to receive descending nociceptive controls to gate sensory flow within the spinal cord, and to undergo disinhibition during allodynia (Torsney and MacDermott 2006, Mirauccourt, Dallel et al. 2007, Lu, Dong et al. 2013, Peirs, Patil et al. 2014, Foster, Wildner et al. 2015, Petitjean, Pawlowski et al. 2015, Abraira, Kuehn et al., 2017). Yet, some unidentified LII interneurons can express T-type channels (Talley, Cribbs et al. 1999, Francois, Schuetter et al. 2015), and can exhibit T-type activity (Ryu and Randic 1990, Ruscheweyh and Sandkuhler 2002, Ku and Schneider 2011, Reali and Russo 2013, Smith, Boyle et al. 2015). This suggests the possibility that Cav3.2 might participate in the intrinsic properties of LII interneurons, but this has not been described so far under either physiological or pathological conditions.

Our aim was to therefore identify the functions of Cav3.2 channels in the spinal cord. Here we show that Cav3.2 channels is broadly expressed in a very heterogeneous population of LII interneurons. An

examination of the electrophysiological properties of unidentified neurons revealed a strong sensitivity of rebound depolarization to TTA-A2, a T-type channel inhibitor. Using a viral based cell identification strategy, we next focused on Cav3.2-expressing interneurons, which exhibited electrophysiological properties close to those of the whole population. A Cre-recombinase induced deletion of Cav3.2 in adult mice changed the distribution of firing patterns, the properties of the action potential and eliminated the pairing of action potentials in LII interneurons exhibiting a rebound behavior. Collectively, our findings reveal an important role of Cav3.2 in the processing of pain information in the spinal cord, and suggest that selective targeting of spinal Cav3.2 channels as a novel therapeutic strategy for pain management.

MATERIALS AND METHODS (1579 words)

Study approval

Animal procedures (#747) complied with the welfare guidelines of the European Community and were ethically approved by the Direction of Veterinary departments of Herault, France (agreement number A 34-172-41) and the Languedoc Roussillon Institutional Animal Care and Use Committee, France (#CE-LR-0818).

Slice preparation for electrophysiological recordings

Adult 6-12 week-old wildtype or Cav3.2-GFP knockin (KI)^{flox} mice (Francois, Schuetter et al. 2015) were anesthetized by injection of 0.1ml/10mg ketamine (10mg/ml) plus xylazine (1mg/ml). They were perfused through the left ventricle with solution-1 [in mM; 122 N-methyl-D-glucamine-Cl, 2.5 KCl, 1 CaCl₂, 7 MgCl₂, 2.5 NaHCO₃, 1.5 NaH₂PO₄, 10 HEPES, 25 glucose, 0.2-5 ascorbic acid, 0.2-5 thiourea; pH 7.4, 0-2°C, gassed with O₂] (Baccam, Alonso et al. 2007). N-acetyl-L-Cysteine 2mM was added when using mice aged 10-12 weeks. The lumbar region of the spinal cord was quickly removed in solution-1, embedded into low-melting Agarose and 300µm-thick frontal sections were processed on a microtome (Leica VT12000S, Leica Microsystem, Nanterre, France) within 20 min and kept at least for 1 hour in solution-2 [in mM; 115 NaCl, 2.5 KCl, 2 CaCl₂, 4 MgCl₂, 26 NaHCO₃, 1.25 NaH₂PO₄, 25 glucose, 0.2 ascorbic acid, 0.2 thiourea; pH 7.4, 30 °C, gassed with 95% CO₂-5% O₂].

Patch-clamp recordings

Slices were immobilized with a nylon grid in a submersion chamber on the stage of an upright microscope (Olympus BX51WIF, Olympus Fr., Rungis, France) and superfused with solution-3 [in mM; 125 NaCl, 2.5 KCl, 2 CaCl₂, 1 MgCl₂, 26 NaHCO₃, 1.25 NaH₂PO₄, 11 glucose; pH 7.4, 32°C, gassed with 95% CO₂-5% O₂] at 2 ml/min for at least 15 min. Infrared differential interference contrast illumination was used to visualize neurons, with a x40 immersion objective and Nomarski differential interference contrast optics, and the images captured with a camera (Jenoptik ProgRes MF, Bayeux, France). When appropriate, the mCherry fluorescent signal was superimposed with the IR-DIC image in order to locate the Cav3.2-expressing neurons. Borosilicate glass pipettes were connected to the head stage of a Axon MultiClamp 700B, interfaced with an Axon Digidata 1550A and controlled with pClamp10 (all from Molecular Devices, Sunnyvale, USA). Drugs were either bath-applied or ejected locally. When bath-applied, solutions were changed by switching the supply of the superfusion system. When ejected in the vicinity of the neurons with a pipette, compounds were diluted in a HEPES-based medium containing in mM: 138 NaCl, 2.5 KCl, 2 CaCl₂, 1 MgCl₂, 3 NaHCO₃, 1.25 NaH₂PO₄, 10 HEPES, 12 glucose, pH 7.4 with NaOH. ATTO-dye 550 or ATTO-dye 488 (Invitrogen, Waltham, USA) were occasionally included in the ejection pipette as a control of ejection accuracy. Slices were discarded

after being exposed to a compound. All chemicals were from Sigma-Aldrich (L'isle d'Abeau, France) excepted TTA-A2 kindly provided by Merck Research Labs (West Point, PA, USA).

For action potentials recordings and for synaptic currents recordings, pipettes (6–8 M Ω) were filled with (in mM): 139 K-gluconate, 10 HEPES, 0.1 EGTA acid, 1 MgCl₂, 2 MgATP, 0.5 Na-GTP, 5 Na₂-phosphocreatine, 2.5 Na-pyruvate, 2 malate, pH 7.3 with KOH (295 mOsm adjusted with KMeSO₃). ATTO-dye (550 or 488) was included in order to verify the identity of the neuron. Action potentials and resting properties were elicited by increasing and decreasing 2s-duration current pulses, respectively, from a holding adjusted at -70mV (Grudt and Perl 2002). Subthreshold electrical activity was triggered from -90mV for 3s to step-by-step current increments of 1.5s until electrical activity was elicited (Tadros, Harris et al. 2012). Miniature synaptic currents were recorded in the presence of extracellular tetrodotoxin (TTX) 500nM (Latoxan) at a holding potential of -70mV. Analysis were performed with Axograph (Clements and Bekkers 1997) or Clampex10 (Molecular Devices) using either a threshold based detection or an appropriate template.

For the recordings of T-type currents, the internal solution was adapted from (Dreyfus, Tschertter et al. 2010) (in mM): 125 CsMeSO₃, 10 HEPES, 5 EGTA acid, 1 MgCl₂, 2 MgATP, 0.5 Na-GTP, 5 Na₂-phosphocreatine, 2 Na-pyruvate, 2 malate, 7 KCl, pH 7.4 with CsOH (295 mOsm adjusted with CsMeSO₃). Blockers were added to the external medium: TTX (500nM), CdCl₂ (100 μ M), 4-aminopyridine (4-AP, 1mM), tetra-ethyl-ammonium (TEA, 10mM) and Ivabradine (1 μ M). The neurons were voltage-clamped at -90mV and 1s-duration pulses of increasing amplitude were delivered by steps of 5mV.

Plasmid cloning and virus production

The minimal Cav3.2 promoter used was based upon nucleotide sequence derived from mouse *cacna1h* gene locus sequence (ENSMUSG00000024112). We purchased a mouse Cav3.2 promoter clone (MPRM 12993) from promoter clone library (GeneCopoeia) with additional restriction endonuclease sites Mlu I and BamHI at the 5 prime and 3 prime ends, respectively. This clone consists of 1462 nucleotides of the mouse Cav3.2 gene, with 1450 nucleotides 5' to Exon 1 and 12 nucleotides of the non-coding exon 1 of mouse Cav3.2 gene (ENSMUSG00000024112, see **Fig. S1 online**). This sequence was subjected to online analysis for core promoter sequences (<http://gpminer.mbc.nctu.edu.tw/index.php>) to confirm the presence of TATA and CCAAT boxes as identified in the rat sequence (van Loo, Schaub et al. 2012). This promoter fragment was isolated via restriction with MluI and BamHI from the original promoter clone (MPRM 12993) and sub cloned into pAAV-hSyn-hChR2(H134R)-mcherry (Addgene26976) using the same restriction sites (MluI and BamHI) to replace the hSyn promoter sequences with mouse Cav3.2 promoter sequence. The plasmid pAAV-Cav3.2-mCherry was cloned using pAAV-Cav3.2-hChR2-mCherry. A 1300bp fragment was

amplified by PCR with the forward primer **ATTCTAGAAAGACGAAGCCGAGGC** and the reverse primer **AAGAATACCAGTCAATCTTTCACAA**. The PCR product was cloned into pAAV-Cav3.2-hChr2-mCherry using the XbaI and AfeI restriction sites. The pAAV-Cav3.2-Cre-mCherry was obtained by cloning the mCherry-IRES-Cre sequence of the plasmid pAAV-EF1a-mCherry-IRES-Cre (Addgene 55632) into the vector pAAV-Cav3.2-mCherry using BamHI and EcoRI restriction sites. The Viral production in HEK-293 cells was performed with the DJ-packaging system (Cell Biolabs) and purified on an heparin column according to (Morgenstern, Marongiu et al. 2011). Virus titers ($>10^{11}$ copies/ml in the present study) were estimated by q-PCR using either the forward primer **TTGTTCTCCACCTCCTTC** and the reverse primer **GCAACATAGCAACCTCAG ACC**, or the forward primer **ACTGTGTTTGCTGACGCAAC** and the reverse primer **AGCGAAAGTCCCGGAAAG**.

Intraspinal injection of virus

The method was adapted from (Inquimbert, Moll et al. 2013): mice were anesthetized with ketamine plus xylazine and installed on a heating plate (37°C). A 2cm-long incision was performed at the level of the L1 vertebra, and the spinal cord was exposed by removing the dorsal portion of the vertebra L1 using a laminectomy forceps. A micro syringe held on a stereotaxic frame and filled with the virus suspension was positioned at the rostral-most portion of the exposed spinal cord, 500µm laterally with respect to the posterior median sulcus. Injections (800µl) were performed at a depth of 300µm, at a rate of 200nl/min. After careful retraction of the syringe, this operation was repeated at the caudal-most portion of the exposed spinal cord. The fascia and the skin were sutured before the mouse was transferred into a recovery cage for >4 hours, and postsurgical treatments were provided according to guidelines.

Immunofluorescence experiments

Mice (8-14 weeks) were anesthetized with ketamine plus xylazine and processed according to (Francois, Schuetter et al. 2015). Spinal cord were fixed with a transcardiac perfusion of cold PBS containing PFA 4% and a post-fixation (<2 hours) at 4°C. They were embedded in 4% agarose and sectioned at 30-40 µm with a vibratome (Microm HM 650V, Brignais, France). In brief, the sections were blocked with TBS plus 0.05% tween 20 (TBST), 0.2% Triton X 100 and 10% normal serum (goat or donkey), 22°C, for 1 hr; the incubations with primary antibodies (supplementary **Table 1** online) were done in blocking solution at 4°C overnight; and the incubation with secondary antibodies (supplementary **Table 1** online) were performed at 22°C, 2 hrs. They were included in Dako Mounting Medium (Agilent Tech., Santa Clara, USA) and images were performed on a confocal microscope (Leica SP8-UV, Nanterre, France) with x40 (Plan Apochromat 1.3 NA oil DIC) and x63 (Plan Apochromat 1.4 NA oil DIC) objectives. Image processing was performed with FiJi (Schindelin, Arganda-Carreras et al. 2012), and cell densities were normalized to DAPI labelling or to the appropriate antigen as stated in the text.

***In situ* hybridization and immunostaining**

In situ hybridization and immunostaining were performed according to (Moqrich, Earley et al. 2004). Mice were deeply anesthetized with a mix of ketamine/xylazine and then transcardially perfused with an ice-cold solution of 4% PFA in PBS. After dissection, spinal cords were post-fixed for 12 h at 4°C and transferred into a 30% (w/v) sucrose solution for cryoprotection before being frozen and stored at -80°C. 16 to 18µm cryosections were obtained using a standard cryostat (Leica). Dioxigenin-labeled RNA probes were synthesized using gene-specific PCR primers (supplementary **Table 2** online) and cDNA templates from adult mouse dorsal root ganglia or hippocampus. Probes were hybridized overnight at 55°C, and the slides incubated with the horseradish peroxidase anti-digoxigenin antibody (Roche). Final detection was achieved using Cy3 TSA plus kit (Perkin Elmer). Sections were then incubated overnight at 4°C with the appropriate antibody (anti-RFP for mCherry, or rabbit anti-PKC γ), diluted in PBS supplemented with 10% (v/v) donkey serum (Sigma), 3% (w/v) bovine albumin (Sigma) and 0.4% (v/v) Triton X-100. Anti-rabbit A488 or anti-rabbit A647 antibodies (supplementary **Table 1** online) were used for secondary detection. Nuclei were stained with Hoescht (Sigma Aldrich). Slides were mounted with Immu-Mount (Thermo Scientific) prior to observation under LSM780 confocal microscope (Carl Zeiss, Jena, Germany). Contrast was adjusted using Photoshop software.

Statistics

Data were generally expressed as mean \pm SEM. In few cases, families of individual values are shown. They were compared with the appropriate tests using Prism, and $p < 0.05$ was considered as significantly different.

RESULTS (2397 words)

Distribution of cells expressing Cav3.2-GFP and neurochemical phenotype

To determine the nature of Cav3.2-expressing cell types in the spinal cord, we took advantage of Cav3.2-GFP KI^{fllox} mice that express GFP at Cav3.2 locus (Francois, Schuetter et al. 2015). In adult Cav3.2-GFP KI^{fllox} mice, GFP labelled cell bodies and nerve terminals mostly, although not exclusively, located in the LII of the spinal cord (**Fig. 1A**), as previously reported (Francois, Schuetter et al. 2015). The majority of GFP-expressing cell bodies (about 70.8%) were co-expressed with Tlx3, a marker of excitatory interneurons. A small fraction (about 15.4%) of GFP-positive cell bodies were positive for Pax2, a marker of inhibitory interneurons (**Fig. 1B-D**). The neuronal origin of GFP-expressing cells in the spinal cord was further confirmed using pan-neuronal NeuN staining. Indeed, the majority of GFP-positive cells expressed NeuN (**Fig. 1H** and **Table 1**). Overall, Cav3.2 was present in about 60% of the LII interneurons, contributing to about half of the Tlx3-positive subset (47.9%, **Table 1**) and to a much smaller subpopulation of Pax2-positive neurons (15.7%, **Table 1**).

Further dissection of neuronal cell types expressing Cav3.2 using immunolabelling for GFP and known markers of subpopulations of LII-LIII interneurons involved in sensory processing by the DH (Calbindin, CB; protein kinase C gamma, PKC γ ; Calretinin, CR; neuronal NOS, nNOS; Parvalbumin, PV), revealed a highly heterogeneous expression pattern (**Fig. 2, Table 2**). Most of GFP-expressing neurons were CB-positive (43.2% of GFP neurons, **Table 2, Fig. 2A**) or PKC γ -positive (37.0% of GFP neurons, **Table 2, Fig. 2B**), two markers of excitatory neurons of the LII (Antal, Polgar et al. 1991, Polgar, Shehab et al. 1999, Hughes, Averill et al. 2008, Abaira, Kuehn et al. 2017). The GFP-positive neurons expressing CB also expressed Tlx3 (40.3% of GFP neurons, **Table 2**), the marker of excitatory DH interneurons (Cheng, Arata et al. 2004). The GFP-positive neurons expressing PKC γ were mainly excitatory since 85.7% of the PKC γ -positive neurons expressed GFP, PKC γ and Tlx3 (**Table 2**). Interestingly, most PKC γ -expressing neurons, which are disinhibited during mechanical allodynia (Lu, Dong et al. 2013, Peirs, Patil et al. 2014, Petitjean, Pawlowski et al. 2015), were Cav3.2-expressing (91.7%, **Fig. 2B, Table 2**). Besides expressing Cav3.2, some PKC γ interneurons could also express Cav3.1 and Cav3.3 mRNAs, as detected by *in situ* hybridization (supplementary **Fig. S2** online). Almost half of the CR neurons, which relay nociceptive inputs to projection neurons (Lu, Dong et al. 2013, Peirs, Patil et al. 2014), were GFP-positive (**Fig. 2C, Table 2**). This population was mostly excitatory, since CR alone, and CR/Tlx3 double labelled represented 26.1% and 22.1%, respectively, of the GFP-positive neurons (**Table 2**). These neurons might correspond to the atypical CR neurons reported in mice (Smith, Boyle et al. 2015). A small subset of GFP-expressing neurons also expressed nNOS (10.7%), and they accounted for almost half of the nNOS-positive neurons (42.1%, **Fig.2D, Table 2**). These neurons, are both inhibitory and excitatory (**Table 2**), in agreement with a previous report (Sardella, Polgar et al. 2011) and are differentially recruited during noxious stimulations (Polgar, Sardella et al. 2013). In contrast, the PV-expressing neurons of LIII, some of which are gatekeepers of the gate control

theory for mechanical allodynia (Petitjean, Pawlowski et al. 2015) were marginally GFP-positive (7.4% of the PV neurons, **Fig. 2E, Table 2**). Altogether, these results indicate that Cav3.2 channels are expressed in a wide variety of spinal cord interneurons, which relay primary afferent activity to projection neurons during mechanical allodynia.

Effect of TTA-A2 on excitatory synaptic transmission

The Cav3.2-expressing primary afferent neurons project to internal LII where most Cav3.2 interneurons are found (Francois, Schuetter et al. 2015). To study the T-type channel contribution to neurotransmission, we examined the synaptic currents in acute spinal cord slices from adult mice using the whole cell configuration of the patch clamp technique. Miniature excitatory post-synaptic currents (mEPSCs) of LII neurons were recorded at a constant membrane potential of -70mV (Inquimbert, Bartels et al. 2012), in the presence of a sodium channel blocker (TTX 500nM, **Fig. 3**). Addition of a T-type blocker TTA-A2 (500nM) in the superfusion medium did not modify the mEPSCs in the experiment of **Fig. 3A,B**. On average, TTA-A2 had no effect of the mean distributions of the amplitudes or the inter-event intervals of mEPSCs recorded at steady state (n=12, **Fig. 3C,D**). Since HCN channels might mask T-type calcium channel activity (Huang, Lujan et al. 2011), this experiment was repeated in the continuing presence of 1 μ M of the HCN inhibitor ivabradine (n=9, **Fig. 3E,F**). The ejection of TTA-A2 in the vicinity of the neurons did not significantly modify the spontaneous mEPSCs over time, under this condition either. T-type channels control the activity of both excitatory and inhibitory terminals (Bao, Li et al. 1998, Yuan, Chen et al. 2009) and these regulations might balance each other. Thus, the effect of TTA-A2 was also examined under constant GABA_A-ergic (Gabazine 3 μ M) and Glycinergic (Strychnine 3 μ M) receptors inhibition (n=5, **Fig. 3G,H**). However, no significant effect of TTA-A2 inhibition on excitatory synaptic transmission was detected under this experimental condition. T-type channels did not participate significantly in the spontaneous excitatory synaptic transmission of LII neurons. This does not exclude the possibility that T-type channels might exert significant contributions in some more homogenous, subpopulations of LII interneurons (see also Garcia-Caballero, Gadotti et al. 2014).

Association of T-type channel activity with firing patterns of LII neurons

T-type calcium channels participate in the intrinsic properties of some DH interneurons (Ruscheweyh and Sandkuhler 2002, Ku and Schneider 2011, Smith, Boyle et al. 2015). We analyzed the firing properties of LII neurons elicited by depolarizing current pulses from a holding potential of -70mV in acute lumbar slices from adult mice (supplementary **Fig. S3-S4** online). These patterns were highly heterogeneous, with the delayed firing profile being the most frequent (28.5%), and various proportions of transient (18%), irregular tonic (16.5%), regular tonic (12.8%), gap firing (12.7%) and single spiking (11%) (n=134, supplementary **Fig. S4C** online).

Subthreshold rebound depolarizations elicited from a hyperpolarizing conditioning prepulse at -90mV were more homogeneous since three behaviors were observed: rebound shaped depolarizations (49%), slow slope depolarizations (18%) and flat, apparently passive, decays (33%) (n=124, **Fig. 4A-B**). Although these properties did not tightly segregate with a firing pattern (n=124, **Fig. 4C**), neurons exhibiting rebounds more likely supported higher activities at the onset of the pulse, namely single spiking, transient and irregular tonic patterns. Since rebound shaped depolarizations can be a signature of T-type channels (Llinas and Steriade 2006), a multiple steps protocol including a subthreshold and a suprathreshold current injection was designed to investigate the role of T-type channels and neuronal firing (**Fig. 4D**). When a neuron elicited a rebound depolarization, the T-type channel inhibitor TTA-A2 significantly decreased the rebound amplitude during the first subthreshold step and abolished action potential firing during the second suprathreshold step (n=7, Wilcoxon paired test, p=0.015), **Fig. 4E-F**. Rebound depolarization was not only associated with an “all-or-none” effect on firing. Indeed, an analysis of the first five action potentials revealed that neurons exhibiting rebound depolarizations also specifically exhibited a pairing of the first two action potentials, (**Fig. 4G-H**), the instantaneous frequency of the second action potential being shorter than all others (n=49, Wilcoxon paired test, p<0.0001, **Fig. 4H**). In the neurons with a slow slope decay (n=39) and neurons with a flat response (n=13), the first action potential had the longest latency (Wilcoxon paired test, respectively, p<0.0001 and p=0.006), **Fig. 4H**), and the next action potentials occurred regularly. Altogether, these data not only confirm the involvement of T-type calcium channels in the spinal cord, but show that they are correlated with specific firing patterns.

Properties of Cav3.2-expressing neurons in the LII of the spinal cord

Since the excitability of LII interneurons appeared to be dependent on T-type calcium channels, a selective role for Cav3.2 was then investigated in greater detail. A 1.4kb fragment of the Cav3.2 promoter gene was inserted into a pAAV-expression vector in order to control the selective expression of the fluorescent protein mCherry in Cav3.2-expressing neurons. The viral particles were injected at two sites of the lumbar spinal cord in 4 weeks-old wildtype mice (**Fig. 5A**). Detection of mCherry-positive neurons by immunofluorescence 3-4 weeks after injection showed a large coverage of the lumbar segments in the rostrocaudal direction (**Fig. 5B**) that was specific for the ipsilateral side (**Fig. 5C**). The mCherry-positive neurons were also GFP-positive, after injection of the AAV-DJ-Cav3.2-mCherry virus in a Cav3.2-GFP KI^{fllox} mouse (**Fig. 5D**). Similarly, the mCherry-positive neurons detected by immunofluorescence expressed Cav3.2 mRNA, as detected by *in situ* hybridization, after injection of the AAV-DJ-Cav3.2-mCherry virus in a wildtype mouse (**Fig. 5E**). On average, the Cav3.2-promoter driven expression of mCherry colocalized with 82% of the Cav3.2-GFP positive neurons, and with 93% of the Cav3.2 mRNA-expressing neurons (**Fig. 5F**) and faithfully reported Cav3.2 expression with a bright fluorescence signal.

Having established and validated a novel tool for identifying Cav3.2 expressing neurons, we were able to investigate the firing properties of Cav3.2-expressing neurons in wildtype mice that had been injected with the AAV-DJ-Cav3.2-mCherry virus. Voltage clamp experiments elicited typical T-type calcium currents from a holding potential of -90 mV in mCherry-positive neurons (**Fig. 6A**). The current-voltage relationship of this T-type current plotted at low membrane voltages was consistent with a low threshold calcium channel (n=7, **Fig. 6B**; see Ryu and Randic 1990). In the current-clamp configuration, the three types of subthreshold activities (rebound, slow slope and flat) were present in Cav3.2-expressing neurons (**Fig. 6C**), as described in unidentified neurons. The peak amplitudes of the subthreshold rebounds were smaller in Cav3.2-expressing neurons ($5.6 \pm 0.4\text{mV}$, n=29, **Fig. 6D**) as compared to unidentified neurons ($9.2 \pm 0.9\text{mV}$, n=26, Mann-Whitney test, p=0.0004, **Fig. 6D**). In contrast, their time-to-peak was lengthened (unidentified neurons, $117 \pm 11\text{ms}$, n=26 and Cav3.2-expressing neurons, $207 \pm 11\text{ms}$, n=29; Mann-Whitney test, p=0.0004, **Fig. 6E**). Yet, T-type channels were strongly involved in these subthreshold properties, as the rebounds were inhibited by $1\mu\text{M}$ TTA-A2 (n=6, Wilcoxon paired test, p=0.03), **Fig. 6F**). The organization of the electrical activity during a pulse was unique in rebound-exhibiting neurons, which showed the pairing effect of the first two action potentials (n=21, Wilcoxon test, p=0.012), **Fig. 6G**). This property was not present in the other populations of Cav3.2-expressing neurons, exhibiting a slow slope and a flat response (**Fig. 6G**). Cav3.2-expressing neurons displayed the various firing patterns, as in unidentified LII neurons (**Fig. 6H**, and supplementary **Table S4 and S5** online) and there was no tight association between a subthreshold activity and a firing pattern (**Fig. 6I**). Collectively, these data suggested that Cav3.2-expressing neurons were not enriched with T-type calcium currents, or putative T-type dependent firing patterns, as compared to unidentified LII neurons. This might be explained by a significant expression of Cav3.1 and Cav3.3 channels in Cav3.2-negative DH neurons (Talley, Cribbs et al. 1999). Nevertheless, Cav3.2 appeared to be involved in the subthreshold and suprathreshold properties of Cav3.2-expressing neurons.

Deletion of Cav3.2 in the LII interneurons of the spinal cord

Not surprisingly, Cav3.1 and Cav3.3 mRNAs could be detected in Cav3.2-expressing neurons (supplementary **Fig. S4** online). Similar to what reported in primary afferent neurons (Bourinet, Alloui et al. 2005, Messinger, Naik et al. 2009, Francois, Schuetter et al. 2015), ablation of Cav3.2 expression was therefore necessary for understanding its specific roles in adult lumbar spinal cord. A virus encoding Cre-recombinase-IRES-mCherry under the control of Cav3.2 promoter was injected in the spinal cord of Cav3.2-GFP KI^{lox} mouse. As shown in **Fig. 7A**, the expression of Cav3.2-GFP was eliminated in cre-recombinase- and mCherry-expressing neurons, and none of the mCherry-positive neurons were GFP-positive (**Fig. 7B**). Some cell bodies were GFP-positive and did not express mCherry (**Fig. 7C**) as expected in neurons that did not take up, nor expressed the AAV.

The properties of mCherry-expressing neurons, that had lost the expression of Cav3.2-GFP, were then examined. Cav3.2 ablation did not change the rheobase of the neurons ($43.5 \pm 2.5\text{pA}$, n=66, and

44.5±4.9pA, n=21, with and without Cav3.2, respectively). The kinetics of the action potentials were significantly modified by the deletion of Cav3.2 (**Fig. 8A-E**). In the typical examples of **Fig. 8A**, the action potential of a Cav3.2-deleted neuron was more ample and faster than in a Cav3.2-expressing neuron, as summarized in the attached table. On average, half-width and time-to-peak were smaller (Mann-Whitney test, respectively, $p < 0.0001$ and $p = 0.028$), **Fig. 8B,C**) in Cav3.2-deleted neurons, and the first action potential tended to be delayed (177±19ms, n=66 and 256±67ms, n=21, with and without Cav3.2, respectively). In addition, the amplitudes of the peak potential (Mann-Whitney test, $p = 0.0006$, **Fig. 8D**) and of the after-hyperpolarization potential (Mann-Whitney test, $p = 0.004$, **Fig. 8E**) were significantly larger in Cav3.2-deleted neurons, without a significant change in the threshold potential (-33.1±0.7mV, n=66 and -32.2±0.9mV, n=21, with and without Cav3.2, respectively). The profile of the first five action potentials firing was selectively modified in rebound-exhibiting neurons, as it did not show the pairing effect at the onset of activity (**Fig. 8F**), the interval of the second action potential being variable from cell to cell. Yet, the latency of the first action potential was still shorter in rebound exhibiting neurons as compared to the two other populations (**Fig. 8F**). Cav3.2 appeared tightly involved in the subthreshold rebound since: (1) the proportion of rebound-exhibiting neurons was decreased in Cav3.2-ablated neurons, to the expense of slow slope depolarization (**Fig. 8G**), and (2) the rebound amplitude was significantly weaker in Cav3.2-ablated neurons as compared to Cav3.2-expressing neurons (Mann-Whitney test, $p = 0.003$, **Fig. 8H**), without alterations in the kinetics (**Fig. 8I**). The firing patterns were also modified in Cav3.2-ablated neurons. The amount of neurons exhibiting higher activities at the beginning of the pulse was diminished, and, notably transient and irregular tonic patterns were lacking in the distribution (n=23, **Fig. 8J**). Thus, regular tonic and delayed patterns dominated this distribution. The regular tonic pattern was different in Cav3.2-ablated neurons, as compared to Cav3.2-expressing neurons (**Fig. 8K**). The relationship between the command current and the number of action potentials elicited during a 2s-long pulse was more flat in Cav3.2-ablated neurons, and this phenomenon was linear over the range of stimulations (**Fig. 8K**). Subthreshold and suprathreshold properties segregated in two main classes: interneurons with rebounds fired mainly with a regular tonic pattern, while the other interneurons had a delayed electrical activity (**Fig. 8L**). Note that the gap firing mode was equally represented in the three classes of neurons. Altogether, these results suggest a critical role of Cav3.2 channels in the subthreshold and suprathreshold properties of Cav3.2-expressing neurons of the LII of the spinal cord.

DISCUSSION (1486 words)

The Cav3.2-GFP KI^{fllox} mouse was instrumental in deciphering the role of Cav3.2 in primary afferent neurons during chronic pain (Francois, Schuetter et al. 2015). Here, this mouse model was used as a genetic tool for identifying Cav3.2 neurons and for ablating Cav3.2 in Cav3.2-expressing neurons in LII interneurons of the spinal cord where Cav3.2 was found to play an important role in the subthreshold and suprathreshold properties.

Primary afferent fibers, including the C-LTMR and the A δ -LTMR, express Cav3.2 and project to the DH of the spinal cord (Shin, Martinez-Salgado et al. 2003, Francois, Schuetter et al. 2015, Bernal Sierra, Haseleu et al. 2017, Usoskin, Furlan et al. 2015). GFP detection in the DH of the Cav3.2-GFP KI^{fllox} mouse suggests that Cav3.2 has a presynaptic role (Francois, Schuetter et al. 2015). In apparent contrast, mEPSC were not modified by TTA-A2, a T-type channel inhibitor, in LII interneurons. Yet, these recordings were performed in a heterogenous population of unidentified neurons, and some subpopulations of LII interneurons might be dependent upon a presynaptic activity of Cav3.2 (Bao, Li et al. 1998; Yuan, Chen et al. 2009, Garcia-Caballero, Gadotti et al. 2015). This will have to be examined by recording the activity of targeted, well-defined, LII interneurons (see discussion below). For a comparison, in lamina I, projection neurons are modulated by primary afferent fibers in a T-type dependent manner (Ikeda, Heinke et al. 2003, Drdla and Sandkuhler 2008), that is impaired in constitutive Cav3.2 knockout mice (Jacus, Uebele et al. 2012). This involvement of T-type channels could have been missed if studying unidentified neurons, because projection neurons are not numerous within the lamina I (Al-Khater, Kerr et al. 2008).

The firing patterns of interneurons are heterogenous in LII (Grudt and Perl 2002, Ruscheweyh and Sandkuhler 2002, Ku and Schneider 2011, Smith, Boyle et al. 2015), and were not less heterogeneous in Cav3.2-expressing neurons. Because of their inactivation properties, T-type calcium channels are first viewed as supporting transient activities (Llinas and Steriade 2006, Isope, Hildebrand et al. 2012). Cav3.2 ablation indeed lowered the population of LII neurons exhibiting a high immediate activity, namely the single-spiking, the transient, and the irregular tonic patterns. Cav3.2-ablated neurons exhibited mostly the delayed and the regular tonic patterns. The delayed pattern, being driven by transient potassium channels, was expected to be exacerbated, if anything, in Cav3.2-ablated neurons (Yoshimura and Jessell 1989, Smith, Boyle et al. 2015). The transition from transient behaviors to more regular tonic patterns might be related to the simultaneous decrease in the proportion of rebound-exhibiting neurons and in the decrease in the amplitude of the rebound in the remaining neurons. T-type calcium channels can also contribute to tonic firing, notably because they can generate a tonic window current (Prescott and De Koninck 2005, Cain and Snutch 2010, Liao, Tsai et al. 2011). Indeed, the tonic activity of Cav3.2-ablated interneurons of the LII was not similar to control, being less sensitive to

current injection at intensities twice as large as the rheobase. Action potential properties were strongly modified as well. The faster action potential and the larger AHP amplitude of Cav3.2-ablated neurons were anticipated since T-type calcium channels participate in the repolarisation of the action potential (Scroggs and Fox 1992, Lambert, McKenna et al. 1998, Ikeda, Heinke et al. 2003). The simultaneous increase of the peak amplitude in Cav3.2-ablated neurons is puzzling because the threshold, the rheobase and the latency of the action potential were not changed at the same time. In other words, the action potentials were quantitatively changed, patterns were modified, but the initiation did not appear to be modified. Interestingly, in the the A \square -LTMR cell body, the ablation of Cav3.2 also modified neuronal excitability without changing either the action potential threshold or the latency of the action potential (Wang and Lewin 2011). Keeping in mind that Cav3.2 is found at the axon initial segment, others have suggested that its contribution to signaling might have profound, albeit non-conventional, effects on neuronal spiking (Bender, Ford et al. 2010, Vascak, Sun et al. 2017). Further studies will be needed to resolve this issue.

Cav3.2 likely plays a role in the coincidence detector function of LII, as suggested by the result of Cav3.2-ablation. First, spike initiation being influenced by T-type channels, variations or regulations of Cav3.2 activity will control the precision of the temporal summation of synaptic inputs (Prescott and De Koninck 2005). Second, delayed excitation (a rebound of the membrane potential triggered by inhibitory transmission) is strongly dependent upon T-type channels activity (Boehme, Uebele et al. 2011, Reali and Russo 2013), and might largely depend upon Cav3.2 in LII interneurons (this study). Third, the downstream transmission of the sensory signal depends on neuronal firing patterns. Single spiking patterns, blunted in Cav3.2-ablated neurons, convey spike time precision and the opportunity in pairing synaptic inputs on postsynaptic neurons (Prescott and De Koninck 2002, Zhang and Schneider 2011, Ratte, Lankarany et al. 2014). The higher proportions of neurons with regular tonic and gap patterns in Cav3.2-ablated LII will also decrease spike time precision (Prescott and De Koninck 2002). However, since regular tonic neurons are less sensitive to current injection in Cav3.2-ablated neurons, temporal summation will not be favoured drastically. Altogether, Cav3.2 ablation perturbed millisecond coding properties of LII interneurons, required for temporal neural codes (Panzeri, Brunel et al. 2010), without quantitative changes in voltage sensitivity (rheobase, threshold, first latency).

The action potential pairing, eliminated in Cav3.2-ablated rebound-exhibiting LII interneurons, is intriguing. Delayed doublet spiking terminates bursts in sensory neurons of an electric fish, but this is a TTX-sensitive event (Lemon and Turner 2000). In motoneurons, doublet spiking is also followed by an AHP which silences electrical activity, and might facilitate force generation (Mrowczynski, Celichowski et al. 2015). However, these doublets are much faster than those elicited by T-type dependent rebounds. In the cerebellum, long term depression at the parallel fiber – purkinje excitatory synapse is better induced by pairing parallele fiber stimulation (interval 60ms) (Casado, Isope et al. 2002). The action

potential pairing found in LII interneurons in the 50-200ms range might rather participate in paired pulse facilitation/depression at inhibitory synapses, more significantly than paired pulse depression at excitatory synapses in the DH of the spinal cord (Zhang and Schneider 2011).

Some Cav3.2-expressing neurons expressed Cav3.1 or Cav3.3 in the spinal cord. Despite similar biochemical and electrophysiological characteristics, the functions of T-type channels can be discriminated from each other (Warre, McNaughton et al. 2002, Molineux, McRory et al. 2006). In addition, their subcellular localisations are not necessarily overlapping (McKay, McRory et al. 2006). In LII interneurons, these channels are not functionally redundant since Cav3.2 deletion modified subthreshold and suprathreshold properties of interneurons. Nevertheless, the remaining T-type channels might support a residual activity, at the cell body or at distance from it. Multiple channel depletion may be required in order to fully describe T-type channel activity in this structure. Yet, Cav3.2 appeared as a promising target in interfering with the processing of the nociceptive information within the spinal cord.

Our immunostaining and the *in situ* hybridization experiments clarified the heterogeneity of the Cav3.2-expressing neuronal population. So far, Cav3.2 colocalized mainly with excitatory neurons in the general population as well as in each of the subpopulations examined, but the PV neurons. Importantly, Cav3.2 is present in almost each PKC γ interneuron, and these neurons are on the pathway of non-nociceptive information to the projection neurons of lamina I (Torsney and MacDermott 2006, Miraucourt, Dallel et al. 2007, Lu, Dong et al. 2013, Peirs, Patil et al. 2014, Foster, Wildner et al. 2015, Petitjean, Pawlowski et al. 2015). The functions of Cav3.2 within PKC γ interneurons might therefore potentiate or interfere with the anti-allodynic effect of Cav3.2 down-regulation found in various chronic pain models (Bourinet, Alloui et al. 2005, Choi, Na et al. 2007, Messinger, Naik et al. 2009, Liao, Tsai et al. 2011, Francois, Schuetter et al. 2015). Interestingly, a large population of CR neurons (41%) is also Cav3.2-positive, and this proportion is somewhat higher than suggested by the patch-clamp recordings of Smith et al. (2015). Some CR neurons are targets of PKC γ interneurons, while some others are unrelated to the processing of mechanical allodynia (Peirs, Patil et al. 2014), and Cav3.2 expression might play differential roles in the various pathways involving CR neurons. In contrast to these Cav3.2-positive neurons that allow the propagation of the allodynic signal to the projection neuron, the PV neurons which gates this pathway (Petitjean, Pawlowski et al. 2015) did not express Cav3.2. Such distribution might be an advantage in tailoring anti-allodynic treatments based on Cav3.2 targeting because these compounds might affect the pathway only once opened by disinhibition of the PV neuron, and have little effect in the absence of chronic pain. Although the understanding of T-type channel functions within the spinal cord during either acute nociception or during chronic pain states is ongoing research, they are likely to tune the excitability of some spinal neuronal networks, the pharmacological modulation of which might be of therapeutic importance.

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank the staff of the Montpellier Biocampus animal facilities for assistance with transgenic mouse lines; the staff of the Montpellier Biocampus imaging core for assistance with confocal microscopy; S Debiesse for genotyping services; and Maud Flaceliere and Pierre Giraud for help with molecular biology experiments. We thank Dr T Muller (Max-Delbrück-Center for Molecular Medicine, Berlin, Germany) for the generous gift of anti Tlx3 antibodies; and Dr V Prévot (Inserm U1172, Lille, France) for the generous gift of the anti nNOS antibody. We thank E Vellayoudom, G Coiffard, Dr S Granier, Dr A Alloui for participating in early pilot experiments. We thank Dr E Valjent, Dr J Chemin, P Tarot and L Cutando (IGF), Dr M Heine and M Dumenieu (Leidnitz Institute of Neurobiology, Magdeburg, Germany), Drs P Carroll and F Scamps (INM, Montpellier), Drs N Leresche and R Lambert (NPS-IBPS, Paris) for helpful discussions. These studies were supported by operating grants to E Bourinet from the Agence Nationale de la Recherche (ANR Pain-T, and ANR C-LTMR), Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, Centre National de la Recherche Scientifique, Université de Montpellier, Labex ICIST, and la Fondation pour la Recherche Médicale (équipe FRM 2015) ; and to GW Zamponi from the Canadian Institutes of Health Research. M Candelas and A Fruquière were supported by fellowships from the LABEX ICST and the FRM respectively.

FIGURES

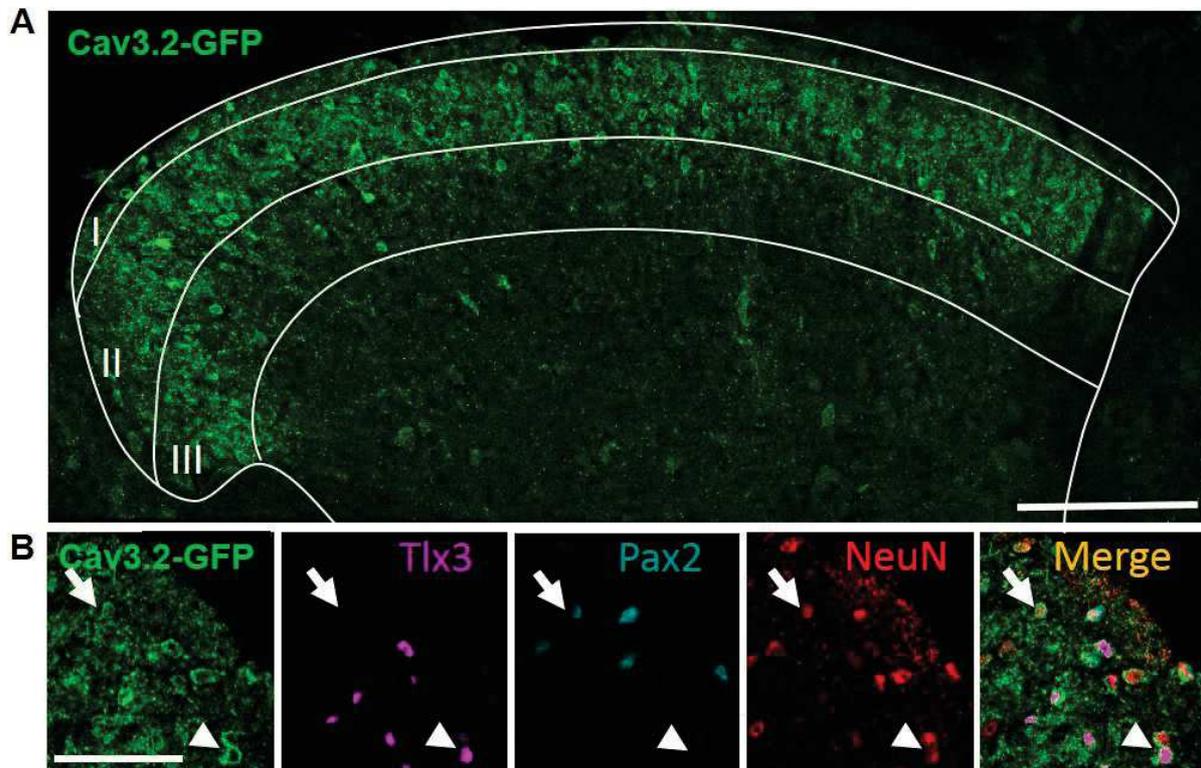


Figure 1. GFP immunofluorescence in the spinal cord of the adult Cav3.2-GFP KI^{lox} mouse. **(A)** Immunostaining for GFP (green), showing the localization of Cav3.2-GFP expressing cell bodies and neuronal fibres in the dorsal horn of the lumbar spinal cord. The majority of GFP is found in the upper layers of the dorsal horn. **(B)** coexpression of GFP (green) with either Tlx3 (purple, arrow), or Pax2 (blue, arrowhead) and NeuN (red), as well as the superimposition of the four images. Scale bars: **A** (100 μ m), **B** (25 μ m).

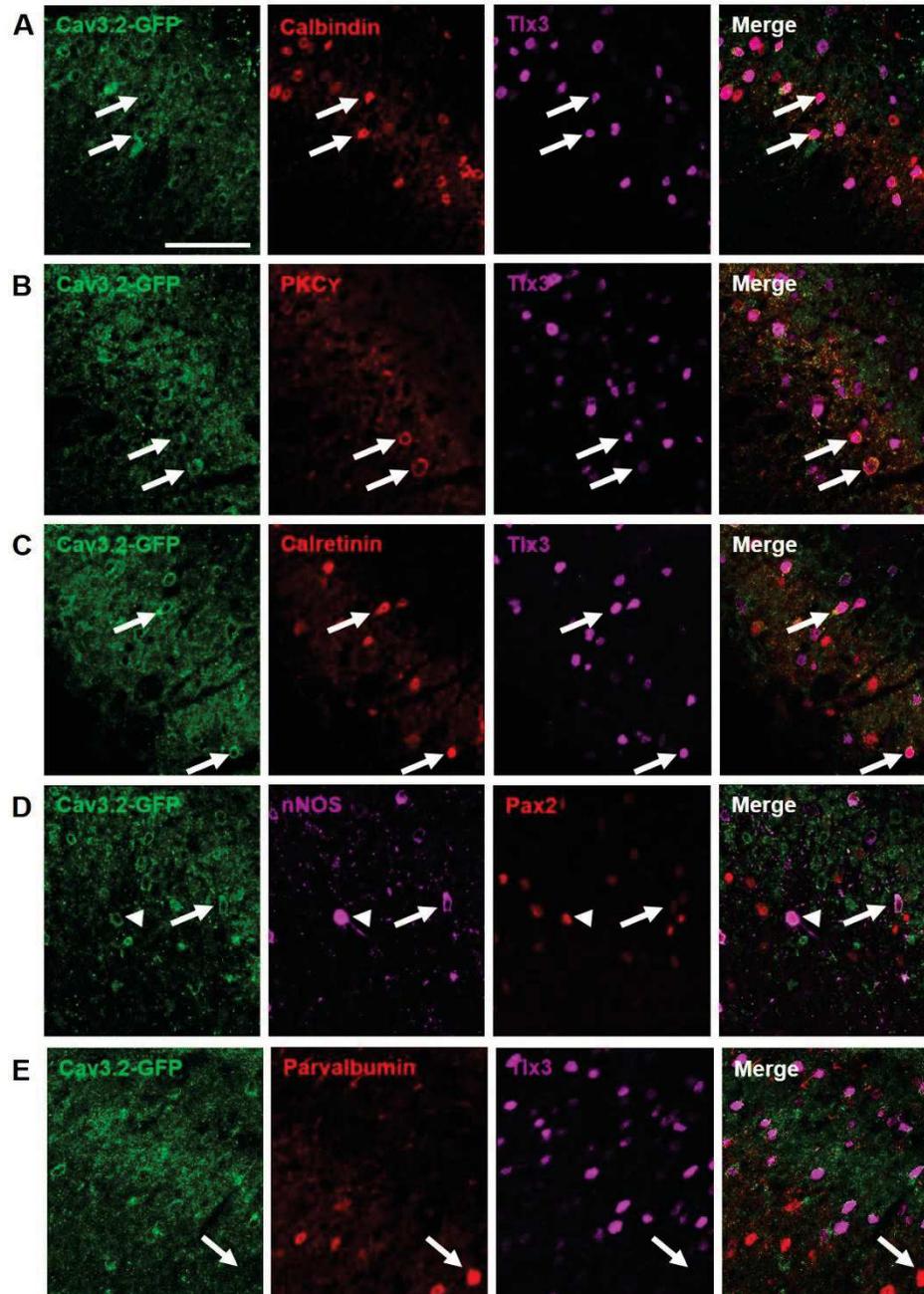


Figure 2. GFP labeled a heterogeneous population in the LII of Cav3.2-GFP KI^{fllox} mice. GFP (green) was coexpressed with calbindin (A), PKC_γ (B), calretinin (C), nNOS (D), but not with parvalbumin (E). These neurons were either excitatory, Tlx3-positive (arrows, A-C,E) and Pax2-negative (arrow, D); or inhibitory, Pax2-positive (arrowhead, C). Scale bar: 50μm.

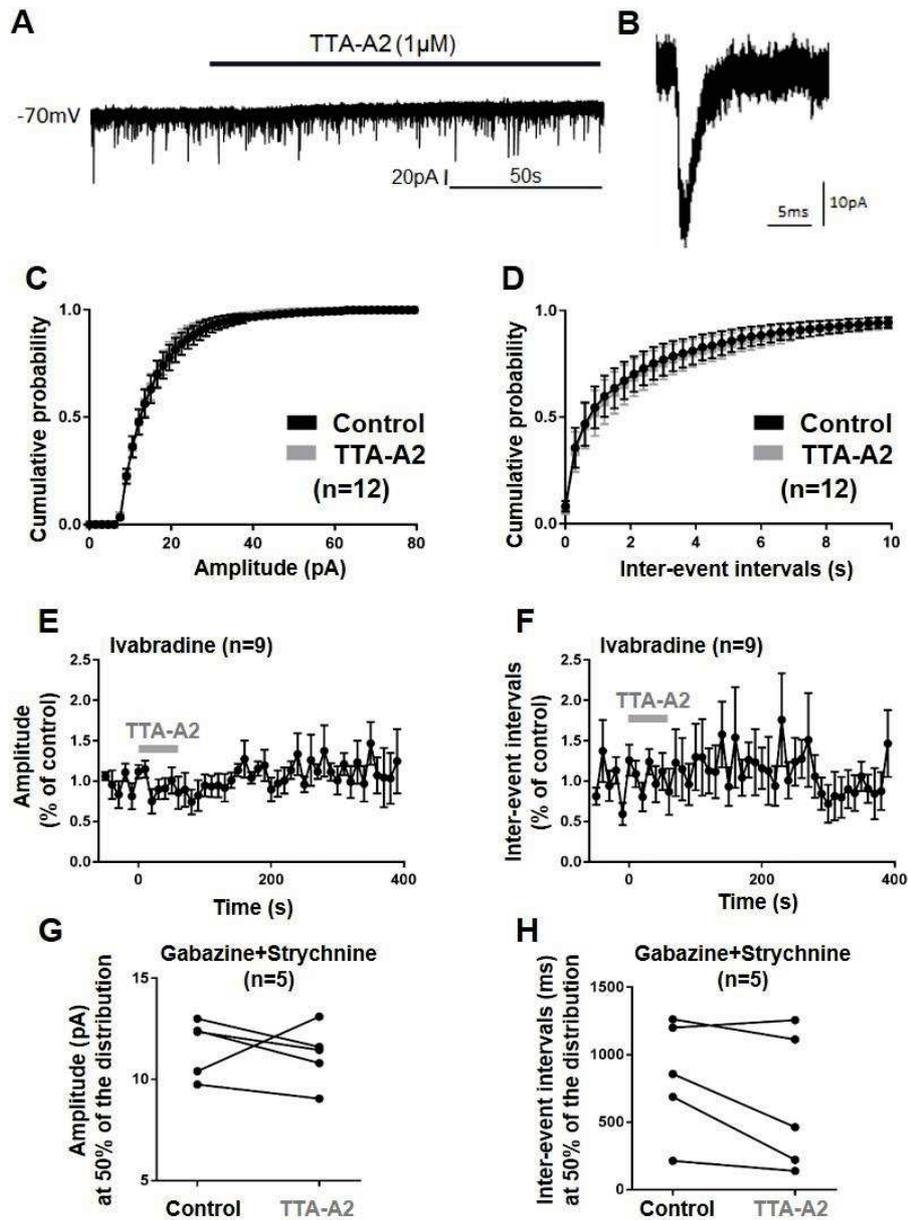


Figure 3. TTA-A2 did not alter excitatory neurotransmission of interneurons in LII of the spinal cord of adult mice. (A) Typical whole cell patch clamp recording, performed in LII of an acute 300 μ m-thick slice taken from a lumbar segment of an adult mouse, showing miniature excitatory postsynaptic currents (mEPSC) of an interneuron held at -70mV. (B) Trace showing an individual mEPSC. (C,D) Mean cumulative distribution of the amplitudes (C) and the inter-event intervals (D) of mEPSC in the absence (control) or presence of 1 μ M TTA-A2, from 12 experiments. (E,F) Mean amplitudes (E) and inter-event intervals (F) of mEPSC before, during and after a 1 min-long ejection of 1 μ M TTA-A2 (start at time 0) in the continuing presence of Ivabradine 1 μ M. Data from 9 experiments, are represented as series of 10s-long bins, normalized to the control levels observed before TTA-A2 application. (G,H) Midpoints of the cumulative distributions of the amplitudes (G) and the inter-event intervals (H) of mEPSC in the absence (control) and presence of TTA-A2 1 μ M in 5 separate experiments performed in the continuing presence of Gab (Gabazine 3 μ M) and Stry (Strychnine 3 μ M).

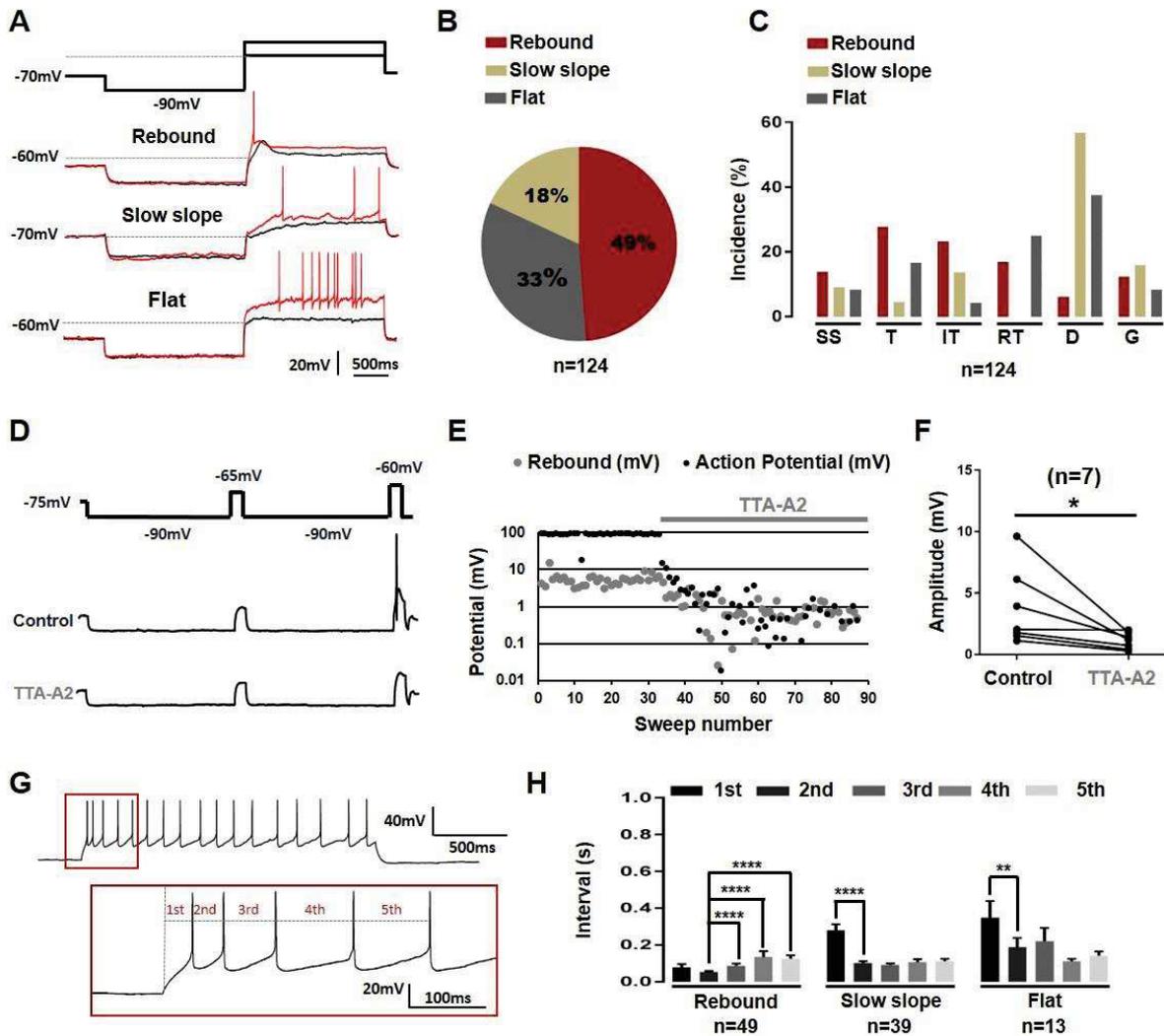


Figure 4. The rebound induced by hyperpolarization is T-type channel dependent. (A) A 2-step current clamp protocol with a hyperpolarizing prepulse to -90mV induced three kind of responses upon step by step depolarizations; rebound shaped, slow slope kinetics and flat depolarizations. Red traces show the firing at the rheobase. (B) Proportion of LII neurons exhibiting these three subthreshold activities. (C) Relationships between firing patterns and subthreshold behaviors. SS (Single spiking), T (Transient), IT (Irregular Tonic), RT (Regular Tonic), D (Delayed) and G (Gap). (D) Multi-steps protocol used in eliciting subthreshold (first depolarizing step) and supra-threshold activities (second depolarizing step), and typical recordings in the absence (control) and presence of TTA-A2. (E) Quantification of the effects of TTA-A2 injection on the amplitude of the subthreshold and supra-threshold activities in a typical experiment in a LII neuron. (F) In all similar experiments, TTA-A2 ($1\mu\text{M}$) diminished the subthreshold rebound depolarization. (G) The intervals of the 5 first action potentials were quantified in LII interneurons. (H) Mean intervals showed a pairing of the first two action potentials in interneurons exhibiting rebound subthreshold activity. Bars are the means and lines are the SEM ****, $p < 0.0001$; ***, $p < 0.001$; **, $p < 0.01$; *, $p < 0.05$ using a Wilcoxon paired test.

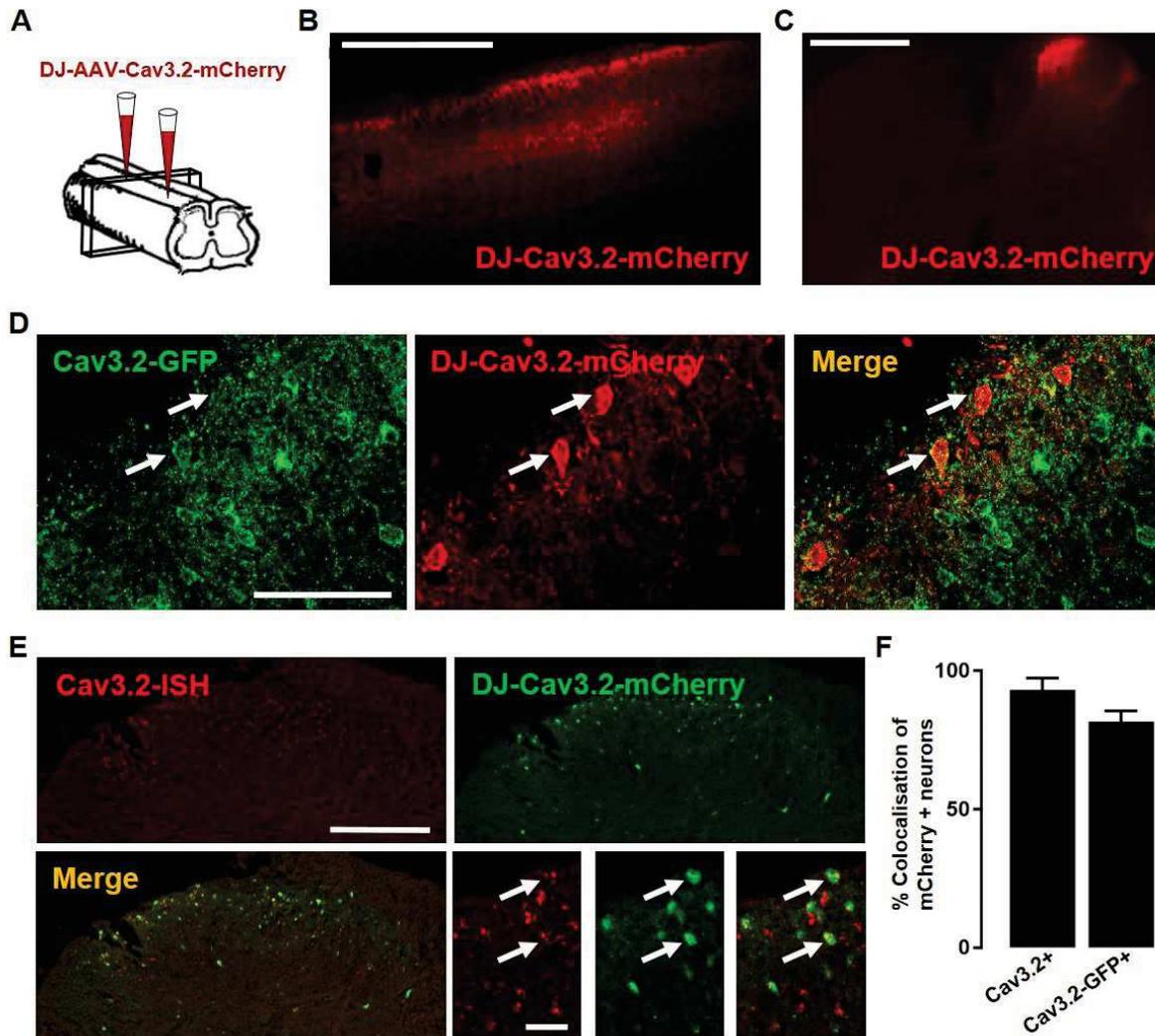


Figure 5. Identification of Cav3.2-expressing interneurons in the lumbar spinal cord in adult mice. (A) Schema of the double injections protocol, adapted from (Inquimbert, Moll et al. 2013). (B,C) Detection of mCherry expression in a parasagittal (B) and a frontal (C) spinal cord slice three weeks after intraspinal injections of AAV-DJ-Cav3.2-mCherry virus in wildtype mice. (D) Detection of GFP (green) and mCherry (red) expressions by immunofluorescence in a frontal spinal cord section three weeks after intraspinal injections of AAV-DJ-Cav3.2-mCherry virus in a Cav3.2-GFP KI^{lox} mouse. Co-expression is indicated (arrows). (E) Detection of Cav3.2 mRNA expression (red) by in situ hybridization and of mCherry expression (green) by immunofluorescence in a frontal spinal cord section three weeks after intraspinal injections of AAV-DJ-Cav3.2-mCherry virus in a wildtype mouse. Co-expression is indicated (arrows). (F) Mean colocalizations between mCherry-positive neurons and either Cav3.2 mRNA in wildtype mice or GFP in Cav3.2-GFP KI^{lox} mice. Bars are the means and lines are the SEM from 2 and 4 mice in immunofluorescence and in situ hybridization experiments, respectively. Scale bars: B (1mm), C (500µm), D (50µm), E (200µm, 50µm).

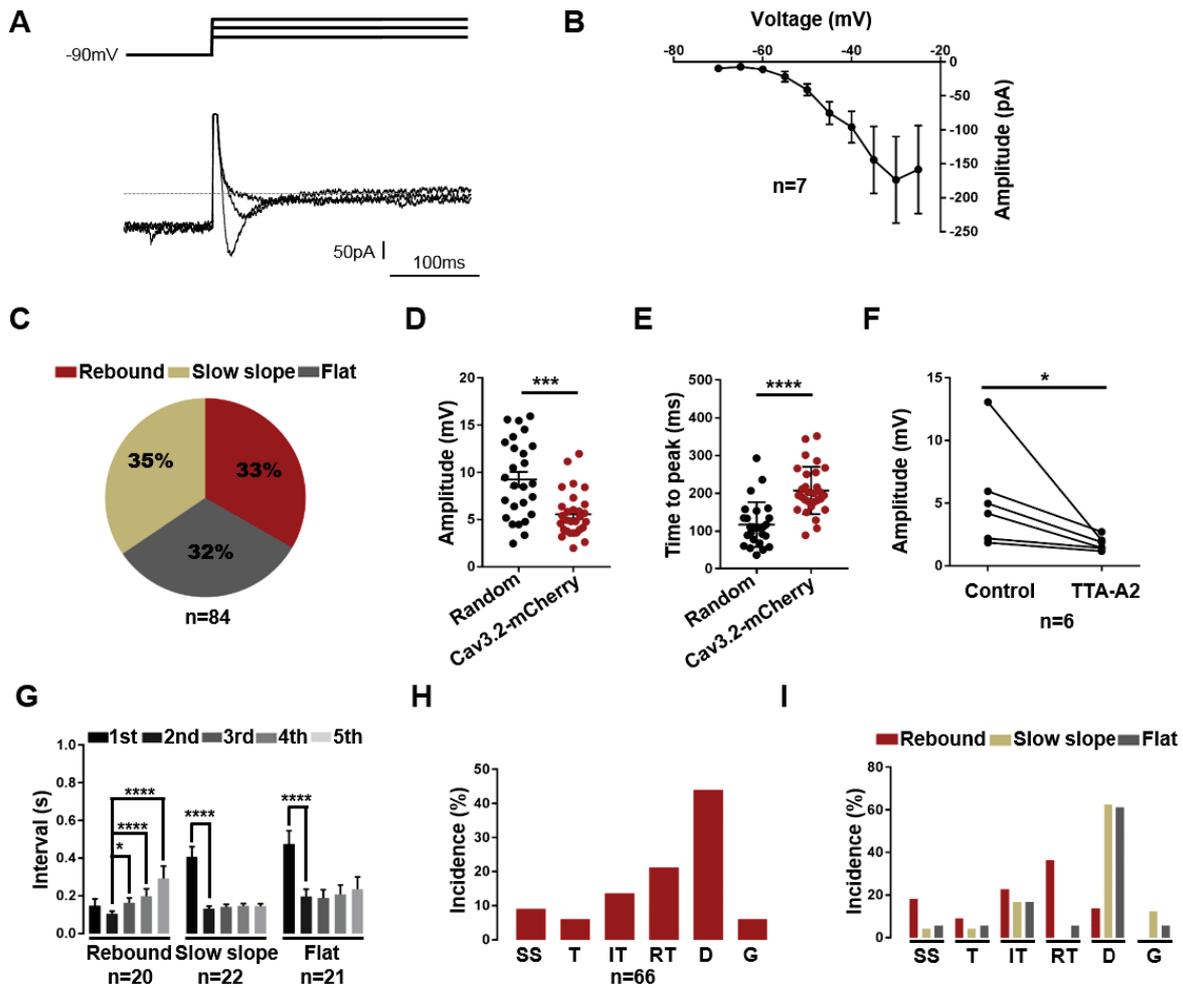


Figure 6. Electrophysiological properties of Cav3.2-expressing interneurons of the LII in adult mice.

(A) Traces showing typical inward currents evoked from a -90mV to -60, -50 and -40mV. (B) Current-voltage relationship of a T-type calcium current in Cav3.2-expressing neurons. (C) Proportions of the subthreshold properties of Cav3.2-expressing neurons. (D-F) Amplitude (D) and time to peak (e) of the rebound shaped activities in Cav3.2-mCherry neurons as compared to unidentified neurons. Cav3.2-mCherry neurons had diminished amplitudes and lengthened time to peak. Lines are means and SEM, and dots are the individual values. ****, $p < 0.0005$; ***, $p < 0.001$ using a Mann-Whitney test. (F) TTA-A2 1 μ M inhibited the rebound-shaped subthreshold activity of LII Cav3.2-expressing interneurons. *, $p = 0.01$ using a Wilcoxon paired test. (G) Mean intervals showed a selective pairing of the first two action potentials in Cav3.2-expressing interneurons exhibiting rebound subthreshold activity. Bars are the means and lines are the SEM Significances are indicated as: ****, $p < 0.0001$; ***, $p < 0.001$; **, $p < 0.01$; *, $p < 0.05$, using a Wilcoxon paired test. (H) Firing patterns in mCherry-positive neurons from AAV-DJ-Cav3.2-mCherry injected mice recorded in the current clamp mode of the whole-cell patch clamp technique. (I) Relationships between firing patterns and subthreshold behaviors. SS (Single spiking), T (Transient), IT (Irregular Tonic), RT (Regular Tonic), D (Delayed) and G (Gap). In A and B, voltage clamp recordings were performed in the presence of extracellular TTX (500mM), CdCl₂ (100 μ M), CsCl₂ (2mM), 4-AP (1mM) and TEA (10mM) in order to isolate T-type currents. Dots are the means and lines are the SEM.

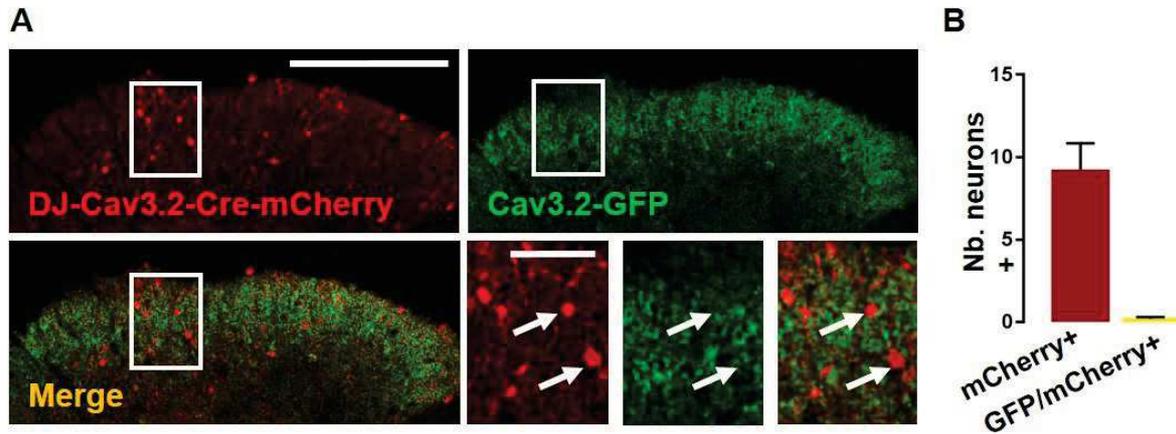


Figure 7. Selective deletion of Cav3.2 in the spinal cord of Cav3.2-GFP mice. (A) DH of the spinal cord slice from an adult Cav3.2-GFP mouse injected with a AAV-DJ-Cav3.2-Cre-mCherry and processed for immunodetections of GFP (green) and mCherry (red). mCherry-positive neurons lacked GFP expression as pointed out by the arrows in the expanded views of the box showed on the widest images. (B) Number of neurons expressing either mCherry alone or both GFP and mCherry per slice. Bars are the means and lines are the SEM of counts in 2 adult mice. Scale bars: A (200µm), (50µm).

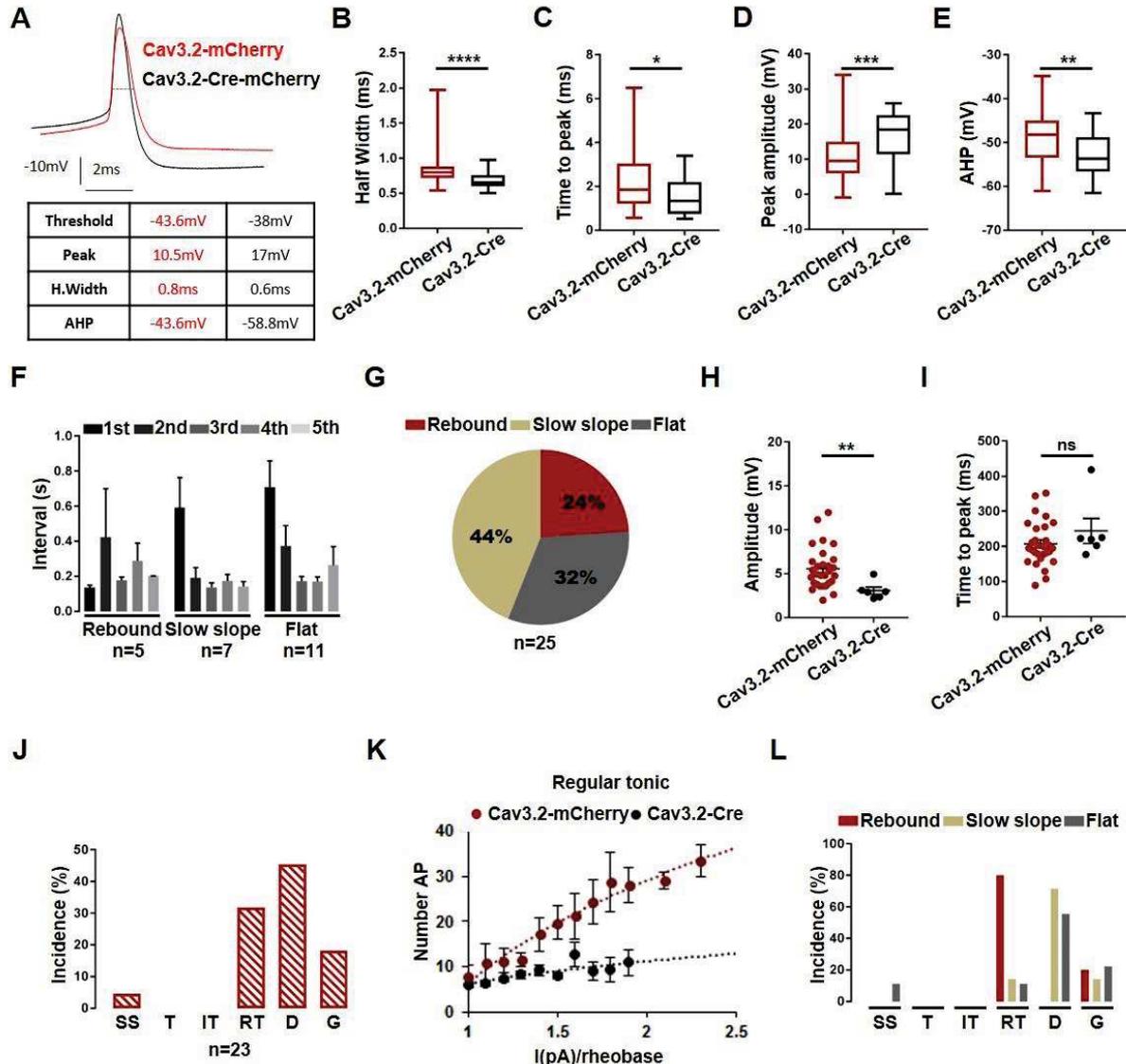


Figure 8. Electrophysiological properties of LII neurons lacking Cav3.2. (A) Raw traces of action potentials recorded in a Cav3.2-mCherry neuron (red line) and a Cav3.2-Cre-mCherry neuron (black line). The related parameters of threshold, peak, half width (hWidth) and afterhyperpolarization potential (AHP) are listed in the table. (B-E) Box and whiskers representations of half widths (B), times-to-peak (C), peak potentials (D), and afterhyperpolarization potentials (AHP, E) in Cav3.2-mCherry neurons (red) and Cav3.2-Cre-mcherry neurons (black). Significance ****, $p < 0.0001$; ***, $p < 0.001$; **, $p < 0.01$; *, $p < 0.05$, using a Mann Whitney test. (F) Mean intervals of the first five action potentials showed no pairing of the first two action potentials in Cav3.2-deleted neurons exhibiting rebound activity. Bars are the means and lines are the SEM. (G) Proportions of the subthreshold properties of mCherry-expressing and Cav3.2-deleted neurons. (H-I) Amplitudes and time-to-peaks of the suprathreshold rebounds in Cav3.2-mCherry neurons (red dots) and Cav3.2-Cre-mCherry neurons (black dots). Lines are mean and SEM. (J) Firing patterns in mCherry-positive neurons from AAV-DJ-Cav3.2-Cre-mCherry injected Cav3.2-GFP mice, recorded in the current clamp mode of the whole-cell patch clamp technique. SS (Single spiking), T (Transient), IT (Irregular Tonic), RT (Regular Tonic), D (Delayed) and G (Gap). (K) Relationships between the mean number of action potentials and stimulatory current amplitude normalized to the rheobase (1=rheobase). Data organized as bins of 10% were fitted to logarithmic equations with the following values: in Cav3.2-mCherry neurons (red dotted line, $y = 32.563 * \ln(x) + 6.4657$, $R^2 = 0.9635$) and in Cav3.2-Cre-mCherry (black dotted line, $y = 7.4019 * \ln(x) + 6.12$, $R^2 = 0.6228$). Dots are the means and lines are the SEM. (L) Relationships between firing patterns and subthreshold behaviors.

Tables

Table 1. Colocalisation of GFP with neuronal markers in Cav3.2-GFP knockin mice

% of GFP-expressing neurons			% of interneurons	
NeuN (8)	Tlx3 (15)	Pax2 (4)	Tlx3 (14)	Pax2 (3)
85.3±5.2	70.8±2.6	13.1±4.7	47.5±2.69	12.6±6.1

Numbers are the mean ± SEM of GFP-expressing neurons. Number of mice are indicated within brackets.

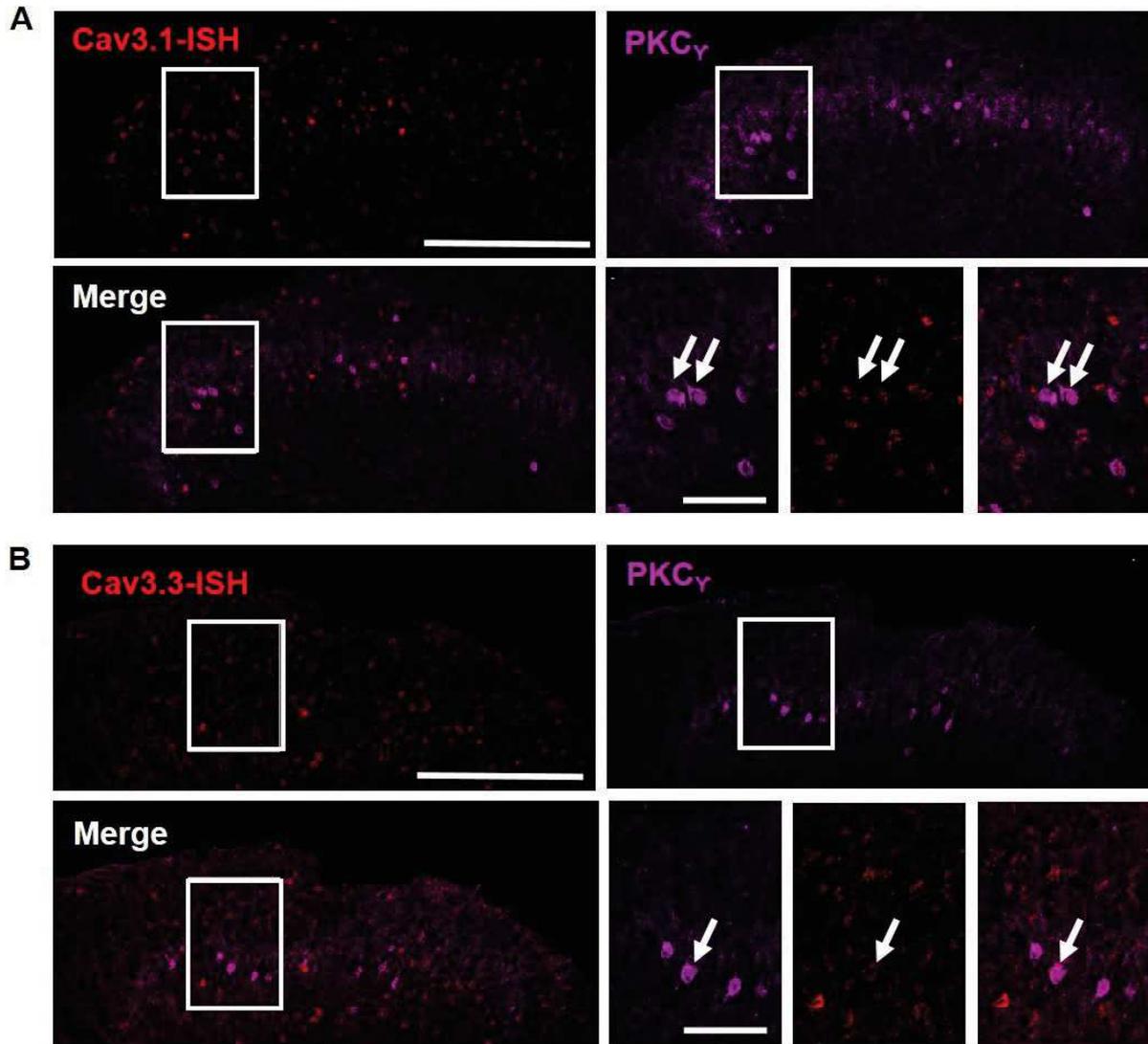
Table 2. Colocalization of GFP with markers of the LII in adult Cav3.2-GFP knockin mice								
% of GFP-positive neurons								
CB	CB/Tlx3	PKC _γ	PKC _γ / Tlx3	CR	CR/Tlx3	nNOS	nNOS/ Pax2	PV
45±5.5 (n=5)	40.2±5.1 (n=5)	39.7±5.6 (n=6)	43.0±4.2 (n=4)	22.5±5.7 (n=5)	22±4 (n=4)	10.7±2.8 (n=4)	1.8±1.8 (n=2)	1.6±1.1 (n=3)
% of interneurons								
CB	CB/Tlx3	PKC _γ	PKC _γ / Tlx3	CR	CR/Tlx3	nNOS	nNOS/ Pax2	PV
46.25±5 (n=5)	69.37±7.4 (n=5)	89.5±2.2 (n=6)	85.7±1.3 (n=4)	41.1±8.5 (n=5)	36.1±6.4 (n=4)	42.1±14.4 (n=4)	20.3±20 (n=2)	7.6±1.1 (n=3)

Numbers are the mean ± SEM of GFP-expressing neurons. Number of mice are indicated within brackets. Counts for nNOS, calretinin (CR) and calbindin (CB) were limited to LII, while they also included the outer part of LIII in the case of PKC_γ and parvalbumin (PV).

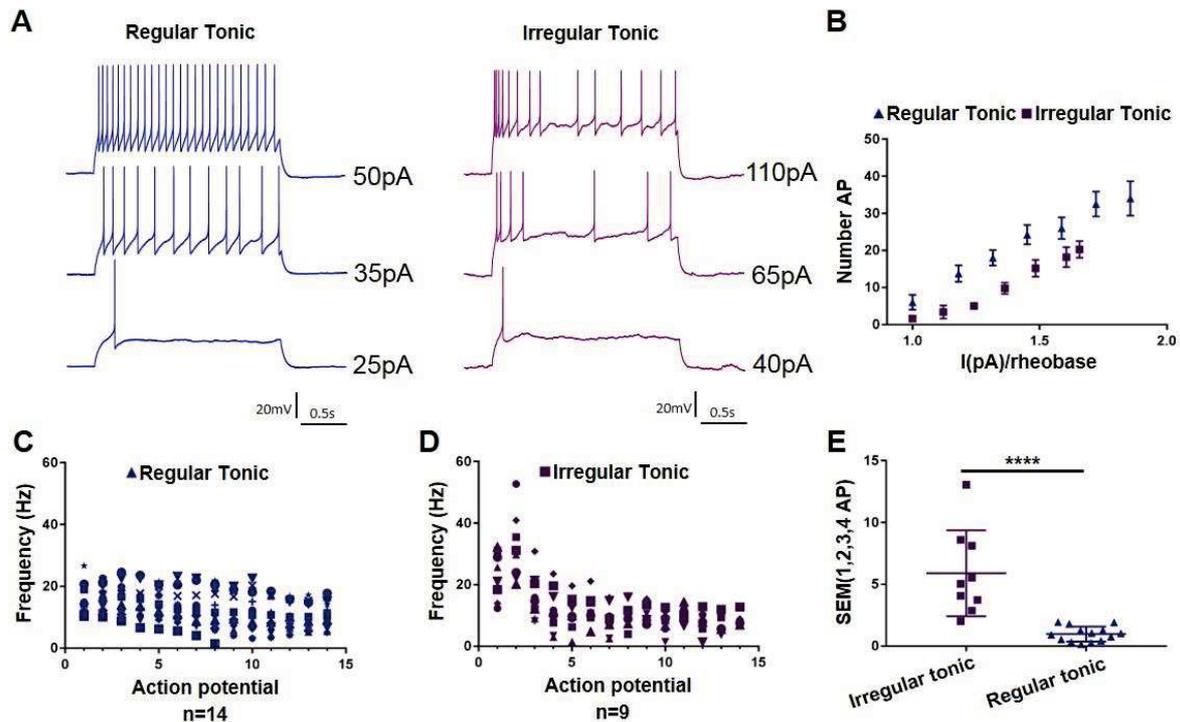
SUPPLEMENTARY FIGURES

*acgc***GTTCAAGGCTCAAGGCTCTTCC**TGATCCCTCTCCTGGGTGGCTAGGTCCTTAATTGCTCTTTGA
MluI
GGACCTTAATTATGGGCCGCAGCCACCCACTGGTAAGTAGGAGCATTAAAATAGAGTAAATGTTTTTC
TTTTCTTGAAAAGTTCACATATAACAAGACAAGGTGCTGTTGGGCCCAGGGCCTGCCCTGCCTGGACC
GACAGGCAGAGGACATGGTTCCTTGTTCCTCCACCTCCTTCCCCAGGCTGTGCCCTTCCCAGGCTCAGTG
GTGAAATCCTCTTAGAATCCCAGAACCACATATGGGAAACTCCACTTCTCTGCAGCTCACCTGCCAG
GGCTCCATCCAGGCTCTGAGGTGCTATGTTGCTCTGGCCCTCCAAAGAGCCCAGCTACCCAGGGCAG
AGGGAGGCTGCTCTTTGTCTAGGACAGGAATGGTTTTCCCAATAACAGGGCCTGAAGGTGAAAGAGC
CCCTTGTGGTTGAAATTTAAGTGGATGTACACCTAAGAGCTGGAATTTTATGGCCCTAGTGTGGTAA
TTGTGAGAAAGTAAAAAATCCCTGCATACCTCCAGCGGGAGAGGGGGGAACAGCCCCTCTGCTCAT
GCCTTCATGGGACAAGGGTCATGCAACCACCTGGAGTATGAAAGGAGATTTCAGCGACATGCTCAGGATA
TACCCCTGTGTGCCCTTGGCGGGTGTGGGAGGCCCGCTCGGCTTGTACTCCTTCTCGAGGTTCTTC
CAAGAGCCCCAGTCCCCAGGAGAAGGGGGAGGGGGATGGGCACCGGCAAGTTTGCGGAAACTGGGAGG
AGTGTGGGGGAGCTGCGTACCAGAGTACCCGGACTGCCCCAGGACAATTGGTGTGCGGTGCGCAACG
CGCCCCACGTGCGCCACGCGCCCCAAAGACACTGGCGCCCCGGCACACCCAAGACACACGCGGTGGGG
GAAGGGCACGCGCTCGCGGGCATGGTCACGGCGTGCTCCACGCCTGCTGAGCCCCGCCCCCTAGC
CGACCCTAGCAGTGAAGAGAAGGGGCGGCGCGGAGAAAAGGAGGGGGTCCCCGCCGGCTCCGCGCCC
CCGCAGTGGGGGTGGGGAAGGACGTTGGCGCCGCTTCCCCGCCCTCGTCCAAGCATCCCTGCGAGC
GCCCCCTGCTGCCGTGCTCTCCCGCGAGACAGTATGGGGCGGGAGGAGAGGTCGGGGAGGGGGGCGCG
GACCGGGTTGCGCCAGTCCCTGGACTTGGGGCTGGCGGCGTACCGGCACGGAGAAACACGGACCAAGGG
ATGTTGTGGGATAGCTTACGTCGTTGGGTGGGGGCGGGCCGGGCTGATGACCCCCGCCACTCTCCGTCC
CTATCTCGGTCCCTGAGGGTCGCCCCCTGCCCGCCCCGGCCGCGTGGCCCCGCCCATGGGCCGCC
CCGCCGCCCGCCTCCCCGCCACTGCTCACCTCCGAAGTTT*ggatcc*
BamHI

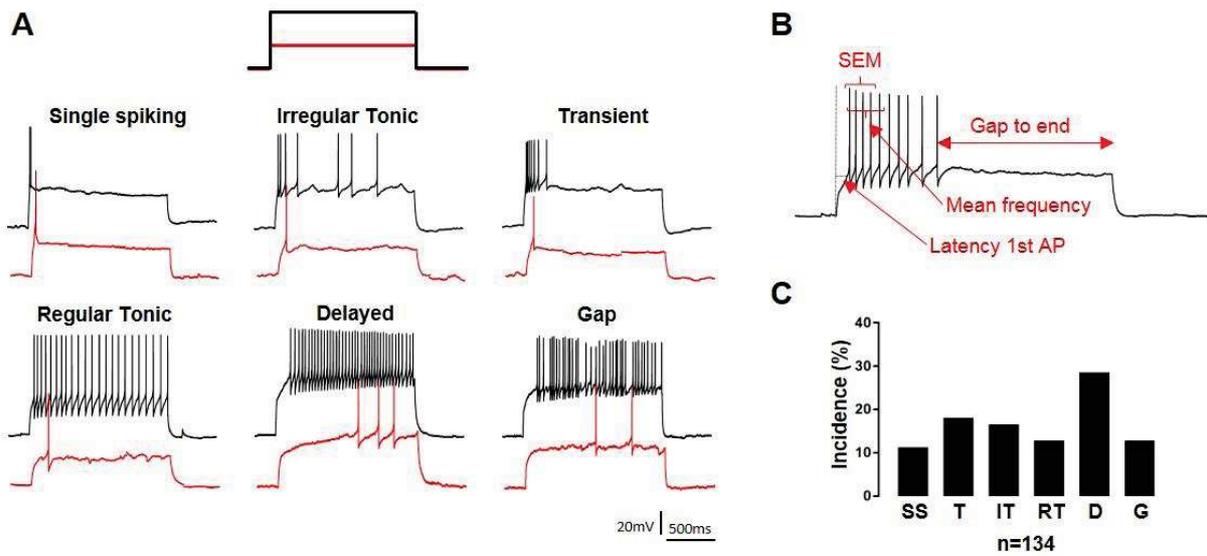
Supplementary Figure S1. Minimal mouse Cav3.2 promoter sequence of the AAV constructs. Core promoter is presented in bold capital letters flanked with extra MluI and BamHI sites (in italics) used for cloning.



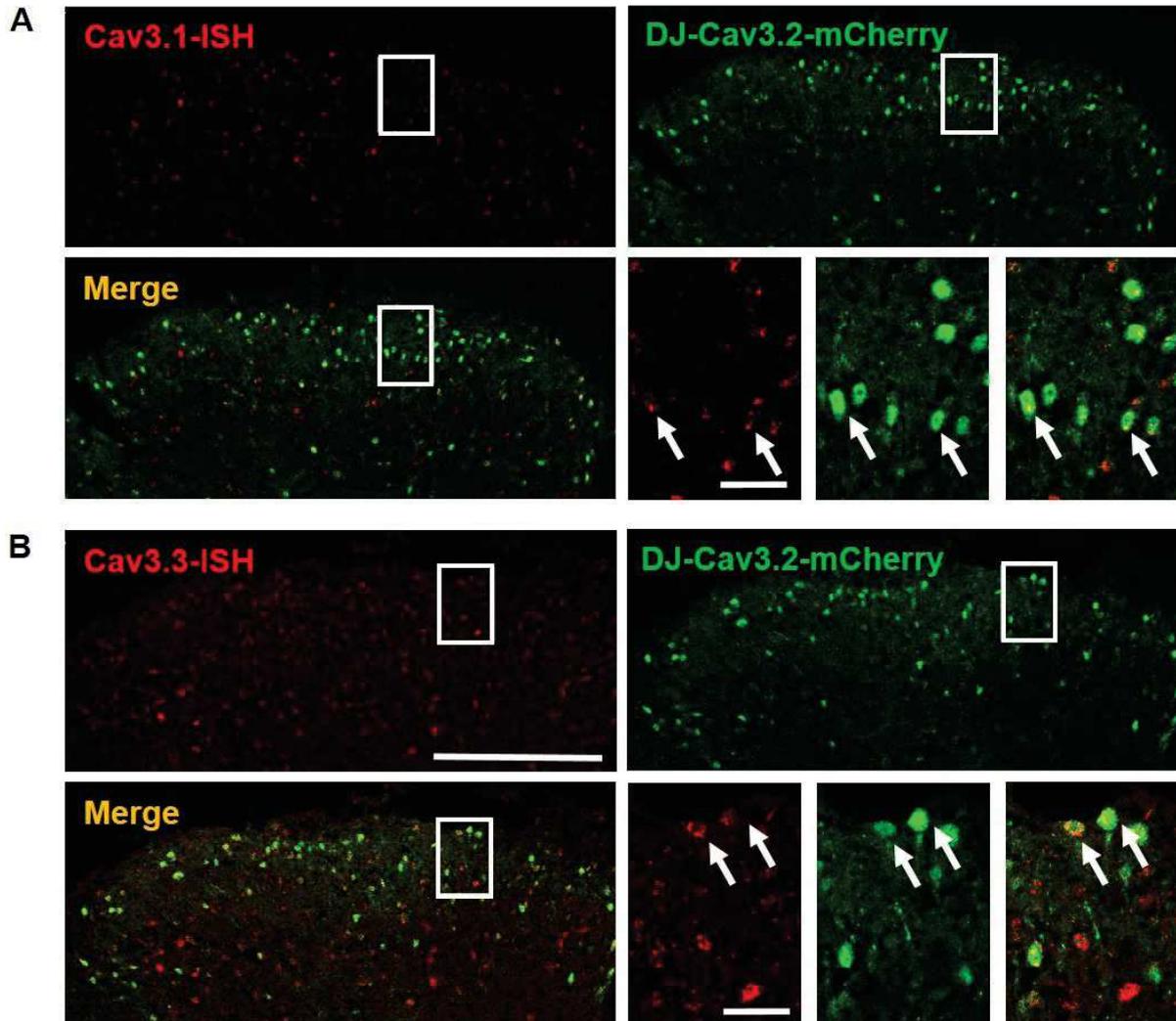
Supplementary Figure S2. PKC γ neurons express Cav3.1 and Cav3.3 in the dorsal horn of the spinal cord of adult mice. (A) Sections of spinal cord at the lumbar level demonstrating overlaps in the expression of Cav3.1 mRNA (red), by means of *in situ* hybridization (see Table 2 for probe sequence), and of PKC γ immunoreactivity (blue) detected with a rabbit anti-PKC γ and amplified with a donkey anti-rabbit A647 antibody. (B) Same as in (A) except that the Cav3.3 (red) was revealed by *in situ* hybridization. Arrows in a and b show colocalizations of markers. Scale bars: A, B (long=200 μ m, and short=50 μ m).



Supplementary Figure S3. LII interneurons displayed two types of tonic firing patterns. (A) Typical recordings of regular tonic and irregular tonic firing patterns at three current injection strengths. **(B)** Mean relationships between the number of action potentials elicited during a pulse and the amplitude of the current normalized to the rheobase in tonic neurons. Regular tonic neurons are more active than irregular tonic neurons. **(C,D)** Instantaneous frequencies of the first 15 action potentials elicited by current injections in different neurons. Note the high frequencies of the second action potentials in irregular tonic neurons, inducing a relative pairing of the first two action potentials. In contrast, regular tonic neurons exhibit a regular pace. **(E)** Calculation of the SEM of the first 4 action potentials is sufficient to discriminate between regular and irregular tonic regime in LII interneurons. Lines are means and SEM, and dots are the individual values. **** $p < 0.0001$ using a Mann-Whitney test.



Supplementary Figure S4. LII interneurons displayed different types of discharge profiles. (A) Individual traces of the firing patterns in LII interneurons. Current injections were performed after setting a resting potential at -70mV. Red traces are the activity at rheobase, and black traces are the activities at steady state regime. **(B)** Parameters allowing the classification of firing patterns of LII interneurons. SEM (Standard error of the mean), AP (Action potential). **(C)** Graph showing the proportion of neuron2 expressing different profile discharges (n=134). SS (Single spiking: less than 2 action potentials per pulse), T (Transient: activity duration < 1.4s in a 2s-long pulse), IT (Irregular Tonic: tonic and having a SEM of the first 4 action potential intervals >2), RT (Regular Tonic: tonic and having a SEM of the first 4 action potential intervals <2), D (Delayed: the latency of the first action potential >95ms and a mean frequency of the 5 first actions potentials >8Hz) and G (Gap: the latency of the first action potential >95ms and a mean frequency of the 5 first actions potentials <8Hz).



Supplementary Figure S5. Cav3.2-mCherry neurons expressed Cav3.1 and Cav3.3. (A) Colocalization of Cav3.1 mRNA (red, supplementary Table S2 online, for probe sequence) by *in situ* hybridization and mCherry (green) by immunodetection in wildtype mice injected with AAV-Cav3.2-mCherry. mCherry was detected with an anti-GFP antibody (supplementary Table S1 online). Arrows show colocalizations. (B) same as in (A) except that Cav3.3 mRNA was targeted by *in situ* hybridization. Scale bars: A,B (200 μ m, 25 μ m).

Supplementary Tables

Supplementary Table S1 : antibodies for immunofluorescence experiments			
Antigen	Species	Dilution	Supplier
Primary antibodies			
GFP	Chicken	1/250	Invitrogen
RFP-pAB	Rabbit	1/500	Medical & Biological Laboratories
Tlx3	Guinea pig	1/20000	Gift by Dr. Muller (Muller, Anlag et al. 2005)
Pax2	Rabbit	1/50	Invitrogen
NeuN	Rabbit	1/1000	Millipore
Calbindin D-28k	Rabbit	1/1000	Swant
Calretinin	Mouse	1/1000	Swant
PKC γ	Guinea pig	1/700	Frontier Institute
PKC γ	Rabbit	1/1000	Santa Cruz Biotechnology
Parvalbumin	Rabbit	1/1000	Swant
nNOS	Sheep	1/3000	Gift by Dr. Prevot (Herbison, Simonian et al. 1996)
Tlx3	Rabbit	1/20000	Gift by Dr. Muller (Muller, Anlag et al. 2005)
NeuN	mouse	1/1000	Millipore
Secondary antibodies			
Anti chicken CF488	Donkey	1/500	Sigma
Anti g-pig A647	Goat	1/500	Invitrogen
Anti rabbit CF350	Donkey	1/500	Biotum
Anti rabbit Cy3	Goat	1/500	Jackson
Anti mouse A568	Goat	1/500	Invitrogen
Anti sheep A647	Donkey	1/500	Invitrogen
Anti rabbit Cy3	Goat	1/500	Jackson
Anti mouse A568	Goat	1/500	Invitrogen
Anti sheep A647	Donkey	1/500	Invitrogen

Supplementary Tables (continued)

Supplementary Table S2: primer sequences used for in situ hybridization		
Gene	Primer	Sequence (5' → 3')
<i>Cacnali</i>	F1	AGCAGCCTGTCACTCACATC
	R1	GGTGTGAACTGTCCCCAAA
	F2	AGTTCAGCAGTACCAGCAGC
	R2	TAATACGACTCACTATAGGGGTCCCCAAAGTGTTACGA
<i>Cacnalg</i>	F1	GCCAAGGACCCTCAAGAGAC
	R1	TGTAATACTACTCACGGCCCC
	F2	AAGGACCCTCAAGAGACCAGA
	R2	TAATACGACTCACTATAGGGCAGACGCTTTCGCCTCAAAA
<i>Cacnalh</i>	F1	GGAAGGGCAGATAGATGACG
	R1	GTCTTATTGCATGGGCCAGT
	F2	CGGAGCCTGCTGAAAATATC
	R2	TAATACGACTCACTATAGGGGAAGGATGCCGAGTGATGATT

Bold text : T7 promoter sequence

Supplementary Tables (continued)

Supplementary Table S3. Parameters of the firing patterns in Cav3.2-expressing neurons.

Electrophysiological parameter					
Firing patterns	Rheobase (pA)	Nb AP	1 st Latency (ms)	Gap to End (ms)	SD IeI (ms)
Single Spiking (6)	60.8 ± 10.9	1.8 ± 0.2	241.6 ± 123.4	1617.8 ± 297.0	54.3 ± 43.7
Transient (4)	61.3 ± 19.0	8.3 ± 0.8	35.1 ± 2.5	1571.3 ± 40.8	33.4 ± 3.5
Irregular Tonic (9)	27.2 ± 3.5	16.6 ± 1.9	48.7 ± 5.9	91.2 ± 22.8	95.7 ± 25.0
Regular Tonic (14)	34.3 ± 3.5	20.4 ± 2.1	72.8 ± 4.7	96.4 ± 22.8	41.2 ± 12.4
Delayed (29)	44.3 ± 2.9	21.7 ± 1.2	236.9 ± 19.2	67.9 ± 18.3	63.4 ± 11.0
Gap (4)	62.5 ± 6.0	7.5 ± 1.8	455.5 ± 80.6	179.3 ± 81.4	134.6 ± 27.7

Data are expressed as mean ± SEM. Numbers of neurons are within brackets. Nb AP: number of action potentials elicited during a 2s-step current pulse, SD IeI, standard deviation of the intervals between action potentials elicited during a 2s-step current pulse.

Supplementary Table S4. Properties of the action potential in Cav3.2-expressing neurons.

Electrophysiological parameter					
Firing patterns	Threshold (mV)	Peak (mV)	AHP (mV)	hWidth (ms)	TTP (ms)
Single Spiking (6)	-34.9 ± 3.4	15.3 ± 2.1	-48.6 ± 3.1	0.8 ± 0.1	2.9 ± 1.2
Transient (4)	-29.4 ± 3.5	12.3 ± 4.1	-43.5 ± 2.2	1.0 ± 0.1	2.4 ± 0.7
Irregular Tonic (9)	-38.1 ± 1.8	11.7 ± 3.3	-47.4 ± 2.9	1.0 ± 0.1	2.5 ± 0.4
Regular Tonic (14)	-36.8 ± 1.1	10.1 ± 1.9	-53.4 ± 1.0	0.8 ± 0.0	2.5 ± 0.4
Delayed (29)	-30.6 ± 0.7	10.0 ± 1.3	-48.6 ± 0.7	0.8 ± 0.0	2.1 ± 0.2
Gap (4)	-27.6 ± 1.4	5.8 ± 1.4	-44.2 ± 1.7	0.8 ± 0.0	1.7 ± 0.6

Data are expressed as mean ± SEM. Numbers of neurons are within brackets. AHP: afterhyperpolarization; hWidth: half-width of the action potential; TTP, time-to-peak.

REFERENCES

- Abraira, V. E., E. D. Kuehn, A. M. Chirila, M. W. Springel, A. A. Toliver, A. L. Zimmerman, L. L. Orefice, K. A. Boyle, L. Bai, B. J. Song, K. A. Bashista, T. G. O'Neill, J. Zhuo, C. Tsan, J. Hoynoski, M. Rutlin, L. Kus, V. Niederkofler, M. Watanabe, S. M. Dymecki, S. B. Nelson, N. Heintz, D. I. Hughes and D. D. Ginty (2017). "The Cellular and Synaptic Architecture of the Mechanosensory Dorsal Horn." *Cell* 168(1-2): 295-310 e219.
- Al-Khater, K. M., R. Kerr and A. J. Todd (2008). "A quantitative study of spinothalamic neurons in laminae I, III, and IV in lumbar and cervical segments of the rat spinal cord." *J Comp Neurol* 511(1): 1-18.
- Antal, M., E. Polgar, J. Chalmers, J. B. Minson, I. Llewellyn-Smith, C. W. Heizmann and P. Somogyi (1991). "Different populations of parvalbumin- and calbindin-D28k-immunoreactive neurons contain GABA and accumulate 3H-D-aspartate in the dorsal horn of the rat spinal cord." *J Comp Neurol* 314(1): 114-124.
- Baccam, N., G. Alonso, T. Costecalde, P. Fontanaud, F. Molino, I. C. Robinson, P. Mollard and P. F. Mery (2007). "Dual-level afferent control of growth hormone-releasing hormone (GHRH) neurons in GHRH-green fluorescent protein transgenic mice." *J Neurosci* 27(7): 1631-1641.
- Bao, J. P., J. J. Li and E. R. Perl (1998). "Differences in Ca²⁺ channels governing generation of miniature and evoked excitatory synaptic currents in spinal laminae I and II." *Journal of Neuroscience* 18(21): 8740-8750.
- Bender, K. J., C. P. Ford and L. O. Trussell (2010). "Dopaminergic modulation of axon initial segment calcium channels regulates action potential initiation." *Neuron* 68(3): 500-511.
- Bernal Sierra, Y. A., J. Haseleu, A. Kozlenkov, V. Begay and G. R. Lewin (2017). "Genetic Tracing of Cav3.2 T-Type Calcium Channel Expression in the Peripheral Nervous System." *Front Mol Neurosci* 10: 70.
- Boehme, R., V. N. Uebele, J. J. Renger and C. Pedroarena (2011). "Rebound excitation triggered by synaptic inhibition in cerebellar nuclear neurons is suppressed by selective T-type calcium channel block." *J Neurophysiol* 106(5): 2653-2661.
- Bourinet, E., A. Alloui, A. Monteil, C. Barrere, B. Couette, O. Poirot, A. Pages, J. McRory, T. P. Snutch, A. Eschalier and J. Nargeot (2005). "Silencing of the Cav3.2 T-type calcium channel gene in sensory neurons demonstrates its major role in nociception." *EMBO J* 24(2): 315-324.
- Cain, S. M. and T. P. Snutch (2010). "Contributions of T-type calcium channel isoforms to neuronal firing." *Channels (Austin)* 4(6): 475-482.
- Casado, M., P. Isope and P. Ascher (2002). "Involvement of presynaptic N-methyl-D-aspartate receptors in cerebellar long-term depression." *Neuron* 33(1): 123-130.
- Cheng, L., A. Arata, R. Mizuguchi, Y. Qian, A. Karunaratne, P. A. Gray, S. Arata, S. Shirasawa, M. Bouchard, P. Luo, C. L. Chen, M. Busslinger, M. Goulding, H. Onimaru and Q. Ma (2004). "Tlx3 and Tlx1 are post-mitotic selector genes determining glutamatergic over GABAergic cell fates." *Nat Neurosci* 7(5): 510-517.
- Choi, S., H. S. Na, J. Kim, J. Lee, S. Lee, D. Kim, J. Park, C. C. Chen, K. P. Campbell and H. S. Shin (2007). "Attenuated pain responses in mice lacking Ca(V)_{3.2} T-type channels." *Genes Brain Behav* 6(5): 425-431.
- Clements, J. D. and J. M. Bekkers (1997). "Detection of spontaneous synaptic events with an optimally scaled template." *Biophys J* 73(1): 220-229.
- Drdla, R. and J. Sandkuhler (2008). "Long-term potentiation at C-fibre synapses by low-level presynaptic activity in vivo." *Mol Pain* 4: 18.
- Dreyfus, F. M., A. Tschertter, A. C. Errington, J. J. Renger, H. S. Shin, V. N. Uebele, V. Crunelli, R. C. Lambert and N. Leresche (2010). "Selective T-type calcium channel block in thalamic neurons reveals channel redundancy and physiological impact of I(T)window." *J Neurosci* 30(1): 99-109.
- Duan, B., L. Cheng, S. Bourane, O. Britz, C. Padilla, L. Garcia-Campmany, M. Krashes, W. Knowlton, T. Velasquez, X. Ren, S. E. Ross, B. B. Lowell, Y. Wang, M. Goulding and Q. Ma (2014). "Identification of spinal circuits transmitting and gating mechanical pain." *Cell* 159(6): 1417-1432.

- Egger, V., K. Svoboda and Z. F. Mainen (2003). "Mechanisms of lateral inhibition in the olfactory bulb: efficiency and modulation of spike-evoked calcium influx into granule cells." *J Neurosci* 23(20): 7551-7558.
- Foster, E., H. Wildner, L. Tudeau, S. Haueter, W. T. Ralvenius, M. Jegen, H. Johannssen, L. Hosli, K. Haenraets, A. Ghanem, K. K. Conzelmann, M. Bosl and H. U. Zeilhofer (2015). "Targeted ablation, silencing, and activation establish glycinergic dorsal horn neurons as key components of a spinal gate for pain and itch." *Neuron* 85(6): 1289-1304.
- Francois, A., N. Schuetter, S. Laffray, J. Sanguesa, A. Pizzoccaro, S. Dubel, A. Mantilleri, J. Nargeot, J. Noel, J. N. Wood, A. Moqrich, O. Pongs and E. Bourinet (2015). "The Low-Threshold Calcium Channel Cav3.2 Determines Low-Threshold Mechanoreceptor Function." *Cell Rep.*
- Garcia-Caballero, A., V. M. Gadotti, P. Stemkowski, N. Weiss, I. A. Souza, V. Hodgkinson, C. Bladen, L. Chen, J. Hamid, A. Pizzoccaro, M. Deage, A. Francois, E. Bourinet and G. W. Zamponi (2014). "The deubiquitinating enzyme USP5 modulates neuropathic and inflammatory pain by enhancing Cav3.2 channel activity." *Neuron* 83(5): 1144-1158.
- Grudt, T. J. and E. R. Perl (2002). "Correlations between neuronal morphology and electrophysiological features in the rodent superficial dorsal horn." *J Physiol* 540(Pt 1): 189-207.
- Herbison, A. E., S. X. Simonian, P. J. Norris and P. C. Emson (1996). "Relationship of neuronal nitric oxide synthase immunoreactivity to GnRH neurons in the ovariectomized and intact female rat." *J Neuroendocrinol* 8(1): 73-82.
- Huang, Z., R. Lujan, I. Kadurin, V. N. Uebele, J. J. Renger, A. C. Dolphin and M. M. Shah (2011). "Presynaptic HCN1 channels regulate Cav3.2 activity and neurotransmission at select cortical synapses." *Nat Neurosci* 14(4): 478-486.
- Hughes, A. S., S. Averill, V. R. King, C. Molander and P. J. Shortland (2008). "Neurochemical characterization of neuronal populations expressing protein kinase C gamma isoform in the spinal cord and gracile nucleus of the rat." *Neuroscience* 153(2): 507-517.
- Ikeda, H., B. Heinke, R. Ruscheweyh and J. Sandkuhler (2003). "Synaptic plasticity in spinal lamina I projection neurons that mediate hyperalgesia." *Science* 299(5610): 1237-1240.
- Ikeda, H., J. Stark, H. Fischer, M. Wagner, R. Drdla, T. Jager and J. Sandkuhler (2006). "Synaptic amplifier of inflammatory pain in the spinal dorsal horn." *Science* 312(5780): 1659-1662.
- Inquimbert, P., K. Bartels, O. B. Babaniyi, L. B. Barrett, I. Tegeder and J. Scholz (2012). "Peripheral nerve injury produces a sustained shift in the balance between glutamate release and uptake in the dorsal horn of the spinal cord." *Pain* 153(12): 2422-2431.
- Inquimbert, P., M. Moll, T. Kohno and J. Scholz (2013). "Stereotaxic injection of a viral vector for conditional gene manipulation in the mouse spinal cord." *J Vis Exp*(73): e50313.
- Isope, P., M. E. Hildebrand and T. P. Snutch (2012). "Contributions of T-type voltage-gated calcium channels to postsynaptic calcium signaling within Purkinje neurons." *Cerebellum* 11(3): 651-665.
- Jacus, M. O., V. N. Uebele, J. J. Renger and S. M. Todorovic (2012). "Presynaptic Ca(V)3.2 Channels Regulate Excitatory Neurotransmission in Nociceptive Dorsal Horn Neurons." *Journal of Neuroscience* 32(27): 9374-9382.
- Kerckhove, N., C. Mallet, A. Francois, M. Boudes, J. Chemin, T. Voets, E. Bourinet, A. Alloui and A. Eschalier (2014). "Ca(v)3.2 calcium channels: the key protagonist in the supraspinal effect of paracetamol." *Pain* 155(4): 764-772.
- Ku, W. H. and S. P. Schneider (2011). "Multiple T-type Ca²⁺ current subtypes in electrophysiologically characterized hamster dorsal horn neurons: possible role in spinal sensory integration." *Journal of Neurophysiology* 106(5): 2486-2498.
- Lambert, R. C., F. McKenna, Y. Maulet, E. M. Talley, D. A. Bayliss, L. L. Cribbs, J. H. Lee, E. Perez-Reyes and A. Feltz (1998). "Low-voltage-activated Ca²⁺ currents are generated by members of the CavT subunit family (alpha1G/H) in rat primary sensory neurons." *J Neurosci* 18(21): 8605-8613.
- Lemon, N. and R. W. Turner (2000). "Conditional spike backpropagation generates burst discharge in a sensory neuron." *J Neurophysiol* 84(3): 1519-1530.
- Liao, Y. F., M. L. Tsai, C. C. Chen and C. T. Yen (2011). "Involvement of the Cav3.2 T-type calcium channel in thalamic neuron discharge patterns." *Mol Pain* 7: 43.
- Llinas, R. R. and M. Steriade (2006). "Bursting of thalamic neurons and states of vigilance." *J Neurophysiol* 95(6): 3297-3308.

- Lu, Y., H. Dong, Y. Gao, Y. Gong, Y. Ren, N. Gu, S. Zhou, N. Xia, Y. Y. Sun, R. R. Ji and L. Xiong (2013). "A feed-forward spinal cord glycinergic neural circuit gates mechanical allodynia." *J Clin Invest* 123(9): 4050-4062.
- Marger, F., A. Gelot, A. Alloui, J. Matricon, J. F. Ferrer, C. Barrere, A. Pizzoccaro, E. Muller, J. Nargeot, T. P. Snutch, A. Eschaliere, E. Bourinet and D. Ardid (2011). "T-type calcium channels contribute to colonic hypersensitivity in a rat model of irritable bowel syndrome." *Proc Natl Acad Sci U S A* 108(27): 11268-11273.
- Markram, H. and B. Sakmann (1994). "Calcium transients in dendrites of neocortical neurons evoked by single subthreshold excitatory postsynaptic potentials via low-voltage-activated calcium channels." *Proc Natl Acad Sci U S A* 91(11): 5207-5211.
- McKay, B. E., J. E. McRory, M. L. Molineux, J. Hamid, T. P. Snutch, G. W. Zamponi and R. W. Turner (2006). "Ca(V)₃ T-type calcium channel isoforms differentially distribute to somatic and dendritic compartments in rat central neurons." *Eur J Neurosci* 24(9): 2581-2594.
- Messinger, R. B., A. K. Naik, M. M. Jagodic, M. T. Nelson, W. Y. Lee, W. J. Choe, P. Orestes, J. R. Latham, S. M. Todorovic and V. Jevtovic-Todorovic (2009). "In vivo silencing of the Ca(V)_{3.2} T-type calcium channels in sensory neurons alleviates hyperalgesia in rats with streptozocin-induced diabetic neuropathy." *Pain* 145(1-2): 184-195.
- Miraucourt, L. S., R. Dallel and D. L. Voisin (2007). "Glycine inhibitory dysfunction turns touch into pain through PKC γ interneurons." *PLoS One* 2(11): e1116.
- Molineux, M. L., J. E. McRory, B. E. McKay, J. Hamid, W. H. Mehaffey, R. Rehak, T. P. Snutch, G. W. Zamponi and R. W. Turner (2006). "Specific T-type calcium channel isoforms are associated with distinct burst phenotypes in deep cerebellar nuclear neurons." *Proc Natl Acad Sci U S A* 103(14): 5555-5560.
- Moqrich, A., T. J. Earley, J. Watson, M. Andahazy, C. Backus, D. Martin-Zanca, D. E. Wright, L. F. Reichardt and A. Patapoutian (2004). "Expressing TrkC from the TrkA locus causes a subset of dorsal root ganglia neurons to switch fate." *Nat Neurosci* 7(8): 812-818.
- Morgenstern, P. F., R. Marongiu, S. A. Musatov and M. G. Kaplitt (2011). "Adeno-associated viral gene delivery in neurodegenerative disease." *Methods Mol Biol* 793: 443-455.
- Mrowczynski, W., J. Celichowski, R. Raikova and P. Krutki (2015). "Physiological consequences of doublet discharges on motoneuronal firing and motor unit force." *Front Cell Neurosci* 9: 81.
- Muller, T., K. Anlag, H. Wildner, S. Britsch, M. Treier and C. Birchmeier (2005). "The bHLH factor Olig3 coordinates the specification of dorsal neurons in the spinal cord." *Genes Dev* 19(6): 733-743.
- Peirs, C., S. Patil, R. Bouali-Benazzouz, A. Artola, M. Landry and R. Dallel (2014). "Protein kinase C γ interneurons in the rat medullary dorsal horn: distribution and synaptic inputs to these neurons, and subcellular localization of the enzyme." *J Comp Neurol* 522(2): 393-413.
- Petitjean, H., S. A. Pawlowski, S. L. Fraine, B. Sharif, D. Hamad, T. Fatima, J. Berg, C. M. Brown, L. Y. Jan, A. Ribeiro-da-Silva, J. M. Braz, A. I. Basbaum and R. Sharif-Naeini (2015). "Dorsal Horn Parvalbumin Neurons Are Gate-Keepers of Touch-Evoked Pain after Nerve Injury." *Cell Rep* 13(6): 1246-1257.
- Pigeat, R., P. Chausson, F. M. Dreyfus, N. Leresche and R. C. Lambert (2015). "Sleep Slow Wave-Related Homo and Heterosynaptic LTD of Intrathalamic GABA(A)ergic Synapses: Involvement of T-Type Ca²⁺ Channels and Metabotropic Glutamate Receptors." *Journal of Neuroscience* 35(1): 64-73.
- Polgar, E., S. A. Shehab, C. Watt and A. J. Todd (1999). "GABAergic neurons that contain neuropeptide Y selectively target cells with the neurokinin 1 receptor in laminae III and IV of the rat spinal cord." *J Neurosci* 19(7): 2637-2646.
- Polgar, E., T. C. Sardella, S. Y. Tiong, S. Locke, M. Watanabe and A. J. Todd (2013). "Functional differences between neurochemically defined populations of inhibitory interneurons in the rat spinal dorsal horn." *Pain* 154(12): 2606-2615.
- Ratte, S., M. Lankarany, Y. A. Rho, A. Patterson and S. A. Prescott (2014). "Subthreshold membrane currents confer distinct tuning properties that enable neurons to encode the integral or derivative of their input." *Front Cell Neurosci* 8: 452.

- Reali, C. and R. E. Russo (2013). "Neuronal intrinsic properties shape naturally evoked sensory inputs in the dorsal horn of the spinal cord." *Frontiers in Cellular Neuroscience* 7.
- Ruscheweyh, R. and J. Sandkuhler (2002). "Lamina-specific membrane and discharge properties of rat spinal dorsal horn neurones in vitro." *J Physiol* 541(Pt 1): 231-244.
- Ryu, P. D. and M. Randic (1990). "Low- and high-voltage-activated calcium currents in rat spinal dorsal horn neurons." *J Neurophysiol* 63(2): 273-285.
- Sardella, T. C., E. Polgar, M. Watanabe and A. J. Todd (2011). "A quantitative study of neuronal nitric oxide synthase expression in laminae I-III of the rat spinal dorsal horn." *Neuroscience* 192: 708-720.
- Schindelin, J., I. Arganda-Carreras, E. Frise, V. Kaynig, M. Longair, T. Pietzsch, S. Preibisch, C. Rueden, S. Saalfeld, B. Schmid, J. Y. Tinevez, D. J. White, V. Hartenstein, K. Eliceiri, P. Tomancak and A. Cardona (2012). "Fiji: an open-source platform for biological-image analysis." *Nat Methods* 9(7): 676-682.
- Scroggs, R. S. and A. P. Fox (1992). "Multiple Ca²⁺ currents elicited by action potential waveforms in acutely isolated adult rat dorsal root ganglion neurons." *J Neurosci* 12(5): 1789-1801.
- Shen, F. Y., Z. Y. Chen, W. Zhong, L. Q. Ma, C. Chen, Z. J. Yang, W. L. Xie and Y. W. Wang (2015). "Alleviation of neuropathic pain by regulating T-type calcium channels in rat anterior cingulate cortex." *Mol Pain* 11: 7.
- Shin, J. B., C. Martinez-Salgado, P. A. Heppenstall and G. R. Lewin (2003). "A T-type calcium channel required for normal function of a mammalian mechanoreceptor." *Nat Neurosci* 6(7): 724-730.
- Smith, K. M., K. A. Boyle, J. F. Madden, S. A. Dickinson, P. Jobling, R. J. Callister, D. I. Hughes and B. A. Graham (2015). "Functional heterogeneity of calretinin-expressing neurons in the mouse superficial dorsal horn: implications for spinal pain processing." *J Physiol* 593(19): 4319-4339.
- Snutch, T. P. and G. W. Zamponi (2017). "Recent advances in the development of T-type calcium channel blockers for pain intervention." *Br J Pharmacol*.
- Talley, E. M., L. L. Cribbs, J. H. Lee, A. Daud, E. Perez-Reyes and D. A. Bayliss (1999). "Differential distribution of three members of a gene family encoding low voltage-activated (T-type) calcium channels." *J Neurosci* 19(6): 1895-1911.
- Tang, A. H., M. A. Karson, D. A. Nagode, J. M. McIntosh, V. N. Uebele, J. J. Renger, M. Klugmann, T. A. Milner and B. E. Alger (2011). "Nerve terminal nicotinic acetylcholine receptors initiate quantal GABA release from perisomatic interneurons by activating axonal T-type (Cav3) Ca²⁺(+) channels and Ca²⁺(+) release from stores." *J Neurosci* 31(38): 13546-13561.
- Torsney, C. and A. B. MacDermott (2006). "Disinhibition opens the gate to pathological pain signaling in superficial neurokinin 1 receptor-expressing neurons in rat spinal cord." *J Neurosci* 26(6): 1833-1843.
- Usoskin, D., A. Furlan, S. Islam, H. Abdo, P. Lonnerberg, D. Lou, J. Hjerling-Leffler, J. Haeggstrom, O. Kharchenko, P. V. Kharchenko, S. Linnarsson and P. Ernfors (2015). "Unbiased classification of sensory neuron types by large-scale single-cell RNA sequencing." *Nat Neurosci* 18(1): 145-153.
- van Loo, K. M., C. Schaub, K. Pernhorst, Y. Yaari, H. Beck, S. Schoch and A. J. Becker (2012). "Transcriptional regulation of T-type calcium channel Ca_v3.2: bi-directionality by early growth response 1 (Egr1) and repressor element 1 (RE-1) protein-silencing transcription factor (REST)." *J Biol Chem* 287(19): 15489-15501.
- Vascak, M., J. Sun, M. Baer, K. M. Jacobs and J. T. Povlishock (2017). "Mild Traumatic Brain Injury Evokes Pyramidal Neuron Axon Initial Segment Plasticity and Diffuse Presynaptic Inhibitory Terminal Loss." *Front Cell Neurosci* 11: 157.
- Wang, R. and G. R. Lewin (2011). "The Cav3.2 T-type calcium channel regulates temporal coding in mouse mechanoreceptors." *J Physiol* 589(Pt 9): 2229-2243.
- Warre, R. C., N. C. McNaughton and A. D. Randall (2002). "Differential discrimination of fast and slow synaptic waveforms by two low-voltage-activated calcium channels." *Neuroscience* 110(2): 375-388.
- Yoshimura, M. and T. M. Jessell (1989). "Membrane properties of rat substantia gelatinosa neurons in vitro." *J Neurophysiol* 62(1): 109-118.

- Yuan, W. X., S. R. Chen, H. Chen and H. L. Pan (2009). "Stimulation of alpha(1)-adrenoceptors reduces glutamatergic synaptic input from primary afferents through GABA(A) receptors and T-type Ca(2+) channels." Neuroscience 158(4): 1616-1624.
- Zhang, W. and S. P. Schneider (2011). "Short-term modulation at synapses between neurons in laminae II-V of the rodent spinal dorsal horn." J Neurophysiol 105(6): 2920-2930.

Résultats complémentaires

Injection intraspinale du virus DJ-Cav3.2-mCherry dans les souris CX3CR1-GFP

Lors des travaux compilés dans l'article, on a utilisé des injections virales des AAV pour identifier les neurones exprimant Cav3.2. Les virus recombinants AAV ont été choisis pour permettre des expressions à long terme du transgène (Kessler, Podsakoff et al. 1996), ainsi que par la faible réponse immunologique qu'ils provoquent (Herzog 2017). Les réponses inflammatoires provoquent l'activation des cellules gliales, telles que les astrocytes et la microglie, qui subissent des changements morphologiques. Celles-ci libèrent aussi des cytokines qui agissent sur des récepteurs neuronaux (Tsuda 2017), provoquant des altérations des réseaux, comme de la transmission synaptique (Ikeda, Tsuda et al. 2007, Zhang, Jiang et al. 2017). De plus, la glie est impliquée dans la transmission nociceptive (Tsuda 2017). De ce fait, l'activation de la glie par l'injection virale pourrait provoquer des modifications dans les réseaux spinaux, et biaiser nos résultats.

Pour analyser la réponse microgliale, le virus DJ-AAV-Cav3.2-mCherry (ou une solution de NaCl) a été injecté dans des souris knockin CX3CR1-eGFP, CX3CR1 étant un récepteur de la fractalkine sélectif des microglies dans le système nerveux (Jung, Aliberti et al. 2000). Les souris furent injectées à l'âge de 4 semaines, puis les expressions du récepteur CX3CR1-eGFP ainsi que du marqueur astrocytaire GFAP furent analysées par immunomarquage (**Fig.1**). La quantification de cellules microgliales montre une légère augmentation du nombre de microglies du côté ipsilatéral à l'injection, par comparaison avec la corne dorsale contralatérale (**Fig.1C**). Au plus fort grossissement, la morphologie des cellules microgliales n'est pas changée (**Fig.1D, 1E**). L'injection des souris avec la solution physiologique (NaCl) entraîne une élévation marginale du nombre de microglies (**Fig.1F-J**).

Les critères morphologiques sont un des paramètres utilisés pour déterminer les différents états d'activation de la microglie (Zanier, Fumagalli et al. 2015). Suite à son activation, la microglie change de forme depuis un état ramifié à un état amiboïde, avec un soma plus large et une diminution des prolongements. Nos résultats ne montrent pas de différence dans la morphologie des microglies (CX3CR1-GFP+) entre les cornes dorsales ipsi- et contralatérales dans les souris

injectées avec le virus, et aucune différence avec les celles des souris injectées avec la solution NaCl 0.9%.

Les lésions du parenchyme entraînent un recrutement de microglies (Tsuda 2017). Nos résultats montrent une légère augmentation du nombre de cellules CX3CR1-positives du côté injecté avec le virus. Par contre, cette modification est très marginale quand elle est comparée aux augmentations induites par d'autres lésions (Sorge, Mapplebeck et al. 2015).

Les marquages GFAP sont similaires quand on compare les côtés ipsi- et contralatéral à l'injection (**Fig.1B, G**). En conclusion, la procédure d'injection virale, bien qu'elle soit invasive, peut être réalisée de sorte qu'elle n'induit pas de changements neuroinflammatoires drastiques et elle est une bonne approche pour manipuler génétiquement des neurones d'intérêt.

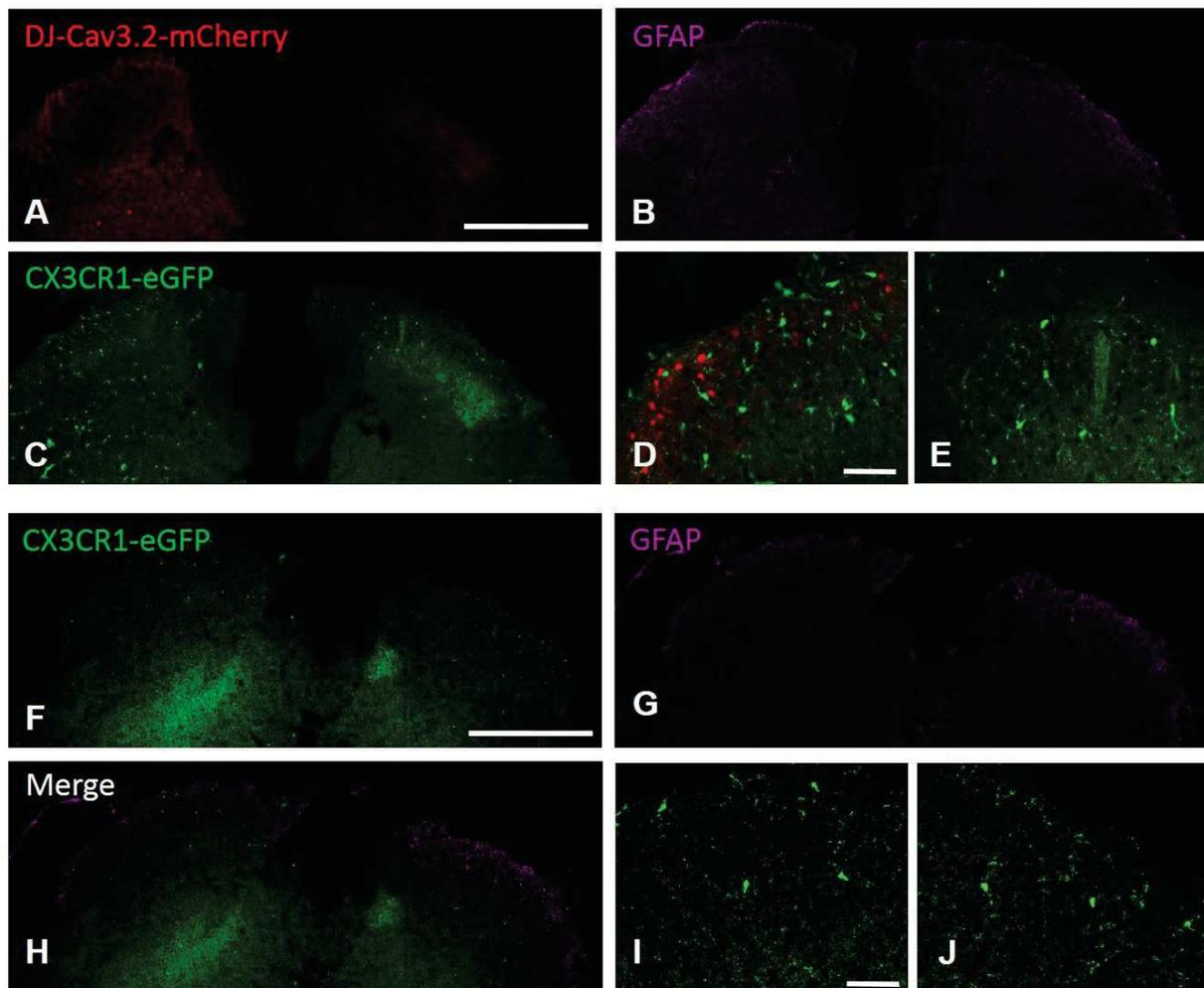


Figure 1. Injection intraspinale du virus DJ-Cav3.2-mCherry ou NaCl chez une souris CX3CR1. (A) Image d'une coupe transversale de moelle épinière au niveau lombaire d'une souris injectée avec le virus DJ-Cav3.2-mCherry. La mCherry (rouge) fut révélée par

immunomarquage. Notez que le marquage est présent seulement du côté injecté. **(B)** Immunomarquage de la GFAP (violet) sur une coupe de moelle épinière. **(C)** Fluorescence du récepteur CX3CR1-eGFP sur une coupe de moelle épinière. **(D-E)** Amplification de la même image montrant chaque côté de la moelle épinière. Notez que le nombre de cellules microgliales est légèrement supérieur du côté infecté, mais la taille des cellules est similaire. **(F-H)** Images d'une coupe transversale de moelle épinière injectée avec une solution NaCl. La GFAP (violet) fut révélée par immunomarquage. **(I-J)** Amplification de la même image. Bar d'échelle : **A, F** (400µm), **D, I** (50µm).

Neurones Cav3.2-mCherry+ dans les souris KO pour Cav3.1

Les trois sous-types de canaux T sont présents dans la lamina II (Talley, Cribbs et al. 1999), ce qui a été archivé dans le Allen Brain Atlas. De plus, nos résultats d'hybridation *in situ* montrent que les neurones exprimant Cav3.2-mCherry présentent aussi des ARNm des canaux Cav3.1 et des canaux Cav3.3 (figure supplémentaire S4 de l'article). Pour mieux étudier la contribution de Cav3.2 par rapport aux autres sous-types, on a injecté du virus DJ-AAV-Cav3.2-mCherry dans une souris KO pour le canal Cav3.1 (Kim, Song et al. 2001). Nous avons ensuite analysé les propriétés électrophysiologiques des cellules exprimant la mCherry par des enregistrements en *patch clamp*.

Les neurones exprimant la mCherry dans la lamina II de la moelle épinière de souris KO pour le canal Cav3.1 ont eu différents profils d'activité électrique. La répartition des profils est un peu différente de celle présentée par les neurones exprimant mCherry dans les souris sauvages (**Fig.2A**), puisqu'on remarque une faible représentation des profils toniques et une prédominance pour le profil retardé (*delayed*). De même, après une hyperpolarisation maintenue, les neurones exprimant la mCherry ont répondu avec des dépolarisations en forme de rebond (27%), des dépolarisations en pentes lentes (*slow-slope*, 35%) et des réponses passives (*flat*, 38%) (**Fig.2B**). Cette répartition est proche de celle observée dans la population exprimant la mCherry dans les souris sauvages. De même, la répartition des profils de décharge en fonction du type de rebond sous-liminaire est la même que dans la population des neurones Cav3.2-mCherry+ des souris sauvages, avec des profils retardés (*delayed*) préférentiellement associés aux neurones déclenchant des réponses en pentes lentes ou des réponses passives, et des profils plutôt transitoires ou toniques pour les neurones ayant déclenché des rebonds (**Fig.2C**).

En ce qui concerne les propriétés du rebond, l'amplitude est diminuée de manière non significative (**Fig.2E**) et le temps au pic (**Fig.2F**) est comparable aux paramètres des neurones

exprimant mCherry dans les souris Cav3.1 knockout et dans les souris sauvages. Ces résultats suggèrent que Cav3.1 ne joue pas un rôle significatif dans l'excitabilité des neurones exprimant Cav3.2. Alternativement, d'autres canaux calciques de type T, soit Cav3.2, soit Cav3.3, compensent l'inactivation constitutive de Cav3.1 dans les interneurons spinaux.

La délétion de Cav3.1 ne modifie pas la largeur (**Fig.2H**), le pic maximal (**Fig.2G**), le seuil d'activation (**Fig.2J**) ou l'AHP (**Fig.2H**) du potentiel d'action, en comparaison avec les neurones exprimant mCherry des souris sauvages. Par contre, les neurones exprimant Cav3.2 des souris délétées pour Cav3.1 et présentant des réponses en rebond sous-liminaire ne produisent pas le phénomène 'd'appariement' du deuxième potentiel d'action, dont la latence n'est pas significativement plus courte que celle des potentiels d'action suivants (**Fig.2D**).

Finalement, l'analyse des courants miniatures excitateurs (mEPSC) ne montre pas d'implication de courants de type T. En effet, l'application de TTA-A2 (1 μ M) ne modifie ni l'amplitude (**Fig.2K**, n=7) ni les intervalles des événements synaptiques (**Fig.2L**, n=7).

Dans l'ensemble, le canal calcique Cav3.1 ne jouerait pas un rôle, ou aurait un rôle mineur, dans l'excitabilité des neurones Cav3.2-mCherry+, à l'exception de l'effet d'appariement des deux premiers potentiels d'action en début d'activation. Cette altération est aussi provoquée par la délétion de Cav3.2, ce qui suggère que ces deux canaux collaboreraient et/ou que l'activité de l'un potentialiserait celle de l'autre. Ceci suggérerait que l'activité de l'un ou l'autre ne serait pas suffisante. Quant à la présence de Cav3.3 dans ces neurones, elle mériterait d'être étudiée également afin de connaître sa participation dans ces propriétés, et/ou dans d'autres propriétés intrinsèques. Les modèles de délétions constitutives sont néanmoins difficiles à analyser car les effets aigus des délétions sont confondus avec les effets développementaux qui ne sont pas le sujet de notre étude.

L'absence d'effet de TTA-A2 sur la transmission synaptique glutamatergique n'est pas inattendue puisque l'inhibiteur n'a pas eu d'effet significatif dans les souris sauvages. Il était plausible de faire l'hypothèse que Cav3.1 puisse masquer l'effet de TTA-A2 sur un autre canal calcique de type T. Par exemple, le canal Cav3.1 pourrait être localisé sur une synapse GABAergique contrôlant l'activité d'un bouton synaptique glutamatergique dont le fonctionnement ferait intervenir Cav3.2 ou Cav3.3. L'implication des canaux calciques de type T devra être étudiée à nouveau dans des sous-populations de neurones identifiés de la lamina II de la moelle épinière.

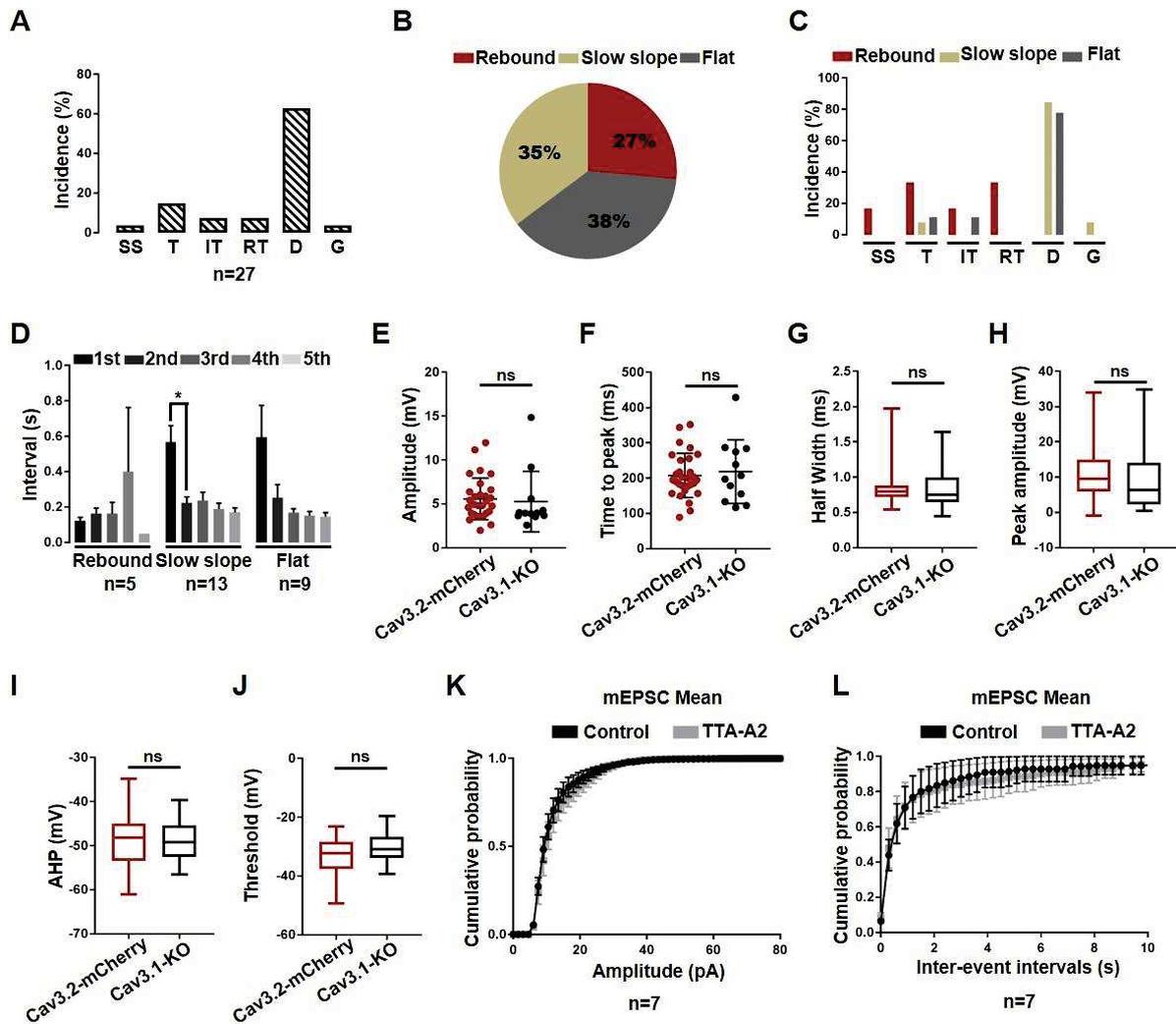


Figure 2. Propriétés électrophysiologiques de neurones Cav3.2-mCherry+ dans une souris Cav3.1 KO. (A) Graphe montrant la distribution de profils de décharge. SS (*Single spiking*), T (*Transient*), IT (*Irregular Tonic*), RT (*Regular Tonic*), D (*Delayed*), G (*Gap*). (B) Distribution de réponses après hyperpolarization. (C) Graphe montrant la distribution de profils de décharge selon le type de rebond. (D) Graphe montrant les intervalles des 5 premiers potentiels d'action dans les neurones ayant déclenchés chaque type de rebond sousliminaire. Les données sont exprimées sous la forme de moyenne \pm SEM. Test apparié Wilcoxon, * $p < 0.05$. (E-F) Graphes montrant les valeurs d'amplitude (E) et temps au pic (F) des rebonds des neurones Cav3.2-mCherry+ (rouge) ou des neurones Cav3.2-mcherry des souris Cav3.1 KO (noire). Test de Mann Whitney, ns : non significatif. (G-J) Graphes montrant différents paramètres du premier potentiel d'action des neurones Cav3.2-mCherry+ (rouge) ou des neurones Cav3.2-mcherry des souris Cav3.1 KO (noire). Test de Mann Whitney, ns : non significatif. (K-L) Graphe montrant les distributions cumulées moyennes des amplitudes (K) et des intervalles (L) des courants miniatures excitateurs (mEPSC) avant (noire) ou après application du bloqueur de canaux T, le TTA-A2 1 μ M (gris).

Neurones Cav3.2-mCherry+ dans un modèle de douleur chronique

Les canaux Cav3.2 ont été largement impliqués dans les phénomènes douloureux, qu'ils soient aigus (Francois, Schuetter et al. 2015) ou chroniques (Bourinet, Alloui et al. 2005, Todorovic and Jevtovic-Todorovic 2014). Des expériences préliminaires ont été faites pour étudier les propriétés électrophysiologiques des neurones Cav3.2 de la lamina II dans un modèle de douleur neuropathique. Ainsi, des souris WT ont été injectées à l'âge de 4 semaines avec le virus DJ-Cav3.2-mCherry comme décrit précédemment. Trois semaines après cette injection, les souris ont subi soit une chirurgie SNI (*Spared Nerve Injury*), soit une chirurgie sham (voir la partie méthodologique pour les détails des procédures). Les enregistrements en *patch clamp* des neurones Cav3.2-mCherry+ ont été faits 2 semaines après la chirurgie, une fois établies les allodynies mécanique et thermique (Decosterd and Woolf 2000).

Les neurones Cav3.2-mCherry+ présentent des profils de décharge variés dans les souris SNI et sham (**Fig.3A**). On remarque quelques différences entre les souris SNI, mais aussi les souris sham, avec les souris Cav3.2 n'ayant pas subi de chirurgie (données présentées dans l'article). En particulier, l'absence de profils *single spiking* est peut-être la conséquence d'un sous-échantillonnage des données. Les différences de répartition entre sham et SNI, concernant les profils transitoires, toniques irréguliers, et « gap » mériteront d'être confirmées par des expériences complémentaires. Les distributions des réponses sous-limaires évoquées par le protocole d'hyperpolarisation transitoire montrent des différences dans les répartitions des comportements « *slow slope* » et « *flat* » entre sham et SNI (**Fig.3B, 3C**). Les **Fig. 3D et 3E** montrent les amplitudes et les temps-au-pic des rebonds dans les neurones exprimant Cav3.2 des souris SNI et Sham, et le nombre de données disponibles ne permet de donner une comparaison.

Ces résultats préliminaires devront être complétés afin de pouvoir discuter un rôle spinal pour Cav3.2 dans le traitement de l'information sensorielle en situation de douleur chronique.

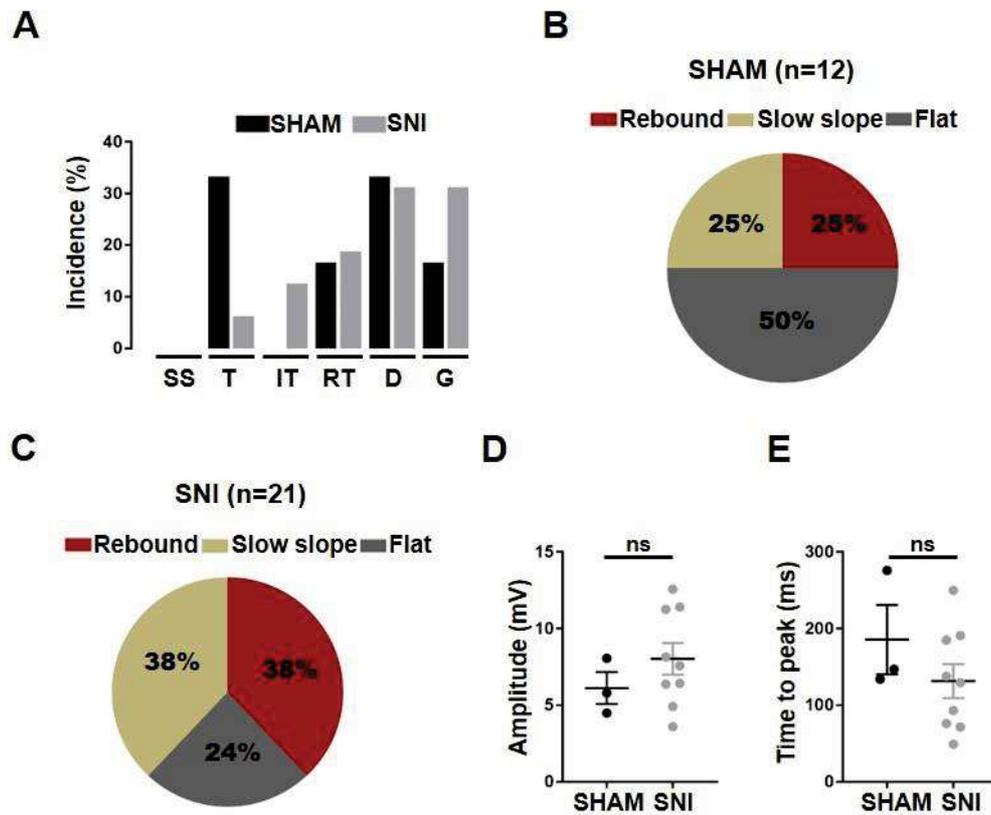


Figure 3. Propriétés électrophysiologiques des neurones Cav3.2-mCherry+ dans un modèle neuropathique. (A) Graphe montrant la distribution de profils de décharge en condition SNI (n=20) ou Sham (n=12). SS (*Single spiking*), T (*Transient*), IT (*Irregular Tonic*), RT (*Regular Tonic*), D (*Delayed*), G (*Gap*). (B,C) Distributions de réponses après hyperpolarization en condition Sham (B) ou SNI (C). (D,E) Graphes montrant l'amplitude (D) et le temps au pic (E) des rebonds en condition Sham (noire, n= 3) ou SNI (gris, n=9). Mann Whitney test, ns : non significatif.

DISCUSSION
ET
PERSPECTIVES

Expression des canaux Cav3.2 dans la moelle épinière

Le premier but de cette thèse était d'étudier la localisation des canaux Cav3.2 dans la partie dorsale de la moelle épinière. La présence de ces canaux dans cette région fut décrit par l'analyse d'ARNm par ISH (Talley, Cribbs et al. 1999, McCarthy 2006). Des précédents travaux dans notre laboratoire sur la souris knock-in Cav3.2-eGFP ont permis de confirmer la présence de ce canal dans les corps cellulaires des laminae superficielles suite à la rhizotomie des afférences primaires. Par contre, il n'existait pas de données sur sa localisation précise dans des sous-populations de neurones.

Les co-marquages avec les facteurs de transcription Tlx3 et Pax2 pour déterminer les neurones excitateurs et inhibiteurs respectivement ont montré que le canal s'exprime principalement dans les neurones excitateurs (70%), mais aussi dans les inhibiteurs (12%). Quand on regarde la proportion de neurones excitateurs exprimant le canal, on en retrouve environ la moitié (42%), alors que seulement 13% des neurones inhibiteurs expriment le canal. On peut déjà confirmer que ce canal est très exprimé dans la moelle épinière, dans plus de la moitié des neurones et qu'il n'est pas spécifique d'une seule population d'interneurones, car les neurones inhibiteurs et excitateurs proviennent de différentes progéniteurs (Lai, Seal et al. 2016). De plus, ces marqueurs ne couvraient pas tous les cellules Cav3.2+. Pour analyser la nature cellulaire du reste des cellules Cav3.2+, des co-marquages avec le marqueur NeuN ont été faits. La colocalisation de Cav3.2 avec NeuN n'est pas totale (~85%), mais il faut noter que le marqueur NeuN peut ne pas caractériser tous les neurones (Gusel'nikova and Korzhevskiy 2015). Nos expériences préliminaires avec la GFAP, marqueur astrocytaire, suggèrent que Cav3.2 n'est pas exprimé dans ces cellules gliales.

Cav3.2 est exprimé en différentes proportions dans les neurones CR, CB et nNOS, et presque absent des neurones PV. Ceci confirme, malgré sa large expression, que Cav3.2 n'est pas reparti de manière homogène. Ceci confirme aussi que ces marqueurs, CR, CB, nNOS, ne définissent pas des populations homogènes (Smith, Boyle et al. 2015). La population PKC γ est plus intéressante car presque toutes les cellules expriment le canal. Les neurones PKC γ déterminent une population hétérogène de neurones dont certains participent à l'allodynie mécanique (Alba-Delgado, El Khoueiry et al. 2015). Il est intéressant que différentes études aient montré que les courants T pourraient être augmentés par l'activité des protéines PKC (Park, Kang et al. 2006, Chemin, Mezghrani et al. 2007). Il a aussi été décrit que l'enzyme PKC γ se trouve proche de la

membrane, où elle pourrait être affectée par le calcium passant à travers les canaux membranaires (Peirs, Patil et al. 2014). Il serait ainsi intéressant d'étudier plus en détail l'interaction entre le canal Cav3.2 et la PKC γ , car il est possible qu'ils interagissent.

Il existe d'autres marqueurs classiques des neurones de la lamina II de nature peptidique, tels que le NPY ou la SP. Ces marqueurs sont plus difficiles à utiliser, car la quantité de ces neuropeptides dans le soma est très faible, ce qui rend difficile leur détection. De ce fait, des expériences de co-marquage entre le canal Cav3.2 et d'ISH des ARNm codant pour ces neuropeptides devraient permettre de compléter le profil d'expression de Cav3.2 dans les populations d'interneurones spinaux.

Localisation subcellulaire du canal Cav3.2

Le marquage par immunohistochimie n'a pas permis d'étudier de façon précise la localisation subcellulaire de Cav3.2 dans la corne dorsale de la moelle épinière. Ceci est dû en partie à la densité du marquage provenant des afférences primaires contenant aussi le canal, qui projettent en partie dans la même zone que les interneurones que nous avons étudiés (Abraira and Ginty 2013, Francois, Schuetter et al. 2015). On observe un marquage faible dans le cytoplasme et plus fort à la surface du soma, et ceci a été utilisé pour définir un neurone comme positif pour Cav3.2. Par contre, il n'est pas possible de différencier si le marquage est membranaire ou sous-membranaire. Il faudrait réaliser des études de co-marquage avec des marqueurs de membrane (Na/K ATPase) et/ou sous-membranaires (PSD95, ankyrin). De plus, l'utilisation d'animaux où le canal Cav3.2 est éliminé de toutes les afférences permettrait sans doute d'être plus résolutif. C'est une perspective à court terme avec le croisement entre la souris Cav3.2-flox-eGFP et la souris *advin* CreErt2 permettant un KO inductible dans les afférences primaires. Ces animaux sont en production au laboratoire.

Morphologie des neurones Cav3.2+

La morphologie des neurones exprimant Cav3.2 enregistrés dans les tranches aiguës n'a pas été montrée dans cette thèse. Différents types de difficultés (problème de dialyse, révélation des marqueurs dialysés) ont été rencontrés. D'après les résultats des expériences d'immunofluorescence discutés ci-dessus, on peut spéculer que le canal est exprimé dans des neurones avec des morphologies très variées. Par exemple, les seuls neurones PKC γ , qui expriment toujours le canal Cav3.2, ne présentent pas une morphologie unique (Alba-Delgado, El Khoueiry et al. 2015).

Canaux Cav3.2 et transmission synaptique

Des études précédentes ont montré que le canal Cav3.2 peut être exprimé dans les terminaisons présynaptiques dans la lamina II (Francois, Schuetter et al. 2015). Par contre, l'origine de ces terminaisons n'a pas été déterminée, qui peuvent être potentiellement des neurones sensoriels C- et A δ -LTMRs Cav3.2+ qui projettent dans la moelle épinière ou des neurones de la corne dorsale.

La participation de ces canaux à la transmission synaptique a été montrée principalement pour des mécanismes indépendants du déclenchement de potentiel d'action (Huang, Lujan et al. 2011). Nous avons étudié, avec et sans TTX, respectivement les courants synaptiques miniatures et les courants synaptiques spontanés, et nous avons observé que l'application de TTA-A2 n'a pas modifié l'amplitude ni la fréquence des événements dans la lamina II. La participation des canaux T n'a pas été révélée dans deux expériences supplémentaires, de démasquage. En effet, les synapses glutamatergiques possèdent des anatomies très complexes, et le blocage des récepteurs GABA et glycinergiques permettait de s'affranchir de ces interactions croisées. De plus, les courants I_h peuvent limiter l'activité présynaptique des canaux T (Huang, Lujan et al. 2011), et les afférences primaires ou les interneurons spinaux expriment HCN responsables des courant I_h (Milligan, Edwards et al. 2006, Hughes, Boyle et al. 2013). L'enregistrement des courants mEPSC d'ivabradine permettait de lever ce verrou. On peut donc conclure qu'un rôle des canaux T dans la transmission synaptique reste à découvrir dans la lamina II de la moelle.

Des études précédentes sur des neurones non identifiés de la lamina II ont montré une forte inhibition des courants mEPSC par le nickel (100 μ M) ou le mibefradil (2.5 μ M) (Bao, Li et al. 1998). Par contre, le nickel inhibe aussi des canaux calciques à haut seuil de type R (Randall and Tsien 1997), qui sont impliqués dans la transmission excitatrice dans la moelle épinière (Jacus, Uebele et al. 2012), et le mibefradil inhibe aussi les canaux de type L (Eller, Berjukov et al. 2000). Ces enregistrements furent faits à température ambiante, à laquelle l'activité de canaux T pourrait être totalement modifiée et encore plus éloignée des conditions physiologiques (Iftinca, McKay et al. 2006). Par ailleurs, cette étude fut menée chez le rat, et une différence interspécifique entre rat et souris est toujours possible.

Une autre étude utilisant le TTA-P2, un autre bloqueur spécifique de canaux T, montre une diminution de la fréquence des mEPSC dans les neurones de projection de la lamina I et pas dans une population d'interneurones inhibiteurs de la lamina II ni dans la lamina III (Jacus, Uebele et al. 2012)(fig.64). Le TTA-P2 ne modifie pas non plus les courants inhibiteurs (mIPSC). Ces auteurs montrent aussi que chez une souris KO pour Cav3.2, il y a une forte diminution de la fréquence des mEPSC dans ces laminae superficielles de la moelle. Il est ainsi suggéré que le canal Cav3.2 serait responsable de l'effet sur la transmission excitatrice dans la lamina I. Nous avons étudié des populations hétérogènes d'interneurones, qui ne sont probablement pas tous contactés de manière dense par des terminaisons Cav3.2+. L'effet moyen du blocage par le TTA-A2 pourrait en être masqué. D'ailleurs, si on considère le détail de nos résultats, le TTA-A2 a induit un effet dans certains neurones de la lamina II. D'après les travaux de Jacus et al. (2012), les neurones connectés à des terminaisons Cav3.2+ pourraient être des interneurones excitateurs de la lamina II, contactant les neurones de projection. Pour tester cette hypothèse, il faudrait faire des enregistrements en double patch entre les neurones de la lamina II et les neurones de projection de la lamina I.

Les afférents primaires contenant Cav3.2, c'est-à-dire les fibres C- et les A δ -LTMRs, projettent majoritairement dans les laminae II et III (Li, Rutlin et al. 2011, Abaira and Ginty 2013). Toutefois, les courants synaptiques d'un neurone ne sont pas issus d'un type d'afférences homogène. L'activité d'afférences Cav3.2-positives sur un neurone pourrait être masquée par la présence de courants synaptiques originaires de fibres Cav3.2-négatives. Pour mieux comprendre le rôle synaptique des canaux Cav3.2 dans la lamina II, il faudra stimuler spécifiquement différentes populations de fibres Cav3.2-positives. Des expériences préliminaires sur des stimulations électriques de racines n'ont pas permis d'obtenir des résultats satisfaisants. Ces stimulations sont encore très grossières et ne permettent pas une spécificité adéquate entre les différents sous-types de fibres C, A δ ou A β . Des techniques d'optogénétique pourront servir à stimuler spécifiquement des sous-types de fibres. Il faudra prendre en compte que le rôle de canaux T dans la transmission synaptique est probablement maximal avec des stimulations sous-liminaire. Pour des stimulations fortes, les canaux calciques à haut seuil seront activés et prendront en charge la libération de vésicules de neurotransmission.

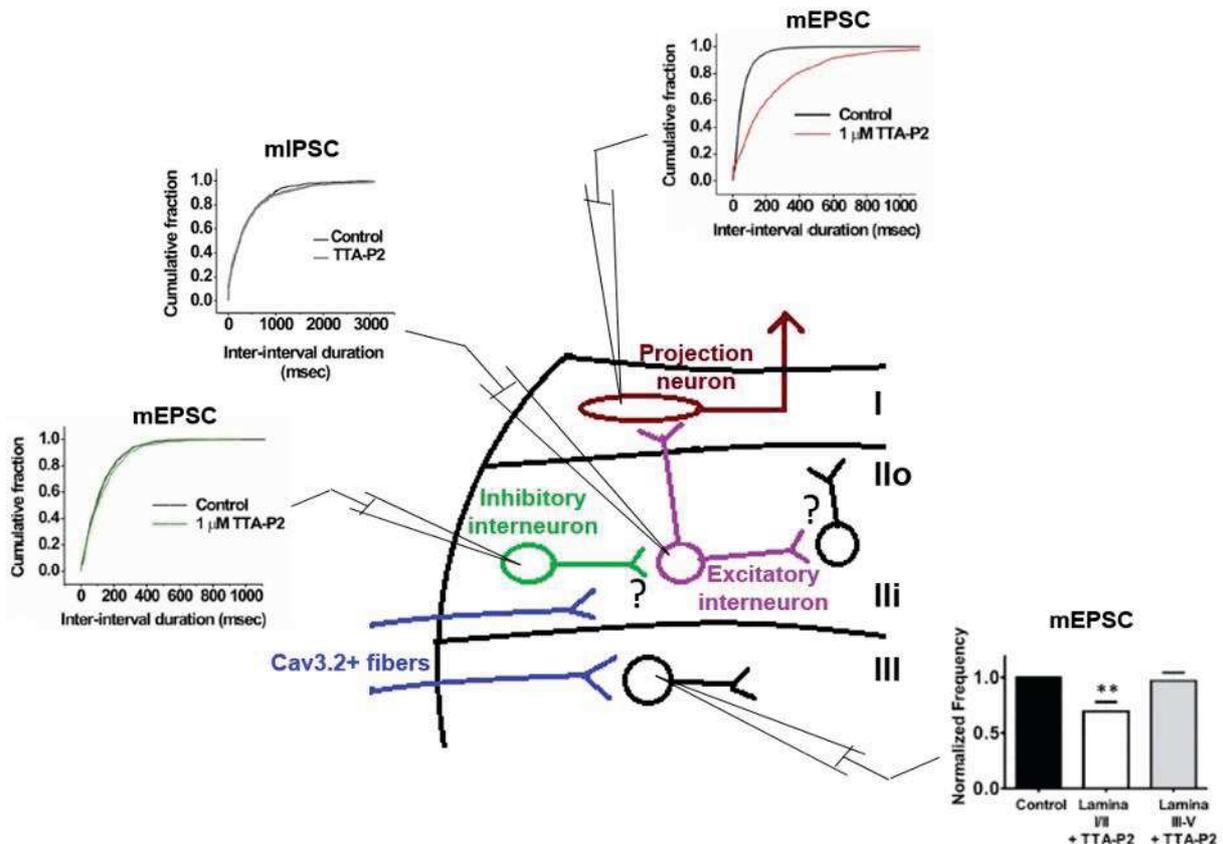


Figure 64. Rôle des canaux T dans la transmission synaptique dans la corne dorsale de la moelle épinière. Schéma simplifié sur les réseaux de la corne dorsale de la moelle épinière et les résultats sur la participation de canaux T dans la transmission synaptique. Le seul effet du TTA-P2 sur la transmission synaptique est celui enregistré dans les mEPSC dans les neurones de projection de la lamina I. Les fibres Cav3.2+ ne semblent pas contacter directement les neurones de projection de la lamina I (Abraira and Ginty 2013). Ainsi, cet effet est probablement dû aux interneurons excitateurs de la lamina II qui contactent des neurones de projection. Adapté d'après (Jacus, Uebele et al. 2012).

Propriétés électrophysiologiques des neurones Cav3.2+

La présence de courants de type T dans la moelle épinière a été décrite dans différentes études (Tadros, Harris et al. 2012). Par contre, on a peu d'information sur les sous-types de canaux T impliqués et sur la participation de ces courants T à l'excitabilité. Nos travaux ont permis l'enregistrement des neurones exprimant Cav3.2, grâce à une approche virale. Les résultats de co-marquage d'immunohistochimie et d'ISH confirment que les virus DJ-AAV-Cav3.2-mCherry-WPRE s'expriment sélectivement dans les neurones GFP+ des souris Cav3.2-eGFP (82%) et/ou dans les neurones exprimant l'ARNm de Cav3.2 (93%). Pour mieux étudier la participation du canal Cav3.2, des enregistrements des neurones Cav3.2-mCherry+ sur des souris KO pour le canal Cav3.1 ont été faits. Finalement, la délétion spécifique du canal Cav3.2

a été faite dans la moelle épinière à l'aide d'un virus DJ-AAV-Cav3.2-Cre-mCherry injecté dans une souris knock-in pour le canal Cav3.2-eGFP floxé.

Canaux Cav3.2 et rebond

De nombreux neurones de la lamina II présentent un rebond sensible au TTA-A2, confirmant l'implication de canaux T dans ce type d'excitabilité, et dans le réseau spinal. Les autres neurones répondent par une dépolarisation lente suivie de potentiels d'action (*slow slope*) (18%) ou sans aucun type de dépolarisation (*flat*) (33%). L'identification des courants T dans les neurones *slow slope* fut difficile à cause d'un *run-down* des potentiels d'action, et ne permet pas une analyse concluante. Nos résultats de patch-clamp suggèrent donc qu'au moins 50% des neurones de la lamina II développent des courants T. Ces résultats sont proches des comptages par immunofluorescence indiquant que ~60% des neurones expriment la protéine. Quand on compare ces résultats avec les études précédentes sur les dépolarisations en rebond, on trouve des valeurs similaires, avec une proportion de 39% des neurones exprimant des rebonds, 16% de dépolarisations lentes et 45% de réponses passives (*flat*) (Graham, Brichta et al. 2004). Des études sur les courants T sont plus variables, avec des proportions de 25-90% selon le type d'enregistrement (Ku and Schneider 2011, Smith, Boyle et al. 2015).

Nous avons étudié l'identité des canaux impliqués puisque la lamina II exprime les trois canaux T, Cav3.1 et Cav3.3 (Talley, Cribbs et al. 1999). De manière surprenante, la proportion de neurones avec rebond est plus faible dans les neurones Cav3.2-mCherry+ (33%) que dans la population générale, d'une part, et les neurones Cav3.2-mCherry+ peuvent présenter un phénotype *slow slope* ou *flat*. Les propriétés du rebond sont aussi différentes que celles de la population générale, puisqu'ils ont une amplitude moyenne plus petite et un temps-au-pic plus long. Les neurones sans Cav3.2 (Cav3.2-Cre-mCherry+) expriment aussi des rebonds, dans des proportions un peu moindres (24%). Leurs rebonds sont significativement plus petits et présentent la même cinétique que dans les neurones Cav3.2+. Ces résultats suggèrent que les canaux Cav3.2 participent en partie aux rebonds. Les enregistrements des neurones Cav3.2-mCherry+ chez des souris KO pour Cav3.1 ne montrent pas de différences de proportion, d'amplitude ou de cinétique des rebonds. Des études dans le cervelet ont montré que différents types de canaux T génèrent différents types de décharge en rebond (Molineux, McRory et al. 2006). Dans cette étude, les canaux Cav3.1 induisent des rebonds provoquant des décharges de potentiel d'action à haute fréquence, qui sont aussi associés à l'amplitude de la dépolarisation en rebond. Par comparaison, nos résultats montrent que l'absence de Cav3.1 ne modifie pas les

propriétés du rebond. On ne peut toutefois pas exclure des compensations par expression des autres canaux T dans la souris KO Cav3.1. Pour compléter, nos enregistrements ont été faits seulement dans les neurones Cav3.2+, et il est possible que Cav3.1 soit responsable de rebonds de majeure amplitude dans les neurones qui n'expriment pas Cav3.2.

Les résultats sur la présence et diminution d'amplitude de rebonds dans les neurones sans Cav3.2 suggèrent aussi la participation d'autres canaux. Les résultats sur les souris KO Cav3.1 excluent un rôle de ce canal. Cav3.1 pourrait ne pas être exprimé dans ces neurones, mais nos données préliminaires d'ISH sur des neurones Cav3.2-mCherry+ montrent une co-localisation du canal Cav3.1. Ce dernier pourrait être impliqué dans un autre phénotype des interneurones de la corne dorsale. Nos données préliminaires d'ISH montrent aussi que le canal Cav3.3 est exprimé dans des neurones Cav3.2-positifs, suggérant son implication dans le résidu de rebond des interneurones invalidés pour Cav3.2.

Les canaux HCN, dont il existe quatre gènes, peuvent aussi contribuer/générer des rebonds (Surges, Sarvari et al. 2006, Rivera-Arconada and Lopez-Garcia 2015). Il est d'ailleurs fréquent que les canaux T et HCN collaborent à la génération des rebonds dans les corps cellulaires des neurones (Surges, Sarvari et al. 2006, Rivera-Arconada and Lopez-Garcia 2015)(fig.65). Ces études montrent que le courant Ih diminue la latence du premier potentiel d'action. La cinétique lente du rebond des neurones Cav3.2+ suggère une faible participation des courants Ih, par rapport aux neurones non identifiés. Ainsi, Ih est un autre candidat, en plus de Cav3.1 et Cav3.3, à l'origine des rebonds rapides des neurones n'exprimant pas Cav3.2. Rappelons que les courants Ih sont très faiblement représentés dans la lamina II, seulement dans 2-15% de neurones (Tadros, Harris et al. 2012, Smith, Boyle et al. 2015). De plus, la proportion d'interneurones montrant des courants mixtes T et Ih est très marginale (<5%) (Tadros, Harris et al. 2012). En complément, le niveau d'expression des canaux HCN est aussi faible dans la lamina II de la corne dorsale (Milligan, Edwards et al. 2006). Dans nos enregistrements, les cellules avec un 'sag', phénomène caractéristique de courants Ih, n'étaient pas fréquentes, ce qui confirmerait que dans les cellules Cav3.2+ les courants Ih seraient faibles. De façon intéressante, 50% des neurones PKC γ expriment le canal HCN4 (Hughes, Boyle et al. 2013). Par contre, nos résultats ne montrent pas de différence de cinétique dans les rebonds des interneurones après délétion de Cav3.2+, parmi lesquels se trouvent des neurones PKC γ . Ces

résultats suggèrent que dans ces neurones PKC γ (Cav3.2+), les canaux HCN4 ne seraient pas suffisants pour déclencher le rebond.

On peut conclure que Cav3.2 participe au rebond dans quelques neurones, aidé d'autres conductances, probablement les canaux Cav3.3. Il faudra étudier la contribution des canaux Cav3.3 au rebond dans ces neurones, par exemple en diminuant son expression avec des antisens ou des souris invalidées pour ce canal.

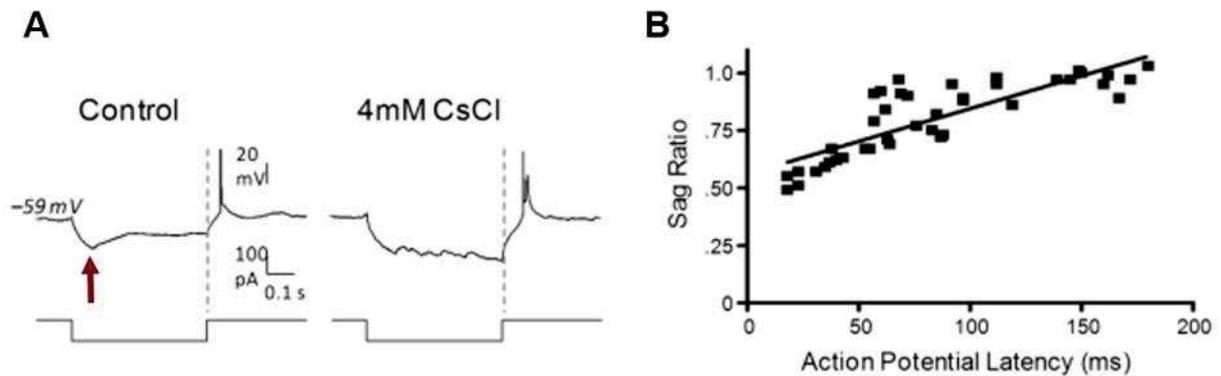


Figure 65. Dépolarisation en rebond des neurones profonds de la moelle épinière. (A). Traces d'enregistrements de neurones de la lamina III-IV de la moelle épinière. Le blocage des courants I_h par le CsCl n'élimine pas la décharge en rebond suite à une hyperpolarisation. Notez que le CsCl élimine le 'sag' au début de l'hyperpolarisation et augmente le délai pour le premier potentiel d'action. **(B).** Relation entre l'amplitude du 'sag' dépendant des courants I_h et la latence du premier potentiel d'action pendant un rebond. D'après (Rivera-Arconada and Lopez-Garcia 2015).

Finalement, les enregistrements de *voltage-clamp* dans les neurones Cav3.2+ montrent que seule la moitié des neurones montrent des courants T mesurables. Toutefois, les enregistrements des courants avec la technique de *patch clamp* en cellule entière, ne permettent pas l'accès dans tous les compartiments membranaires des neurones. Il est donc possible, que les canaux Cav3.2 soient exprimés loin du soma, où son enregistrement n'est pas contrôlé. Ces résultats sont en accord avec la bibliographie, qui montre des proportions de neurones exprimant des courants plus faibles que le nombre de neurones exprimant des ARNm des canaux T (Talley, Cribbs et al. 1999, Tadros, Harris et al. 2012). Cette discordance peut être due à une régulation de l'expression de la protéine ou une localisation subcellulaire différente d'un type neuronal à l'autre. Ainsi, on trouverait des neurones avec le canal exprimé proche du soma, où il peut participer aux courants T enregistrés, ou loin du soma, où sa participation aux courants T enregistrés avec des techniques de *patch clamp* est limitée. Nos marquages d'immunohistochimie suggèrent une forte expression du canal Cav3.2, plus proche de résultats

d'ISH. Par contre, comme précisé avant, le marquage ne permet pas de déterminer si le canal est inséré dans la membrane et donc participe aux courants enregistrés. En considérant la grande hétérogénéité des neurones de la lamina II, il est fortement possible que dans chaque sous-type neuronal, Cav3.2 joue un rôle différent, ce qui expliquerait l'hétérogénéité des résultats.

Canaux Cav3.2 et excitabilité

L'implication des différents sous-types de canaux T aux profils de décharge a été bien décrite dans des structures telles que le thalamus. Par contre, dans la moelle épinière la participation de ces canaux à l'excitabilité a rarement été abordée.

Nos résultats sur des neurones de la lamina II montrent qu'ils présentent les différents types de profils de décharge décrits précédemment (Grudt and Perl 2002). Une nouvelle division a été faite pour les neurones de décharge tonique. L'observation plus attentive de ces profils permet de les différencier selon le mode de décharge pendant le pulse de stimulation. Ainsi, les neurones tonique irréguliers déchargent plus au début du pulse, avec des SEM des 4 premiers potentiels d'action supérieures à 2. Les neurones toniques réguliers déchargent de façon plus homogène au long du pulse, et présentent des valeurs de SEM des 4 premiers potentiels d'action inférieures à 2.

Les neurones Cav3.2-mCherry+ présentent tous les types de profil de décharge, avec une proportion plus importante pour le profil retardé (*delayed*). L'absence de Cav3.2 provoque des changements drastiques du type de profil de décharge, avec une absence des profils de décharge transitoires et irréguliers toniques, et une augmentation des neurones avec décharge *gap*. De plus, les neurones avec un profil tonique régulier présentent une diminution de l'excitabilité. Les profils de décharge dans les neurones Cav3.2-mCherry+ dans le KO Cav3.1 ne montrent pas de changements drastiques. Ces résultats suggèrent un rôle plus important des canaux Cav3.2 dans le profil de décharge.

Dans les neurones à décharge tonique, des canaux potassiques activés par le calcium (SK) sont souvent présents pour réguler la fréquence (Melnick, Santos et al. 2004, Yang 2016). La suppression de canaux Cav3.2 provoque une diminution de l'entrée de calcium. Cette diminution pourrait diminuer l'activation de ces canaux SK, et donc provoquer une augmentation de la fréquence. Par contre, nos résultats montrent une diminution. Le couplage

est possible seulement si les deux canaux sont exprimés dans un nanodomaine (Yang 2016). Ainsi, il est possible que les canaux Cav3.2 ne soient pas proches des canaux SK dans les interneurons de la lamina II, et que l'influx calcique qu'ils provoquent soit inefficace pour stimuler les canaux SK. De plus, d'autres études ont montré une diminution de l'excitabilité, après ablation des canaux Cav3.2 ou après blocage pharmacologique (Liao, Tsai et al. 2011, Deleuze, David et al. 2012).

Les études sur les dynamiques d'initiation de potentiels d'action montrent que les canaux calciques à bas seuil sont essentiels dans les profils de décharge toniques et transitoires (Prescott, De Koninck et al. 2008). Une autre étude sur les neurones de la lamina II a montré que les neurones avec des courants T de grande amplitude présentent préférentiellement un profil de décharge transitoire (Ku and Schneider 2011). En accord avec ces travaux, les interneurons avec rebond présentent préférentiellement des profils de décharge transitoires et toniques. Les neurones avec dépolarisations lentes et sans rebond présentent préférentiellement des profils retardés. La même distribution est observée dans les neurones Cav3.2-mCherry+, Cav3.2-Cre-mCherry+ et Cav3.2-mCherry+ chez le KO pour Cav3.1. De plus, nos résultats montrent que les profils transitoire et tonique irrégulier avec des fréquences plus importantes au début du pulse, sont éliminés dans les neurones dans lesquels Cav3.2 a été délété. Ainsi, les canaux Cav3.2 jouent un rôle important dans le profil de décharges transitoires et tonique. La suppression des canaux Cav3.2 s'accompagne d'une augmentation préférentielle de profils de décharge *gap*. Ce phénotype, où certains intervalles entre potentiels d'action sont exceptionnellement longs, pourrait donc être une exagération du phénotype tonique irrégulier, en l'absence de canal Cav3.2. Autre hypothèse, le phénotype transitoire reposant sur une coopération entre Cav3.2 et un canal SK activé par le calcium pourrait être converti en « *gap* » en l'absence d'un recrutement massif et synchronisé de ces canaux SK.

Les propriétés du premier potentiel d'action sont aussi soumises à l'influence de Cav3.2. Sa délétion majore l'amplitude du pic et de l'hyperpolarisation après le potentiel d'action (AHP : *afterhyperpolarisation*), et diminue la largeur à la moitié du potentiel d'action (*half width*). Les données obtenues *in vitro* dans des systèmes d'expression hétérologue montrent que les canaux T conditionnent fortement la phase de repolarisation (Lambert, McKenna et al. 1998, Chemin, Monteil et al. 2002). En accord avec ces résultats, on trouve des différences dans les paramètres tardifs du potentiel d'action. Les neurones Cav3.2-positifs des souris KO Cav3.1 n'ont pas ce

phénotype, suggérant que le canal Cav3.2 joue un rôle exclusif dans cette gamme de temps. Le niveau d'expression de Cav3.1 dans les neurones Cav3.2 pourrait ne pas être suffisant pour y participer.

L'activité des canaux ne conditionne pas seulement les propriétés du premier potentiel d'action, puisqu'ils participent aux décharges en bouffées à haut fréquence (Kim, Song et al. 2001, Liao, Tsai et al. 2011). Pour étudier ce phénomène nous avons regardé les intervalles de décharges des 5 premiers potentiels d'action. Ces analyses montrent que la présence de rebond favorise le déclenchement du potentiel d'action « numéro 2 », qui a un intervalle significativement plus petit que les suivants. Ce phénomène est retrouvé dans les neurones Cav3.2-mCherry+, mais il est aboli dans les neurones sans Cav3.2-Cre-mCherry+ ou Cav3.1 KO. Ceci suggère que les canaux Cav3.1 et Cav3.2 sont importants pour ce phénomène. La diminution de la largeur du potentiel d'action (*half width*) pourrait expliquer l'absence d'un deuxième potentiel d'action à haute fréquence (intervalle mineur) dans les neurones sans Cav3.2. On n'a pas trouvé de corrélations entre l'amplitude ou le temps au pic du rebond et la fréquence du deuxième potentiel d'action (données non montrées).

Différentes études ont montré que les canaux T peuvent diminuer le seuil de déclenchement du potentiel d'action dans les neurones sensoriels, et dans des neurones thalamiques (Dreyfus, Tscherter et al. 2010, Francois, Schuetter et al. 2015). Nos résultats ne montrent pas de différences dans le seuil du déclenchement de potentiels d'action en l'absence de Cav3.2. Dans les neurones où les canaux T participent au seuil de déclenchement du potentiel d'action, de larges courants T peuvent être enregistrés (Dreyfus, Tscherter et al. 2010). Ces courants peuvent générer des courants de fenêtre significatifs qui dépolarisent les neurones de façon décisive. Par contre, dans les neurones de la lamina II, les courants T sont très faibles, et proportionnellement, le courant de fenêtre anticipé pourrait être peu significatif en face des autres conductances membranaires, dans les conditions d'enregistrements utilisées.

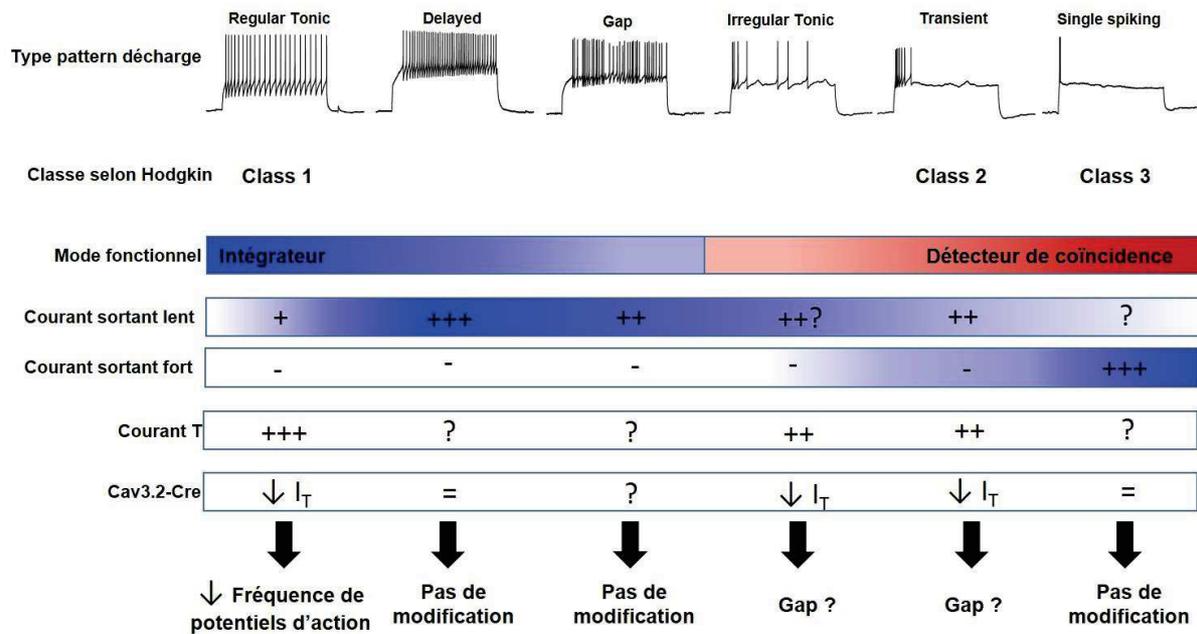


Figure 66. Résumé des résultats sur le rôle de Cav3.2 dans le profil de décharge. D'après (Ruscheweyh and Sandkuhler 2002, Schneider 2003, Melnick, Santos et al. 2004, Prescott, De Koninck et al. 2008, Ratte, Hong et al. 2013).

Implications fonctionnelles

Le profil de décharge signe le mode de communication des neurones. Ainsi, on peut imaginer que des variations subtiles vont coder des informations différentes. La fréquence de décharge a été associée avec le codage de l'information dans différentes structures. Des études dans les neurones corticaux montrent que l'intervalle à l'intérieur d'une bouffée de potentiels d'actions code pour l'intensité des stimuli (Oswald, Doiron et al. 2007). Dans la moelle épinière, il est probable que la fréquence de décharge code aussi l'information à transmettre. Par contre, face à la méconnaissance des réseaux, on ne peut que spéculer sur le codage des transmissions intrasegmentaires. Les résultats obtenus lors de nos travaux montrent l'importance du canal Cav3.2 pour coder la fréquence des premiers potentiels d'action, qui pourraient être essentiels à la bonne transmission du message.

Le couplage des deux premiers potentiels d'action porté par Cav3.2 dans les interneurons spinaux pourrait provoquer une potentiation de la transmission synaptique car l'intervalle entre ces deux événements tombe dans la gamme des facilitations de la neurotransmission. Dans cette hypothèse, l'influx calcique lors du premier potentiel d'action pourrait s'ajouter, au moins partiellement, à celui porté par le second potentiel d'action, et favoriser l'exocytose.

Les dépolarisations en rebond sont des mécanismes qui peuvent protéger la transmission synaptique en consolidant l'intégration synaptique face aux influences inhibitrices (Ly, Bouvier et al. 2016, Evans, Zhu et al. 2017). Cette idée est à mettre en relation avec la morphologie de nombreuses synapses glutamatergiques dans les couches II-III, les glomérules, où l'activité d'un bouton semble immédiatement et localement contrôlée par une grappe de boutons pré- et/ou post-synaptiques.

Co-expression des canaux T dans les mêmes neurones

D'après les résultats préliminaires d'ISH de Cav3.1 ou Cav3.3 dans les neurones exprimant Cav3.2-mCherry +, on observe une forte co-expression de plusieurs types de canaux calciques à bas seuil. Ceci est aussi le cas dans d'autres structures du système nerveux central, telles que les neurones RT du thalamus, qui expriment les canaux Cav3.2 et Cav3.3 ou les neurones du cervelet (Molineux, McRory et al. 2006). On pourrait penser qu'il est redondant d'exprimer deux types de canaux avec des propriétés similaires. Par contre, comme décrit dans l'introduction, ces canaux présentent de subtiles différences de cinétiques avec de conséquences majeures pour les comportements neuronaux. De plus, les rôles de ces canaux peuvent être très différents selon la localisation subcellulaire. On peut aussi imaginer, que chaque sous-type soit exprimé à une localisation spécifique, dans le cas des co-expressions.

Cav3.2 dans la moelle et douleur

Des augmentations des courant T et de l'excitabilité des neurones ont été démontrées dans les neurones sensoriels, dans différents modèles de douleur chronique (Jagodic, Pathirathna et al. 2008). Des résultats préliminaires dans le laboratoire montrent l'absence d'allodynie mécanique et au froid dans un modèle de neuropathie (SNI) quand le canal Cav3.2 est supprimé au niveau lombaire. Par contre, la perception douloureuse en condition naïve ne semble pas modifiée. Ces résultats suggèrent un rôle primordial de ces canaux T segmentaires dans la douleur neuropathique. Nos résultats préliminaires sur les propriétés électrophysiologiques des neurones Cav3.2+ sur des souris neuropathiques ne montrent aucune différence dans la distribution du profil de décharge entre les souris Sham et SNI. Il n'y a pas non plus de différences entre la proportion de rebond, leur amplitude ou leur temps au pic. Ces analyses ont été faites 14 jours après la chirurgie, quand allodynies et hyperalgésies mécanique et thermique sont établies (Decosterd and Woolf 2000). Ainsi, nos résultats ne suggèrent pas une augmentation de courants T, qui pourrait provoquer une augmentation de l'excitabilité (Nelson, Joksovic et al.

2005). Si ces résultats étaient confirmés dans la lamina II, il serait intéressant d'étudier les synapses et les neurones de la lamina I, puisque Cav3.2 pourrait y jouer un rôle plus significatif au cours de la phase chronique de la douleur neuropathique. Il est par contre possible que l'augmentation des courants T soit transitoire et nécessaire aux premières étapes de l'établissement de neuropathies. En effet, dans un modèle de douleur musculaire induite par l'acide, il a été montré que les canaux T sont importants pour l'initiation de l'hyperalgésie mécanique, mais pas pour sa maintenance (Chen, Liu et al. 2010). Il serait donc intéressant d'étudier les courants T ou dépolarisations en rebond à différents moments après l'induction de la neuropathie.

On peut aussi imaginer un rôle déterminant du profil de décharge dépendant du Cav3.2+. Les résultats électrophysiologiques sur les neurones Cav3.2-mCherry+ et sans Cav3.2 montrent que le canal peut déterminer certains profils de décharge, mais pas dans tous les neurones Cav3.2-mCherry+. D'après ces résultats hétérogènes, le canal Cav3.2 semble jouer différents rôles dans chaque type de neurone. Il est important de rappeler que le canal est exprimé dans des neurones excitateurs et inhibiteurs, ce qui rend difficile une interprétation macroscopique à l'échelle de l'organe. On peut imaginer que ces changements de profil n'ont pas lieu, ou qu'ils ont moins d'impact dans les neurones inhibiteurs qui servent à contrôler les réseaux et inhiber la transmission de messages nociceptifs. Ainsi, il est possible que le changement de profil de décharge vers des profils moins excitables ait lieu dans des neurones essentiels pour transmettre le message nociceptif. Ainsi, la diminution d'excitabilité dans ces neurones pro-nociceptifs provoquerait l'absence de symptômes d'hyperalgésie et d'allodynie. Dans cette direction, nos résultats montrent que les neurones PKC γ , très importants pour l'établissement de l'allodynie mécanique expriment fortement le canal Cav3.2. On peut imaginer que quand ces neurones n'expriment pas le canal Cav3.2, ils deviennent moins efficaces dans la transmission du message nociceptif vers les neurones de projection de la lamina I (Lu, Dong et al. 2013, Peirs, Patil et al. 2014).

RAPPEL DES CONCLUSIONS

- Cav3.2 est exprimé dans 12% de neurones inhibiteurs et 50% des neurones excitateurs de la corne dorsale de la moelle épinière (laminae I-III).
- Parmi les 70% de Cav3.2 qui marquent des neurones excitateurs, 40% sont PKC γ ⁺. De plus, presque tous les neurones PKC γ expriment Cav3.2 (90%).
- Les neurones Cav3.2-mCherry⁺ expriment différents types de profil de décharge et types de rebond.
- La délétion de Cav3.2 dans les interneurons de la lamina II diminue la proportion de neurones avec différents profils de décharge de type transitoire.
- La délétion de Cav3.2 réduit les rebonds sous-liminaire, sans en affecter les cinétiques.
- La délétion de Cav3.2 élimine la propriété « d'appariement » des deux premiers potentiels d'action typique des neurones à rebond.
- La délétion de Cav3.2 change les paramètres du potentiel d'action, en diminuant sa largeur et en augmentant les amplitudes du pic et de l'AHP.

PERSPECTIVES

Nos travaux ont montré que le canal Cav3.2 est exprimé dans différents types neuronaux dans la moelle épinière. De plus, nos résultats suggèrent que le canal joue différents rôles selon le type neuronal. Ainsi, les prochaines expériences viseront à étudier des populations plus discrètes de neurones exprimant le canal Cav3.2. Parmi ces populations, les neurones PKC γ semblent être intéressants, car ils expriment tous le canal et sa fonction correspond aux comportements douloureux observés chez le KO spinal pour Cav3.2. Des approches virales telles que celles utilisées lors de ces travaux avec le promoteur spécifique de la PKC γ pourront être utilisées pour identifier ces neurones sur des tranches de moelle épinière.

Pour étudier l'implication de ces canaux dans la transmission synaptique, les approches optogénétiques semblent les plus adéquates. Il serait intéressant d'exprimer la channelrhodopsine dans une sous-population de fibres exprimant Cav3.2 ou dans une population des interneurons de la moelle épinière. Cette technique a été récemment utilisée pour stimuler les neurones PV⁺ dans des tranches de moelle épinière (Yang, Ma et al. 2015).

Les canaux Cav3.2 peuvent jouer différents rôles selon la localisation subcellulaire (Engbers, Anderson et al. 2011, Huang, Lujan et al. 2011, Fekete, Johnston et al. 2014). Pour étudier la

localisation sous-cellulaire dans les neurones de la lamina II, il faudrait enregistrer les courants calciques avec des techniques d'imagerie calcique (Evans, Zhu et al. 2017). Ces études permettraient de mieux comprendre les fonctions que ces canaux peuvent jouer dans les neurones de la lamina II et adapter les protocoles.

BIBLIOGRAPHIE

- Abraira, V. E. and D. D. Ginty (2013). "The sensory neurons of touch." *Neuron* 79(4): 618-639.
- Abraira, V. E., E. D. Kuehn, A. M. Chirila, M. W. Springel, A. A. Toliver, A. L. Zimmerman, L. L. Orefice, K. A. Boyle, L. Bai, B. J. Song, K. A. Bashista, T. G. O'Neill, J. Zhuo, C. Tsan, J. Hoynoski, M. Rutlin, L. Kus, V. Niederkofler, M. Watanabe, S. M. Dymecki, S. B. Nelson, N. Heintz, D. I. Hughes and D. D. Ginty (2017). "The Cellular and Synaptic Architecture of the Mechanosensory Dorsal Horn." *Cell* 168(1-2): 295-310 e219.
- Aguado, C., S. Garcia-Madrone, M. Gil-Minguez and R. Lujan (2016). "Ontogenic Changes and Differential Localization of T-type Ca(2+) Channel Subunits Cav3.1 and Cav3.2 in Mouse Hippocampus and Cerebellum." *Front Neuroanat* 10: 83.
- Alba-Delgado, C., C. El Khoueiry, C. Peirs, R. Dallel, A. Artola and M. Antri (2015). "Subpopulations of PKCgamma interneurons within the medullary dorsal horn revealed by electrophysiologic and morphologic approach." *Pain* 156(9): 1714-1728.
- Ali, Z., M. Ringkamp, T. V. Hartke, H. F. Chien, N. A. Flavahan, J. N. Campbell and R. A. Meyer (1999). "Uninjured C-fiber nociceptors develop spontaneous activity and alpha-adrenergic sensitivity following L6 spinal nerve ligation in monkey." *J Neurophysiol* 81(2): 455-466.
- Al-Khater, K. M. and A. J. Todd (2009). "Collateral projections of neurons in laminae I, III, and IV of rat spinal cord to thalamus, periaqueductal gray matter, and lateral parabrachial area." *J Comp Neurol* 515(6): 629-646.
- Almeida, T. F., S. Roizenblatt and S. Tufik (2004). "Afferent pain pathways: a neuroanatomical review." *Brain Res* 1000(1-2): 40-56.
- Amir, R., M. Michaelis and M. Devor (1999). "Membrane potential oscillations in dorsal root ganglion neurons: role in normal electrogenesis and neuropathic pain." *J Neurosci* 19(19): 8589-8596.
- Anderson, M. P., T. Mochizuki, J. Xie, W. Fischler, J. P. Manger, E. M. Talley, T. E. Scammell and S. Tonegawa (2005). "Thalamic Cav3.1 T-type Ca²⁺ channel plays a crucial role in stabilizing sleep." *Proc Natl Acad Sci U S A* 102(5): 1743-1748.
- Antal, M., E. Polgar, J. Chalmers, J. B. Minson, I. Llewellyn-Smith, C. W. Heizmann and P. Somogyi (1991). "Different populations of parvalbumin- and calbindin-D28k-immunoreactive neurons contain GABA and accumulate 3H-D-aspartate in the dorsal horn of the rat spinal cord." *J Comp Neurol* 314(1): 114-124.
- Arcourt, A., L. Gorham, R. Dhandapani, V. Prato, F. J. Taberner, H. Wende, V. Gangadharan, C. Birchmeier, P. A. Heppenstall and S. G. Lechner (2017). "Touch Receptor-Derived Sensory Information Alleviates Acute Pain Signaling and Fine-Tunes Nociceptive Reflex Coordination." *Neuron* 93(1): 179-193.
- Baba, H., R. R. Ji, T. Kohno, K. A. Moore, T. Ataka, A. Wakai, M. Okamoto and C. J. Woolf (2003). "Removal of GABAergic inhibition facilitates polysynaptic A fiber-mediated excitatory transmission to the superficial spinal dorsal horn." *Mol Cell Neurosci* 24(3): 818-830.
- Baba, H., T. P. Doubell and C. J. Woolf (1999). "Peripheral inflammation facilitates Abeta fiber-mediated synaptic input to the substantia gelatinosa of the adult rat spinal cord." *J Neurosci* 19(2): 859-867.
- Balasubramanian, S., P. L. Stemkowski, M. J. Stebbing and P. A. Smith (2006). "Sciatic chronic constriction injury produces cell-type-specific changes in the electrophysiological properties of rat substantia gelatinosa neurons." *J Neurophysiol* 96(2): 579-590.
- Bao, J. P., J. J. Li and E. R. Perl (1998). "Differences in Ca²⁺ channels governing generation of miniature and evoked excitatory synaptic currents in spinal laminae I and II." *Journal of Neuroscience* 18(21): 8740-8750.
- Bao, L., H. F. Wang, H. J. Cai, Y. G. Tong, S. X. Jin, Y. J. Lu, G. Grant, T. Hokfelt and X. Zhang (2002). "Peripheral axotomy induces only very limited sprouting of coarse myelinated afferents into inner lamina II of rat spinal cord." *Eur J Neurosci* 16(2): 175-185.
- Bardoni, R., T. Takazawa, C. K. Tong, P. Choudhury, G. Scherrer and A. B. Macdermott (2013). "Pre- and postsynaptic inhibitory control in the spinal cord dorsal horn." *Ann N Y Acad Sci* 1279: 90-96.

- Bautista, D. M., J. Siemens, J. M. Glazer, P. R. Tsuruda, A. I. Basbaum, C. L. Stucky, S. E. Jordt and D. Julius (2007). "The menthol receptor TRPM8 is the principal detector of environmental cold." *Nature* 448(7150): 204-208.
- Bautista, D. M., S. E. Jordt, T. Nikai, P. R. Tsuruda, A. J. Read, J. Poblete, E. N. Yamoah, A. I. Basbaum and D. Julius (2006). "TRPA1 mediates the inflammatory actions of environmental irritants and proalgesic agents." *Cell* 124(6): 1269-1282.
- Bender, K. J., C. P. Ford and L. O. Trussell (2010). "Dopaminergic modulation of axon initial segment calcium channels regulates action potential initiation." *Neuron* 68(3): 500-511.
- Bennett, G. J. and Y. K. Xie (1988). "A peripheral mononeuropathy in rat that produces disorders of pain sensation like those seen in man." *Pain* 33(1): 87-107.
- Biella, G., L. Riva and M. L. Sotgiu (1997). "Interaction between neurons in different laminae of the dorsal horn of the spinal cord. A correlation study in normal and neuropathic rats." *Eur J Neurosci* 9(5): 1017-1025.
- Billing-Marczak, K., L. Buzanska, L. Winsky, M. Nowotny, T. Rudka, K. Isaacs, M. F. Belin and J. Kuznicki (2002). "AP2-like cis element is required for calretinin gene promoter activity in cells of neuronal phenotype differentiated from multipotent human cell line DEV." *Biochim Biophys Acta* 1577(3): 412-420.
- Birtoli, B. and D. Ulrich (2004). "Firing mode-dependent synaptic plasticity in rat neocortical pyramidal neurons." *J Neurosci* 24(21): 4935-4940.
- Bois, P., J. Bescond, B. Renaudon and J. Lenfant (1996). "Mode of action of bradycardic agent, S 16257, on ionic currents of rabbit sinoatrial node cells." *Br J Pharmacol* 118(4): 1051-1057.
- Borsotto, M., J. Barhanin, R. I. Norman and M. Lazdunski (1984). "Purification of the dihydropyridine receptor of the voltage-dependent Ca²⁺ channel from skeletal muscle transverse tubules using (+) [3H]PN 200-110." *Biochem Biophys Res Commun* 122(3): 1357-1366.
- Bosch, M. A., J. Hou, Y. Fang, M. J. Kelly and O. K. Ronnekleiv (2009). "17Beta-estradiol regulation of the mRNA expression of T-type calcium channel subunits: role of estrogen receptor alpha and estrogen receptor beta." *J Comp Neurol* 512(3): 347-358.
- Boudes, M. and F. Scamps (2012). "Calcium-activated chloride current expression in axotomized sensory neurons: what for?" *Front Mol Neurosci* 5: 35.
- Bourane, S., B. Duan, S. C. Koch, A. Dalet, O. Britz, L. Garcia-Campmany, E. Kim, L. Cheng, A. Ghosh, Q. Ma and M. Goulding (2015). "Gate control of mechanical itch by a subpopulation of spinal cord interneurons." *Science* 350(6260): 550-554.
- Bourane, S., K. S. Grossmann, O. Britz, A. Dalet, M. G. Del Barrio, F. J. Stam, L. Garcia-Campmany, S. Koch and M. Goulding (2015). "Identification of a spinal circuit for light touch and fine motor control." *Cell* 160(3): 503-515.
- Bourinet, E., A. Alloui, A. Monteil, C. Barrere, B. Couette, O. Poirot, A. Pages, J. McRory, T. P. Snutch, A. Eschalier and J. Nargeot (2005). "Silencing of the Cav3.2 T-type calcium channel gene in sensory neurons demonstrates its major role in nociception." *EMBO J* 24(2): 315-324.
- Bourinet, E., T. W. Soong, K. Sutton, S. Slaymaker, E. Mathews, A. Monteil, G. W. Zamponi, J. Nargeot and T. P. Snutch (1999). "Splicing of alpha 1A subunit gene generates phenotypic variants of P- and Q-type calcium channels." *Nat Neurosci* 2(5): 407-415.
- Breivik, H., B. Collett, V. Ventafridda, R. Cohen and D. Gallacher (2006). "Survey of chronic pain in Europe: prevalence, impact on daily life, and treatment." *Eur J Pain* 10(4): 287-333.
- Burgess, G. and D. Williams (2010). "The discovery and development of analgesics: new mechanisms, new modalities." *J Clin Invest* 120(11): 3753-3759.
- Burgess, G. M., I. Mullaney, M. McNeill, P. M. Dunn and H. P. Rang (1989). "Second messengers involved in the mechanism of action of bradykinin in sensory neurons in culture." *J Neurosci* 9(9): 3314-3325.
- Cain, S. M. and T. P. Snutch (2010). "Contributions of T-type calcium channel isoforms to neuronal firing." *Channels (Austin)* 4(6): 475-482.
- Carbone, E. and H. D. Lux (1984). "A low voltage-activated calcium conductance in embryonic chick sensory neurons." *Biophys J* 46(3): 413-418.
- Carbone, E. and H. D. Lux (1984). "A low voltage-activated, fully inactivating Ca channel in vertebrate sensory neurones." *Nature* 310(5977): 501-502.

- Carbone, E., C. Calorio and D. H. F. Vandael (2014). "T-type channel-mediated neurotransmitter release." *Pflugers Archiv-European Journal of Physiology* 466(4): 677-687.
- Carstens, E. and G. P. Moberg (2000). "Recognizing pain and distress in laboratory animals." *ILAR J* 41(2): 62-71.
- Caterina, M. J., A. Leffler, A. B. Malmberg, W. J. Martin, J. Trafton, K. R. Petersen-Zeitz, M. Koltzenburg, A. I. Basbaum and D. Julius (2000). "Impaired nociception and pain sensation in mice lacking the capsaicin receptor." *Science* 288(5464): 306-313.
- Caterina, M. J., M. A. Schumacher, M. Tominaga, T. A. Rosen, J. D. Levine and D. Julius (1997). "The capsaicin receptor: a heat-activated ion channel in the pain pathway." *Nature* 389(6653): 816-824.
- Chemin, J., A. Mezghrani, I. Bidaud, S. Dupasquier, F. Marger, C. Barrere, J. Nargeot and P. Lory (2007). "Temperature-dependent modulation of CaV3 T-type calcium channels by protein kinases C and A in mammalian cells." *J Biol Chem* 282(45): 32710-32718.
- Chemin, J., A. Monteil, E. Perez-Reyes, E. Bourinet, J. Nargeot and P. Lory (2002). "Specific contribution of human T-type calcium channel isoforms (α 1G), α 1H) and α 1I) to neuronal excitability." *J Physiol* 540(Pt 1): 3-14.
- Chemin, J., A. Trabuolsie and P. Lory (2006). "Molecular pathways underlying the modulation of T-type calcium channels by neurotransmitters and hormones." *Cell Calcium* 40(2): 121-134.
- Chemin, J., J. Nargeot and P. Lory (2007). "Chemical determinants involved in anandamide-induced inhibition of T-type calcium channels." *J Biol Chem* 282(4): 2314-2323.
- Chen, W. K., I. Y. Liu, Y. T. Chang, Y. C. Chen, C. C. Chen, C. T. Yen, H. S. Shin and C. C. Chen (2010). "Ca(v)3.2 T-type Ca²⁺ channel-dependent activation of ERK in paraventricular thalamus modulates acid-induced chronic muscle pain." *J Neurosci* 30(31): 10360-10368.
- Chen, Y., S. Balasubramanian, A. Y. Lai, K. G. Todd and P. A. Smith (2009). "Effects of sciatic nerve axotomy on excitatory synaptic transmission in rat substantia gelatinosa." *J Neurophysiol* 102(6): 3203-3215.
- Cheng, L., A. Arata, R. Mizuguchi, Y. Qian, A. Karunaratne, P. A. Gray, S. Arata, S. Shirasawa, M. Bouchard, P. Luo, C. L. Chen, M. Busslinger, M. Goulding, H. Onimaru and Q. Ma (2004). "Tlx3 and Tlx1 are post-mitotic selector genes determining glutamatergic over GABAergic cell fates." *Nat Neurosci* 7(5): 510-517.
- Cheng, L., B. Duan, T. Huang, Y. Zhang, Y. Chen, O. Britz, L. Garcia-Campmany, X. Ren, L. Vong, B. B. Lowell, M. Goulding, Y. Wang and Q. Ma (2017). "Identification of spinal circuits involved in touch-evoked dynamic mechanical pain." *Nat Neurosci* 20(6): 804-814.
- Chevalier, M., P. Lory, C. Mironneau, N. Macrez and J. F. Quignard (2006). "T-type CaV3.3 calcium channels produce spontaneous low-threshold action potentials and intracellular calcium oscillations." *Eur J Neurosci* 23(9): 2321-2329.
- Choe, W., R. B. Messinger, E. Leach, V. S. Eckle, A. Obradovic, R. Salajegheh, V. Jevtovic-Todorovic and S. M. Todorovic (2011). "TTA-P2 is a potent and selective blocker of T-type calcium channels in rat sensory neurons and a novel antinociceptive agent." *Mol Pharmacol* 80(5): 900-910.
- Choi, J. H., N. K. Yu, G. C. Baek, J. Bakes, D. Seo, H. J. Nam, S. H. Baek, C. S. Lim, Y. S. Lee and B. K. Kaang (2014). "Optimization of AAV expression cassettes to improve packaging capacity and transgene expression in neurons." *Mol Brain* 7: 17.
- Choi, S., H. S. Na, J. Kim, J. Lee, S. Lee, D. Kim, J. Park, C. C. Chen, K. P. Campbell and H. S. Shin (2007). "Attenuated pain responses in mice lacking Ca(V)3.2 T-type channels." *Genes Brain Behav* 6(5): 425-431.
- Corder, G., A. Siegel, A. B. Intondi, X. Zhang, J. E. Zadina and B. K. Taylor (2010). "A novel method to quantify histochemical changes throughout the mediolateral axis of the substantia gelatinosa after spared nerve injury: characterization with TRPV1 and substance P." *J Pain* 11(4): 388-398.
- Cordero-Erausquin, M., P. Inquimbert, R. Schlichter and S. Hugel (2016). "Neuronal networks and nociceptive processing in the dorsal horn of the spinal cord." *Neuroscience* 338: 230-247.
- Coste, B., J. Mathur, M. Schmidt, T. J. Earley, S. Ranade, M. J. Petrus, A. E. Dubin and A. Patapoutian (2010). "Piezo1 and Piezo2 are essential components of distinct mechanically activated cation channels." *Science* 330(6000): 55-60.

- Coull, J. A., D. Boudreau, K. Bachand, S. A. Prescott, F. Nault, A. Sik, P. De Koninck and Y. De Koninck (2003). "Trans-synaptic shift in anion gradient in spinal lamina I neurons as a mechanism of neuropathic pain." *Nature* 424(6951): 938-942.
- Coull, J. A., S. Beggs, D. Boudreau, D. Boivin, M. Tsuda, K. Inoue, C. Gravel, M. W. Salter and Y. De Koninck (2005). "BDNF from microglia causes the shift in neuronal anion gradient underlying neuropathic pain." *Nature* 438(7070): 1017-1021.
- Cox, J. J., F. Reimann, A. K. Nicholas, G. Thornton, E. Roberts, K. Springell, G. Karbani, H. Jafri, J. Mannan, Y. Raashid, L. Al-Gazali, H. Hamamy, E. M. Valente, S. Gorman, R. Williams, D. P. McHale, J. N. Wood, F. M. Gribble and C. G. Woods (2006). "An SCN9A channelopathy causes congenital inability to experience pain." *Nature* 444(7121): 894-898.
- Craig, A. D. and J. O. Dostrovsky (2001). "Differential projections of thermoreceptive and nociceptive lamina I trigeminothalamic and spinothalamic neurons in the cat." *J Neurophysiol* 86(2): 856-870.
- Cribbs, L. L., J. H. Lee, J. Yang, J. Satin, Y. Zhang, A. Daud, J. Barclay, M. P. Williamson, M. Fox, M. Rees and E. Perez-Reyes (1998). "Cloning and characterization of alpha1H from human heart, a member of the T-type Ca²⁺ channel gene family." *Circ Res* 83(1): 103-109.
- Crunelli, V., T. I. Toth, D. W. Cope, K. Blethyn and S. W. Hughes (2005). "The 'window' T-type calcium current in brain dynamics of different behavioural states." *J Physiol* 562(Pt 1): 121-129.
- Cueni, L., M. Canepari, J. P. Adelman and A. Luthi (2009). "Ca²⁺ signaling by T-type Ca²⁺ channels in neurons." *Pflugers Arch* 457(5): 1161-1172.
- Cueni, L., M. Canepari, R. Lujan, Y. Emmenegger, M. Watanabe, C. T. Bond, P. Franken, J. P. Adelman and A. Luthi (2008). "T-type Ca²⁺ channels, SK2 channels and SERCAs gate sleep-related oscillations in thalamic dendrites." *Nat Neurosci* 11(6): 683-692.
- De Felice, M., R. Sanoja, R. Wang, L. Vera-Portocarrero, J. Oyarzo, T. King, M. H. Ossipov, T. W. Vanderah, J. Lai, G. O. Dussor, H. L. Fields, T. J. Price and F. Porreca (2011). "Engagement of descending inhibition from the rostral ventromedial medulla protects against chronic neuropathic pain." *Pain* 152(12): 2701-2709.
- Decosterd, I. and C. J. Woolf (2000). "Spared nerve injury: an animal model of persistent peripheral neuropathic pain." *Pain* 87(2): 149-158.
- Del Barrio, M. G., S. Bourane, K. Grossmann, R. Schule, S. Britsch, D. D. O'Leary and M. Goulding (2013). "A transcription factor code defines nine sensory interneuron subtypes in the mechanosensory area of the spinal cord." *PLoS One* 8(11): e77928.
- Deleuze, C., F. David, S. Behuret, G. Sadoc, H. S. Shin, V. N. Uebele, J. J. Renger, R. C. Lambert, N. Leresche and T. Bal (2012). "T-type calcium channels consolidate tonic action potential output of thalamic neurons to neocortex." *J Neurosci* 32(35): 12228-12236.
- Delfini, M. C., A. Mantilleri, S. Gaillard, J. Hao, A. Reynders, P. Malapert, S. Alonso, A. Francois, C. Barrere, R. Seal, M. Landry, A. Eschallier, A. Alloui, E. Bourinet, P. Delmas, Y. Le Feuvre and A. Moqrich (2013). "TFAFA4, a chemokine-like protein, modulates injury-induced mechanical and chemical pain hypersensitivity in mice." *Cell Rep* 5(2): 378-388.
- Delmas, P., J. Hao and L. Rodat-Despoix (2011). "Molecular mechanisms of mechanotransduction in mammalian sensory neurons." *Nat Rev Neurosci* 12(3): 139-153.
- DePuy, S. D., J. Yao, C. Hu, W. McIntire, I. Bidaud, P. Lory, F. Rastinejad, C. Gonzalez, J. C. Garrison and P. Q. Barrett (2006). "The molecular basis for T-type Ca²⁺ channel inhibition by G protein beta2gamma2 subunits." *Proc Natl Acad Sci U S A* 103(39): 14590-14595.
- Descalzi, G., D. Ikegami, T. Ushijima, E. J. Nestler, V. Zachariou and M. Narita (2015). "Epigenetic mechanisms of chronic pain." *Trends Neurosci* 38(4): 237-246.
- Deval, E., J. Noel, N. Lay, A. Alloui, S. Diochot, V. Friend, M. Jodar, M. Lazdunski and E. Lingueglia (2008). "ASIC3, a sensor of acidic and primary inflammatory pain." *EMBO J* 27(22): 3047-3055.
- Dolphin, A. C., C. N. Wyatt, J. Richards, R. E. Beattie, P. Craig, J. H. Lee, L. L. Cribbs, S. G. Volsen and E. Perez-Reyes (1999). "The effect of alpha2-delta and other accessory subunits on expression and properties of the calcium channel alpha1G." *J Physiol* 519 Pt 1: 35-45.
- Dougherty, P. M. and J. Chen (2016). "Relationship of membrane properties, spike burst responses, laminar location, and functional class of dorsal horn neurons recorded in vitro." *J Neurophysiol* 116(3): 1137-1151.

- Drdla, R. and J. Sandkuhler (2008). "Long-term potentiation at C-fibre synapses by low-level presynaptic activity in vivo." *Mol Pain* 4: 18.
- Drdla, R., M. Gassner, E. Gingl and J. Sandkuhler (2009). "Induction of synaptic long-term potentiation after opioid withdrawal." *Science* 325(5937): 207-210.
- Drdla-Schutting, R., J. Benrath, G. Wunderbaldinger and J. Sandkuhler (2012). "Erasure of a spinal memory trace of pain by a brief, high-dose opioid administration." *Science* 335(6065): 235-238.
- Dreyfus, F. M., A. Tschertter, A. C. Errington, J. J. Renger, H. S. Shin, V. N. Uebele, V. Crunelli, R. C. Lambert and N. Leresche (2010). "Selective T-type calcium channel block in thalamic neurons reveals channel redundancy and physiological impact of I(T)window." *J Neurosci* 30(1): 99-109.
- Duan, B., L. Cheng, S. Bourane, O. Britz, C. Padilla, L. Garcia-Campmany, M. Krashes, W. Knowlton, T. Velasquez, X. Ren, S. E. Ross, B. B. Lowell, Y. Wang, M. Goulding and Q. Ma (2014). "Identification of spinal circuits transmitting and gating mechanical pain." *Cell* 159(6): 1417-1432.
- Eller, P., S. Berjukov, S. Wanner, I. Huber, S. Hering, H. G. Knaus, G. Toth, S. D. Kimball and J. Striessnig (2000). "High affinity interaction of mibefradil with voltage-gated calcium and sodium channels." *Br J Pharmacol* 130(3): 669-677.
- Emery, E. C., A. P. Luiz, S. Sikandar, R. Magnusdottir, X. Dong and J. N. Wood (2016). "In vivo characterization of distinct modality-specific subsets of somatosensory neurons using GCaMP." *Sci Adv* 2(11): e1600990.
- Engbers, J. D., D. Anderson, G. W. Zamponi and R. W. Turner (2013). "Signal processing by T-type calcium channel interactions in the cerebellum." *Front Cell Neurosci* 7: 230.
- Engbers, J. D., D. Anderson, H. Asmara, R. Rehak, W. H. Mehaffey, S. Hameed, B. E. McKay, M. Kruskic, G. W. Zamponi and R. W. Turner (2012). "Intermediate conductance calcium-activated potassium channels modulate summation of parallel fiber input in cerebellar Purkinje cells." *Proc Natl Acad Sci U S A* 109(7): 2601-2606.
- Engbers, J. D., D. Anderson, R. Tadayonnejad, W. H. Mehaffey, M. L. Molineux and R. W. Turner (2011). "Distinct roles for I(T) and I(H) in controlling the frequency and timing of rebound spike responses." *J Physiol* 589(Pt 22): 5391-5413.
- Evans, R. C., M. Zhu and Z. M. Khaliq (2017). "Dopamine Inhibition Differentially Controls Excitability of Substantia Nigra Dopamine Neuron Subpopulations through T-Type Calcium Channels." *J Neurosci* 37(13): 3704-3720.
- Fan, J., M. A. Gandini, F. X. Zhang, L. Chen, I. A. Souza and G. W. Zamponi (2017). "Down-regulation of T-type Cav3.2 channels by hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated channel 1 (HCN1): Evidence of a signaling complex." *Channels (Austin)*: 1-10.
- Fatt, P. and B. Katz (1953). "The electrical properties of crustacean muscle fibres." *J Physiol* 120(1-2): 171-204.
- Fatt, P. and B. L. Ginsborg (1958). "The ionic requirements for the production of action potentials in crustacean muscle fibres." *J Physiol* 142(3): 516-543.
- Fekete, A., J. Johnston and K. R. Delaney (2014). "Presynaptic T-Type Ca²⁺ Channels Modulate Dendrodendritic Mitral-Mitral and Mitral-Periglomerular Connections in Mouse Olfactory Bulb." *Journal of Neuroscience* 34(42): 14032-14045.
- Fenselau, H., B. Heinke and J. Sandkuhler (2011). "Heterosynaptic long-term potentiation at GABAergic synapses of spinal lamina I neurons." *J Neurosci* 31(48): 17383-17391.
- Fields, H. (1994). "Pain modulation and the action of analgesic medications." *Ann Neurol* 35 Suppl: S42-45.
- Foster, E., H. Wildner, L. Tudeau, S. Haueter, W. T. Ralvenius, M. Jegen, H. Johannssen, L. Hosli, K. Haenraets, A. Ghanem, K. K. Conzelmann, M. Bosl and H. U. Zeilhofer (2015). "Targeted ablation, silencing, and activation establish glycinergic dorsal horn neurons as key components of a spinal gate for pain and itch." *Neuron* 85(6): 1289-1304.
- Francois, A., N. Kerckhove, M. Meleine, A. Alloui, C. Barrere, A. Gelot, V. N. Uebele, J. J. Renger, A. Eschalier, D. Ardid and E. Bourinet (2013). "State-dependent properties of a new T-type calcium channel blocker enhance Ca(V)_{3.2} selectivity and support analgesic effects." *Pain* 154(2): 283-293.
- Francois, A., N. Schuetter, S. Laffray, J. Sanguesa, A. Pizzoccaro, S. Dubel, A. Mantilleri, J. Nargeot, J. Noel, J. N. Wood, A. Moqrich, O. Pongs and E. Bourinet (2015). "The Low-Threshold Calcium Channel Cav3.2 Determines Low-Threshold Mechanoreceptor Function." *Cell Rep*.

- Gabay, E. and M. Tal (2004). "Pain behavior and nerve electrophysiology in the CCI model of neuropathic pain." *Pain* 110(1-2): 354-360.
- Ganley, R. P., N. Iwagaki, P. del Rio, N. Baseer, A. C. Dickie, K. A. Boyle, E. Polgar, M. Watanabe, V. E. Abraira, A. Zimmerman, J. S. Riddell and A. J. Todd (2015). "Inhibitory Interneurons That Express GFP in the PrP-GFP Mouse Spinal Cord Are Morphologically Heterogeneous, Innervated by Several Classes of Primary Afferent and Include Lamina I Projection Neurons among Their Postsynaptic Targets." *J Neurosci* 35(19): 7626-7642.
- Garcia-Caballero, A., V. M. Gadotti, P. Stemkowski, N. Weiss, I. A. Souza, V. Hodgkinson, C. Bladen, L. Chen, J. Hamid, A. Pizzoccaro, M. Deage, A. Francois, E. Bourinet and G. W. Zamponi (2014). "The deubiquitinating enzyme USP5 modulates neuropathic and inflammatory pain by enhancing Cav3.2 channel activity." *Neuron* 83(5): 1144-1158.
- Garrison, S. R., A. Dietrich and C. L. Stucky (2012). "TRPC1 contributes to light-touch sensation and mechanical responses in low-threshold cutaneous sensory neurons." *J Neurophysiol* 107(3): 913-922.
- Gautam, S. H., K. I. Otsuguro, S. Ito, T. Saito and Y. Habara (2007). "T-type Ca²⁺ channels mediate propagation of odor-induced Ca²⁺ transients in rat olfactory receptor neurons." *Neuroscience* 144(2): 702-713.
- Glasgow, S. M., R. M. Henke, R. J. Macdonald, C. V. Wright and J. E. Johnson (2005). "Ptf1a determines GABAergic over glutamatergic neuronal cell fate in the spinal cord dorsal horn." *Development* 132(24): 5461-5469.
- Goswami, S. C., S. K. Mishra, D. Maric, K. Kaszas, G. L. Gonnella, S. J. Clokie, H. D. Kominsky, J. R. Gross, J. M. Keller, A. J. Mannes, M. A. Hoon and M. J. Iadarola (2014). "Molecular signatures of mouse TRPV1-lineage neurons revealed by RNA-Seq transcriptome analysis." *J Pain* 15(12): 1338-1359.
- Graham, B. A., A. M. Brichta and R. J. Callister (2004). "In vivo responses of mouse superficial dorsal horn neurones to both current injection and peripheral cutaneous stimulation." *J Physiol* 561(Pt 3): 749-763.
- Graham, B. A., A. M. Brichta and R. J. Callister (2007). "Pinch-current injection defines two discharge profiles in mouse superficial dorsal horn neurones, in vitro." *J Physiol* 578(Pt 3): 787-798.
- Graham, B. A., A. M. Brichta and R. J. Callister (2008). "Recording temperature affects the excitability of mouse superficial dorsal horn neurones, in vitro." *J Neurophysiol* 99(5): 2048-2059.
- Grauert, A., D. Engel and A. J. Ruiz (2014). "Endogenous zinc depresses GABAergic transmission via T-type Ca(2+) channels and broadens the time window for integration of glutamatergic inputs in dentate granule cells." *J Physiol* 592(1): 67-86.
- Gross, M. K., M. Dottori and M. Goulding (2002). "Lbx1 specifies somatosensory association interneurons in the dorsal spinal cord." *Neuron* 34(4): 535-549.
- Grubb, M. S. and J. Burrone (2010). "Activity-dependent relocation of the axon initial segment fine-tunes neuronal excitability." *Nature* 465(7301): 1070-1074.
- Grubb, M. S., Y. Shu, H. Kuba, M. N. Rasband, V. C. Wimmer and K. J. Bender (2011). "Short- and long-term plasticity at the axon initial segment." *J Neurosci* 31(45): 16049-16055.
- Grudt, T. J. and E. R. Perl (2002). "Correlations between neuronal morphology and electrophysiological features in the rodent superficial dorsal horn." *J Physiol* 540(Pt 1): 189-207.
- Gusel'nikova, V. V. and D. E. Korzhevskiy (2015). "NeuN As a Neuronal Nuclear Antigen and Neuron Differentiation Marker." *Acta Naturae* 7(2): 42-47.
- Gutierrez-Mecinas, M., M. Watanabe and A. J. Todd (2014). "Expression of gastrin-releasing peptide by excitatory interneurons in the mouse superficial dorsal horn." *Mol Pain* 10: 79.
- Gutierrez-Mecinas, M., T. Furuta, M. Watanabe and A. J. Todd (2016). "A quantitative study of neurochemically defined excitatory interneuron populations in laminae I-III of the mouse spinal cord." *Mol Pain* 12.
- Hachisuka, J., K. M. Baumbauer, Y. Omori, L. M. Snyder, H. R. Koerber and S. E. Ross (2016). "Semi-intact ex vivo approach to investigate spinal somatosensory circuits." *Elife* 5.
- Hagiwara, S. and K. I. Naka (1964). "The Initiation of Spike Potential in Barnacle Muscle Fibers under Low Intracellular Ca⁺⁺." *J Gen Physiol* 48: 141-162.
- Hagiwara, S., S. Ozawa and O. Sand (1975). "Voltage clamp analysis of two inward current mechanisms in the egg cell membrane of a starfish." *J Gen Physiol* 65(5): 617-644.

- Hamidi, G. A., M. H. Ramezani, M. N. Arani, S. A. Talaei, A. Mesdaghinia and H. R. Banafshe (2012). "Ethosuximide reduces allodynia and hyperalgesia and potentiates morphine effects in the chronic constriction injury model of neuropathic pain." *Eur J Pharmacol* 674(2-3): 260-264.
- Hansen, J. P., R. S. Chen, J. K. Larsen, P. J. Chu, D. M. Janes, K. E. Weis and P. M. Best (2004). "Calcium channel gamma6 subunits are unique modulators of low voltage-activated (Cav3.1) calcium current." *J Mol Cell Cardiol* 37(6): 1147-1158.
- Helms, A. W. and J. E. Johnson (2003). "Specification of dorsal spinal cord interneurons." *Curr Opin Neurobiol* 13(1): 42-49.
- Herbison, A. E., S. X. Simonian, P. J. Norris and P. C. Emson (1996). "Relationship of neuronal nitric oxide synthase immunoreactivity to GnRH neurons in the ovariectomized and intact female rat." *J Neuroendocrinol* 8(1): 73-82.
- Hering, J., A. Feltz and R. C. Lambert (2004). "Slow inactivation of the Ca(V)3.1 isotype of T-type calcium channels." *J Physiol* 555(Pt 2): 331-344.
- Herzog, R. W. (2017). "Complexity of immune responses to AAV transgene products - Example of factor IX." *Cell Immunol*.
- Hildebrand, M. E., P. Isope, T. Miyazaki, T. Nakaya, E. Garcia, A. Feltz, T. Schneider, J. Hescheler, M. Kano, K. Sakimura, M. Watanabe, S. Dieudonne and T. P. Snutch (2009). "Functional coupling between mGluR1 and Cav3.1 T-type calcium channels contributes to parallel fiber-induced fast calcium signaling within Purkinje cell dendritic spines." *J Neurosci* 29(31): 9668-9682.
- Hodgkin, A. L. and A. F. Huxley (1952). "A quantitative description of membrane current and its application to conduction and excitation in nerve." *J Physiol* 117(4): 500-544.
- Horch, K. W., R. P. Tuckett and P. R. Burgess (1977). "A key to the classification of cutaneous mechanoreceptors." *J Invest Dermatol* 69(1): 75-82.
- Hu, H. J., K. S. Glauner and R. W. t. Gereau (2003). "ERK integrates PKA and PKC signaling in superficial dorsal horn neurons. I. Modulation of A-type K⁺ currents." *J Neurophysiol* 90(3): 1671-1679.
- Hu, H. J., Y. Carrasquillo, F. Karim, W. E. Jung, J. M. Nerbonne, T. L. Schwarz and R. W. t. Gereau (2006). "The kv4.2 potassium channel subunit is required for pain plasticity." *Neuron* 50(1): 89-100.
- Huang, E. J., G. A. Wilkinson, I. Farinas, C. Backus, K. Zang, S. L. Wong and L. F. Reichardt (1999). "Expression of Trk receptors in the developing mouse trigeminal ganglion: in vivo evidence for NT-3 activation of TrkA and TrkB in addition to TrkC." *Development* 126(10): 2191-2203.
- Huang, Z., R. Lujan, I. Kadurin, V. N. Uebele, J. J. Renger, A. C. Dolphin and M. M. Shah (2011). "Presynaptic HCN1 channels regulate Cav3.2 activity and neurotransmission at select cortical synapses." *Nat Neurosci* 14(4): 478-486.
- Hughes, A. S., S. Averill, V. R. King, C. Molander and P. J. Shortland (2008). "Neurochemical characterization of neuronal populations expressing protein kinase C gamma isoform in the spinal cord and gracile nucleus of the rat." *Neuroscience* 153(2): 507-517.
- Hughes, D. I., D. T. Scott, A. J. Todd and J. S. Riddell (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): 9491-9499.
- Hughes, D. I., D. T. Scott, J. S. Riddell and A. J. Todd (2007). "Upregulation of substance P in low-threshold myelinated afferents is not required for tactile allodynia in the chronic constriction injury and spinal nerve ligation models." *J Neurosci* 27(8): 2035-2044.
- Hughes, D. I., K. A. Boyle, C. M. Kinnon, C. Bilsland, J. A. Quayle, R. J. Callister and B. A. Graham (2013). "HCN4 subunit expression in fast-spiking interneurons of the rat spinal cord and hippocampus." *Neuroscience* 237: 7-18.
- Hughes, D. I., S. Sikander, C. M. Kinnon, K. A. Boyle, M. Watanabe, R. J. Callister and B. A. Graham (2012). "Morphological, neurochemical and electrophysiological features of parvalbumin-expressing cells: a likely source of axo-axonic inputs in the mouse spinal dorsal horn." *J Physiol* 590(16): 3927-3951.
- Huguenard, J. R. and D. A. Prince (1992). "A novel T-type current underlies prolonged Ca(2+)-dependent burst firing in GABAergic neurons of rat thalamic reticular nucleus." *J Neurosci* 12(10): 3804-3817.

- Iftinca, M., B. E. McKay, T. P. Snutch, J. E. McRory, R. W. Turner and G. W. Zamponi (2006). "Temperature dependence of T-type calcium channel gating." *Neuroscience* 142(4): 1031-1042.
- Ikeda, H., B. Heinke, R. Ruscheweyh and J. Sandkuhler (2003). "Synaptic plasticity in spinal lamina I projection neurons that mediate hyperalgesia." *Science* 299(5610): 1237-1240.
- Ikeda, H., J. Stark, H. Fischer, M. Wagner, R. Drdla, T. Jager and J. Sandkuhler (2006). "Synaptic amplifier of inflammatory pain in the spinal dorsal horn." *Science* 312(5780): 1659-1662.
- Ikeda, H., M. Tsuda, K. Inoue and K. Murase (2007). "Long-term potentiation of neuronal excitation by neuron-glia interactions in the rat spinal dorsal horn." *Eur J Neurosci* 25(5): 1297-1306.
- Ingvar, M. (1999). "Pain and functional imaging." *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 354(1387): 1347-1358.
- Inquimbert, P., M. Moll, T. Kohno and J. Scholz (2013). "Stereotaxic injection of a viral vector for conditional gene manipulation in the mouse spinal cord." *J Vis Exp*(73): e50313.
- Irving, G. A., M. M. Backonja, E. Dunteman, E. R. Blonsky, G. F. Vanhove, S. P. Lu, J. Tobias and N.-C. S. Group (2011). "A multicenter, randomized, double-blind, controlled study of NGX-4010, a high-concentration capsaicin patch, for the treatment of postherpetic neuralgia." *Pain Med* 12(1): 99-109.
- Iwagaki, N., R. P. Ganley, A. C. Dickie, E. Polgar, D. I. Hughes, P. Del Rio, Y. Revina, M. Watanabe, A. J. Todd and J. S. Riddell (2016). "A combined electrophysiological and morphological study of neuropeptide Y-expressing inhibitory interneurons in the spinal dorsal horn of the mouse." *Pain* 157(3): 598-612.
- Jacus, M. O., V. N. Uebele, J. J. Renger and S. M. Todorovic (2012). "Presynaptic Ca(V)3.2 Channels Regulate Excitatory Neurotransmission in Nociceptive Dorsal Horn Neurons." *Journal of Neuroscience* 32(27): 9374-9382.
- Jagodic, M. M., S. Pathirathna, P. M. Joksovic, W. Lee, M. T. Nelson, A. K. Naik, P. Su, V. Jevtovic-Todorovic and S. M. Todorovic (2008). "Upregulation of the T-type calcium current in small rat sensory neurons after chronic constrictive injury of the sciatic nerve." *J Neurophysiol* 99(6): 3151-3156.
- Julius, D. and A. I. Basbaum (2001). "Molecular mechanisms of nociception." *Nature* 413(6852): 203-210.
- Jung, S., J. Aliberti, P. Graemmel, M. J. Sunshine, G. W. Kreutzberg, A. Sher and D. R. Littman (2000). "Analysis of fractalkine receptor CX(3)CR1 function by targeted deletion and green fluorescent protein reporter gene insertion." *Mol Cell Biol* 20(11): 4106-4114.
- Kaneko, M. and D. L. Hammond (1997). "Role of spinal gamma-aminobutyric acidA receptors in formalin-induced nociception in the rat." *J Pharmacol Exp Ther* 282(2): 928-938.
- Kardon, A. P., E. Polgar, J. Hachisuka, L. M. Snyder, D. Cameron, S. Savage, X. Cai, S. Karnup, C. R. Fan, G. M. Hemenway, C. S. Bernard, E. S. Schwartz, H. Nagase, C. Schwarzer, M. Watanabe, T. Furuta, T. Kaneko, H. R. Koerber, A. J. Todd and S. E. Ross (2014). "Dynorphin acts as a neuromodulator to inhibit itch in the dorsal horn of the spinal cord." *Neuron* 82(3): 573-586.
- Kato, G., Y. Kawasaki, K. Koga, D. Uta, M. Kosugi, T. Yasaka, M. Yoshimura, R. R. Ji and A. M. Strassman (2009). "Organization of intralaminar and translaminar neuronal connectivity in the superficial spinal dorsal horn." *J Neurosci* 29(16): 5088-5099.
- Kawai, F. and E. Miyachi (2001). "Enhancement by T-type Ca²⁺ currents of odor sensitivity in olfactory receptor cells." *J Neurosci* 21(10): RC144.
- Kessler, P. D., G. M. Podsakoff, X. Chen, S. A. McQuiston, P. C. Colosi, L. A. Matelis, G. J. Kurtzman and B. J. Byrne (1996). "Gene delivery to skeletal muscle results in sustained expression and systemic delivery of a therapeutic protein." *Proc Natl Acad Sci U S A* 93(24): 14082-14087.
- Kidd, B. L. and L. A. Urban (2001). "Mechanisms of inflammatory pain." *Br J Anaesth* 87(1): 3-11.
- Kim, D., I. Song, S. Keum, T. Lee, M. J. Jeong, S. S. Kim, M. W. McEnery and H. S. Shin (2001). "Lack of the burst firing of thalamocortical relay neurons and resistance to absence seizures in mice lacking alpha(1G) T-type Ca(2+) channels." *Neuron* 31(1): 35-45.
- Kim, S. H. and J. M. Chung (1992). "An experimental model for peripheral neuropathy produced by segmental spinal nerve ligation in the rat." *Pain* 50(3): 355-363.

- Knowlton, W. M., R. Palkar, E. K. Lippoldt, D. D. McCoy, F. Baluch, J. Chen and D. D. McKemy (2013). "A sensory-labeled line for cold: TRPM8-expressing sensory neurons define the cellular basis for cold, cold pain, and cooling-mediated analgesia." *J Neurosci* 33(7): 2837-2848.
- Kozlov, A. S., F. McKenna, J. H. Lee, L. L. Cribbs, E. Perez-Reyes, A. Feltz and R. C. Lambert (1999). "Distinct kinetics of cloned T-type Ca²⁺ channels lead to differential Ca²⁺ entry and frequency-dependence during mock action potentials." *Eur J Neurosci* 11(12): 4149-4158.
- Ku, W. H. and S. P. Schneider (2011). "Multiple T-type Ca²⁺ current subtypes in electrophysiologically characterized hamster dorsal horn neurons: possible role in spinal sensory integration." *Journal of Neurophysiology* 106(5): 2486-2498.
- Lai, H. C., R. P. Seal and J. E. Johnson (2016). "Making sense out of spinal cord somatosensory development." *Development* 143(19): 3434-3448.
- Lallemend, F. and P. Ernfors (2012). "Molecular interactions underlying the specification of sensory neurons." *Trends Neurosci* 35(6): 373-381.
- Lambert, R. C., F. McKenna, Y. Maulet, E. M. Talley, D. A. Bayliss, L. L. Cribbs, J. H. Lee, E. Perez-Reyes and A. Feltz (1998). "Low-voltage-activated Ca²⁺ currents are generated by members of the CavT subunit family (alpha1G/H) in rat primary sensory neurons." *J Neurosci* 18(21): 8605-8613.
- Latham, J. R., S. Pathirathna, M. M. Jagodic, W. J. Choe, M. E. Levin, M. T. Nelson, W. Y. Lee, K. Krishnan, D. F. Covey, S. M. Todorovic and V. Jevtovic-Todorovic (2009). "Selective T-type calcium channel blockade alleviates hyperalgesia in ob/ob mice." *Diabetes* 58(11): 2656-2665.
- Lee, H., T. Iida, A. Mizuno, M. Suzuki and M. J. Caterina (2005). "Altered thermal selection behavior in mice lacking transient receptor potential vanilloid 4." *J Neurosci* 25(5): 1304-1310.
- Lee, J. C., J. C. Callaway and R. C. Foehring (2005). "Effects of temperature on calcium transients and Ca²⁺-dependent afterhyperpolarizations in neocortical pyramidal neurons." *J Neurophysiol* 93(4): 2012-2020.
- Lee, J. H., J. C. Gomora, L. L. Cribbs and E. Perez-Reyes (1999). "Nickel block of three cloned T-type calcium channels: low concentrations selectively block alpha1H." *Biophys J* 77(6): 3034-3042.
- Lee, J., D. Kim and H. S. Shin (2004). "Lack of delta waves and sleep disturbances during non-rapid eye movement sleep in mice lacking alpha1G-subunit of T-type calcium channels." *Proc Natl Acad Sci U S A* 101(52): 18195-18199.
- Lee, M. J., T. J. Shin, J. E. Lee, H. Choo, H. Y. Koh, H. J. Chung, A. N. Pae, S. C. Lee and H. J. Kim (2010). "KST5468, a new T-type calcium channel antagonist, has an antinociceptive effect on inflammatory and neuropathic pain models." *Pharmacol Biochem Behav* 97(2): 198-204.
- Lee, Y. C., N. J. Nassikas and D. J. Clauw (2011). "The role of the central nervous system in the generation and maintenance of chronic pain in rheumatoid arthritis, osteoarthritis and fibromyalgia." *Arthritis Res Ther* 13(2): 211.
- Leitner, J., S. Westerholz, B. Heinke, L. Forsthuber, G. Wunderbaldinger, T. Jager, D. Gruber-Schoffnegger, K. Braun and J. Sandkuhler (2013). "Impaired excitatory drive to spinal GABAergic neurons of neuropathic mice." *PLoS One* 8(8): e73370.
- Li, L., M. Rutlin, V. E. Abraira, C. Cassidy, L. Kus, S. Gong, M. P. Jankowski, W. Luo, N. Heintz, H. R. Koerber, C. J. Woodbury and D. D. Ginty (2011). "The functional organization of cutaneous low-threshold mechanosensory neurons." *Cell* 147(7): 1615-1627.
- Liao, Y. F., M. L. Tsai, C. C. Chen and C. T. Yen (2011). "Involvement of the Cav3.2 T-type calcium channel in thalamic neuron discharge profiles." *Mol Pain* 7: 43.
- Liu, X. G., C. R. Morton, J. J. Azkue, M. Zimmermann and J. Sandkuhler (1998). "Long-term depression of C-fibre-evoked spinal field potentials by stimulation of primary afferent A delta-fibres in the adult rat." *Eur J Neurosci* 10(10): 3069-3075.
- Lopez-Garcia, J. A. and A. E. King (1994). "Membrane properties of physiologically classified rat dorsal horn neurons in vitro: correlation with cutaneous sensory afferent input." *Eur J Neurosci* 6(6): 998-1007.
- Lu, Y. and E. R. Perl (2003). "A specific inhibitory pathway between substantia gelatinosa neurons receiving direct C-fiber input." *J Neurosci* 23(25): 8752-8758.
- Lu, Y. and E. R. Perl (2005). "Modular organization of excitatory circuits between neurons of the spinal superficial dorsal horn (laminae I and II)." *J Neurosci* 25(15): 3900-3907.

- Lu, Y. and E. R. Perl (2007). "Selective action of noradrenaline and serotonin on neurones of the spinal superficial dorsal horn in the rat." *J Physiol* 582(Pt 1): 127-136.
- Lu, Y., H. Dong, Y. Gao, Y. Gong, Y. Ren, N. Gu, S. Zhou, N. Xia, Y. Y. Sun, R. R. Ji and L. Xiong (2013). "A feed-forward spinal cord glycinergic neural circuit gates mechanical allodynia." *J Clin Invest* 123(9): 4050-4062.
- Luo, C., T. Kuner and R. Kuner (2014). "Synaptic plasticity in pathological pain." *Trends Neurosci* 37(6): 343-355.
- Ly, R., G. Bouvier, G. Szapiro, H. M. Prosser, A. D. Randall, M. Kano, K. Sakimura, P. Isope, B. Barbour and A. Feltz (2016). "Contribution of postsynaptic T-type calcium channels to parallel fibre-Purkinje cell synaptic responses." *J Physiol* 594(4): 915-936.
- Malfait, A. M. and T. J. Schnitzer (2013). "Towards a mechanism-based approach to pain management in osteoarthritis." *Nat Rev Rheumatol* 9(11): 654-664.
- Malmberg, A. B., C. Chen, S. Tonegawa and A. I. Basbaum (1997). "Preserved acute pain and reduced neuropathic pain in mice lacking PKC γ ." *Science* 278(5336): 279-283.
- Mannion, R. J., T. P. Doubell, R. E. Coggeshall and C. J. Woolf (1996). "Collateral sprouting of uninjured primary afferent A-fibers into the superficial dorsal horn of the adult rat spinal cord after topical capsaicin treatment to the sciatic nerve." *J Neurosci* 16(16): 5189-5195.
- Mao, J. (2012). "Current challenges in translational pain research." *Trends Pharmacol Sci* 33(11): 568-573.
- Marchand, J. E., W. H. Wurm, T. Kato and R. M. Kream (1994). "Altered tachykinin expression by dorsal root ganglion neurons in a rat model of neuropathic pain." *Pain* 58(2): 219-231.
- Marger, F., A. Gelot, A. Alloui, J. Matricon, J. F. Ferrer, C. Barrere, A. Pizzoccaro, E. Muller, J. Nargeot, T. P. Snutch, A. Eschalier, E. Bourinet and D. Ardid (2011). "T-type calcium channels contribute to colonic hypersensitivity in a rat model of irritable bowel syndrome." *Proc Natl Acad Sci U S A* 108(27): 11268-11273.
- Marra, S., R. Ferru-Clement, V. Breuil, A. Delaunay, M. Christin, V. Friend, S. Seville, C. Cognard, T. Ferreira, C. Roux, L. Euller-Ziegler, J. Noel, E. Lingueglia and E. Deval (2016). "Non-acidic activation of pain-related Acid-Sensing Ion Channel 3 by lipids." *EMBO J* 35(4): 414-428.
- Martin, W. J., Y. Cao and A. I. Basbaum (2004). "Characterization of wide dynamic range neurons in the deep dorsal horn of the spinal cord in preprotachykinin-a null mice in vivo." *J Neurophysiol* 91(5): 1945-1954.
- Matschke, L. A., M. Bertoune, J. Roeper, T. P. Snutch, W. H. Oertel, S. Rinne and N. Decher (2015). "A concerted action of L- and T-type Ca²⁺ channels regulates locus coeruleus pacemaking." *Mol Cell Neurosci* 68: 293-302.
- McCarthy, M. (2006). "Allen Brain Atlas maps 21,000 genes of the mouse brain." *Lancet Neurol* 5(11): 907-908.
- McCobb, D. P. and K. G. Beam (1991). "Action potential waveform voltage-clamp commands reveal striking differences in calcium entry via low and high voltage-activated calcium channels." *Neuron* 7(1): 119-127.
- Melnick, I. V., S. F. Santos and B. V. Safronov (2004). "Mechanism of spike frequency adaptation in substantia gelatinosa neurones of rat." *J Physiol* 559(Pt 2): 383-395.
- Melnick, I. V., S. F. Santos, K. Szokol, P. Szucs and B. V. Safronov (2004). "Ionic basis of tonic firing in spinal substantia gelatinosa neurones of rat." *J Neurophysiol* 91(2): 646-655.
- Melzack, R. and P. D. Wall (1965). "Pain mechanisms: a new theory." *Science* 150(3699): 971-979.
- Mesnage, B., S. Gaillard, A. G. Godin, J. L. Rodeau, M. Hammer, J. Von Engelhardt, P. W. Wiseman, Y. De Koninck, R. Schlichter and M. Cordero-Erausquin (2011). "Morphological and functional characterization of cholinergic interneurons in the dorsal horn of the mouse spinal cord." *J Comp Neurol* 519(16): 3139-3158.
- Messinger, R. B., A. K. Naik, M. M. Jagodic, M. T. Nelson, W. Y. Lee, W. J. Choe, P. Orestes, J. R. Latham, S. M. Todorovic and V. Jevtovic-Todorovic (2009). "In vivo silencing of the Ca_v3.2 T-type calcium channels in sensory neurons alleviates hyperalgesia in rats with streptozocin-induced diabetic neuropathy." *Pain* 145(1-2): 184-195.
- Millan, M. J. (2002). "Descending control of pain." *Prog Neurobiol* 66(6): 355-474.

- Milligan, C. J., I. J. Edwards and J. Deuchars (2006). "HCN1 ion channel immunoreactivity in spinal cord and medulla oblongata." *Brain Res* 1081(1): 79-91.
- Milligan, E. D., V. Zapata, M. Chacur, D. Schoeniger, J. Biedenkapp, K. A. O'Connor, G. M. Verge, G. Chapman, P. Green, A. C. Foster, G. S. Naeve, S. F. Maier and L. R. Watkins (2004). "Evidence that exogenous and endogenous fractalkine can induce spinal nociceptive facilitation in rats." *Eur J Neurosci* 20(9): 2294-2302.
- Miraucourt, L. S., R. Dallel and D. L. Voisin (2007). "Glycine inhibitory dysfunction turns touch into pain through PKCgamma interneurons." *PLoS One* 2(11): e1116.
- Mishra, S. K., S. M. Tisel, P. Orestes, S. K. Bhangoo and M. A. Hoon (2011). "TRPV1-lineage neurons are required for thermal sensation." *EMBO J* 30(3): 582-593.
- Mogil, J. S. (2009). "Animal models of pain: progress and challenges." *Nat Rev Neurosci* 10(4): 283-294.
- Molineux, M. L., J. E. McRory, B. E. McKay, J. Hamid, W. H. Mehaffey, R. Rehak, T. P. Snutch, G. W. Zamponi and R. W. Turner (2006). "Specific T-type calcium channel isoforms are associated with distinct burst phenotypes in deep cerebellar nuclear neurons." *Proc Natl Acad Sci U S A* 103(14): 5555-5560.
- Molony, V. and J. E. Kent (1997). "Assessment of acute pain in farm animals using behavioral and physiological measurements." *J Anim Sci* 75(1): 266-272.
- Moore, A., P. Wiffen and E. Kalso (2014). "Antiepileptic drugs for neuropathic pain and fibromyalgia." *JAMA* 312(2): 182-183.
- Moore, K. A., T. Kohno, L. A. Karchewski, J. Scholz, H. Baba and C. J. Woolf (2002). "Partial peripheral nerve injury promotes a selective loss of GABAergic inhibition in the superficial dorsal horn of the spinal cord." *J Neurosci* 22(15): 6724-6731.
- Moqrich, A., S. W. Hwang, T. J. Earley, M. J. Petrus, A. N. Murray, K. S. Spencer, M. Andahazy, G. M. Story and A. Patapoutian (2005). "Impaired thermosensation in mice lacking TRPV3, a heat and camphor sensor in the skin." *Science* 307(5714): 1468-1472.
- Morgenstern, P. F., R. Marongiu, S. A. Musatov and M. G. Kaplitt (2011). "Adeno-associated viral gene delivery in neurodegenerative disease." *Methods Mol Biol* 793: 443-455.
- Muller, T., K. Anlag, H. Wildner, S. Britsch, M. Treier and C. Birchmeier (2005). "The bHLH factor Olig3 coordinates the specification of dorsal neurons in the spinal cord." *Genes Dev* 19(6): 733-743.
- Narahashi, T., J. W. Moore and W. R. Scott (1964). "Tetrodotoxin Blockage of Sodium Conductance Increase in Lobster Giant Axons." *J Gen Physiol* 47: 965-974.
- Nelson, M. T., P. M. Joksovic, E. Perez-Reyes and S. M. Todorovic (2005). "The endogenous redox agent L-cysteine induces T-type Ca²⁺ channel-dependent sensitization of a novel subpopulation of rat peripheral nociceptors." *J Neurosci* 25(38): 8766-8775.
- Nelson, M. T., P. M. Joksovic, P. Su, H. W. Kang, A. Van Deusen, J. P. Baumgart, L. S. David, T. P. Snutch, P. Q. Barrett, J. H. Lee, C. F. Zorumski, E. Perez-Reyes and S. M. Todorovic (2007). "Molecular mechanisms of subtype-specific inhibition of neuronal T-type calcium channels by acide ascorbique." *J Neurosci* 27(46): 12577-12583.
- Noguchi, K., R. Dubner, M. De Leon, E. Senba and M. A. Ruda (1994). "Axotomy induces preprotachykinin gene expression in a subpopulation of dorsal root ganglion neurons." *J Neurosci Res* 37(5): 596-603.
- Nurmikko, T. J., M. G. Serpell, B. Hoggart, P. J. Toomey, B. J. Morlion and D. Haines (2007). "Sativex successfully treats neuropathic pain characterised by allodynia: a randomised, double-blind, placebo-controlled clinical trial." *Pain* 133(1-3): 210-220.
- Okubo, K., M. Matsumura, Y. Kawaishi, Y. Aoki, M. Matsunami, Y. Okawa, F. Sekiguchi and A. Kawabata (2012). "Hydrogen sulfide-induced mechanical hyperalgesia and allodynia require activation of both Cav3.2 and TRPA1 channels in mice." *Br J Pharmacol* 166(5): 1738-1743.
- Ossipov, M. H., K. Morimura and F. Porreca (2014). "Descending pain modulation and chronification of pain." *Curr Opin Support Palliat Care* 8(2): 143-151.
- Oswald, A. M., B. Doiron and L. Maler (2007). "Interval coding. I. Burst interspike intervals as indicators of stimulus intensity." *J Neurophysiol* 97(4): 2731-2743.
- Pan, Z. H., H. J. Hu, P. Perring and R. Andrade (2001). "T-type Ca(2+) channels mediate neurotransmitter release in retinal bipolar cells." *Neuron* 32(1): 89-98.

- Park, J. Y., H. W. Kang, H. J. Moon, S. U. Huh, S. W. Jeong, N. M. Soldatov and J. H. Lee (2006). "Activation of protein kinase C augments T-type Ca²⁺ channel activity without changing channel surface density." *J Physiol* 577(Pt 2): 513-523.
- Peirs, C. and R. P. Seal (2016). "Neural circuits for pain: Recent advances and current views." *Science* 354(6312): 578-584.
- Peirs, C., S. P. Williams, X. Zhao, C. E. Walsh, J. Y. Gedeon, N. E. Cagle, A. C. Goldring, H. Hioki, Z. Liu, P. S. Marell and R. P. Seal (2015). "Dorsal Horn Circuits for Persistent Mechanical Pain." *Neuron* 87(4): 797-812.
- Peirs, C., S. Patil, R. Bouali-Benazzouz, A. Artola, M. Landry and R. Dallel (2014). "Protein kinase C gamma interneurons in the rat medullary dorsal horn: distribution and synaptic inputs to these neurons, and subcellular localization of the enzyme." *J Comp Neurol* 522(2): 393-413.
- Perez-Reyes, E. (2003). "Molecular physiology of low-voltage-activated t-type calcium channels." *Physiol Rev* 83(1): 117-161.
- Perez-Reyes, E., L. L. Cribbs, A. Daud, A. E. Lacerda, J. Barclay, M. P. Williamson, M. Fox, M. Rees and J. H. Lee (1998). "Molecular characterization of a neuronal low-voltage-activated T-type calcium channel." *Nature* 391(6670): 896-900.
- Perl, E. R. (1998). "Getting a line on pain: is it mediated by dedicated pathways?" *Nat Neurosci* 1(3): 177-178.
- Perl, E. R. (2007). "Ideas about pain, a historical view." *Nat Rev Neurosci* 8(1): 71-80.
- Petitjean, H., S. A. Pawlowski, S. L. Fraine, B. Sharif, D. Hamad, T. Fatima, J. Berg, C. M. Brown, L. Y. Jan, A. Ribeiro-da-Silva, J. M. Braz, A. I. Basbaum and R. Sharif-Naeini (2015). "Dorsal Horn Parvalbumin Neurons Are Gate-Keepers of Touch-Evoked Pain after Nerve Injury." *Cell Rep* 13(6): 1246-1257.
- Petitjean, H., S. Hugel, F. Barthas, Y. Bohren, M. Barrot, I. Yalcin and R. Schlichter (2014). "Activation of transient receptor potential vanilloid 2-expressing primary afferents stimulates synaptic transmission in the deep dorsal horn of the rat spinal cord and elicits mechanical hyperalgesia." *Eur J Neurosci* 40(8): 3189-3201.
- Pigeat, R., P. Chausson, F. M. Dreyfus, N. Leresche and R. C. Lambert (2015). "Sleep Slow Wave-Related Homo and Heterosynaptic LTD of Intrathalamic GABA(A)ergic Synapses: Involvement of T-Type Ca²⁺ Channels and Metabotropic Glutamate Receptors." *Journal of Neuroscience* 35(1): 64-73.
- Ploner, M., J. Gross, L. Timmermann and A. Schnitzler (2002). "Cortical representation of first and second pain sensation in humans." *Proc Natl Acad Sci U S A* 99(19): 12444-12448.
- Polgar, E. and A. J. Todd (2008). "Tactile allodynia can occur in the spared nerve injury model in the rat without selective loss of GABA or GABA(A) receptors from synapses in laminae I-II of the ipsilateral spinal dorsal horn." *Neuroscience* 156(1): 193-202.
- Polgar, E., C. Durrieux, D. I. Hughes and A. J. Todd (2013). "A quantitative study of inhibitory interneurons in laminae I-III of the mouse spinal dorsal horn." *PLoS One* 8(10): e78309.
- Polgar, E., D. I. Hughes, A. Z. Arham and A. J. 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): 6658-6666.
- Polgar, E., K. M. Al-Khater, S. Shehab, M. Watanabe and A. J. Todd (2008). "Large projection neurons in lamina I of the rat spinal cord that lack the neurokinin 1 receptor are densely innervated by VGLUT2-containing axons and possess GluR4-containing AMPA receptors." *J Neurosci* 28(49): 13150-13160.
- Polgar, E., S. A. Shehab, C. Watt and A. J. Todd (1999). "GABAergic neurons that contain neuropeptide Y selectively target cells with the neurokinin 1 receptor in laminae III and IV of the rat spinal cord." *J Neurosci* 19(7): 2637-2646.
- Polgar, E., T. C. Sardella, M. Watanabe and A. J. Todd (2011). "Quantitative study of NPY-expressing GABAergic neurons and axons in rat spinal dorsal horn." *J Comp Neurol* 519(6): 1007-1023.
- Polgar, E., T. C. Sardella, S. Y. Tiong, S. Locke, M. Watanabe and A. J. Todd (2013). "Functional differences between neurochemically defined populations of inhibitory interneurons in the rat spinal dorsal horn." *Pain* 154(12): 2606-2615.

- Prescott, S. A. and S. Ratte (2012). "Pain processing by spinal microcircuits: afferent combinatorics." Curr Opin Neurobiol 22(4): 631-639.
- Prescott, S. A. and Y. De Koninck (2005). "Integration time in a subset of spinal lamina I neurons is lengthened by sodium and calcium currents acting synergistically to prolong subthreshold depolarization." J Neurosci 25(19): 4743-4754.
- Prescott, S. A., Y. De Koninck and T. J. Sejnowski (2008). "Biophysical basis for three distinct dynamical mechanisms of action potential initiation." PLoS Comput Biol 4(10): e1000198.
- Price, D. D., R. Dubner and J. W. Hu (1976). "Trigeminothalamic neurons in nucleus caudalis responsive to tactile, thermal, and nociceptive stimulation of monkey's face." J Neurophysiol 39(5): 936-953.
- Price, D. D., R. Staud, M. E. Robinson, A. P. Mauderli, R. Cannon and C. J. Vierck (2002). "M." Pain 99(1-2): 49-59.
- Puskar, Z., E. Polgar and A. J. Todd (2001). "A population of large lamina I projection neurons with selective inhibitory input in rat spinal cord." Neuroscience 102(1): 167-176.
- Qiu, J., M. A. Bosch, K. Jamali, C. Xue, M. J. Kelly and O. K. Ronnekleiv (2006). "Estrogen upregulates T-type calcium channels in the hypothalamus and pituitary." J Neurosci 26(43): 11072-11082.
- Ramon y Cajal, S. (1909). "Histologie du Système Nerveux de l'Homme et des Vertébrés", vol. 1 Paris : Maloine.
- Randall, A. D. and R. W. Tsien (1997). "Contrasting biophysical and pharmacological properties of T-type and R-type calcium channels." Neuropharmacology 36(7): 879-893.
- Ratte, S., S. Hong, E. De Schutter and S. A. Prescott (2013). "Impact of neuronal properties on network coding: roles of spike initiation dynamics and robust synchrony transfer." Neuron 78(5): 758-772.
- Rexed, B. (1952). "The cytoarchitectonic organization of the spinal cord in the cat." J Comp Neurol 96(3): 414-495.
- Reynders, A., A. Mantilleri, P. Malapert, S. Rialle, S. Nidelet, S. Laffray, C. Beurrier, E. Bourinet and A. Moqrich (2015). "Transcriptional Profiling of Cutaneous MRGPRD Free Nerve Endings and C-LTMRs." Cell Rep.
- Ribeiro-da-Silva, A. and A. Coimbra (1982). "Two types of synaptic glomeruli and their distribution in laminae I-III of the rat spinal cord." J Comp Neurol 209(2): 176-186.
- Richter, F., G. Natura, S. Loser, K. Schmidt, H. Viisanen and H. G. Schaible (2010). "Tumor necrosis factor causes persistent sensitization of joint nociceptors to mechanical stimuli in rats." Arthritis Rheum 62(12): 3806-3814.
- Rivera-Arconada, I. and J. A. Lopez-Garcia (2010). "Changes in membrane excitability and potassium currents in sensitized dorsal horn neurons of mice pups." J Neurosci 30(15): 5376-5383.
- Rivera-Arconada, I. and J. A. Lopez-Garcia (2015). "Characterisation of rebound depolarisation in mice deep dorsal horn neurons in vitro." Pflugers Archiv-European Journal of Physiology 467(9): 1985-1996.
- Ross, S. E., A. R. Mardinly, A. E. McCord, J. Zurawski, S. Cohen, C. Jung, L. Hu, S. I. Mok, A. Shah, E. M. Savner, C. Tolia, R. Corfas, S. Chen, P. Inquimbert, Y. Xu, R. R. McInnes, F. L. Rice, G. Corfas, Q. Ma, C. J. Woolf and M. E. Greenberg (2010). "Loss of inhibitory interneurons in the dorsal spinal cord and elevated itch in Bhlhb5 mutant mice." Neuron 65(6): 886-898.
- Rozanski, G. M., A. R. Nath, M. E. Adams and E. F. Stanley (2013). "Low voltage-activated calcium channels gate transmitter release at the dorsal root ganglion sandwich synapse." Journal of Physiology-London 591(22): 5575-5583.
- Ruscheweyh, R. and J. Sandkuhler (2002). "Lamina-specific membrane and discharge properties of rat spinal dorsal horn neurones in vitro." J Physiol 541(Pt 1): 231-244.
- Safronov, B. V., M. Wolff and W. Vogel (1997). "Functional distribution of three types of Na⁺ channel on soma and processes of dorsal horn neurones of rat spinal cord." J Physiol 503 (Pt 2): 371-385.
- Sanchez-Alonso, J. L., J. V. Halliwell and A. Colino (2008). "ZD 7288 inhibits T-type calcium current in rat hippocampal pyramidal cells." Neurosci Lett 439(3): 275-280.
- Sandkuhler, J. (2009). "Models and mechanisms of hyperalgesia and allodynia." Physiol Rev 89(2): 707-758.

- Sardella, T. C., E. Polgar, F. Garzillo, T. Furuta, T. Kaneko, M. Watanabe and A. J. Todd (2011). "Dynorphin is expressed primarily by GABAergic neurons that contain galanin in the rat dorsal horn." *Mol Pain* 7: 76.
- Sardella, T. C., E. Polgar, M. Watanabe and A. J. Todd (2011). "A quantitative study of neuronal nitric oxide synthase expression in laminae I-III of the rat spinal dorsal horn." *Neuroscience* 192: 708-720.
- Schneider, S. P. (2003). "Spike frequency adaptation and signaling properties of identified neurons in rodent deep spinal dorsal horn." *J Neurophysiol* 90(1): 245-258.
- Schneider, S. P. (2005). "Mechanosensory afferent input and neuronal firing properties in rodent spinal laminae III-V: re-examination of relationships with analysis of responses to static and time-varying stimuli." *Brain Res* 1034(1-2): 71-89.
- Schoffnegger, D., B. Heinke, C. Sommer and J. Sandkuhler (2006). "Physiological properties of spinal lamina II GABAergic neurons in mice following peripheral nerve injury." *J Physiol* 577(Pt 3): 869-878.
- Scholz, J. and C. J. Woolf (2002). "Can we conquer pain?" *Nat Neurosci* 5 Suppl: 1062-1067.
- Sdrulla, A. D., Q. Xu, S. Q. He, V. Tiwari, F. Yang, C. Zhang, B. Shu, R. Shechter, S. N. Raja, Y. Wang, X. Dong and Y. Guan (2015). "Electrical stimulation of low-threshold afferent fibers induces a prolonged synaptic depression in lamina II dorsal horn neurons to high-threshold afferent inputs in mice." *Pain* 156(6): 1008-1017.
- Seal, R. P., X. Wang, Y. Guan, S. N. Raja, C. J. Woodbury, A. I. Basbaum and R. H. Edwards (2009). "Injury-induced mechanical hypersensitivity requires C-low threshold mechanoreceptors." *Nature* 462(7273): 651-655.
- Senatore, A. and J. D. Spafford (2012). "Gene transcription and splicing of T-type channels are evolutionarily-conserved strategies for regulating channel expression and gating." *PLoS One* 7(6): e37409.
- Seybold, V. S., J. L. Hylden and G. L. Wilcox (1982). "Intrathecal substance P and somatostatin in rats: behaviors indicative of sensation." *Peptides* 3(1): 49-54.
- Shen, F. Y., Z. Y. Chen, W. Zhong, L. Q. Ma, C. Chen, Z. J. Yang, W. L. Xie and Y. W. Wang (2015). "Alleviation of neuropathic pain by regulating T-type calcium channels in rat anterior cingulate cortex." *Mol Pain* 11: 7.
- Shields, S. D., W. A. Eckert, 3rd and A. I. Basbaum (2003). "Spared nerve injury model of neuropathic pain in the mouse: a behavioral and anatomic analysis." *J Pain* 4(8): 465-470.
- Shu, X. and L. M. Mendell (1999). "Nerve growth factor acutely sensitizes the response of adult rat sensory neurons to capsaicin." *Neurosci Lett* 274(3): 159-162.
- Smith, A. K., C. L. O'Hara and C. L. Stucky (2013). "Mechanical sensitization of cutaneous sensory fibers in the spared nerve injury mouse model." *Mol Pain* 9: 61.
- Smith, E. S. and G. R. Lewin (2009). "Nociceptors: a phylogenetic view." *J Comp Physiol A Neuroethol Sens Neural Behav Physiol* 195(12): 1089-1106.
- Smith, K. M., K. A. Boyle, J. F. Madden, S. A. Dickinson, P. Jobling, R. J. Callister, D. I. Hughes and B. A. Graham (2015). "Functional heterogeneity of calretinin-expressing neurons in the mouse superficial dorsal horn: implications for spinal pain processing." *J Physiol* 593(19): 4319-4339.
- Solorzano, C., D. Villafuerte, K. Meda, F. Cevikbas, J. Braz, R. Sharif-Naeini, D. Juarez-Salinas, I. J. Llewellyn-Smith, Z. Guan and A. I. Basbaum (2015). "Primary afferent and spinal cord expression of gastrin-releasing peptide: message, protein, and antibody concerns." *J Neurosci* 35(2): 648-657.
- Soril, L. J., L. M. Ramer, L. T. McPhail, T. K. Kaan and M. S. Ramer (2008). "Spinal brain-derived neurotrophic factor governs neuroplasticity and recovery from cold-hypersensitivity following dorsal rhizotomy." *Pain* 138(1): 98-110.
- Strauss, K. I., J. Kuznicki, L. Winsky, J. I. Kawagoe, M. Hammer and D. M. Jacobowitz (1997). "The mouse calretinin gene promoter region: structural and functional components." *Brain Res Mol Brain Res* 49(1-2): 175-187.
- Sun, Y. G. and Z. F. Chen (2007). "A gastrin-releasing peptide receptor mediates the itch sensation in the spinal cord." *Nature* 448(7154): 700-703.
- Suzuki, S. and M. A. Rogawski (1989). "T-type calcium channels mediate the transition between tonic and phasic firing in thalamic neurons." *Proc Natl Acad Sci U S A* 86(18): 7228-7232.

- Tadros, M. A., B. M. Harris, W. B. Anderson, A. M. Brichta, B. A. Graham and R. J. Callister (2012). "Are all spinal segments equal: intrinsic membrane properties of superficial dorsal horn neurons in the developing and mature mouse spinal cord." *J Physiol* 590(10): 2409-2425.
- Takahashi, T., Y. Aoki, K. Okubo, Y. Maeda, F. Sekiguchi, K. Mitani, H. Nishikawa and A. Kawabata (2010). "Upregulation of Ca(v)3.2 T-type calcium channels targeted by endogenous hydrogen sulfide contributes to maintenance of neuropathic pain." *Pain* 150(1): 183-191.
- Tal, M. and E. Eliav (1996). "Abnormal discharge originates at the site of nerve injury in experimental constriction neuropathy (CCI) in the rat." *Pain* 64(3): 511-518.
- Talley, E. M., L. L. Cribbs, J. H. Lee, A. Daud, E. Perez-Reyes and D. A. Bayliss (1999). "Differential distribution of three members of a gene family encoding low voltage-activated (T-type) calcium channels." *J Neurosci* 19(6): 1895-1911.
- Tandrup, T. (1995). "Are the neurons in the dorsal root ganglion pseudounipolar? A comparison of the number of neurons and number of myelinated and unmyelinated fibres in the dorsal root." *J Comp Neurol* 357(3): 341-347.
- Taylor, B. K. (2009). "Spinal inhibitory neurotransmission in neuropathic pain." *Curr Pain Headache Rep* 13(3): 208-214.
- Thomas Cheng, H. (2010). "Spinal cord mechanisms of chronic pain and clinical implications." *Curr Pain Headache Rep* 14(3): 213-220.
- Tiong, S. Y., E. Polgar, J. C. van Kralingen, M. Watanabe and A. J. Todd (2011). "Galanin-immunoreactivity identifies a distinct population of inhibitory interneurons in laminae I-III of the rat spinal cord." *Mol Pain* 7: 36.
- Todd, A. J. (2010). "Neuronal circuitry for pain processing in the dorsal horn." *Nat Rev Neurosci* 11(12): 823-836.
- Todd, A. J. (2017). "Identifying functional populations among the interneurons in laminae I-III of the spinal dorsal horn." *Mol Pain* 13: 1744806917693003.
- Todd, A. J. and A. C. Sullivan (1990). "Light microscope study of the coexistence of GABA-like and glycine-like immunoreactivities in the spinal cord of the rat." *J Comp Neurol* 296(3): 496-505.
- Todd, A. J., Z. Puskar, R. C. Spike, C. Hughes, C. Watt and L. Forrest (2002). "Projection neurons in lamina I of rat spinal cord with the neurokinin 1 receptor are selectively innervated by substance p-containing afferents and respond to noxious stimulation." *J Neurosci* 22(10): 4103-4113.
- Todorovic, S. M. and V. Jevtovic-Todorovic (2014). "Targeting of CaV3.2 T-type calcium channels in peripheral sensory neurons for the treatment of painful diabetic neuropathy." *Pflugers Arch* 466(4): 701-706.
- Todorovic, S. M., A. Meyenburg and V. Jevtovic-Todorovic (2002). "Mechanical and thermal antinociception in rats following systemic administration of mibefradil, a T-type calcium channel blocker." *Brain Res* 951(2): 336-340.
- Todorovic, S. M., V. Jevtovic-Todorovic, A. Meyenburg, S. Mennerick, E. Perez-Reyes, C. Romano, J. W. Olney and C. F. Zorumski (2001). "Redox modulation of T-type calcium channels in rat peripheral nociceptors." *Neuron* 31(1): 75-85.
- Torrance, N., B. H. Smith, M. I. Bennett and A. J. Lee (2006). "The epidemiology of chronic pain of predominantly neuropathic origin. Results from a general population survey." *J Pain* 7(4): 281-289.
- Torsney, C. and A. B. MacDermott (2006). "Disinhibition opens the gate to pathological pain signaling in superficial neurokinin 1 receptor-expressing neurons in rat spinal cord." *J Neurosci* 26(6): 1833-1843.
- Traboulsie, A., J. Chemin, M. Chevalier, J. F. Quignard, J. Nargeot and P. Lory (2007). "Subunit-specific modulation of T-type calcium channels by zinc." *J Physiol* 578(Pt 1): 159-171.
- Tringham, E., K. L. Powell, S. M. Cain, K. Kuplast, J. Mezeyova, M. Weerapura, C. Eduljee, X. Jiang, P. Smith, J. L. Morrison, N. C. Jones, E. Braine, G. Rind, M. Fee-Maki, D. Parker, H. Pajouhesh, M. Parmar, T. J. O'Brien and T. P. Snutch (2012). "T-type calcium channel blockers that attenuate thalamic burst firing and suppress absence seizures." *Sci Transl Med* 4(121): 121ra119.
- Tsuda, M. (2017). "Modulation of Pain and Itch by Spinal Glia." *Neurosci Bull*.
- Usoskin, D., A. Furlan, S. Islam, H. Abdo, P. Lonnerberg, D. Lou, J. Hjerling-Leffler, J. Haeggstrom, O. Kharchenko, P. V. Kharchenko, S. Linnarsson and P. Ernfors (2015). "Unbiased classification of sensory neuron types by large-scale single-cell RNA sequencing." *Nat Neurosci* 18(1): 145-153.

- Valet, M., T. Sprenger, H. Boecker, F. Willoch, E. Rummeny, B. Conrad, P. Erhard and T. R. Tolle (2004). "Distraction modulates connectivity of the cingulo-frontal cortex and the midbrain during pain--an fMRI analysis." *Pain* 109(3): 399-408.
- van Hecke, O., N. Torrance and B. H. Smith (2013). "Chronic pain epidemiology - where do lifestyle factors fit in?" *Br J Pain* 7(4): 209-217.
- Vilceanu, D. and C. L. Stucky (2010). "TRPA1 mediates mechanical currents in the plasma membrane of mouse sensory neurons." *PLoS One* 5(8): e12177.
- Vitko, I., I. Bidaud, J. M. Arias, A. Mezghrani, P. Lory and E. Perez-Reyes (2007). "The I-II loop controls plasma membrane expression and gating of Ca(v)3.2 T-type Ca²⁺ channels: a paradigm for childhood absence epilepsy mutations." *J Neurosci* 27(2): 322-330.
- Wall, P. D. and M. Gutnick (1974). "Ongoing activity in peripheral nerves: the physiology and pharmacology of impulses originating from a neuroma." *Exp Neurol* 43(3): 580-593.
- Wang, H. and M. J. Zylka (2009). "Mrgprd-expressing polymodal nociceptive neurons innervate most known classes of substantia gelatinosa neurons." *J Neurosci* 29(42): 13202-13209.
- Ward, L., E. Wright and S. B. McMahon (1996). "A comparison of the effects of noxious and innocuous counterstimuli on experimentally induced itch and pain." *Pain* 64(1): 129-138.
- Weiss, N., S. A. Black, C. Bladen, L. Chen and G. W. Zamponi (2013). "Surface expression and function of Cav3.2 T-type calcium channels are controlled by asparagine-linked glycosylation." *Pflugers Arch* 465(8): 1159-1170.
- Weiss, N., S. Hameed, J. M. Fernandez-Fernandez, K. Fablet, M. Karmazinova, C. Poillot, J. Proft, L. N. Chen, I. Bidaud, A. Monteil, S. Huc-Brandt, L. Lacinova, P. Lory, G. W. Zamponi and M. De Waard (2012). "A Ca(v)3.2/Syntaxin-1A Signaling Complex Controls T-type Channel Activity and Low-threshold Exocytosis." *Journal of Biological Chemistry* 287(4): 2810-2818.
- Welsby, P. J., H. Wang, J. T. Wolfe, R. J. Colbran, M. L. Johnson and P. Q. Barrett (2003). "A mechanism for the direct regulation of T-type calcium channels by Ca²⁺/calmodulin-dependent kinase II." *J Neurosci* 23(31): 10116-10121.
- Williams, M. E., M. S. Washburn, M. Hans, A. Urrutia, P. F. Brust, P. Prodanovich, M. M. Harpold and K. A. Stauderman (1999). "Structure and functional characterization of a novel human low-voltage activated calcium channel." *J Neurochem* 72(2): 791-799.
- Williams, S. R., T. I. Toth, J. P. Turner, S. W. Hughes and V. Crunelli (1997). "The 'window' component of the low threshold Ca²⁺ current produces input signal amplification and bistability in cat and rat thalamocortical neurones." *J Physiol* 505 (Pt 3): 689-705.
- Woolf, C. J. (1983). "Evidence for a central component of post-injury pain hypersensitivity." *Nature* 306(5944): 686-688.
- Wu, J., Z. Yan, Z. Li, C. Yan, S. Lu, M. Dong and N. Yan (2015). "Structure of the voltage-gated calcium channel Cav1.1 complex." *Science* 350(6267): aad2395.
- Wu, J., Z. Yan, Z. Li, X. Qian, S. Lu, M. Dong, Q. Zhou and N. Yan (2016). "Structure of the voltage-gated calcium channel Ca(v)1.1 at 3.6 Å resolution." *Nature* 537(7619): 191-196.
- Xu, M., V. K. Kontinen and E. Kalso (1999). "Endogenous noradrenergic tone controls symptoms of allodynia in the spinal nerve ligation model of neuropathic pain." *Eur J Pharmacol* 366(1): 41-45.
- Yang, K. (2016). "Regulation of excitability in tonic firing substantia gelatinosa neurons of the spinal cord by small-conductance Ca(2+)-activated K(+) channels." *Neuropharmacology* 105: 15-24.
- Yang, K., R. Ma, Q. Wang, P. Jiang and Y. Q. Li (2015). "Optoactivation of parvalbumin neurons in the spinal dorsal horn evokes GABA release that is regulated by presynaptic GABAB receptors." *Neurosci Lett* 594: 55-59.
- Yasaka, T., G. Kato, H. Furue, M. H. Rashid, M. Sonohata, A. Tamae, Y. Murata, S. Masuko and M. Yoshimura (2007). "Cell-type-specific excitatory and inhibitory circuits involving primary afferents in the substantia gelatinosa of the rat spinal dorsal horn in vitro." *J Physiol* 581(Pt 2): 603-618.
- Yeh, J. Z., G. S. Oxford, C. H. Wu and T. Narahashi (1976). "Dynamics of aminopyridine block of potassium channels in squid axon membrane." *J Gen Physiol* 68(5): 519-535.
- Yu, X., L. Guo, G. Yin, X. Zong and Y. Ai (2006). "Effect of non-specific HCN1 blocker CsCl on spatial learning and memory in mouse." *J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci* 26(2): 164-166.

- Zamponi, G. W., J. Striessnig, A. Koschak and A. C. Dolphin (2015). "The Physiology, Pathology, and Pharmacology of Voltage-Gated Calcium Channels and Their Future Therapeutic Potential." Pharmacol Rev 67(4): 821-870.
- Zanier, E. R., S. Fumagalli, C. Perego, F. Pischiutta and M. G. De Simoni (2015). "Shape descriptors of the "never resting" microglia in three different acute brain injury models in mice." Intensive Care Med Exp 3(1): 39.
- Zhang, H. M., L. J. Zhou, X. D. Hu, N. W. Hu, T. Zhang and X. G. Liu (2004). "Acute nerve injury induces long-term potentiation of C-fiber evoked field potentials in spinal dorsal horn of intact rat." Sheng Li Xue Bao 56(5): 591-596.
- Zhang, X. (2015). "Molecular sensors and modulators of thermoreception." Channels (Austin) 9(2): 73-81.
- Zhang, Y., X. Jiang, T. P. Snutch and J. Tao (2013). "Modulation of low-voltage-activated T-type Ca(2)(+) channels." Biochim Biophys Acta 1828(7): 1550-1559.
- Zhang, Z. J., B. C. Jiang and Y. J. Gao (2017). "Chemokines in neuron-glia cell interaction and pathogenesis of neuropathic pain." Cell Mol Life Sci.
- Zheng, J., Y. Lu and E. R. Perl (2010). "Inhibitory neurones of the spinal substantia gelatinosa mediate interaction of signals from primary afferents." J Physiol 588(Pt 12): 2065-2075.
- Zufferey, R., J. E. Donello, D. Trono and T. J. Hope (1999). "Woodchuck hepatitis virus posttranscriptional regulatory element enhances expression of transgenes delivered by retroviral vectors." J Virol 73(4): 2886-2892.