



HAL
open science

Contrôle des réseaux spinaux de la lamina II de la moelle épinière par les fibres C-LTMRs : approches optogénétique et pharmacologique

Charline Kambrun

► **To cite this version:**

Charline Kambrun. Contrôle des réseaux spinaux de la lamina II de la moelle épinière par les fibres C-LTMRs : approches optogénétique et pharmacologique. Médecine humaine et pathologie. Université de Bordeaux, 2017. Français. NNT : 2017BORD0869 . tel-01686699

HAL Id: tel-01686699

<https://theses.hal.science/tel-01686699>

Submitted on 17 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 PRÉSENTÉE
POUR OBTENIR LE GRADE DE
DOCTEUR DE
L'UNIVERSITÉ DE BORDEAUX

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

Par Charline Kambrun

**Contrôle des réseaux spinaux de la lamina II de la
moelle épinière par les fibres C-LTMRs: approches
optogénétique et pharmacologique.**

Sous la direction de : Dr. Yves Le Feuvre

Soutenue le 11 Décembre 2017

Membres du jury :

| | | | |
|-------------------------|------------------------|-----------------|--------------------|
| M. Moqrich, Aziz | Directeur de Recherche | IBDM Marseille | Président |
| M. Poisbeau, Pierrick | Professeur | INCI Strasbourg | Rapporteur |
| M. De Koninck, Yves | Professeur | CERVO Laval | Rapporteur |
| M. Boué-Grabot, Eric | Directeur de Recherche | IMN Bordeaux | Examinateur |
| Mme Inquimbert, Perrine | Maître de conférences | INCI Strasbourg | Examinatrice |
| M. Le Feuvre, Yves | Chargé de Recherche | IINS Bordeaux | Directeur de thèse |

Titre : Contrôle des réseaux spinaux de la lamina II de la moelle épinière par les fibres C-LTMRs: approches optogénétique et pharmacologique.

Résumé :

La perception de la douleur résulte de l'intégration dans la moelle épinière des informations sensorielles et nociceptives transmises par les afférences primaires. Parmi celles-ci, les Mécanorécepteurs C à bas seuil (C-LTMR), exprimant la chimiokine TFAFA4, ont été identifiés comme des modulateurs de la douleur. Cependant, les mécanismes sous-jacents au contrôle de l'intégration sensori-nociceptive par TFAFA4 restent mal compris. Grâce aux enregistrements obtenus *in vitro* par patch clamp chez des souris naïves, nous montrons que l'application exogène de TFAFA4 induit une diminution de la fréquence des courants post-synaptiques excitateurs spontanés (CPSE). A l'inverse nous observons une augmentation de la fréquence des événements synaptiques inhibiteurs spontanés (CPSI). Cette modulation de l'activité synaptique est préservée avec TTX, indiquant que TFAFA4 modifie la transmission synaptique par des mécanismes présynaptiques. En stimulant les fibres nociceptives à haut seuil d'activation, nous démontrons que TFAFA4 induit une augmentation du ratio des réponses synaptiques des interneurons évoquées par des stimulations d'impulsions paires. Par conséquent, TFAFA4 renforce l'inhibition présynaptique des fibres nociceptives. Nous démontrons également que les effets de TFAFA4 sur la transmission excitatrice spontanée et évoquée sont bloqués par des antagonistes des récepteurs GABA, indiquant que les C-LTMRs interagissent principalement avec les neurones GABAergiques. De plus, des expériences de microscopie électronique ont révélé la présence de contacts synaptiques directs entre les C-LTMRs et les terminaisons GABAergiques dans la lamina II. Pour aller plus loin dans la caractérisation des effets de TFAFA4 sur la transmission de la douleur, nous avons induit une inflammation de la patte arrière des souris (modèle CFA). Chez ces souris, l'effet de TFAFA4 sur la fréquence EPSC et IPSC est conservé. Nous constatons que chez les souris CFA, TFAFA4 diminue la décharge neuronale enregistrée *in vivo* suite à une stimulation mécanique nociceptive de la patte inflammée. Cet effet est bloqué par une injection d'antagonistes des récepteurs GABA. En effectuant le test Von Frey sur des souris inflammées, nous montrons que l'action anti-allodymique induite par l'injection intrathécale de TFAFA4 est bloquée par les antagonistes des récepteurs GABA. Nous avançons l'hypothèse que les C-LTMRs contactent directement les interneurons GABAergiques de la corne dorsale et que, via la libération de TFAFA4, renforcent l'activité synaptique inhibitrice participant à l'effet anti-nociceptif de TFAFA4. En outre, TFAFA4 favorise la rétraction microgliale chez les animaux inflammés, ainsi qu'une augmentation du nombre de synapses inhibitrices sur les somas des neurones de la lamina II. En conclusion, ces résultats identifient les interneurons GABAergiques comme premier relais d'intégration pour les C-LTMRs et mettent en évidence une nouvelle interaction entre les neurones sensoriels, les cellules microgliales et les interneurons de la moelle épinière, permettant une modulation fine de l'activité inhibitrice et de la transmission nociceptive en situation pathologique.

Mots clés : Douleur, Moelle épinière, C-LTMR, TFAFA4, réseaux neuronaux

Unité de recherche

Institut Interdisciplinaire de Neurosciences CNRS UMR5297

Centre Broca Nouvelle-Aquitaine, 146 rue Léo Saignat 33076 BORDEAUX

Title : Control of spinal networks within the lamina II of the spinal cord by C-LTMRs fibers: optogenetic and pharmacological approaches.

Abstract :

Pain elaboration results from the integration within dorsal spinal cord of sensory and nociceptive information conveyed by primary afferents. Among these, C low-threshold Mechano Receptors (C-LTMR), expressing the chemokine TFAFA4, were identified as modulators of pain. However, mechanisms underlying the control of sensori-nociceptive integration by TFAFA4 remains poorly understood. Using *in vitro* patch clamp recording on spinal cord slices of naïve mice we show that, bath application of TFAFA4 induces a decrease in frequency of spontaneous excitatory post synaptic currents (EPSCs). This effect is mirrored by an increase in frequency of spontaneous inhibitory synaptic events (IPSCs). This modulation of synaptic activity is preserved with TTX, indicating that TFAFA4 alters synaptic transmission through presynaptic mechanisms. By recruiting high threshold nociceptive fibers, we demonstrate that TFAFA4 induces an increase in the paired pulse ratio of evoked synaptic responses in interneurons, and thus, reinforces presynaptic inhibition of nociceptive fibers. We also demonstrate that the effects of TFAFA4 on spontaneous and evoked excitatory transmission are blocked by antagonists of GABA receptors, indicating that -C-LTMRs mainly interact with GABAergic neurons. Moreover, Electron Microscopy provides evidence of direct synaptic contacts between C-LTMRs and GABAergic terminals in lamina Ili. To further characterize the effects of TFAFA4 on pain transmission, we inflamed mice using Complete Freund Adjuvant (CFA). In CFA mice, the effect of TFAFA4 on EPSC and IPSC frequency is preserved. We find that in CFA mice, TFAFA4 decreases the neuronal discharge recorded *in vivo* following a nociceptive mechanical stimulation in inflamed hindpaw. This effect is blocked by an injection of GABA receptors antagonists. By performing Von Frey test on inflamed mice, we show that intrathecal injection of TFAFA4 provides anti-allodynic effects blocked by GABA receptors antagonists. We propose that C-LTMR directly contact GABAergic interneurons in dorsal horn, and, through the liberation of TFAFA4 reinforce inhibitory synaptic activity which may in turn promote their anti-nociceptive activity. Furthermore, TFAFA4 promotes microglial retraction in CFA inflamed animals, together with an increase in the number of inhibitory synapses on lamina Ili somata. Altogether, these results identify GABAergic interneurons as the first integration relay for C-LTMRs and highlight a novel interplay between sensory neurons, microglial cells and spinal interneurons leading to a fine tuning of inhibitory activity and nociceptive transmission in pathological conditions.

Keywords : Pain, Spinal cord, C-LTMR, TFAFA4, neuronal network

Unité de recherche

Institut Interdisciplinaire de Neurosciences CNRS UMR5297

Centre Broca Nouvelle-Aquitaine, 146 rue Léo Saignat 33076 BORDEAUX

Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier très sincèrement les membres de mon jury : le Dr. Aziz Moqrich pour avoir accepté de présider cette soutenance, le Pr. Pierrick Poisbeau et le Pr. Yves De Koninck d'avoir accepté de juger et de commenter ce manuscrit. Je tiens également à remercier le Dr. Eric Boué-Grabot et le Dr. Perrine Inquimbert d'avoir bien voulu examiner ce travail.

Avant de remercier l'équipe Landry je tiens à remercier Valérie Fénelon pour m'avoir accepté en tant que stagiaire volontaire en master 1 et m'avoir fait découvrir le monde de la douleur et de la moelle épinière. Même si je ne suis restée qu'un mois j'ai vraiment apprécié de travailler avec vous et avec Lucie et déjà à cette période j'avais quelques soucis techniques avec les immunos! Merci pour le temps que vous avez passé à relire mon rapport de master 2 puis le manuscrit de l'article et pour tous les conseils que vous avez pu me donner et pour votre gentillesse.

Je tiens bien évidemment à remercier toute l'équipe Landry ou the Landry's team pour les intimes : Marc Landry, André Calas, Yves Le Feuvre, Alexandre Faveraux, Pascal Fossat, Rabia Benazzouz et Christel Baudet. Vous nous avez à la fois supporté et encouragé avec Anaïs pendant ces bientôt 5 années et vous avez contribué à faire en sorte que notre thèse se passe dans les meilleures conditions. Merci à vous tous.

Je remercie aussi très sincèrement nos aînés, nos deux post docs préférés Olivier et Maria ainsi que Sébastien notre technicien parisien-landais qui, même s'il a changé d'équipe restera toujours un Landry.

Je n'oublie pas de remercier Houda et ses petites questions qui a commencé sa thèse en même temps que nous et à qui je souhaite le meilleur pour la suite. Il y a aussi la relève, bon courage à Franck, Joao et Otmane (même si pour toi la fin n'est plus très loin) j'espère que vous appréciez votre thèse au labo autant que nous avons apprécié la nôtre.

Merci aux étudiants qui ont partagé et partagent encore notre quotidien et animent le bureau des étudiants : Yazid, Mélissa, Rheda, Amanie, Mariam, Vivien, Paul (même si c'était un Le Masson), Morgane, Nino, Constantin, Gabriella, Laura, Anthony, Léo et j'en oublie certainement. Un merci tout particulier à Miriam qui a fait son stage de master 2 sur le projet TAF4 et qui a réussi à soutenir avant moi et également à Camille que j'ai eu la chance d'encadrer.

Notre équipe reste sans aucun doute la plus originale de l'institut ! A bien y réfléchir cela doit sûrement venir du fait que nous sommes une société de production d'œuvres cinématographiques originales, que nous avons le sens de la décoration des bureaux et que dire que notre sens de l'humour pas toujours très distingué ! Mais quelle chance d'avoir fait ma thèse dans cette équipe !

Tout d'abord un grand merci à Marc de m'avoir accueillie dans l'équipe depuis le master 2. Merci pour vos conseils avisés et pour votre pédagogie. Merci également pour nous avoir laissé nous exprimer pendant notre thèse ! Notre grande fierté restera d'avoir décoré la baie vitrée de votre salon avec nos œuvres.

Je remercie sincèrement mon cher Directeur de thèse Yves pour la patience dont il a fait preuve durant ces presque 5 années. Tout d'abord merci de vous être autant investi dans ma préparation pour le concours de l'école doctorale parce que ce n'était pas gagné d'avance ! Outre le fait de m'avoir enseigné l'art délicat du patch sur tranche de moelle, je vous remercie de m'avoir inculqué l'exigence scientifique, la persévérance et d'avoir respecté mon petit côté autonome et indépendant ! Merci d'avoir répondu présent pour des séances de comportements à l'animalerie qui n'ont pas été, il faut l'avouer des plus passionnantes. Malgré nos déboires avec l'optogénétique et mes petites souris KO (j'ai enfin réussi à les placer !!!), nous ne nous sommes pas laissé abattre ! Merci d'avoir passé autant de temps à apporter des corrections à toutes mes présentations orales et autre rapport de mi thèse, demandes de financements et bien entendu ce manuscrit. Ma reconnaissance se lira d'ailleurs dans ce manuscrit puisque j'ai volontairement laissé un « nonobstant », preuve que votre formation a porté ses fruits. Merci de m'avoir laissé participer à de nombreux congrès, même si maintenant je réfléchirai à deux fois avant de prendre le car seule, ce n'est pas la meilleure idée que j'ai eu. J'ai vraiment apprécié votre encadrement durant cette thèse. Malgré vos efforts ne me suis pas pris de passion pour le dessin vectoriel, Coreldraw reste pour moi encore une énigme au vue du temps que j'ai passé juste pour que tout le texte soit avec la même fonte ! Mais l'apprentissage se fait dans les deux sens, grâce à moi vous savez maintenant que le vert grenouille n'est pas la seule couleur disponible pour faire les graphiques, le rose c'est tellement mieux ! Promis pour le post doc je ferai en sorte qu'il y ai un point d'eau pour que vous puissiez faire de la planche à voile.

Après Yves vient Monsieur Alexandre Favereaux ou Seigneur Faverette. Merci pour ton optimisme et pour avoir été une oreille attentive. Sur un plan plus scientifique, je te remercie pour tes conseils sur mon projet même si tu n'étais pas directement impliqué tu as toujours été là pour poser des questions pertinentes et apporter des critiques constructives. Avec Yves vous avez toujours formé un super binôme pour nous préparer avec Anaïs pour chaque étape importante de notre petite carrière scientifique. Et je préfère te prévenir la prochaine étape c'est l'utilisation du bluepipin ! Quand on ne parle pas science on peut le dire Alex tu es aussi un peu notre copine. Toujours partant pour un peu d'humour (sans arrière-pensée et toujours de bon goût), pour des lancés de charriot dans les couloirs du labo ou pour des chavirages de canoë.

Je pense que t'embêter est devenu notre sport quotidien mais il faut dire que tu nous le rends bien. Merci pour ces goûters diététiques à base de coca mais c'est bon à partir de maintenant on arrête! Et vive télérama!

Je me dois aussi de remercier Olivier-Charles (et oui j'ai osé !) ou patach ou encore patachon. Dès le master 2 tu as été présent et disponible pour nous aider et on a pu déceler en toi le potentiel pour suivre nos délires au laboratoire. C'est toi mon maître en électrophysiologie *in vivo*! Merci d'avoir eu la patience de m'apprendre à écouter le murmure des neurones même si au départ ce n'était pas gagné! Merci de t'être autant impliqué dans ce projet et d'avoir supporté « l'histoire de la vie » qui reste à mon avis une des meilleures chansons pour finir comme il se doit une journée d'analyses ou d'enregistrements! J'ai apprécié travailler avec toi pour ta rigueur et ton petit côté passionné! Merci pour tous tes conseils qu'ils soient scientifiques ou non! Merci aussi pour toutes ces conversations sur les sujets de base de la vie kaamelott, le cinéma ou encore les inconnus mais aussi les parties de tennis avec des oranges, sport pas encore reconnu comme discipline olympique mais ça ne saurait tarder.

Merci également à notre deuxième post doc la seule et l'unique María. Merci de m'avoir initié à la culture de DRG. Même si je ne l'ai pas fait très longtemps tu m'as très bien formée! Tu as su toi aussi mettre de l'ambiance dans notre bureau à Magendie et nous avons partagé beaucoup de moments de créations graphiques plus qu'originales! Je n'oublierai pas nos conversations très sérieuses sur games of thrones le mardi matin et je suis désolée mais je n'aime toujours pas Star Wars un jour peut être.... Je n'aurais que quelques mots à dire « For the Watch! ».

Je remercie aussi Sébastien ou plutôt Benquichoux. Nous avons commencé notre vie de thésarde en même temps que tu as commencé dans l'équipe forcément nous étions faits pour nous entendre. Grâce à toi on n'a pas eu le temps de s'ennuyer à Magendie ! Entre la fabrication de nichoir, les séances de ciné dans le bureau et les lancés de boulettes de papier notre programme était bien rempli. Ta patience légendaire surtout avec l'ordinateur et ta passion pour les pigeons ramiers nous ont valu beaucoup de rires. Je ne ferais pas de commentaires sur les férias, les clés de voiture ou les verres de demi-pêche, ce qui se passe à Bayonne reste à Bayonne... Merci de ton soutien et de ta bonne humeur landaise ! Promis je vais maintenant pouvoir descendre plus souvent te voir je vais être moins occupée.

Venons-en à toi Anaïs ou plutôt ma petite nanais. Certes en master tu étais mariée à Alice et moi à Aliénor mais notre réussite à toutes les deux au concours de l'école doctorale (ce qui était

plutôt inattendu le premier signe de la nature je pense) a changé la donne et il a suffi que l'on donne naissance à Jean-Pierrisse l'écrevisse pour sceller notre alliance. Je ne pense pas qu'il y ai beaucoup de thésard qui ai la chance de faire leur thèse avec une collègue comme toi. Collègue ou plutôt amie car on en a vécu des choses depuis 5 ans. Nous avons franchi toutes les étapes importantes au laboratoire à deux avec un soutien mutuel qui est plus que rassurant dans les moments de stress ! Et puis il y a les (nombreux) moments où nous n'avons pas été très efficaces alors quand on s'ennuie et bien on décore les bureaux, on colle des photos, on chante et même on s'enferme dans les toilettes (mais heureusement on a la carrure pour casser des portes). Je ne pensais pas que ce serait en thèse qu'on apprendrait à faire autant de montages vidéos, des photos montages et autres enregistrements de chansons dans les toilettes. Ta fraîcheur, ta spontanéité, ton optimiste, ton humour et ton franc-parler font de toi quelqu'un d'unique avec qui il est agréable de travailler. Toujours prête pour l'aventure finalement tu n'as pas peur de grand-chose à part peut-être des poissons. Tes péripéties informatiques et administratives font qu'il n'y a pas de routine dans notre couple tu es pleine de surprises. Cette longue et intense histoire entre nous se devait de finir en apothéose. On va finir par arriver à faire ce rallye je ne sais pas encore comment (enfin si, il faudrait qu'ILS m'appellent) ni quand (on y arrivera peut-être à la retraite avec 500 euros récoltés par an). Tes futures collègues de Londres ne le savent pas encore mais ils auront de la chance de travailler avec toi !

Un grand merci à la plateforme *in vivo* et plus particulièrement à Audrey, Mélissa Amandine et Elisabeth pour avoir pris soin de nos lignées de petites souris et pour le super travail que vous faites au quotidien.

Je remercie également Sébastien du BIC pour m'avoir formée et apportée son aide avec IMARIS et m'avoir aidée pour l'analyse de mes immunos.

Je tiens à remercier chaleureusement Rémi et Jessica pour l'énorme travail qu'ils effectuent au sein de l'institut et leur aide précieuse. C'est en grande partie grâce à tous les deux que nous avons d'aussi bonnes conditions de travail !

Merci à toute l'équipe administrative, Cédric, Mélanie, Marie-France et Marie-Noëlle, qui font un travail remarquable et sont toujours disponibles pour nos nombreuses questions et autres angoisses au quotidien.

Je tiens à remercier le bureau de l'association 2D2B avec qui ça a été un plaisir d'organiser tous ces évènements dans la joie et la bonne humeur. Même si l'organisation de la dernière journée

de l'école doctorale n'a pas été parfaite, cette journée a été une réussite et nous pouvons en être fiers.

Merci à tous les thésards de 3 ou 4^{ième} année qui ont soutenu ou qui vont soutenir en cette fin d'année, Corey, Benjamin, Matthieu, ma petite latiatia, Thomas (petite otarie), Thomas, Matia avec qui ce fut un plaisir de partager les étapes de cette thèse mais aussi de partager quelques soirées et quelques verres au PQ. Un merci particulier à laetitia avec qui on se supporte depuis le master 1. Décidemment je suis attirée pas le pays basque ! Ta spontanéité, ton humour et ton petit côté naïf me feront toujours rire. Par contre il faut vraiment qu'on s'organise pour aller à Berlin ! Des soirées j'en ai passé aussi avec les thésards et post docs de Magendie qui m'ont chaleureusement accueillie au sein de leur groupe et avec qui j'ai passé de supers moments de décompression je pense notamment à Eva, Marie, Thomas, Ben, Mélissa, Sarah, Dr. Mazier et tous les autres. Merci à vous tous.

Geoffrey, merci pour ton soutien, ton humour, ton enthousiasme et ta joie de vivre qui rendent mon quotidien tellement plus agréable. Je te remercie de me forcer à toujours me dépasser et à tenter de faire toujours mieux. Tu as toujours eu un regard critique et constructif sur mon projet à tel point que je demande si ce ne serait pas mieux que tu passes l'oral à ma place ! Grâce à moi tu sais maintenant que la douleur ça fait mal. Merci aussi de comprendre ma passion pour le fromage et les films de Cannes j'ai conscience que ce n'est pas toujours facile. Merci pour tout et n'oublie pas l'année prochaine ce sera ton tour...

Je remercie également toute la famille de Geoffrey de m'avoir accueilli avec gentillesse et bienveillance.

Je tiens bien évidemment à remercier de tout cœur mes parents pour leur compréhension, leur soutien tout au long de mes « longues études » et dans mes projets (quels qu'ils soient) et leur présence quand j'en ai eu besoin (vous remarquerez que ça fait longtemps que je n'ai pas déménagé !). J'espère que serez fiers de ce travail. Je remercie aussi le reste de ma famille, mon frère, mes nièces, mes tantes, cousins, cousines pour leur soutien pendant ces années.

Merci à tous!

Night gathers, and now my watch begins. It shall not end until my death. I shall take no wife, hold no lands, father no children. I shall wear no crowns and win no glory. I shall live and die at my post. I am the sword in the darkness. I am the watcher on the walls. I am the fire that burns against the cold, The light that brings the dawn, The horn that wakes the sleepers, The shield that guards the realms of men. I pledge my life and honor to the Night's Watch,
For this night and all the nights to come.

-Jon snow Games of thrones-

Avant-propos

Cette thèse de doctorat a été réalisée au sein de l'Institut Interdisciplinaire de Neurosciences CNRS UMR5297 dirigé par Dr. Daniel Choquet dans l'équipe « Mécanisme central de la sensibilisation à la douleur dirigée » par le Pr. Marc Landry. Cette thèse a été conduite sous la direction du Dr. Yves Le Feuvre. Ce travail a été financé par une bourse ministérielle du Ministère de l'enseignement supérieur et de la recherche ainsi que par le Labex Brain.

Les résultats obtenus au cours de ce projet ont donné lieu aux publications et communications suivantes.

Publications

The C-LTMR derived chemokine TFAFA4 reverses mechanical allodynia through activation of GABAergic transmission and microglial process retraction.

Kambrun C, Roca-Lapirot O, Salio C, Landry M, Moqrich A, Le Feuvre Y

En soumission pour Cell Report

GINIP, a Gai-interacting protein, functions as a key modulator of peripheral GABAB receptor-mediated analgesia.

Gaillard S, Lo Re L, Mantilleri A, Hepp R, Urien L, Malapert P, Alonso S, Deage M, **Kambrun C**, Landry M, Low SA, Alloui A, Lambolez B, Scherrer G, Le Feuvre Y, Bourinet E, Moqrich A.

Neuron. 2014 84(1):123-36

Le travail effectué au cours des années ayant précédé ce doctorat a d'autre part donné lieu aux communications suivantes :

The influence of scopolamine on motor control and attentional processes.

Emma Bestaven, **Charline Kambrun**, Dominique Guehl, Jean-René Cazalets, Etienne Guillaud

PeerJ, 2016 DOI 10.7717/peerj.2008

Communications orales

Pain relief through activation of spinal GABAergic neurons by the C-LTMR derived chemokine TFAFA4.

Kambrun C, Roca-Lapirot O, Salio C, Landry M, Moqrich A, Le Feuvre Y.

NeuroFrance 2017 (Bordeaux), 17th May 2017

Activation of spinal dorsal horn inhibitory networks by the C-LTMR derived chemokine TFAFA4.

Kambrun C, Roca-Lapirot O, Salio C, Landry M, Moqrich A, Le Feuvre Y.

12th Symposium of National research network on pain (Nice), 17th March 2016

C Low Threshold Mechano Receptor(C-LTMRs): A key for the nociceptive circuitry

Kambrun C, Roca-Lapirot O, Salio C, Landry M, Moqrich A, Le Feuvre Y.

Conference Interdisciplinary Institute for Neuroscience (Bordeaux), 5th November 2015

Communications affichées

Activation of spinal dorsal horn inhibitory networks by the C-LTMR derived chemokine TFAFA4

Kambrun C, Roca-Lapirot O, Salio C, Landry M, Moqrich A, Le Feuvre Y.

NeuroFrance 2017 (Bordeaux), 17, 18,19th May 2017

Activation of spinal dorsal horn inhibitory networks by the C-LTMR derived chemokine TFAFA4 in inflammatory condition.

Kambrun C, Roca-Lapirot O, Salio C, Landry M, Moqrich A, Le Feuvre Y.

Physiology 2016 (Dublin), 29-31 Juillet 2016

Activation of spinal dorsal horn inhibitory networks by the C-LTMR derived chemokine TFAFA4.

Kambrun C, Roca-Lapirot O, Salio C, Landry M, Moqrich A, Le Feuvre Y.

Federation of European Neuroscience societies (Copenhagen), 2-6th July 2016

Activation of spinal GABAergic neurons by the C-LTMR derived chemokine TFAFA4.

Kambrun C, Roca-Lapirot O, Salio C, Landry M, Moqrich A, Le Feuvre Y

Graduate School day (life and health science) of Bordeaux (Arcachon), 6th April 2016

Shift in the excitatory/inhibitory synaptic balance induced by the C low-threshold Mechano Receptor derived chemokine TFAFA4 in dorsal spinal cord in nociceptive spinal networks.

Kambrun C, Landry M, Le Feuvre Y.

12ième symposium of French society for Neuroscience (Montpellier), 19-22th May 2015

C Low Threshold Mechano Receptor(C-LTMRs): A key for the nociceptive circuitry

Kambrun C, Landry M, Le Feuvre Y.

Journée de l'Ecole Doctorale Sciences de la vie et de la santé de Bordeaux (Arcachon), 16 Avril 2015

SOMMAIRE

| | |
|--|-----------|
| SOMMAIRE | 1 |
| ABRÉVIATIONS | 4 |
| LISTE DES FIGURES ET TABLEAUX | 6 |
| CONTEXTE GENERAL DE L'ETUDE | 7 |
| INTRODUCTION GENERALE | 11 |
| I. LA DOULEUR : DEFINITION ET DIVERSITE | 12 |
| II. AFFERENCES PRIMAIRES A HAUT SEUIL D'ACTIVATION | 16 |
| 1. PRESENTATION GENERALE DES NOCICEPTEURS | 16 |
| 2. LES FIBRES AFFERENTES A HAUT SEUIL | 16 |
| 1. <i>Fibres A</i> | 17 |
| 1. Fibres A δ | 17 |
| 2. Fibres A β | 17 |
| 2. <i>Fibres C</i> | 18 |
| 1. Les fibres C peptidergiques | 18 |
| 2. Les fibres C non peptidergiques | 19 |
| 3. TERMINAISONS CENTRALES DES AFFERENCES PRIMAIRES SENSORIELLES NOCICEPTIVES | 19 |
| 4. INTEGRATIONS DES INFORMATIONS NOCICEPTIVES | 21 |
| 1. <i>Organisation de la corne dorsale de la moelle épinière</i> | 21 |
| 1. Lamina I | 21 |
| 2. Lamina II | 24 |
| 5. TRANSMISSION DU SIGNAL NOCICEPTIF | 29 |
| 1. <i>Théorie de la spécificité des voies transmettant le signal nociceptif</i> | 29 |
| 2. <i>Connections neuronales dans la lamina I</i> | 30 |
| 3. <i>Connections neuronales dans la lamina II</i> | 31 |
| 4. <i>Voies ascendantes de la moelle épinière au cerveau</i> | 32 |
| 6. SENSIBILISATION CENTRALE | 33 |
| 1. <i>Sensibilisation centrale et transmission glutamatergique</i> | 33 |
| 2. <i>Sensibilisation centrale et désinhibition</i> | 34 |
| 3. <i>Microglie et sensibilisation centrale</i> | 37 |
| 1. Les cellules microgliales | 37 |
| 2. Déplacement des synapses par la microglie | 38 |
| 3. Les cellules microgliales en condition pathologique | 39 |
| 4. Modulation de la transmission des informations nociceptives par la microglie. | 40 |
| III. AFFERENCES PRIMAIRES A BAS SEUIL D'ACTIVATION | 44 |
| 1. LES MECANORECEPTEURS PRESENTATION GENERALE | 44 |
| 2. MECANORECEPTEURS A BAS SEUIL DANS LA PEAU GLABRE | 44 |
| 1. <i>Complexe neurite-cellule de Merkel</i> | 44 |
| 2. <i>Les corpuscules de Ruffini</i> | 45 |
| 3. <i>Les corpuscules de Meissner</i> | 45 |
| 4. <i>Les corpuscules de Pacini</i> | 46 |
| 3. MECANORECEPTEURS A BAS SEUIL DANS LA PEAU POILUE | 46 |
| 1. <i>Fibres Aβ-LTMR</i> | 46 |
| 2. <i>Fibres Aδ-LTMR</i> | 47 |
| 3. <i>Fibres C-LTMR</i> | 47 |
| 4. LA SENSIBILITE THERMIQUE | 48 |
| 5. CONNECTION DES FIBRES A BAS SEUIL DANS LA MOELLE EPINIERE | 49 |
| 6. LA THEORIE DU PORTILLON | 50 |
| 7. INTERFERENCES ENTRE LES CIRCUITS DU TOUCHER ET DE LA NOCICEPTION | 50 |

| | | |
|-------------|---|------------|
| 1. | <i>Mécanismes de l'hyperalgésie et de l'allodynie mécanique</i> | 50 |
| 1. | Activation des réseaux nociceptifs par les afférences à bas seuil | 51 |
| 2. | Contrôle de la transmission des informations nociceptives par les mécanorécepteurs à bas seuil | 54 |
| IV. | LES MECANORECEPTEURS C A BAS SEUIL | 56 |
| 1. | HISTORIQUE | 56 |
| 2. | CARACTERISTIQUES FONCTIONNELLES DES MECANORECEPTEURS C A BAS SEUIL | 57 |
| 1. | <i>Caractéristiques morphologiques</i> | 57 |
| 2. | <i>Vitesse de conduction</i> | 57 |
| 3. | <i>Réponses aux stimuli</i> | 57 |
| 4. | <i>Fatigue et adaptation des C-LTMRs</i> | 58 |
| 5. | <i>Décharge post stimulation des C-LTMRs</i> | 58 |
| 3. | MECANORECEPTEURS C A BAS SEUIL DANS LE TOUCHER AFFECTIF | 59 |
| 1. | <i>Différenciation des fibres Aβ et C-LTMRs chez les patients</i> | 59 |
| 2. | <i>Implication des C-LTMRs dans l'aspect affectif du toucher</i> | 60 |
| 4. | CARACTERISATION MOLECULAIRE DES MECANORECEPTEURS C A BAS SEUIL | 60 |
| 5. | LES MECANORECEPTEURS C A BAS SEUIL ET LA REGULATION DE LA TRANSMISSION DES INFORMATIONS NOCICEPTIVES. | 62 |
| V. | OBJECTIFS DE L'ETUDE | 67 |
| | RESULTATS EXPERIMENTAUX: APPROCHE OPTOGENETIQUE | 69 |
| I. | INTRODUCTION | 70 |
| II. | MATERIEL ET METHODES | 73 |
| 1. | <i>Animaux</i> | 73 |
| 2. | <i>Mode d'injection et virus utilisés :</i> | 73 |
| 3. | <i>Obtention des coupes de tissus :</i> | 74 |
| 4. | <i>Immunohistochimie sur coupes de moelle épinière et de DRG.</i> | 75 |
| 5. | <i>Acquisition et analyse des images.</i> | 76 |
| III. | RESULTATS | 77 |
| 1. | APPROCHE VIRALE | 77 |
| 1. | <i>Expression de ChR2-Venus dans les DRG suite à une injection virale intra sciatique, intrathécale ou intra DRG.</i> | 77 |
| 2. | <i>Expression du transgène ChR2-venus dans les neurones des ganglions rachidiens.</i> | 79 |
| 3. | <i>Expression du transgène ChR2-venus dans la moelle épinière.</i> | 80 |
| 4. | <i>Expression des virus 2/1 et 2/9 dans les C-LTMRs ?</i> | 81 |
| 5. | <i>Vérification du modèle génétique</i> | 83 |
| 2. | APPROCHE PAR CROISEMENT | 85 |
| 1. | <i>Expression de la TH et de la ChR2-EYFP dans les DRG thoraciques et lombaires.</i> | 85 |
| 2. | <i>Expression de la ChR2-EYFP au niveau de la moelle épinière</i> | 86 |
| | RESULTATS EXPERIMENTAUX: APPROCHE PHARMACOLOGIQUE | 89 |
| I. | PRESENTATION DU PROJET TAF4 | 90 |
| | MANUSCRIT | 93 |
| | DISCUSSION | 151 |
| | APPROCHE OPTOGENETIQUE | 152 |
| | <i>Approche virale</i> | 152 |
| | <i>Validation du modèle génétique</i> | 153 |
| | APPROCHE PAR CROISEMENT | 153 |
| | ACTION DE TAF4 SUR LES PROPRIETES INTRINSEQUES DES NEURONES | 155 |
| | ABSENCE D'EFFET DU TAF4 CHEZ LES ANIMAUX NAÏFS <i>IN VIVO</i> | 156 |
| | ACTION DE TAF4 SUR LES INTERNEURONES GABAERGIQUES | 157 |
| | MODIFICATION DES CONNECTIONS ENTRE LES FIBRES A BAS SEUIL ET LES INTERNEURONES INDUITE PAR TAF4. | 158 |

| | |
|---|------------|
| ACTION DIFFERENTIELLE DE TAF4 SUR LES CELLULES MICROGLIALES ET LES MACROPHAGES. | 159 |
| INTERACTION DES CELLULES MICROGLIALES PREFERENTIELLEMENT AVEC LA TRANSMISSION INHIBITRICE | 160 |
| CONCLUSION ET PERSPECTIVES | 163 |
| ANNEXE | 167 |
| I. PRESENTATION DU PROJET GINIP | 168 |
| ARTICLE | 171 |
| BIBLIOGRAPHIE | 209 |

ABRÉVIATIONS

| | |
|-----------------|---|
| AAV | Adeno-Associated Virus |
| ACSF | Artificial Cerebro Spinal Fluid |
| AMC | A fiber Mechanical Cold |
| AMH | A fiber Mechanical Heat |
| AMPA | α -amino-3-hydroxy-5-méthylisoazol-4-propionate |
| APV, AP5 | Acide 2-amino-5-phosphovalérique |
| ARNm | Acide Ribonucléique messenger |
| ATP | Adenosine 5'Tri-Phosphate |
| BDNF | Brain-derived neurotrophic factor |
| CAG | Chicken β Actin promoter |
| CR3 | Complement receptor 3 |
| CD11b | Cluster differentiation 11b/c |
| CFA | Complete Freund Adjuvant |
| CH | C fiber Heat |
| CGRP | Calcitonin gene-related peptide |
| ChR2 | ChannelRhodopsine2 |
| CH | C Heat |
| C-LTMR | C-Low Threshold Mechano Receptors |
| CM | C Mechanical |
| CMH | C Mechanical Heat |
| CMiHi | C Mechano Heat insensitive fibers |
| CMV | Cytomegalovirus |
| CNQX | 6-cyano-7-nitroquinoxaline-2,3-dione |
| CPSE | Courant post-synaptique exciteur |
| CPSI | Courant post-synaptique inhibiteur |
| CREB | C-AMP Response Element-binding protein |
| CreER | Cre recombinase oestrogen receptor |
| C-Ret | c-Ret receptor tyrosine kinase |
| CX3CL1 | Chemokine (C-X3-C motif) ligand 1 ou fractalkine |
| CX3CR1 | Chemokine (C-X3-C motif) ligand 1 ou fractalkine receptor |
| DIO | Double-floxed Inverse Open reading frame |
| DRG | Dorsal Root Ganglion |
| FRP | Formyl Peptide Receptor |
| GABA | Acide γ -aminobutyrique |
| GAD | Glutamic Acid Decarboxylase |
| GDNF | Glial Derived Nerve Factor |
| GFP | Green Fluorescent Protein |
| GINIP | G alpha Inhibitory Interacting Protein |
| HPC | Heat, Pinch, Cold |
| 4-HT | 4-hydroxy tamoxifen |
| 5HT | Serotonin |
| IB4 | Isolectin Binding 4 |
| KCC2 | Potassium-chloride transporter member 5 |
| LTMR | Low Threshold mecano-Receptor |
| Mg | Magnésium |
| MRGPR | Mas-related G-protein coupled receptor member |
| NG2 | Neural/Glial antigen 2 |
| NGF | Nerve Growth Factor |
| NK1 | Neurokinin 1 |

| | |
|-------------------------------|---|
| NKCC1 | Na-K-2Cl cotransporter |
| NMDA | <i>N</i> -méthyl-D-aspartate Receptor |
| nNOS | Neuronal Nitric Oxide Synthase |
| NO | Monoxyde d'azote |
| NPY | Neuropeptide Y |
| IASP | International Association for the Study of Pain |
| Iba-1 | Ionized calcium-binding adaptor molecule-1 |
| IL-1β | Interleukine 1 β |
| IP | Intrapéritonéal |
| IT | Intrathécale |
| LPS | Lipopolysaccharide |
| MAP kinase | Mitogen-activated Protein kinase |
| NMDA | Acide N-méthyle-D-aspartate |
| NS | Nociceptive specific |
| PAD | Primary afferent depolarisation |
| PGE2 | Prostaglandine E ₂ |
| PKCγ | Protein Kinase C gamma |
| P2X | Purinergic Receptor/lonotropic |
| Runx1 | Runt Related Transcription factor 1 |
| SST2A | Somatostatine Receptor 2A |
| SV 40 | Simian virus 40 |
| TH | Tyrosine Hydroxylase |
| TLR4 | Toll Like Receptor 4 |
| TNFα | Tumor necrosis factor α |
| Trk | Tropomyosin Receptor Kinase |
| TRPA1 | Transient receptor potential, subfamily A, member 1 |
| TRPV1 | Transient receptor potential, subfamily V, member 1 |
| TTX | Tetrodotoxin |
| VGlut3 | Vesicular transporter of glutamate 3 |

LISTE DES FIGURES ET TABLEAUX

Introduction générale

| | |
|---|----|
| <i>Figure 1 : Représentation graphique des réponses à une stimulation de faible ou de forte intensité en condition physiologique et pathologique.</i> | 14 |
| <i>Figure 2 : Classification des fibres C à haut et bas seuil</i> | 19 |
| <i>Figure 3 : Différents glomérules synaptiques de la corne dorsale de la moelle épinière chez le rat.</i> | 21 |
| <i>Figure 4 : Morphologie des neurones de la lamina I de la moelle épinière.</i> | 24 |
| <i>Figure 5 : Représentation schématique de l'organisation des neurones de la lamina II.</i> | 26 |
| <i>Figure 6 : Classification neurochimique des interneurons GABAergiques de la lamina II.</i> | 28 |
| <i>Figure 7 : Représentation schématique des connexions inhibitrices entre les cellules islet et centrales dans la lamina II.</i> | 31 |
| <i>Figure 8 : Représentation schématique des connexions identifiées dans les laminae superficielles de la moelle épinière.</i> | 32 |
| <i>Figure 9: Régulation de la transmission synaptique par les médiateurs microgliaux.</i> | 40 |
| <i>Figure 10: Schéma explicatif de la répartition des mécanorécepteurs dans la peau glabre et poilue.</i> | 48 |
| <i>Figure 11 : La théorie du portillon proposée par Melzack et Wall (1965).</i> | 50 |
| <i>Figure 12: Circuit intégrant les informations nociceptives mécaniques dans la corne dorsale.</i> | 53 |
| <i>Figure 13 : Circuit neuronal impliqué dans l'allodynie mécanique en condition neuropathique.</i> | 54 |
| <i>Figure 14: Diversité moléculaire des neurones sensoriels.</i> | 61 |
| <i>Figure 15: La perte de VGlut3^{-/-} chez les souris entraîne une diminution de l'hypersensibilité mécanique en condition inflammatoire et neuropathique.</i> | 63 |
| <i>Figure 16: Hypersensibilité mécanique prolongée chez les souris TFA4^{-/-} en condition inflammatoire.</i> | 64 |

Résultats expérimentaux: Approche optogénétique

| | |
|---|----|
| <i>Figure 17: Schéma du principe de l'approche optogénétique utilisée.</i> | 70 |
| <i>Figure 18: Représentation schématique des deux stratégies d'expression spécifique de la Chr2 dans les C-LTMRs mises en oeuvre</i> | 71 |
| <i>Figure 19: Expression post natale de l'expression de la tyrosine hydroxylase.</i> | 78 |
| <i>Figure 20: Efficacité de la transduction virale des neurones des DRG suivant trois modalités d'injection.</i> | 78 |
| <i>Figure 21: Efficacité et sélectivité de la transduction des neurones des DRG pour différents sérotypes d'AAV.</i> | 80 |
| <i>Figure 22: Expression du sérotype AAV2/1 dans les fibres sensorielles au niveau de la moelle épinière.</i> | 81 |
| <i>Figure 23: Expression du transgène dans les fibres C-LTMRs.</i> | 82 |
| <i>Figure 24: Distribution des fibres marquées par les sérotypes AAV2/1 et 2/9 dans la moelle épinière.</i> | 83 |
| <i>Figure 25: Expression de la Tomato et de la TH dans les DRG des souris issues du croisement THCre Ai9Tomato à différents stades post nataux.</i> | 84 |
| <i>Figure 26: Expression de la Chr2 dans les neurones des DRG thoraciques et lombaires des souris issues du croisement ThCreER X COP4.</i> | 86 |
| <i>Figure 27: Expression de la Chr2-EYFP dans la moelle épinière.</i> | 87 |

| | |
|--|----|
| <i>Tableau 1: Virus utilisés lors des expériences.....</i> | 74 |
| <i>Tableau 2: Anticorps primaires utilisés</i> | 75 |
| <i>Tableau 3: Anticorps secondaires utilisés.....</i> | 76 |

Discussion

| | |
|---|-----|
| <i>Figure 28: Effet de tafa4 sur la résistance et l'excitabilité cellulaire des neurones de la lamina II.</i> | 155 |
| <i>Figure 29: Occurrence des réponses synaptiques aux stimulations des fibres Aβ, Aδ et C.</i> | 159 |

Contexte général de l'étude

La douleur est un signal physiologique essentiel pour la protection des individus contre des stimulations provenant de l'environnement potentiellement dangereuses pour leur intégrité physique. Cependant, dans certaines conditions pathologiques, un dysfonctionnement de la plasticité neuronale des neurones transmettant et intégrant les informations nociceptives peut conduire à l'apparition de douleurs intenses et prolongées dépourvues de valeur protectrice pour l'individu. A ce jour, les traitements disponibles afin de traiter la douleur ne permettent pas de soulager tous les types de douleur.

A la suite d'un stimulus nociceptif, les informations nociceptives en provenance de la périphérie sont détectées et propagées via des afférences somesthésiques morphologiquement et fonctionnellement spécialisées, dont le soma est localisé dans les ganglions rachidiens (Dorsale Root Ganglia, DRG). Ces informations sont ensuite intégrées par des interneurons au niveau de la corne dorsale de la moelle épinière ou par les neurones du complexe trigéminal avant d'être relayées jusqu'au cerveau où s'élabore la perception douloureuse. Au niveau de la corne dorsale les informations nociceptives sont intégrées avec des informations issues d'autres modalités sensorielles (démangeaison, toucher) susceptibles de moduler la transmission nociceptive. Parmi ces modalités sensorielles, les informations liées au toucher léger semblent jouer un rôle prépondérant. Ces dernières sont transmises par une classe spécialisée de mécanorécepteurs C à bas seuil (C-LTMR). Bien que ces fibres aient depuis longtemps été décrites comme l'un des médiateurs des aspects émotionnels et affectifs du toucher, leur rôle dans la modulation de la transmission des informations nociceptives est en pleine émergence dans des modèles de douleur aiguë et chronique (Olausson et al., 2008). En effet, des études ont démontré que ces fibres pouvaient moduler positivement ou négativement la transmission des informations nociceptives au niveau des circuits neuronaux locaux localisés dans la corne dorsale de la moelle épinière (Delfini et al., 2013; Seal et al., 2009). Néanmoins les cibles neuronales de ces fibres restent encore méconnues. L'objectif principal de ce projet est de déterminer les mécanismes permettant aux C-LTMRs de contrôler l'intégration des informations nociceptives dans la moelle épinière en conditions physiologiques et pathologiques.

Notre travail a eu pour but d'identifier les réseaux neuronaux contactés par les C-LTMRs, tout d'abord en essayant de mettre au point une approche optogénétique présentant l'avantage de permettre une stimulation spécifique des fibres C-LTMRs et d'enregistrer la réponse cellulaire dans la lamina II. La seconde approche a consisté à étudier l'effet d'une chimiokine spécifiquement exprimée par les C-LTMRs sur la transmission synaptique au sein des réseaux neuronaux de la corne dorsale de la moelle épinière.

Dans le but de définir le contexte dans lequel s'inscrit ce projet, l'introduction de ce manuscrit commencera par une brève définition du phénomène de la douleur. Ensuite, il était essentiel de décrire les mécanismes de transmission des informations sensorielles qu'elles soient nociceptives ou non. Je commencerai par une description des fibres à haut seuil d'activation transmettant les informations nociceptives puis j'examinerai l'intégration de ces informations par les interneurons localisés dans la corne dorsale de la moelle épinière avant que ces informations ne soient relayées vers les structures supra spinales.

Je décrirai dans un second temps les mécanismes pouvant être à l'origine de la sensibilisation centrale, qui participe à la chronicisation de la douleur, et notamment le phénomène de désinhibition. Nous verrons en particulier le rôle joué par les cellules gliales et plus particulièrement par la microglie dans ces phénomènes de sensibilisation centrale et de désinhibition des réseaux spinaux.

Les réseaux neuronaux de la corne dorsale n'intègrent pas seulement les informations nociceptives, ils intègrent également d'autres modalités sensorielles, comme le toucher, transmises par les afférences primaires à bas seuil d'activation. Ces modalités sont susceptibles d'altérer la transmission des informations nociceptives, c'est pourquoi la troisième partie de l'introduction sera consacrée à leur description. Parmi ces afférences primaires, les C-LTMRs transmettent le toucher léger mais de récentes études ont révélé leur rôle dans la modulation de la perception douloureuse. Leur étude étant au cœur de notre projet la dernière de l'introduction leur sera donc consacrée.

A la suite de l'introduction de mon projet de thèse, les deux approches mises en place pour permettre l'étude des réseaux neuronaux contactés par les C-LTMRs seront décrites ainsi que l'ensemble des résultats obtenus durant cette thèse dont une partie fait l'objet d'une publication en soumission (Kambrun et al.). Ces résultats seront ensuite discutés et replacés dans le contexte scientifique. Je présenterai finalement une étude portant sur la description du rôle d'un autre marqueur moléculaire des afférences sensorielles primaires à bas seuil en condition pathologique, effectuée en collaboration avec l'équipe d'Aziz Moqrich.

Introduction générale

I. LA DOULEUR : DEFINITION ET DIVERSITE

La douleur est une expérience sensorielle complexe perçue suite à une stimulation nocive ou potentiellement dangereuse pour l'intégrité physique des individus. Selon l'Association Internationale de la Douleur (International Association for the Study of Pain, IASP) la douleur se définit comme « une expérience sensorielle et émotionnelle désagréable en réponse à une atteinte tissulaire réelle ou potentielle ou décrite en ces termes ». En condition physiologique, la douleur est donc un signal d'alarme protecteur dont la transmission graduelle rend compte de l'intensité des stimuli reçus. Elle est également essentielle pour que les individus adaptent leur comportement face à une situation potentiellement dangereuse. Si ce signal d'alarme est absent, comme dans des cas d'insensibilité congénitale à la douleur, les patients s'exposent davantage aux dangers pouvant entraîner des traumatismes multiples comme des brûlures ou des fractures (Cox et al., 2006, 2010; Nagasako et al., 2003).

Il y a une grande variabilité interindividuelle dans le ressenti de intensité de la douleur, qui est fortement dépendant du contexte physiologique et émotionnel, faisant de la douleur un phénomène énigmatique et complexe à étudier. D'une part, elle présente une composante sensori-discriminative (intensité de la douleur, localisation). D'autre part, elle présente également une composante émotionnelle qui est subjective (Craig, 2003).

Il convient de distinguer la douleur de la nociception. La nociception est le processus permettant la détection et la transmission d'informations sensorielles générées suite à l'activation des terminaisons périphériques des nocicepteurs par des stimuli de fortes intensités qu'ils soient thermiques, mécaniques ou chimiques (Dubin and Patapoutian, 2010). Ce n'est que lorsque les informations sensorielles parviennent jusqu'au cortex cérébral que la perception de la douleur a lieu. Cette distinction a tout d'abord été décrite par Woodworth and Sherrington (1904) qui dans un modèle de cerveau isolé chez le chat sous anesthésie profonde, démontrèrent que les structures sous corticales sont nécessaires à la perception de la douleur.

Dans certaines conditions pathologiques, un dysfonctionnement des neurones intégrant les informations nociceptives peut conduire à l'apparition de douleurs intenses et prolongées, dépourvues de valeur protectrice pour l'individu. Ces douleurs chroniques d'intensité modérée ou sévère affectent 19% de la population européenne et 20 à 25% de la population mondiale. Elles entraînent une altération de la vie quotidienne de ces patients. De plus, 40% d'entre eux ne bénéficient pas d'une prise en charge adaptée, et les traitements prévus sont peu spécifiques à leur douleur. De ce fait, la douleur est un problème de santé publique majeur en Europe et dans le reste du monde (Breivik et al., 2006, IASP).

Il est possible de distinguer deux types de douleurs en fonction de la durée de la perception de la douleur. Tout d'abord la douleur aiguë qui présente un caractère plus ou moins transitoire, pouvant perdurer plusieurs jours à plusieurs semaines. Elle se caractérise comme étant une réponse physiologique prévisible suite à une stimulation intense mécanique, thermique ou chimique. Elle peut se développer après une chirurgie ou un trauma et peut parfois être révélatrice du développement d'une maladie. Lorsque sa durée excède trois mois, la douleur est qualifiée de chronique. Lorsqu'elle devient chronique, la douleur perd son caractère protecteur et devient une maladie à part entière.

Symptomatologie de la douleur :

En cas d'inflammation ou de lésion des nerfs, la modification des réponses neuronales peut se traduire par deux symptômes différents. Ainsi, un stimulus sensoriel normalement inoffensif peut provoquer une perception douloureuse on parlera d'allodynie. De même, la sensation douloureuse peut être exacerbée lors d'une stimulation faiblement nociceptive ; on parlera alors d'hyperalgésie (**Figure 1**, Costigan et al., 2009).

On peut distinguer l'hyperalgésie primaire, induite par la libération de médiateurs de l'inflammation qui vont activer les nocicepteurs (terminaisons libres des neurones sensoriels spécialisés) proches du site de la lésion. L'activation des nocicepteurs adjacents provoque une sensibilisation de cette zone et une sensibilité accrue pour les stimuli mécaniques et thermiques (chaleur et froid). Ce type d'hyperalgésie est caractéristique d'une douleur inflammatoire. L'hyperalgésie secondaire correspond quant à elle à une sensibilisation des neurones de la moelle épinière suite à une stimulation répétée des afférences primaires nociceptives par les médiateurs de l'inflammation. Cette hyperalgésie peut perdurer même s'il n'y a plus de lésion tissulaire et peut alors acquérir une dimension neuropathique (Beaulieu, 2005; Treede et al., 1992).

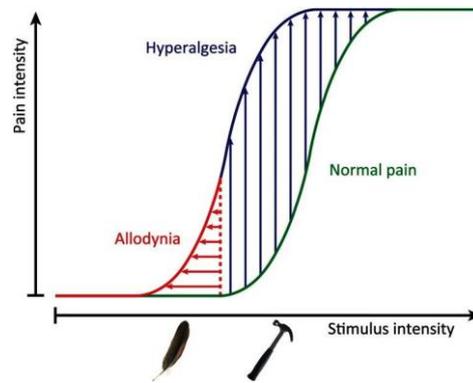


Figure 1 : Représentation graphique des réponses à une stimulation de faible ou de forte intensité en condition physiologique et pathologique.

L'allodynie est définie comme une réponse douloureuse à un stimulus non nocif et l'hyperalgésie comme une exacerbation de la réponse douloureuse à un stimulus nocif en comparaison avec la condition physiologique. Adaptée de (Lolignier et al., 2015)

La complexité de la douleur réside aussi dans le fait qu'en fonction de son origine, les mécanismes impliqués dans le développement de la douleur sont différents. On peut ainsi distinguer plusieurs grands types de douleur :

La douleur nociceptive :

C'est un signal d'alarme qui se développe suite à une stimulation nocive (c'est-à-dire susceptible d'engendrer une lésion tissulaire) périphérique des neurones sensoriels nocicepteurs par des stimuli thermiques (comme lors d'une brûlure), mécaniques (pique) ou chimiques (irritation). Elle ne résulte pas de lésions du système nerveux ou d'une réaction inflammatoire (Costigan et al., 2009). Afin de conserver son caractère protecteur la douleur nociceptive doit être suffisamment désagréable pour ne pas être ignorée. Cette douleur se maintient pendant la durée de la stimulation nocive.

La douleur inflammatoire :

Cette douleur apparaît suite à une lésion tissulaire qui engendre une réaction inflammatoire. Les cellules du système immunitaire vont libérer des médiateurs chimiques (cytokines, chimiokines, prostaglandines) formant un cocktail ou « soupe inflammatoire » pouvant modifier les réponses neuronales évoquées par la stimulation des terminaisons des neurones sensoriels en périphérie. Les douleurs inflammatoires cessent lorsque la lésion tissulaire est réparée (Costigan et al., 2009; Linley et al., 2010).

La douleur neuropathique :

Elle résulte d'une lésion du système nerveux périphérique ou central qui peut avoir une origine infectieuse, métabolique ou traumatique (Woolf and Mannion, 1999). La douleur neuropathique peut être associée à une allodynie ainsi qu'une hyperalgie (de même que la douleur inflammatoire, Costigan et al., 2009). Contrairement aux autres douleurs, la douleur neuropathique se distingue par l'apparition de douleurs spontanées sans stimulation des terminaisons sensorielles périphériques.

Les douleurs dysfonctionnelles :

Ce type de douleurs tout comme les douleurs psychogènes ne résulte pas d'inflammation ou de lésions physiques apparentes. De nombreux syndromes douloureux fréquemment retrouvés dans la population appartiennent à cette catégorie, comme les céphalées, la fibromyalgie ou encore le syndrome du côlon irritable. Bien qu'elles aient longtemps été considérées comme des douleurs psychogènes, plusieurs hypothèses physiopathologiques suggèrent qu'elles n'ont pas uniquement une origine psychologique. Par exemple, la fibromyalgie pourrait avoir pour origine un dysfonctionnement des mécanismes de la sensibilisation centrale (Voir II.6). Chez certains patients des lésions nerveuses sont apparentes laissant suggérer que certaines douleurs dysfonctionnelles pourraient constituer une sous-classe de douleurs neuropathiques (Bouhassira and Attal, 2012).

Les douleurs psychogènes:

Elles regroupent des douleurs sans lésions physiques apparentes mais sont attribuées à des facteurs psychologiques. Cette douleur ne peut pas être diagnostiquée chez le patient sur la base de l'étiologie de la douleur, il n'y a aucun symptôme ou signe objectif physique mais elle repose souvent sur un trouble psychopathologique (Bouhassira and Attal, 2012; Toda, 2007).

Même si elle est étudiée depuis des siècles, de par la complexité des circuits neuronaux impliqués et sa composante psychologique importante, certains mécanismes impliqués dans la transmission des informations nociceptives restent encore méconnus.

II. AFFERENCES PRIMAIRES A HAUT SEUIL D'ACTIVATION

1. PRESENTATION GENERALE DES NOCICEPTEURS

Les stimuli de fortes intensités pouvant potentiellement induire des lésions tissulaires, sont détectés par une sous population neuronale spécialisée appelée nocicepteurs. Ces fibres de petit diamètre sont glutamatergiques (De Biasi and Rustioni, 1988). Leur corps cellulaire est localisé dans les ganglions de la racine dorsale (Dorsal Root Ganglia, DRG) pour les fibres innervant le tronc et les membres ou dans le ganglion trigéminal pour les fibres innervant la face (Basbaum et al., 2009). Ces neurones possèdent une particularité morphologique : ils sont pseudo-unipolaires, possédant un seul axone qui se divise en une branche périphérique, qui n'est pas associée à un organe sensoriel mais qui forme une terminaison libre dans le derme, à proximité des kératinocytes, des cellules de Langherans ou des mélanocytes (Roudaut et al., 2012). L'autre branche, dite centrale va contacter les réseaux neuronaux de la moelle épinière impliqués dans l'intégration des informations nociceptives (Woolf and Ma, 2007). Contrairement aux neurones possédant des dendrites au sein desquelles l'environnement biochimique diffère de celui de l'axone, les protéines synthétisées dans le corps cellulaire des nocicepteurs sont distribuées de façon équivalente entre les deux branches dérivant du même axone. Cela implique que ces neurones sont capables de recevoir et d'envoyer des informations de façon similaire à chaque terminaison. Les deux terminaisons centrales et périphériques peuvent être ciblées par les mêmes molécules endogènes, comme les neurotransmetteurs, permettant ainsi une régulation de la sensibilité des nocicepteurs. Cependant seule la terminaison périphérique répondra aux stimuli de l'environnement (Basbaum et al., 2009).

Les nocicepteurs sont activés par des stimuli de fortes intensités, ce qui les différencie des autres neurones sensoriels activés par des stimuli de faible intensité et donc inoffensifs. Différentes classes de nocicepteurs coexistent, chaque classe répondant à un ensemble défini de stimuli thermiques, mécaniques et/ou chimiques. Les nocicepteurs se caractérisent en outre par leur propriété de sensibilisation qui est l'une des conséquences d'une lésion tissulaire ou d'une inflammation. Elle se définit comme étant une réduction de leur seuil d'activation et une augmentation de l'intensité de leur réponse à une stimulation nocive (Bessou and Perl, 1969).

2. LES FIBRES AFFERENTES A HAUT SEUIL

Il existe deux grandes classes de nocicepteurs capables de détecter et de répondre aux stimuli potentiellement dangereux pour l'individu: les afférences primaires de type A et les fibres C qui sont deux populations neuronales hétérogènes.

1. FIBRES A

1. FIBRES A δ

Ces fibres faiblement myélinisées et de diamètre moyen sont responsables de la première sensation de douleur qui est rapide aigüe et localisée. Leur vitesse de conduction de l'influx nerveux, se situe entre 5 et 30 m/s (Roudaut et al., 2012). Elles projettent vers les lamina I et V de la moelle épinière (Light and Perl, 1979). Deux grands types de fibres A δ ont été décrits (Treede et al., 1998).

Le **type I** innervant la peau glabre et poilue, est constitué de nocicepteurs mécaniques et thermiques (chaud), (AMH, Mechano and Heat sensitive A fiber nociceptor) répondant avec une adaptation lente (délai avant la décharge des fibres) à la fois aux stimuli mécaniques et thermiques. Les fibres A δ de type I possèdent un seuil d'activation modéré pour les stimuli mécaniques (<6 bar) et très élevé pour les stimuli thermiques (>53°C). Lors de stimulation thermique de 3s répétées toutes les 28s, la fréquence de décharge de ces fibres augmente graduellement ; elles se sensibilisent de sorte que leur seuil d'activation va s'abaisser (45°C) (Campbell et al., 1979; Ringkamp and Meyer, 2008; Treede et al., 1995). Dans la peau glabre ces fibres ont impliquées dans l'hyperalgésie générée par l'application d'un stimulus thermique de forte intensité et de manière plus générale sont impliquées dans la transmission des informations nociceptives lorsque le stimulus thermique est de longue durée (Meyer and Campbell, 1981; Treede et al., 1998). Ces fibres sont de plus impliquées dans la première sensation douloureuse suite à une stimulation mécanique (Treede et al., 1998).

Les fibres de **type II** ont un seuil d'activation thermique plus bas que les fibres de type I (>46°C). Pour la majorité, les fibres A δ de type II présentent un seuil d'activation qui est très élevé pour les stimuli mécaniques, voire une absence de réponse à ces mêmes stimuli mécaniques (Basbaum et al., 2009; Ringkamp and Meyer, 2008). Ce type de fibre sera davantage impliqué dans la première sensation de douleur suite à une stimulation thermique chaude (Treede et al., 1998).

Enfin, une proportion des fibres A δ innervant la peau poilue est activée par des stimuli mécaniques et nocifs froids (AMC, High threshold mechanically sensitive cold fibers, Cain et al., 2001).

2. FIBRES A β

Les fibres A β sont des fibres fortement myélinisées de gros diamètre, essentiellement impliquées dans la transmission des informations tactiles. Bien que peu décrites dans la littérature comme pouvant être considérés comme des nocicepteurs, certaines fibres A β pourraient présenter des réponses sensiblement voisines de celles des fibres A δ de type I (18 à 65 % des nocicepteurs de

types A selon les espèces). Par conséquent ces fibres pourraient donc être impliquées dans la première sensation de douleur (Djoughri and Lawson, 2004).

2. FIBRES C

Ces fibres amyéliniques de petit diamètre ont un rôle dans la deuxième sensation douloureuse qui est lente, diffuse et persistante. Etant non myélinisées, leur vitesse de conduction est plus lente que celle des fibres A, (entre 0.5 et 2 m/s Roudaut et al., 2012). Au sein de cette population de nocicepteurs, la plupart des afférences sont polymodales (Bessou and Perl, 1969; Dubin and Patapoutian, 2010; Schepers and Ringkamp, 2010) répondant aussi bien aux stimuli mécaniques que thermiques (chauds et froids) et chimiques. Ces fibres polymodales incluent des fibres sensibles aux stimuli mécaniques ou thermiques (chaud) (CMH, C-Mechano-Heat fibers), des fibres uniquement sensibles aux stimuli mécaniques (CM, C-Mechanical fibers), et des fibres uniquement activées par des stimuli thermiques (chaud) (CH, C-Heat fibers). Certaines afférences appelées nocicepteurs silencieux (C-M_iH_i, C-Mechano-Heat insensitive fibers) ont quant à elles un seuil d'activation élevé pour la chaleur et sont insensibles aux stimuli mécaniques. Étonnement en condition inflammatoire ces mêmes fibres s'activent en réponse à une stimulation mécanique et présentent un seuil de sensibilité aux stimuli thermiques (chaud) abaissé (Schmidt et al., 1995).

Les fibres C sont également hétérogènes de par les marqueurs moléculaires qu'elles expriment, permettant de les classer en deux grandes catégories : les fibres peptidergiques et non peptidergiques. Ces deux classes de fibres se distinguent entre autre par le fait que seules les fibres C non peptidergiques lient l'isolectine B4 (IB4, **Figure 2**, Fang et al., 2006).

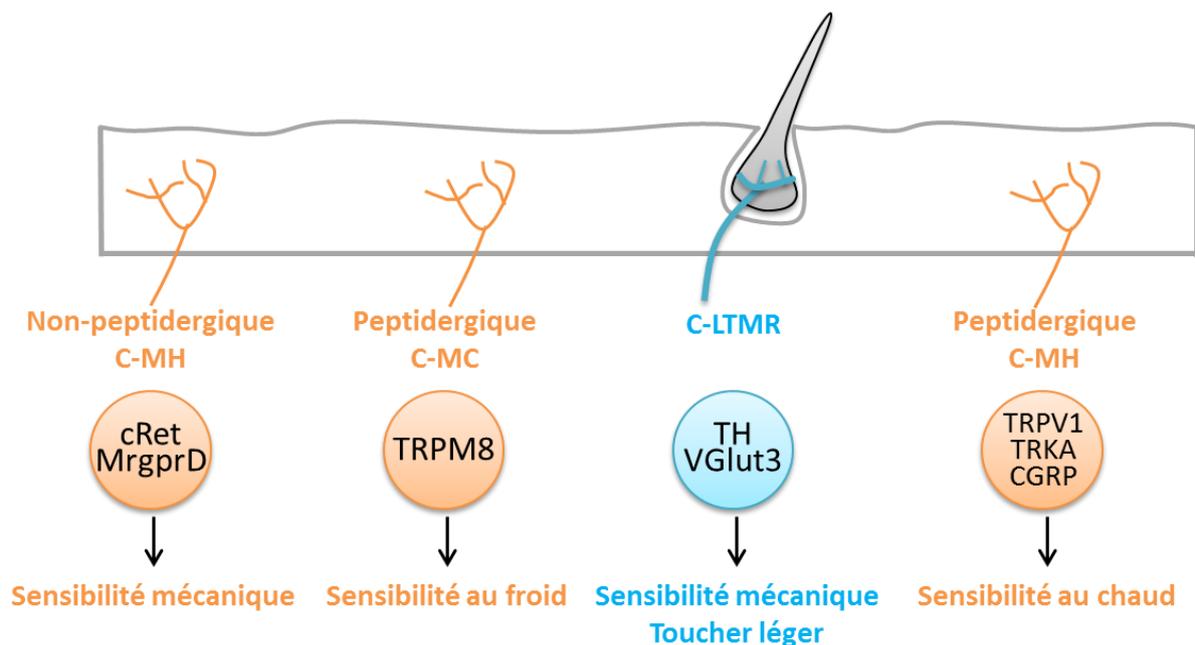
1. LES FIBRES C PEPTIDERGIQUES

Ces fibres représentent la moitié des nocicepteurs de type C. Elles projettent vers les laminae I et II externe (Molliver et al., 1995, voir également II.4) expriment le récepteur TrkA (Tropomyosin receptor kinase A) qui lie avec une grande affinité le NGF (Nerve Growth Factor), indispensable à la survie des neurones sensoriels de petits diamètres au cours du développement (Silos-Santiago et al., 1995). Ces nocicepteurs expriment à leur terminaison spinale plusieurs neuropeptides dont le CGRP (Calcitonin-Gen Related Peptide), la substance P (ces neuropeptides sont également exprimés par 30% des fibres A δ qui projettent dans la lamina II externe, McCarthy and Lawson, 1990; Todd, 2010) ainsi que la neurokinine A, dont la libération est augmentée lors d'un stimulus nociceptif ou en cas d'inflammation (Dalsgaard et al., 1985; De Koninck and Henry, 1991; Morton and Hutchison, 1989).

2. LES FIBRES C NON PEPTIDERGIQUES

Ces fibres sont caractérisées par l'expression du récepteur c-RET, qui lie de façon spécifique le GDNF (Glial cell-line derived neurotrophic factor, Molliver et al., 1997).

Elles expriment également les récepteurs couplés aux protéines G appartenant à la famille des Mrgpr (Mas related G Protein coupled receptors) MrgprA et MrgprD. Au sein de cette population de fibres, seule la sous population exprimant MrgprD (75 % des fibres IB4⁺, Dong et al., 2001; Zylka et al., 2003) exprime également un sous type spécifique de récepteur purinergique : le P2X₃ (Dong et al., 2001; Lewis et al., 1995). Ces fibres projettent plus spécifiquement dans la lamina II interne de la moelle épinière (Molliver et al., 1995). Il est à noter que, au cours du développement embryonnaire, ces fibres expriment le récepteur TrkA et leur survie au cours du développement dépend donc de la présence du NGF.



· Figure 2 : Classification des fibres C à haut et bas seuil

Les fibres C à haut seuil (orange) sont des fibres nociceptives qui possèdent une terminaison périphérique libre innervant la peau et détectent divers stimuli sensoriels. Les mécanorécepteurs C à bas seuil (bas) innervent les follicules pileux et détectent le toucher léger. Adaptée de (Lechner, 2017).

3. TERMINAISONS CENTRALES DES AFFÉRENCES PRIMAIRES SENSORIELLES NOCICEPTIVES

Dans la corne dorsale de la moelle épinière, les afférences primaires peuvent à leur terminaison centrale former des synapses axodendritiques ainsi que des synapses axosomatiques avec les interneurons spinaux (Ribeiro-da-Silva and De Koninck, 2008). Cependant, une partie des fibres nociceptives forme avec les interneurons locaux des structures complexes appelés glomérules synaptiques (Ribeiro-da-Silva and Coimbra, 1982).

Les glomérules sont composés d'une terminaison centrale appelée core (C) avec des vésicules synaptiques rondes ; cette terminaison centrale est entourée de nombreux (quatre au minimum) neurones (dendrites ou boutons axonaux), et plusieurs contacts synaptiques peuvent être observés entre la terminaison centrale et les neurones spinaux (Ribeiro-Da-Silva, 2015). Cette structure permet la transmission de l'information sensorielle des afférences primaires à plusieurs interneurones de la corne dorsale. Les glomérules constituent donc un élément central dans l'intégration des informations synaptiques dans la moelle épinière.

Au sein des glomérules, la communication est fréquemment bidirectionnelle, permettant à la fois un transfert des informations de l'afférence primaire vers les interneurones spinaux, mais également un contrôle présynaptique de l'afférence primaire par les interneurones. Deux types de glomérules ont été décrits chez le rat : le **type I** et le **type II (Figure 3, Ribeiro-da-Silva and Coimbra, 1982)**. Le type I qui représente 73.5% de la totalité des glomérules, est composé d'un bouton C assez petit et est reconnaissable à son contour festonné et sa faible densité de mitochondries. A l'inverse les glomérules de type II ne représentent que 25,7% des glomérules, ils sont larges avec une terminaison centrale au contour arrondi et une densité de mitochondries plus importante (Ribeiro-da-Silva and Coimbra, 1982).

Les glomérules de **type I** sont localisés dans la lamina II de la moelle épinière et se divisent en deux sous types Ia et Ib (Ribeiro-da-Silva and Coimbra, 1982). Les glomérules de types Ia sont formés par des fibres nociceptives non myélinisées non peptidergiques IB4⁺. Ils permettent une communication complexe et bidirectionnelle entre les afférences primaires et interneurones spinaux (la terminaison centrale étant à la fois pré- et post-synaptique aux interneurones spinaux). A l'inverse des glomérules, de type Ia les glomérules de type Ib engagent en leur centre, une terminaison peptidergique IB4⁻ avec des vésicules immunopositives pour le CGRP, la substance P, ou la somatostatine (Ribeiro-da-Silva, 1995). Seules 20% des fibres peptidergiques de petit diamètre forment les glomérules de type Ib, de fait la majorité de ces fibres ne forment pas de glomérules dans la moelle épinière. De plus, les glomérules de type Ib ne permettent la transmission des informations synaptiques que de l'afférence primaire vers les interneurones spinaux (la terminaison centrale étant toujours pré-synaptique aux interneurones spinaux, Ribeiro-Da-Silva, 2015).

Les glomérules de **type II** sont formés par des fibres non nociceptives et sont localisés dans la lamina II_v ventrale et dorsale ainsi que dans la lamina III. Ces glomérules sont eux aussi subdivisés en deux classes IIa et IIb. Ils se différencient par la présence de faisceaux de neurofilaments dans le core pour les glomérules IIb.

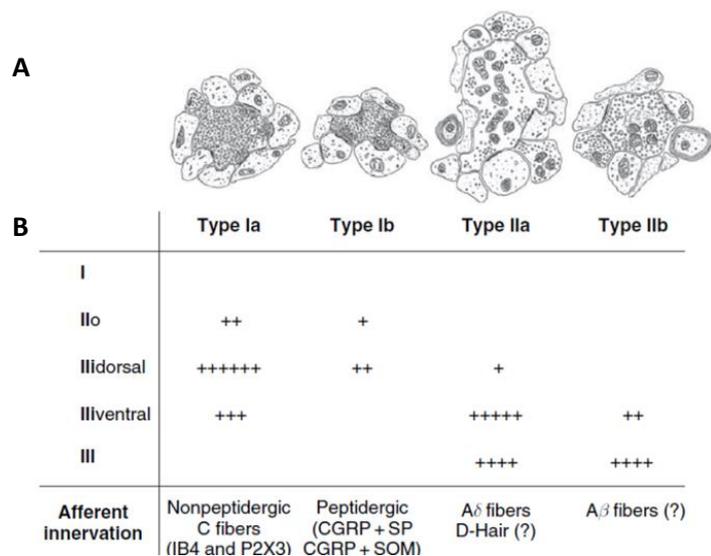


Figure 3 : Différents glomérules synaptiques de la corne dorsale de la moelle épinière chez le rat.

A. Schémas représentatifs des différents types de glomérules réalisés à partir d'observations en microscopie électronique.

B. Prévalence semi quantitative des différents types de glomérules dans les laminae I, II et III. (Ribeiro-da-Silva and De Koninck, 2008).

4. INTEGRATIONS DES INFORMATIONS NOCICEPTIVES

1. ORGANISATION DE LA CORNE DORSALE DE LA MOELLE EPINIERE

La substance grise de la moelle épinière se divise en dix couches ou laminae de Rexed définies sur des bases cyto-architectoniques (Rexed, 1952). Les laminae de I à VI composent la corne dorsale de la moelle épinière, région essentielle à l'intégration des informations sensorielles. Les couches les plus superficielles (laminae I et II) constituent le premier relais d'intégration des informations nociceptives puisque les afférences primaires nociceptives projettent dans cette zone (laminae I et II pour les fibres C, et laminae I et V pour les fibres A δ). La grande majorité des neurones présents dans la corne dorsale sont des interneurons locaux qui contactent uniquement des neurones localisés dans la moelle épinière (Ribeiro-da-Silva and De Koninck, 2008).

Les informations nociceptives étant majoritairement intégrées par les laminae I et II qui constituent donc le premier relai d'intégration de ces informations, nous avons choisi dans cette partie de nous intéresser plus particulièrement à la description de ces deux couches superficielles.

1. LAMINA I

Appelée zone marginale, cette couche est la plus superficielle de la moelle épinière et également la plus fine (30-40 μ m). Elle joue un rôle important dans le traitement des informations sensorielles nociceptives et thermiques puisque c'est à ce niveau que projette l'essentiel des fibres

A δ et C (Craig, 2000). Une partie de la population neuronale de cette lamina, les neurones de projection, transmettent les informations nociceptives au tronc cérébral (substance grise périaqueducule, noyau parabrachial, Almarestani et al., 2007) et au cerveau (Burstein et al., 1987, dont 9% projetant vers le thalamus, Yu et al., 2005).

Cette lamina se compose de quatre types neuronaux définis chez le rat selon leur morphologie : fusiforme, pyramidal, multipolaire et aplanis (**Figure 4**), ces derniers étant fréquemment regroupés dans la catégorie des neurones multipolaires (Lima and Coimbra, 1983, 1986; Zhang and Craig, 1997). Une corrélation a pu être établie entre la morphologie de ces cellules, leur rôle fonctionnel ainsi que leurs caractéristiques électrophysiologiques. Ces cellules se différencient également par l'expression de marqueurs moléculaires spécifiques.

Les neurones fusiformes appelées également neurones Nociceptifs-Spécifiques (NS) sont activés par des stimuli nociceptifs thermiques (chaleur) ou mécaniques (type pincements de la peau). Les neurones fusiformes contactés par les fibres A δ répondent de façon tonique à une stimulation mécanique nocive maintenue (Han et al., 1998). Ces cellules peuvent exprimer la dynorphine et le GABA (Lima et al., 1993).

Les neurones multipolaires sont des neurones polymodaux appelés Polymodal Nociceptive (HPC, pour Heat, Pinch and Cold). Ils répondent aux stimulations thermiques nociceptives (chaleur et froid) ainsi qu'aux pincements. Les cellules HPC reçoivent des informations en provenance des fibres C. Elles présentent une décharge phasique, répondant aux stimuli par un unique potentiel d'action retardé (Craig, 2000; Prescott and Koninck, 2002). Ces neurones et notamment les neurones aplanis, peuvent exprimer la dynorphine, la substance P et le GABA (Lima et al., 1993). Bien que la majorité de ces cellules soit de petit ou moyen diamètre, un faible pourcentage de ces cellules sont dites « géantes » de par leur soma et leur importante arborisation dendritique s'étendant sur l'axe médiolatéral (Puskár et al., 2001).

La majorité des cellules de la lamina I n'étendent pas leur arborisation dendritique au-delà de la lamina I (Yu et al., 2005).

Les neurones pyramidaux ou thermoreceptive specific (COLD) sont sensibles aux stimuli thermiques (froid) non nocifs (Craig and Kniffki, 1985; Han et al., 1998). Les neurones pyramidaux peuvent exprimer la dynorphine et des enképhalines (Lima et al., 1993).

La lamina I étant la zone où projettent les fibres nociceptives peptidergiques C et A δ qui libèrent la substance P, les neurones de cette lamina peuvent aussi se différencier en fonction de l'expression ou non de son récepteur, le récepteur NK1. Seuls 5% des neurones pyramidaux situés

dans les élargissements lombaires et cervicaux de la moelle épinière expriment le récepteur NK1 (Yu et al., 1999; Zhang and Craig, 1997; Zhang et al., 1996), ce qui est en accord avec leur rôle dans la transmission des informations thermiques non nocives. En effet la substance P agit de façon préférentielle sur les neurones impliqués dans la transmission des informations nociceptives (Henry, 1976). Le récepteur NK1 s'exprime majoritairement dans les neurones multipolaires et fusiformes (Yu et al., 1999, 2005).

60 à 80% des neurones de projection expriment le récepteur NK1 (Yu et al., 1999, 2005), cependant seulement 49% des neurones NK1 positifs sont des neurones de projection (Yu et al., 2005). Les cellules « géantes » qui n'expriment pas NK1 représentent quant à elles 2 à 3% des neurones de projection (Todd, 2010).

Un grand nombre de neurones de la corne dorsale sont glutamatergiques. Néanmoins il n'existe pas de marqueurs permettant de marquer par immunocytochimie les corps cellulaires des neurones exprimant le glutamate. On considère donc indirectement que les neurones n'exprimant ni le GABA ni la glycine sont glutamatergiques (Ottersen and Storm-Mathisen, 1984). Il est tout de même possible de visualiser les axones des neurones exprimant le glutamate en révélant la présence du transporteur vésiculaire au glutamate 2 (VGLut2), ce qui a permis de déterminer que les neurones exprimant la somatostatine, la substance P ou la neurotensine sont positifs pour le glutamate (Todd et al., 2003). De même, bien qu'il n'y ait pas de preuves immunocytochimiques directes, il est néanmoins probable que les neurones de projection de la lamina I soient glutamatergiques. Des expériences d'hybridation in situ seraient cependant nécessaires pour confirmer la présence de transporteurs au glutamate sur les neurones de projection (Ribeiro-da-Silva and De Koninck, 2008).

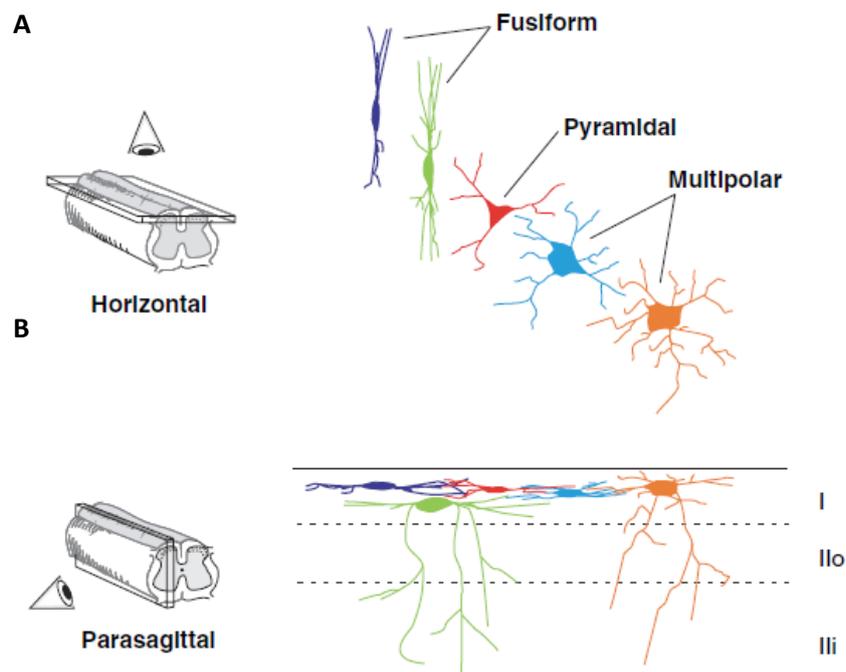


Figure 4 : Morphologie des neurones de la lamina I de la moelle épinière.

A. Représentation schématique des différents types cellulaires présents dans la lamina I de la moelle épinière.

B. Représentation schématique de l'organisation des neurones de la lamina I dans le plan parasagittal (Ribeiro-da-Silva and De Koninck, 2008).

2. LAMINA II

La lamina II ou substance gélatineuse est une zone de projection des afférences primaires nociceptives (Light and Perl, 1979), elle est également impliquée dans la modulation des informations sensorielles thermiques et mécaniques non nocives transmises par les fibres A δ et C à bas seuil d'activation (voir III) jusque dans cette lamina (Light and Perl, 1979; Melzack and Wall, 1965; Ribeiro-da-Silva and De Koninck, 2008). C'est une région hétérogène sur le plan structural et fonctionnel. Elle se divise en lamina II externe (lamina II_e) et interne (lamina II_i) qui se composent, contrairement à la lamina I, exclusivement d'interneurones excitateurs et inhibiteurs de petit diamètre (Pan and Pan, 2004). Les neurones localisés dans la lamina II_e sont activés par des stimuli nociceptifs ainsi que par des stimuli thermiques non nocifs. Les interneurones de la lamina II_i sont activés par des stimulations non nocives mécaniques (Light and Willcockson, 1999).

1. CLASSIFICATION MORPHOLOGIQUE DES CELLULES DE LA LAMINA II

L'étude de Grudt et Perl en 2002 a mis en évidence cinq types neuronaux de morphologies cellulaires différentes au sein de la lamina II. Les cellules islet et centrales étendent leur arborisation

dendritique dans le plan rostrocaudal. Les cellules médio-latérales ont une arborisation dendritique beaucoup plus étendue que les autres cellules en médiolatéral et en dorsoventral jusque dans les laminae I et III. Enfin, les cellules radiales et verticales ont une arborisation dendritique plus étendue en dorsoventral (**Figure 5**).

Les interneurones islet, sont des cellules reconnaissables morphologiquement de par leur longue extension dendritique dans le plan rostrocaudal (jusqu'à 1mm, Melnick, 2008). Ce sont des cellules inhibitrices exprimant le GABA (Gobel et al., 1980; Todd and McKenzie, 1989) pouvant également exprimer la glycine et la parvalbumine (Hughes et al., 2012; Todd and Sullivan, 1990). Les islet impliquées dans la modulation et l'intégration des informations nociceptives vont être localisées préférentiellement dans la lamina II_e, alors que les cellules islet impliquées dans la transmission des informations mécaniques de bas seuil sont localisées dans la lamina II_i (Bennett et al., 1980; Gobel et al., 1980). Bien que ces cellules présentent des propriétés électrophysiologiques différentes selon leur localisation au sein de la lamina II, elles se caractérisent par une décharge neuronale tonique, un potentiel de repos inférieur (de 10mV) à celui des autres populations cellulaires de la lamina II, un courant cationique I_h ainsi que des courants post synaptiques inhibiteurs et excitateurs spontanés (Grudt and Perl, 2002).

Les interneurones médiolatéraux sont moins décrits dans la littérature. Ces neurones sont caractérisés par la présence de courants potassiques à bas seuil I_A (Grudt and Perl, 2002).

Les interneurones radiaux sont localisés préférentiellement à la limite entre les laminae II_e et II_i avec des dendrites projetant dans toutes les directions leur donnant leur nom de radial. Certains ont une arborisation compacte, ils sont glutamatergiques et développent un courant potassique de type I_A ayant pour conséquence une décharge neuronale différée par rapport au début de la dépolarisation. Cependant on peut également distinguer une population cellulaire possédant des dendrites beaucoup plus longs et qui elle sera GABAergique (Grudt and Perl, 2002; Maxwell et al., 2007; Yasaka et al., 2010a).

Les interneurones centraux ont leur corps cellulaires situés en majorité au sein de la lamina II_i. Leurs dendrites se trouvent en grande majorité dans la lamina II_i, indiquant que leurs contacts synaptiques se feront de manière privilégiée dans cette zone. Leur arborisation axonale peut traverser une partie de la corne dorsale, projetant aussi bien dans la lamina I que dans la partie superficielle de la lamina III (Grudt and Perl, 2002; Yasaka et al., 2010a). Ce n'est pas une population homogène puisqu'il est possible de distinguer une population d'interneurones glutamatergiques ainsi qu'une population GABAergique (Maxwell et al., 2007; Todd and McKenzie, 1989; Yasaka et al., 2010a). D'un point de vue fonctionnel, deux groupes cellulaires émergent en fonction de leur pattern de décharge. Le

premier groupe est constitué de neurones toniques, le deuxième de neurones présentant une décharge à adaptation rapide suite à une dépolarisation. Les cellules centrales transitoires sont divisées en deux sous populations par la présence ou l'absence du courant I_A .

Les interneurons verticaux sont situés pour la majorité d'entre eux dans la lamina II_e , les autres corps cellulaires se trouvant à la limite entre la lamina II_e et la lamina II_i ou dans la partie la plus superficielle de la lamina II_i . Leurs dendrites s'étendent de la lamina I à la lamina III pour les interneurons excitateurs alors qu'ils restent confinés dans la lamina II pour les neurones inhibiteurs (Grudt and Perl, 2002; Maxwell et al., 2007). Tout comme les interneurons centraux, ces neurones peuvent être soit excitateurs (la grande majorité) soit inhibiteurs (Maxwell et al., 2007; Yasaka et al., 2010a). C'est une population composée de neurones qui présente une grande variété de pattern de décharge. Une partie des cellules décharge de façon régulière durant toute la durée de stimulation, l'autre partie décharge de façon différée avec un pattern plus ou moins régulier.

Afin d'établir une classification plus robuste des différents types neuronaux composant la lamina II, des études immunohistochimiques ont conduit à caractériser les différents marqueurs cellulaires exprimés par ces neurones.

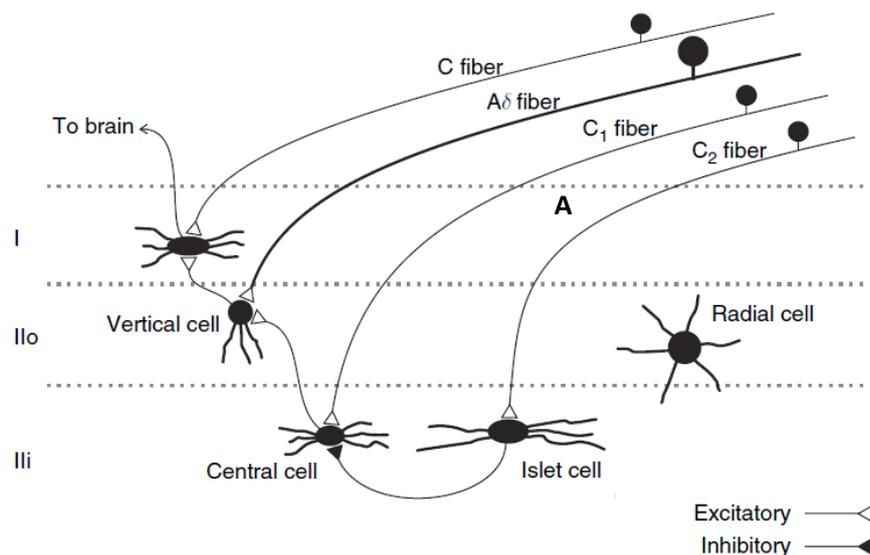


Figure 5 : Représentation schématique de l'organisation des neurones de la lamina II.

A. Les études de Lu et Perl (2003 ;2005) ont permis d'identifier quatre populations cellulaires de morphologies caractéristiques ainsi que les principales connexions que ces cellules établissent entre elles ou avec les fibres nociceptives (Lu and Perl, 2003, 2005).

2. CLASSIFICATION « NEUROCHIMIQUES » DES NEURONES DE LA LAMINA II

A) LE GLUTAMATE ET SES RECEPTEURS

Comme précédemment expliqué pour la lamina I, il n'y a pas de preuves immunohistochimiques directes de l'expression de glutamate par les cellules néanmoins il est possible de révéler la présence du transporteur vésiculaire au glutamate VGLUT2 par les neurones. On considère donc indirectement que les neurones n'exprimant ni le GABA ni la glycine sont glutamatergiques (Ottersen and Storm-Mathisen, 1984).

Concernant les récepteurs au glutamate, les récepteurs ionotropiques AMPA (α -amino-3-hydroxy-5-méthyl-4-isoxazolepropionique acid) et NMDA (N-méthyl-D-aspartate) sont exprimés à la fois par les neurones inhibiteurs et excitateurs (Kerr et al., 1998; Tölle et al., 1993). Les récepteurs métabotropiques et plus particulièrement le récepteur mGluR5 sont également exprimés dans les neurones de la lamina II (Jia et al., 1999).

B) LES NEUROTRANSMETTEURS INHIBITEURS ET LEURS RECEPTEURS

Les neurones GABAergiques représentent 30% de la population neuronale (Polgár et al., 2003) et sont majoritairement des cellules islet. Ces neurones vont participer à l'inhibition au sein des réseaux de la corne dorsale. Ils inhibent également de façon présynaptique les informations transmises par les afférences primaires. Le récepteur GABA_A, récepteur ionotropique du GABA, est ubiquitaire dans la corne dorsale de la moelle épinière (Persohn et al., 1991) et est localisé sur les dendrites et corps cellulaires des interneurons (Alvarez et al., 1996). Le récepteur GABA_B est préférentiellement situé dans les laminae superficielles de la corne dorsale (laminae I et II, Margeta-Mitrovic et al., 1999) dans les corps cellulaires neuronaux.

Les neurones qui expriment la glycine, le deuxième neurotransmetteur inhibiteur, représentent 14 % de la population neuronale de la lamina II (Todd and Sullivan, 1990). Tous les interneurons exprimant la glycine sont également positifs pour le GABA. En effet plusieurs études ont démontré la co-libération par les synapses inhibitrices de vésicules contenant à la fois du GABA et de la glycine (Chéry and De Koninck, 1999; O'Brien and Berger, 1999). Cependant, seule la moitié des neurones GABAergiques libèrent également de la glycine (Todd and Sullivan, 1990). Les terminaisons exprimant à la fois la glycine et le GABA sont, dans la corne dorsale, pour la grande majorité présynaptiques aux dendrites et corps cellulaires des interneurons des réseaux neuronaux locaux. Dans la lamina II, ces terminaisons peuvent également être présynaptiques aux afférences primaires sensorielles (glomeruli type II, Todd, 1996). Les récepteurs glycinergiques ionotropiques sont spécifiquement exprimés dans les trois laminae les plus superficielles de la corne dorsale

(Mitchell et al., 1993). L'une des sous-unités du récepteur (GlyR $\alpha 3$) est spécifiquement localisée dans la lamina II (Harvey et al., 2004).

La population des interneurons GABAergiques est particulièrement complexe et hétérogène puisque l'on peut distinguer plusieurs populations neuronales en fonction des molécules qu'elles co-expriment. Ces neurones peuvent co-exprimer ou non la glycine. Les neurones exprimant la glycine sont positifs soit pour la parvalbumine soit pour l'Oxyde Nitrique Synthase (nNOS, neuronal nitric oxyde synthase), les neurones qui n'expriment pas la glycine pour leur part expriment soit le neuropeptide P, l'enkephaline, la nNOS ou l'acétylcholine et la nNOS (**Figure 6**, Hantman et al., 2004; Polgár et al., 2013; Yasaka et al., 2010a).

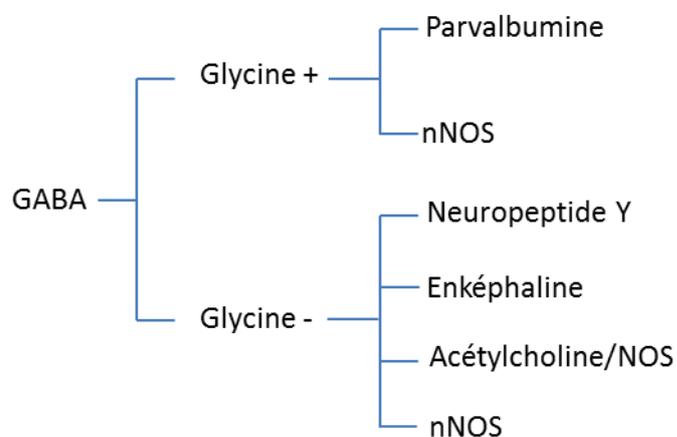


Figure 6 : Classification neurochimique des interneurons GABAergiques de la lamina II.

Cette classification rend compte de la diversité et de l'hétérogénéité des interneurons GABAergiques en fonction des molécules qu'ils co-expriment.

3. NEUROKININES ET NEUROPEPTIDES

La **substance P**, libérée par les fibres C peptidergiques, est également exprimée par les neurones VGlut2 spinaux positifs et donc glutamatergiques (Ribeiro-da-Silva et al., 1991). Ces mêmes neurones peuvent également exprimer la **neurokinine A** (NKA). La troisième neurokinine, la **neurokinine B**, qui contrairement aux deux autres n'est pas exprimée par les afférences primaires (Ogawa et al., 1985) est principalement retrouvée dans les axones dans les laminae les plus superficielles. La substance P est également exprimée dans les corps cellulaires et dans les dendrites au niveau de la lamina II_i. Ces trois neurokinines sont impliquées dans la modulation de la transmission des informations nociceptives dans la corne dorsale (McLeod et al., 2000).

La **somatostatine** est un peptide libéré, suite à une stimulation nociceptive, par les neurones de la corne dorsale de la moelle épinière. Les corps cellulaires positifs à la somatostatine sont localisés majoritairement dans la lamina II et sont glutamatergiques puisqu'ils expriment également

VGlut2 (Todd et al., 2003). Ces neurones sont impliqués dans la transmission des informations nociceptives mécaniques mais pas des informations thermiques (Duan et al., 2014). Les récepteurs à la somatostatine sont localisés dans les laminae superficielles et notamment le récepteur sst2a (Somatostatin receptor 2a) dont l'expression est restreinte aux neurones GABAergiques dans la lamina II (Todd et al., 1998).

La **dynorphine** est un peptide appartenant à la famille des opioïdes exprimé par les neurones majoritairement GABAergiques (80%) dans la lamina II_e (Cho and Basbaum, 1989; Sardella et al., 2011). Ces neurones s'activent lors d'une stimulation nociceptive qu'elle soit mécanique ou thermique (Polgár et al., 2013). Les neurones inhibiteurs positifs pour la dynorphine expriment aussi la **galanine** qui est un peptide impliqué dans la régulation de l'activité des neurones de la corne dorsale de la moelle épinière (Tiong et al., 2011).

4. AUTRE MARQUEURS

L'**isoforme γ de la protéine kinase C (PKC γ)** a été identifié dans une population neuronale spécifique dans les laminae II_i et III, dans des neurones somatostatine positifs n'exprimant pas le GABA (Malmberg et al., 1997; Polgár et al., 1999). Les neurones PKC γ + constituent un tiers de l'ensemble des neurones présents dans la lamina II_i (Peirs et al., 2014). Cette enzyme n'est pas impliquée dans la transmission des informations nociceptives, mais est impliquée dans le mécanisme d'allodynie mécanique qui se développe suite à une section partielle du nerf sciatique (Malmberg et al., 1997; Miraucourt et al., 2007; Petitjean et al., 2015).

La **calbindine** et la **calrétinine** sont deux protéines qui lient le calcium et sont donc impliquées dans sa signalisation. Elles sont exprimées dans tout le système nerveux et notamment dans la lamina I et II de la corne dorsale de la moelle épinière. Les neurones à calrétinine sont plus abondants dans la lamina I, et ces deux protéines peuvent être co-exprimées par les neurones de la lamina II (Rogers, 1987). Les neurones à calrétinine ont été décrits comme étant glutamatergiques (Albuquerque et al., 1999), mais une étude plus récente a également démontré leur expression dans une population d'interneurones GABAergiques (Huang et al., 2010).

5. TRANSMISSION DU SIGNAL NOCICEPTIF

1. THEORIE DE LA SPECIFICITE DES VOIES TRANSMETTANT LE SIGNAL NOCICEPTIF

Afin d'induire une réponse comportementale appropriée, les informations sensorielles sont transmises par des voies spécifiques à chaque type de stimulus qui est transmis. (Ma, 2010).

En effet, les sensations thermiques nocives chaudes ou froides sont transmises par des afférences primaires différentes.

Par exemple si les afférences primaires exprimant le MrgprD sont spécifiquement supprimées, la sensibilité des animaux à une stimulation thermique restera inchangée. A l'inverse ils n'auront plus de réponse mécanique appropriée (Caterina et al., 1997). De même si les fibres exprimant le canal TRPV1 (Transient receptor potential, subfamily V, member 1, s'activant spécifiquement suite à une stimulation thermique nocive chaude) sont supprimées, les animaux perdent leur sensibilité pour les stimuli thermiques nocifs (chaleur), mais conservent cependant une sensibilité mécanique et thermique au froid (Cavanaugh et al., 2009; Mishra and Hoon, 2010). Ces études démontrent une spécificité du comportement provoqué par l'activation d'une population spécifique des nocicepteurs. Cependant les nocicepteurs (fibres C et A) sont pour la plupart polymodaux et peuvent s'activer pour des modalités sensorielles différentes (mécanique, thermique, chimique). Ceci implique qu'au sein des laminae superficielles de la corne dorsale, ce sont les réseaux neuronaux qui permettent un encodage des informations nociceptives et la production d'une réponse comportementale adaptée au stimulus détecté par les nocicepteurs. De plus, ces mêmes réseaux ne restent pas figés, il y a une importante plasticité qui peut se mettre en place en cas de douleur et plus particulièrement en cas de douleur chronique. Les voies qui transmettent spécifiquement les informations sensorielles sont donc susceptibles d'être modifiées ce qui rend l'étude des réseaux de la corne dorsale de la moelle épinière très complexe. Il n'est pour l'instant pas possible de définir pour chaque modalité sensorielle les réseaux transmettant l'information aux centres supra spinaux (Basbaum et al., 2009).

2. CONNECTIONS NEURONALES DANS LA LAMINA I

Bien que complexes, il est tout de même possible de définir certains réseaux neuronaux entre les nocicepteurs et les neurones de la corne dorsale impliqués dans la transmission des informations nociceptives.

Au sein de la lamina I, des contacts synaptiques directs entre les afférences sensorielles primaires et les neurones s'établissent. Les neurones « géants » appartenant aux neurones de projection ne reçoivent que peu de contacts directs des afférences primaires, la majorité des contacts synaptiques provenant des interneurones excitateurs et inhibiteurs.

L'implication des neurones géants dans la transmission des stimuli nocifs se fait donc au travers des contacts établis avec les interneurones excitateurs (Puskár et al., 2001). Ces neurones reçoivent également une innervation inhibitrice des interneurones GABAergiques exprimant la nNOS localisés dans la lamina II (Puskár et al., 2001). Les neurones de projection exprimant le NK1 reçoivent une

innervation des nocicepteurs peptidergiques exprimant la substance P (Todd et al., 2002), ils reçoivent également une innervation des cellules verticales glutamatergiques ainsi que des cellules centrales glutamatergiques de la lamina II (Lu and Perl, 2005). Une partie des autres neurones de projection reçoit directement des informations transmises par les nocicepteurs A δ (Grudt and Perl, 2002).

3. CONNECTIONS NEURONALES DANS LA LAMINA II

A l'aide d'approches électrophysiologiques il a été possible de définir des connections au sein de la lamina II entre les afférences primaires et les interneurones locaux. Les fibres C innervent de façon monosynaptique préférentiellement les cellules centrales et les cellules islet (Lu and Perl, 2005; Yasaka et al., 2007), alors que les cellules verticales et radiales reçoivent des informations des fibres C et A δ . Les fibres C exprimant les récepteurs TRPA1 (Transient receptor potential, subfamily A, member 1, récepteur pour les stimuli thermiques froids) et TRPV1 sont présynaptiques aux cellules verticales et radiales mais pas aux cellules centrales et islet (Uta et al., 2010). Au sein même de la lamina II les interneurones forment des connections synaptiques entre eux. Les cellules islet forment des synapses GABAergiques sur les cellules centrales et ces interneurones vont quant à eux former des synapses glutamatergiques sur les cellules verticales (**Figure 7**, Lu and Perl, 2003, 2005).

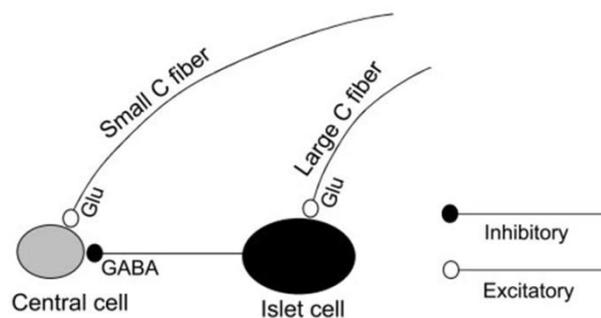


Figure 7 : Représentation schématique des connexions inhibitrices entre les cellules islet et centrales dans la lamina II.

Les cellules islet forment des contacts GABAergiques avec les cellules centrales. Les deux types cellulaires sont contactés par les fibres C aux propriétés électrophysiologiques différentes (Lu and Perl, 2005).

Dans la corne dorsale, des afférences primaires reçoivent une innervation par les interneurones. En effet l'activité de ces afférences est régulée par une inhibition pré synaptique qui s'exerce à leur terminaison (**Figure 8**).

Des boutons synaptiques contenant du GABA et de la glycine sont retrouvés en présynaptique des fibres A δ alors que les boutons pré synaptiques des fibres C ne contiennent que du GABA, indiquant que les interneurones innervant les nocicepteurs sont différents (Todd, 1996).

Les circuits neuronaux identifiés mettant en jeu les neurones à somatostatine et exprimant la PKC γ seront présentés dans la partie III.7.1.

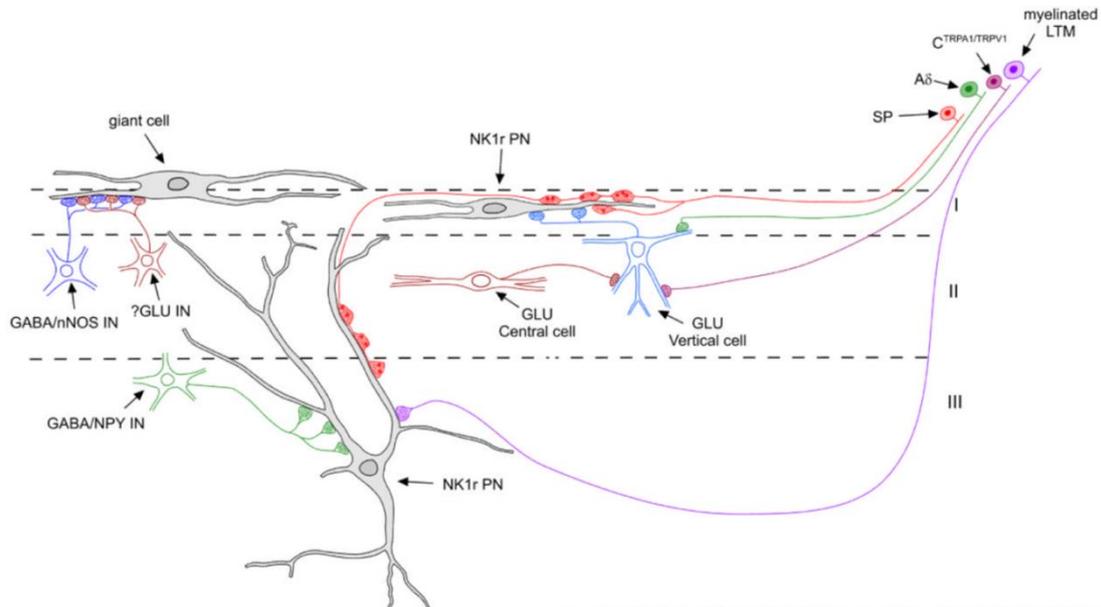


Figure 8 : Représentation schématique des connexions identifiées dans les laminae superficielles de la moelle épinière.

Les neurones de projection de la lamina I exprimant NK1 reçoivent une innervation dense provenant des afférences primaires exprimant la substance P. Les neurones NK1 reçoivent aussi des informations provenant des cellules verticales innervées par les cellules centrales et par les fibres C (Todd, 2010).

4. VOIES ASCENDANTES DE LA MOELLE EPINIÈRE AU CERVEAU

Suite à l'intégration des informations sensorielles dans la corne dorsale de la moelle épinière, les neurones de projection majoritairement situés dans les laminae I et V décussent et participent à la formation de faisceaux d'axones qui contactent le thalamus et le tronc cérébral. Il existe trois grandes voies ascendantes qui transmettent les informations nociceptives jusqu'aux structures supra-spinales.

Tout d'abord le **tractus spinothalamique**, qui regroupe des projections de neurones provenant des couches I, IV, V, VI, VII et VIII, transmet des informations nociceptives (I), des informations qui peuvent être issues de stimuli nocifs ou non (IV, VI) ou issues d'une large gamme de stimulations cutanées (VII, VIII).

Ce faisceau transmet les informations au thalamus et permet de définir l'aspect sensori-discriminatif de la douleur c'est-à-dire la localisation et l'intensité du stimulus appliqué (Basbaum et al., 2009; Hodge and Apkarian, 1990).

Le second faisceau est le **tractus spino-réticulo-thalamique**, composé des neurones nociceptifs provenant des laminae I et V. Contrairement aux neurones du faisceau spino-thalamique tous les neurones ne décussent pas et certaines fibres restent du même côté que le corps cellulaire dont elles sont issues. Ces neurones projettent dans les noyaux du tronc cérébral et transmettent des informations nociceptives avec beaucoup moins de précisions quant à la localisation de la stimulation nocive (Basbaum et al., 2009; Guirimand and Le Bars, 1996).

La troisième grande voie anatomique, le **tractus spino-mésencéphalique**, se compose de neurones provenant de la lamina I projetant sur la substance grise périaqueducale et l'aire parabrachiale. De façon intéressante, les neurones de l'aire parabrachiale contactent notamment l'amygdale qui est une structure impliquée dans les réactions émotionnelles. Cette région serait impliquée dans la réaction comportementale aversive induite par l'expérience de la douleur (Basbaum et al., 2009; Bernard and Besson, 1990).

Les informations sont ensuite transmises à différentes structures corticales qui sont impliquées dans l'aspect émotionnel de la douleur (cortex insulaire) ou encore dans l'aspect sensori-discriminatif (cortex somatosensoriel, Basbaum et al., 2009).

Dans certains cas d'inflammation ou de lésions tissulaires les circuits neuronaux décrits précédemment peuvent se dérégler, la douleur peut devenir chronique perdant sa valeur protectrice pour l'individu. La persistance de la douleur peut avoir pour origine une sensibilisation périphérique des nocicepteurs mais également une sensibilisation centrale de la moelle épinière. Cette sensibilisation a pour conséquence de favoriser la transmission des informations nociceptives aux structures supra spinales (Woolf, 1983). Les principales causes de cette sensibilisation centrale résident dans la modification de la transmission excitatrice glutamatergique ainsi que le mécanisme de désinhibition.

6. SENSIBILISATION CENTRALE

1. SENSIBILISATION CENTRALE ET TRANSMISSION GLUTAMATERGIQUE

En cas de douleur aiguë, la stimulation des nocicepteurs provoque une libération de glutamate dans la moelle épinière qui, en se fixant, provoque l'activation des récepteurs AMPA et la genèse de courants post synaptiques excitateurs (CPSE). La sommation de ces CPSE peut provoquer l'émission d'un potentiel d'action pouvant activer les neurones de la corne dorsale de la moelle épinière. En condition pathologique ou lors d'une stimulation nocive intense, répétée et maintenue durant une dizaine de secondes, la libération de glutamate augmente. La sommation des CPSE peut alors provoquer au niveau des neurones post-synaptiques une dépolarisation suffisante pour

permettre l'activation des récepteurs ionotropiques NMDA en levant le blocage du récepteur par le Mg^{2+} (Magnésium). Un deuxième mécanisme permettant l'activation du récepteur NMDA implique des récepteurs couplés aux protéines G présents dans les neurones de la corne dorsale de la moelle épinière, comme les récepteur NK1 ou des récepteurs à tyrosine kinase tels que trkB (Lu et al., 1999; Mannion et al., 1999). Ces récepteurs activent les voies de signalisation de la protéine kinase C ou de la MAP Kinase II exprimées toutes deux dans la corne dorsale et connue pour potentialiser l'action des récepteurs NMDA (Lu et al., 1999; Yamamoto and Yaksh, 1992).

L'activation de ces derniers provoque une augmentation de la transmission calcique qui favorise la transmission des informations nociceptives et donc une sensibilisation (Basbaum et al., 2009; Latremoliere and Woolf, 2009; Thompson et al., 1990; Woolf and Salter, 2000). A l'appui de cette observation, l'application d'antagonistes du récepteur NMDA, induit une diminution de l'hyperexcitabilité neuronale en condition pathologique (Woolf and Thompson, 1991).

La sensibilisation centrale peut se restreindre à une seule synapse elle est alors appelée homosynaptique, ou au contraire s'étendre à plusieurs synapses. Elle se définit comme étant hétérosynaptique. La potentialisation homosynaptique des réponses du récepteur AMPA est générée par une stimulation brève à haute fréquence des nocicepteurs et est dépendante de l'activation du récepteur NMDA (Randić et al., 1993). Cependant les nocicepteurs étant rarement activés par des stimulations de cette fréquence, la sensibilisation centrale proviendra plus probablement d'une potentialisation hétérosynaptique des récepteurs glutamatergiques. Cette potentialisation initiée par des stimuli de faible fréquence peut favoriser l'activation des synapses qui ne sont pas en contact direct avec les afférences primaires stimulées, ce qui peut induire une hypersensibilité se traduisant par une augmentation du champ récepteur des fibres (McMahon and Wall, 1984; Randić et al., 1993; Simone et al., 1989; Woolf and King, 1989).

Le deuxième grand mécanisme à l'origine de la sensibilisation centrale est le mécanisme de désinhibition.

2. SENSIBILISATION CENTRALE ET DESINHIBITION

Une lésion tissulaire ou une inflammation peuvent induire une allodynie c'est-à-dire la perception d'une sensation de douleur alors que le stimulus est non nocif, une hyperalgésie c'est-à-dire une perception douloureuse plus importante suite à un stimulus nociceptif ou encore une douleur spontanée (Sandkühler, 2009). L'une des causes possibles de ces phénomènes réside dans la désinhibition des réseaux neuronaux spinaux. Comme décrit précédemment la corne dorsale de la moelle épinière est riche en interneurones inhibiteurs GABAergiques et/ou glycinergiques et la

diminution de l'inhibition au sein de la moelle épinière peut conduire à une augmentation de la perception de la douleur (Melzack and Wall, 1965). En effet par des approches pharmacologiques, il a été démontré que l'injection d'antagonistes des récepteurs GABA_A et GABA_B induit une augmentation de la sensibilité thermique et provoque une allodynie mécanique. De plus, des données expérimentales obtenues par des enregistrements électrophysiologiques *in vivo* démontrent que la diminution de l'efficacité de la transmission inhibitrice suite à l'injection des antagonistes aux récepteurs glycinergiques et GABAergiques peut contribuer à l'allodynie induite par le toucher en condition pathologique (Sivilotti and Woolf, 1994). Ces résultats sont renforcés par des enregistrements électrophysiologiques de la réponse synaptique des neurones de la lamina II de la moelle épinière en réponse à une stimulation des fibres A. En effet, la présence de l'antagoniste du récepteur GABA_A provoque une augmentation de la transmission excitatrice dans la lamina II pouvant être à l'origine d'une hyperalgésie en condition douloureuse (Baba et al., 2003). En situation non pathologique l'inhibition GABAergique est essentielle pour que les stimuli non nocifs qu'ils soient thermiques, chimiques ou mécaniques ne soient pas perçus comme douloureux. A l'inverse, l'injection des agonistes des récepteurs au GABA reverse l'allodynie mécanique induite par une lésion d'un nerf périphérique (Malan et al., 2002). Ces résultats indiquent que la perte de l'inhibition GABAergique peut être la cause d'une hyperalgésie ou d'une allodynie. Il semble que la transmission glycinergique soit quant à elle inchangée en cas de neuropathie (Moore et al., 2002). La diminution de l'activité GABAergique en condition neuropathique n'a pas pour origine la modification ou l'altération des propriétés intrinsèques des neurones GABAergiques. En effet, les propriétés électrophysiologiques des neurones GABAergiques de la lamina II ne diffèrent pas entre les animaux sham et animaux neuropathiques (Schoffnegger et al., 2006).

La désinhibition peut cependant s'expliquer par plusieurs autres mécanismes décrits dans la littérature. Il a tout d'abord été démontré qu'en condition neuropathique le nombre de cellules exprimant le GABA diminue dès le troisième jour après la constriction du nerf sciatique. Cette diminution perdure plusieurs semaines avant que le GABA soit de nouveau exprimé dans la corne dorsale indiquant une régulation négative de l'expression du GABA suite à une neuropathie (Eaton et al., 1998; Ibuki et al., 1997). Ces observations sont corrélées avec une étude qui, grâce à une approche électrophysiologique, a montré une diminution des courants post synaptiques inhibiteurs GABAergiques en condition neuropathique (Moore et al., 2002). Dans cette même étude Moore et al. (2002) démontrent également une apoptose des interneurones GABAergiques dans les laminae superficielles de la corne dorsale dans un modèle de neuropathie induite par une constriction du nerf sciatique ou par une lésion du nerf sciatique. Cette mort neuronale entraînerait une diminution de l'activité inhibitrice pouvant être l'une des causes de l'allodynie ou de l'hyperalgésie observée en cas de

neuropathie. Cependant, cette théorie a été remise en question par une étude de Polgár et al. (2005) qui ne montre aucune diminution du nombre de neurones GABAergiques ou glycinergiques dans la corne dorsale de la moelle épinière en cas de constriction du nerf sciatique et de lésion partielle du nerf sciatique, bien qu'il y ait développement d'hyperalgésie et allodynie (Polgár et al., 2005). Ces résultats signifient que bien qu'il puisse y avoir une mort neuronale lors de neuropathie, celle-ci n'est pas à l'origine des symptômes qui y sont associés.

Une autre hypothèse pouvant expliquer cette diminution de l'innervation GABAergique est la diminution de la quantité de GABA libéré par les synapses due à une réduction de la synthèse de ce neurotransmetteur. Concernant cette hypothèse, les observations sont, comme pour l'hypothèse de la mort neuronale, assez contradictoires. En effet, l'étude de Moore et al. (2002) montre grâce à un marquage des 2 isoformes des enzymes synthétisant le GABA, la GAD65 et la GAD67, une déplétion de la GAD65 sans changement du niveau d'expression de la GAD67 suite à une constriction du nerf sciatique ou suite à une lésion partielle de celui-ci (Moore et al., 2002). Cependant les résultats obtenus par Polgár et al., qui ont mesuré la déplétion du GABA dans les terminaison neuronales de la lamina II, n'indiquent aucune modification du taux de GABA dans cette lamina en cas de neuropathie. Ces résultats signifient que bien qu'il y ait une déplétion de la GAD65 celle-ci n'entraîne pas de diminution de la synthèse du GABA (Moore et al., 2002; Polgár et al., 2008).

En l'absence de modifications des niveaux de synthèse du GABA dans la corne dorsale de la moelle épinière, l'hyperexcitabilité neuronale pourrait provenir d'un changement du mode d'action du GABA en condition neuropathique. Selon une étude de Coull et al., le co-transporteur potassium/chlore KCC2 (Potassium-chloride transporter member 5) est sous exprimé dans la lamina I de la moelle épinière en condition neuropathique. Ceci a pour conséquence une inversion du potentiel d'inversion du chlore changeant de ce fait l'efficacité de la transmission GABAergique (le GABA, inhibiteur en conditions physiologiques, deviendrait excitateur en conditions pathologiques). Ce mécanisme favorise l'excitabilité neuronale et donc la transmission des informations nociceptives (Basbaum et al., 2009; Coull et al., 2003). Ces résultats sont confirmés par des expériences démontrant que le blocage du transporteur KCC2 induit une diminution du seuil de nociception chez les animaux naifs. Cependant, ces derniers résultats n'expliquent pas la réduction de l'allodynie tactile observée lors de l'injection d'agonistes des récepteurs GABAergiques (comme expliqué précédemment).

Un dernier mécanisme permettant d'expliquer la désinhibition en condition neuropathique est la diminution transitoire du nombre de varicosités des afférences primaires sensorielles C non peptidergiques et donc la réduction du nombre de contacts synaptiques entre ces fibres et les interneurons inhibiteurs. Cependant ce mécanisme étant transitoire il pourrait être impliqué dans

les phases précoces de développement de l'hyperalgie ou de l'allodynie (Bailey and Ribeiro-da-Silva, 2006).

La désinhibition n'est pas un phénomène observé uniquement en cas de neuropathie. Lors d'une inflammation périphérique, on observe une sensibilisation centrale qui conduit à une hypersensibilité thermique et mécanique. Ce phénomène s'accompagne d'une désinhibition qui peut avoir pour origine une modulation de la transmission glycinergique. Par exemple, l'inflammation périphérique peut induire dans la moelle épinière une libération de la prostaglandine PGE2. PGE2 inhibe le récepteur à la glycine GlyR $\alpha 3$ qui est exprimé dans la corne dorsale, rendant de ce fait ce récepteur insensible à la glycine. PGE2 désinhibe dans lamina II la transmission des informations nociceptives vers les centres supra spinaux. En cas d'inflammation, ce mécanisme est impliqué dans l'hypersensibilité thermique et mécanique.

3. MICROGLIE ET SENSIBILISATION CENTRALE

Alors que les neurones constituent le support de la transmission du message douloureux, un nombre de plus en plus important d'études apportent des preuves de l'implication des cellules gliales dans le développement de l'allodynie et de l'hyperalgésie. Dans le système nerveux les cellules gliales constituent environ 70% de la population cellulaire du cerveau et de la moelle épinière (Sandkühler, 2009). Cette population se compose des astrocytes, des cellules exprimant le protéoglycane NG2 (Neural/Glial antigen 2, ou polydendrocytes), des cellules microgliales, des oligodendrocytes (dans le système nerveux central) et des cellules de Schwann (dans le système nerveux périphérique). Ces cellules longtemps considérées comme n'étant que des cellules de soutien des neurones, se révèlent jouer un rôle dans la modulation de l'activité synaptique. En effet, ces cellules expriment des récepteurs et des transporteurs membranaires leur permettant d'interagir avec les neurones, et sont capables également de libérer des médiateurs. Dans cette partie nous nous concentrerons davantage sur la participation de la microglie dans le processus de sensibilisation centrale dans la moelle épinière.

1. LES CELLULES MICROGLIALES

Ces cellules dérivent de la lignée myéloïde, comme les macrophages, et colonisent le système nerveux central pendant le développement embryonnaire et fœtal (Chan et al., 2007). Les cellules microgliales sont les cellules immunocompétentes résidentes du système nerveux central. Elles partagent de nombreuses propriétés avec les macrophages qui sont eux localisés dans le système nerveux périphérique. Elles constituent un élément clef dans la défense du système nerveux contre les maladies infectieuses, l'inflammation ou encore la neurodégénérescence. Ces cellules sont

distribuées de façon homogène dans toute la substance grise de la moelle épinière et forment un véritable réseau de cellules constituant le système de défense de la moelle épinière (Basbaum et al., 2009). Plusieurs études décrivent une certaine hétérogénéité au sein de cette population cellulaire concernant leur phénotype ou leur mécanisme d'action (Davis et al., 1994). En situation physiologique, ces cellules ont une morphologie ramifiée et occupent un territoire défini de sorte que deux cellules microgliales n'ont aucun contact physique entre elles (Färber and Kettenmann, 2005). Bien que qualifiées de cellules quiescentes les cellules microgliales ne régulent pas seulement l'environnement ionique extracellulaire et la phagocytose des débris cellulaires. En projetant et rétractant leurs extensions en seulement quelques minutes, les cellules microgliales interagissent en permanence avec leur environnement, détectant ainsi toute altération de celui-ci pour agir comme une sentinelle prête à intervenir en cas de lésion ou d'infection du tissu (Audinat and Arnoux, 2014). Lors du développement du système nerveux central, sans aucun signe d'inflammation, les cellules microgliales éliminent ainsi un nombre important de synapses immatures selon un processus appelé « élagage synaptique », renforçant ainsi l'activité des autres synapses et participant au modelage des réseaux neuronaux et donc à la maturation du système nerveux central (Tremblay et al., 2011). De plus, des expériences d'imagerie *in vivo* dans le cortex visuel primaire ont démontré que les contacts entre les épines dendritiques des neurones et les prolongements microgliaux sont régulés par l'expérience sensorielle (structure, durée, nombre, fréquence), faisant de la microglie des cellules contribuant à une modulation fine de la plasticité synaptique en situation physiologique (Tremblay et al., 2010).

2. DEPLACEMENT DES SYNAPSES PAR LA MICROGLIE

En plus de la suppression des synapses au cours du développement, la microglie est capable de déplacer les synapses chez l'animal adulte. En effet suite à la section du nerf facial chez la souris, les cellules microgliales viennent entourer physiquement les motoneurones lésés dans le tronc cérébral (noyaux facial). En entourant les neurones, la microglie déplace les synapses inhibitrices axosomatiques du soma et du segment initial du motoneurone endommagé. Ce déplacement synaptique s'accompagne de la régénération du motoneurone et joue un rôle neuroprotecteur (Blinzinger and Kreutzberg, 1968). Une étude récente a également démontré en condition inflammatoire (injection LPS), un déplacement des synapses inhibitrices des somas neuronaux dans l'hippocampe et a identifié des voies de signalisation permettant la libération de médiateurs anti apoptotiques et neuroprotecteurs et sont donc impliquées dans la survie neuronale (Chen et al., 2014). La neuroprotection provoquée par le déplacement des synapses inhibitrices et donc la diminution de la transmission inhibitrice peut avoir pour origine l'activation des récepteurs NMDA. Cette activation entraîne l'augmentation de l'influx d'ions calciques et provoque la phosphorylation

du facteur de transcription CREB qui à son tour favorise la transcription de gènes importants pour la survie neuronale comme Bcl-2 et le BDNF (Chen et al., 2014; Hardingham et al., 2002).

3. LES CELLULES MICROGLIALES EN CONDITION PATHOLOGIQUE

La lésion d'un tissu ou une inflammation détectée par la microglie entraîne son activation. Cette activation est multi dimensionnelle impliquant tout d'abord un changement de morphologie de la microglie qui passe d'une forme ramifiée à une forme amiboïde. Les cellules microgliales, acquièrent également la capacité de migrer, proliférer et phagocyter les débris cellulaires comme les macrophages (Audinat and Arnoux, 2014; Kettenmann et al., 2011).

Enfin, ce changement de phénotype s'accompagne d'un changement de l'expression de certaines protéines, dépendant du type de stimulation inflammatoire exercée.

Lors de l'activation microgliale, on observe également une augmentation de l'expression de marqueurs microgliaux spécifiques tels que CR3 (complement receptor 3)/CD11b (Cluster differentiation b/c), le complexe majeur d'histocompatibilité II et Iba-1 (ionized calcium-binding adaptor molecule-1) (Imai et al., 1996). La microglie activée libère également des facteurs pro ou anti inflammatoires parmi lesquels des cytokines, notamment le TNF α (tumor necrosis factor α), les interleukines 1 β et 6, des prostaglandines (PGE $_2$), la protéine BDNF (Brain-Derived Neurotrophic Factor) qui est une neurotrophine, de l'ATP et du monoxyde d'Azote (NO) (Coull et al., 2005; Inoue et al., 2007; Kim et al., 2007). Ces médiateurs libérés en conditions neuropathiques et inflammatoires vont ensuite moduler l'activité neuronale et favoriser la transmission des informations nociceptives dans la moelle épinière par des mécanismes qui sont de mieux en mieux décrits (**Figure 9**).

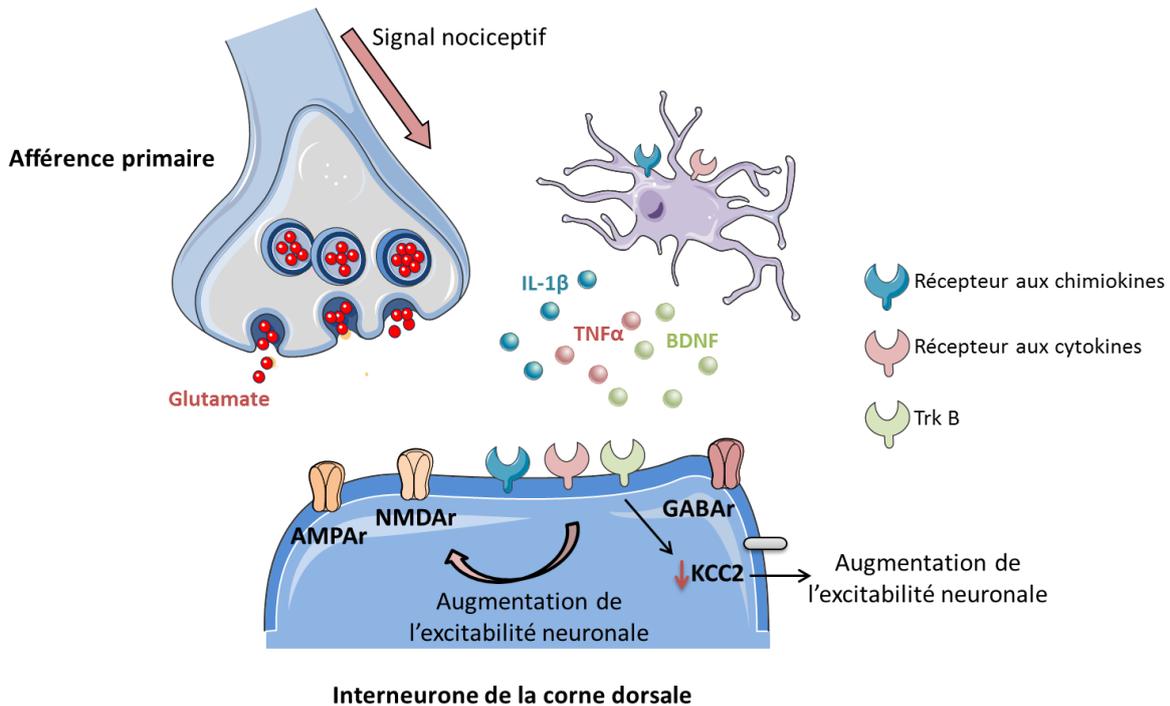


Figure 9: Régulation de la transmission synaptique par les médiateurs microgliaux.

En condition neuropathique ou inflammatoire, les cellules microgliales activées libèrent des médiateurs qui en se fixant sur leur récepteur neuronal et peuvent participer à la sensibilisation centrale des interneurons de la corne dorsale. Adaptée de (Calvo et al., 2012).

4. MODULATION DE LA TRANSMISSION DES INFORMATIONS NOCICEPTIVES PAR LA MICROGLIE.

1. MODULATION DE L'HYPERSENSIBILITE PAR LES RECEPTES EXPRIMES PAR LA MICROGLIE

En condition pathologique, que ce soit en cas d'inflammation ou de neuropathie, l'hyperalgésie et/ou l'allodynie s'accompagne d'une activation microgliale dans la moelle épinière (Watkins et al., 2001). La première question a été de savoir si les cellules microgliales étaient nécessaires à l'établissement de l'augmentation de la perception douloureuse. En condition neuropathique, en empêchant l'activation microgliale par injection systémique de minocycline, un inhibiteur spécifique de la microglie, l'hyperalgésie et l'allodynie sont atténuées et la libération de cytokines pro inflammatoires diminue. Cette diminution de l'hyperalgésie et de l'allodynie n'est observée que lorsque la minocycline est injectée avant la lésion de nerf sciatique. En effet, si la minocycline est injectée cinq jours après la chirurgie les animaux l'hyperalgésie et/ou l'allodynie se maintient. Ces résultats indiquent que les cellules microgliales sont davantage impliquées dans

l'induction de l'hyperalgésie plutôt que dans son maintien (Raghavendra et al., 2003). De même, une injection intrathécale d'extraits immunogènes de virus et bactéries induit à la fois une activation gliale et une exacerbation des réponses douloureuses. Etant donné que le blocage de l'activité microgliale change la perception douloureuse, les auteurs concluent que l'activation gliale est la cause de l'hyperalgésie et de l'allodynie observées dans leur étude (Milligan et al., 2001).

Une deuxième approche pour définir le rôle de la microglie dans la sensibilisation centrale en condition pathologique a porté sur le rôle de la fractalkine (CX3CL1) dans la facilitation de la transmission des informations nociceptives. Cette protéine est exprimée à la fois par les neurones de la moelle épinière et par les afférences primaires. Elle se fixe sur le récepteur CX3CR1 uniquement exprimé par les cellules microgliales, et dont l'expression augmente après une lésion du nerf sciatique (Sun et al., 2007; Zhuang et al., 2007). La fractalkine constitue donc un signal entre la microglie et les neurones. Son application exogène induit une hyperalgésie ainsi qu'une allodynie. De même la diminution de la libération de cette protéine atténue l'hyperalgésie et l'allodynie dans un modèle de neuropathie (Zhuang et al., 2007). Cette voie de signalisation est donc importante pour la facilitation de la transmission des informations nociceptives dans la moelle épinière. Ces résultats indiquent le rôle important des cellules microgliales dans la sensibilisation centrale au sein de la moelle épinière.

Une autre voie de signalisation pouvant être impliquée dans l'hypersensibilité neuronale en condition pathologique pourrait résider dans l'activation du récepteur TLR4 (Toll-like receptor4) exclusivement exprimé par les cellules gliales. Ce récepteur est activé aussi bien en condition inflammatoire qu'en condition neuropathique par des ligands endogènes comme les acides gras insaturés libérés lors de la section d'un nerf ou par des ligands exogènes comme le LPS (lipopolysaccharide, Tanga et al., 2005). En condition pathologique, on assiste à une augmentation de l'expression de l'ARNm codant pour TLR4. Cette augmentation n'est cependant observée que durant la phase d'initiation de l'hyperalgésie ou allodynie. A l'issue de cette phase, l'expression de l'ARNm TLR4 diminue pour retrouver son niveau de base. Ce résultat est en adéquation avec l'étude précédente sur le rôle de la microglie dans l'induction de la phase d'initiation du comportement d'hyperalgésie alors que les astrocytes seraient quant à eux responsables du maintien de cette hyperalgésie. De plus, l'inhibition de TLR4 provoque une diminution de l'activation de la microglie et une diminution de l'hypersensibilité. Les nombreux médiateurs jouent eux aussi un rôle dans l'hyperalgésie et l'allodynie (Tanga et al., 2004, 2005).

2. ROLE DES MEDIATEURS LIBERES PAR LA MICROGLIE DANS L'HYPERALGESIE ET L'ALLODYNIE

En cas de lésion tissulaire l'un des médiateurs les plus libérés par les cellules endommagées est l'ATP. En effet suite à une lésion les afférences primaires peuvent libérer au niveau des réseaux spinaux de l'ATP (Basbaum et al., 2009; Coull et al., 2005; Tsuda et al., 2003). La microglie exprime aussi spécifiquement le récepteur purinergique P2X4 qui est activé par l'ATP. La fixation de l'ATP sur ce récepteur entraîne la libération de BDNF par la microglie, ce BDNF se fixe sur les récepteurs TrkB (Tropomyosine Receptor Kinase B) situés sur les neurones de la lamina I de la moelle épinière. Comme expliqué précédemment (II.6.2), le BDNF induit une inversion du gradient électrochimique des ions chlorures. La mise en jeu des récepteurs GABA ionotropiques par le GABA provoque alors une dépolarisation des neurones (et non plus une hyperpolarisation), favorisant la transmission des informations nociceptives dans la corne dorsale de la moelle épinière (Coull et al., 2005).

3. REGULATION DE L'ACTIVITE SYNAPTIQUE EXCITATRICE PAR LES MEDIATEURS MICROGLIAUX

Les médiateurs libérés par la microglie peuvent également réguler l'activité synaptique de façon pré, post ou extra synaptique. La cytokine pro inflammatoire l'IL-1 β (Interleukine 1 β) libérée par les cellules gliales en cas d'inflammation ou de neuropathie augmente l'amplitude des courants post synaptiques excitateurs spontanés (CPSE) via des mécanismes post synaptiques dépendants des récepteurs au glutamate AMPA (Ji et al., 2013). Une perfusion d'IL-1 β induit également une augmentation des courants NMDA enregistrés dans les neurones de la lamina II de la moelle épinière indiquant que cette interleukine facilite la transmission des informations nociceptives en augmentant l'activité synaptique excitatrice (Ji et al., 2013). Le TNF α (Tumor Necrosis Factor α) est lui aussi un médiateur surexprimé en condition pathologique par la microglie impliqué dans la sensibilisation neuronale. Tout comme l'IL-1 β , il module l'activité excitatrice en augmentant la fréquence des CPSE via l'activation du récepteur TRPV1 localisé sur les terminaisons centrales des fibres C activées par des stimuli thermiques (chauds). Les neurones sensibles au TNF α localisés dans la lamina II sont excitateurs et reçoivent une innervation des fibres C TRPV1⁺, formant ainsi un circuit neuronal favorisant la perception douloureuse (Todd, 2010). Le TNF α est aussi impliqué dans le trafic des récepteurs AMPA composés de la sous unité GluR1 dans la corne dorsale de la moelle épinière en condition inflammatoire (Choi et al., 2010), il potentialise également les récepteurs NMDA dans les neurones de la corne dorsale de la moelle épinière (**Figure 9**, Xu et al., 2010).

4. REGULATION DE L'ACTIVITE SYNAPTIQUE INHIBITRICE PAR LES MEDIEATEURS MICROGLIAUX

La réduction de l'activité inhibitrice ou désinhibition peut, comme décrit précédemment (voir II.6.2), provenir de la libération du BDNF qui en se fixant sur les neurones de la lamina I change le potentiel d'inversion des ions chlorures (Coull et al., 2005). D'autres médiateurs libérés par la microglie peuvent également altérer la transmission inhibitrice. Ainsi, la libération de PGE2 inhibe la transmission glycinergique via son action post synaptique sur le récepteur GlyR3 (Ahmadi et al., 2002). Les interleukines IL-1 β et IL-6 modulent elles aussi la transmission inhibitrice en réduisant la fréquence des courants post synaptiques inhibiteurs spontanés (CPSI) dans les neurones de la lamina II et l'amplitude des courants évoqués par le GABA et la Glycine (Kawasaki et al., 2008) diminuant de fait le tonus inhibiteur au sein de la corne dorsale de la moelle épinière. La diminution de l'activité inhibitrice au sein de la corne dorsale de la moelle épinière favorise la transmission des informations nociceptives vers les centres supra spinaux. Par leur régulation négative sur la transmission inhibitrice ces médiateurs favorisent la sensibilisation centrale en condition inflammatoire ou neuropathique.

III. AFFERENCES PRIMAIRES A BAS SEUIL D'ACTIVATION

1. LES MECANORECEPTEURS PRESENTATION GENERALE

La corne dorsale de la moelle épinière, en plus d'intégrer les informations transmises par les afférences nociceptives, intègre également les informations tactiles provenant de la peau. Les mécanorécepteurs cutanés sont localisés dans toutes les couches de la peau et sont capables de détecter un nombre important et varié de stimuli mécaniques non nocifs de faible intensité tels que la caresse, l'étirement, la vibration. En accord avec la théorie des « Labelled lines » chaque stimulation mécanique est transmise par des afférences spécifiques aux réseaux spinaux puis aux régions supra spinales. Ces neurones somatosensoriels partagent la même morphologie de neurones pseudo unipolaire que les fibres afférentes à haut seuil. Ils possèdent donc leur corps cellulaire dans les DRG, une extrémité axonale qui innerve la peau et une terminaison centrale qui innerve la moelle épinière (Lumpkin et al., 2010; Roudaut et al., 2012). Ce groupe de neurones somatosensoriels, les mécanorécepteurs à bas seuil (LTMRs), se composent de fibres A β , A δ et C. Les fibres C-LTMRs et A δ -LTMR possèdent les mêmes caractéristiques morphologiques que les nocicepteurs C et A δ à haut seuil décrit précédemment. Leur vitesse de conduction est cependant réduite par rapport aux fibres nociceptives (A δ -LTMR :5-7 m/s, C-LTMR : 0.5 m/s) et leur seuil mécanique d'activation est abaissé (Brown and Iggo, 1967; Roudaut et al., 2012). Les fibres A β sont quant à elles des fibres sensorielles possédant un corps cellulaire de diamètre plus important que celui des autres fibres. Ces fibres sont également fortement myélinisées ce qui leur confère une vitesse de conduction rapide de l'ordre de 16 à 100m/s. La majorité des fibres A β ont un seuil mécanique d'activation bas et sont considérés comme des récepteurs du toucher léger (Abraira and Ginty, 2013). Les fibres à bas seuil peuvent également se classer par leur vitesse d'adaptation un stimuli mécanique prolongé; elles sont classés en mécanorécepteurs à vitesse d'adaptation lente, intermédiaire et rapide (Johnson and Hsiao, 1992; Roudaut et al., 2012). Le phénomène d'adaptation correspond à une diminution de la réponse neuronale suite à une unique stimulation prolongée. Ce mécanisme est à différencier de la fatigue neuronale (Voir IV.2.4). Les mécanorécepteurs à bas seuil se différencient également par les récepteurs qu'ils innervent dans la peau poilue ou glabre.

2. MECANORECEPTEURS A BAS SEUIL DANS LA PEAU GLABRE

1. COMPLEXE NEURITE-CELLULE DE MERKEL

Les disques de Merkel sont situés dans l'épiderme et bien que distribués sur toute la peau, leur densité est beaucoup plus importante au niveau de la peau glabre que de la peau poilue.

Chez l'homme, les zones comme les lèvres et les doigts, zones importantes pour le toucher, sont particulièrement enrichies en complexes de Merkel qui forment des dômes tactiles. Ces dômes tactiles sont également retrouvés chez les animaux chez qui ils se composent d'une terminaison élargie de fibres A β apposée à une cellule de Merkel. Dans les dômes tactiles, chez l'homme, jusqu'à 150 cellules de Merkel peuvent se regrouper et elles sont innervées à la fois par les fibres A β , A δ et C (Reinisch and Tschachler, 2005). Les complexes de Merkel sont activés par des stimulations localisées et leur réponse est à adaptation lente (Type I). Ils répondent à une déformation profonde de la peau et possèdent la plus importante résolution spatiale en comparaison avec les autres mécanorécepteurs. Ils sont ainsi capables de coder la vitesse et la position du stimulus, et permettent de discriminer la forme et la texture de ce qui est touché (Halata et al., 2003; Roudaut et al., 2012). Cependant, de la cellule de Merkel ou de la fibre sensitive, il n'a pas encore été établi quel était le mécano transducteur. En effet chez les souris ne possédant plus de cellules de Merkel, la réponse à adaptation lente n'est plus enregistrée démontrant que ces cellules sont nécessaires à la réponse mécanique de ces complexes (Maricich et al., 2009). A contrario des cellules de Merkel en culture stimulées par pression ne montrent aucune réponse mécanique (Yamashita et al., 1992), des expériences supplémentaires sont nécessaires pour définir si les cellules de Merkel communiquent via des synapses ou par la libération de neuropeptides pour communiquer avec les fibres A β et transmettre le signal.

2. LES CORPUSCULES DE RUFFINI

Ces corpuscules sont situés dans le derme, de forme fuselée ils forment des contacts synaptiques également avec les fibres A β et sont activés par une stimulation non localisée. Leur réponse à une stimulation mécanique est à adaptation lente (type II). Ils sont activés par l'étirement de la peau ou par une faible pression prolongée appliquée perpendiculairement à la peau. Ces récepteurs permettent de détecter la direction des étirements de la peau, la forme de la main et la position des doigts (Roudaut et al., 2012).

3. LES CORPUSCULES DE MEISSNER

Localisés dans les papilles dermiques de la peau glabre, chaque corpuscule est en contact avec une seule fibre A β qui se trouve encapsulée par des cellules de support. La réponse de ces corpuscules est à adaptation rapide (Type I). Leur activation par une déformation de la peau induit une décharge brusque et transitoire sous forme d'une volée de potentiels d'action. Les corpuscules de Meissner sont activés par les mouvements de la peau et la détection de la préhension des objets (Roudaut et al., 2012).

4. LES CORPUSCULES DE PACINI

Ces structures sont les plus profondément localisées dans le derme de tous les mécanorécepteurs. Ces corpuscules sont larges et forment des couches concentriques composées de fibroblastes bordés par des cellules de Schwann au centre desquelles se trouve une terminaison d'une fibre A β (Johnson, 2001). Ces mécanorécepteurs répondent avec une adaptation rapide (Type II) aux vibrations dans une grande gamme de fréquences, mais leur réponse est optimale pour des fréquences entre 150 et 300 Hz qu'ils peuvent détecter à plusieurs centimètres de distance (Mendelson and Lowenstein, 1964). Ce sont des détecteurs d'accélération de la déformation de la peau mais ils ne détectent ni la durée ni la vitesse de la stimulation (Roudaut et al., 2012).

3. MECANORECEPTEURS A BAS SEUIL DANS LA PEAU POILUE

Les follicules pileux détectent le touche léger (l'effleurement, le frôlement) ils sont associés à des mécanorécepteurs à bas seuil A β , A δ et C répondant aux mouvements des poils. Dans la peau poilue on peut distinguer trois types de follicules pileux : les plus nombreux étant les follicules appelés zigzag, les follicules Awl/Auchene et enfin les follicules de garde (Hussein, 1971). Les follicules pileux de garde sont les plus larges et les moins abondants et sont généralement associés à des glandes sébacées. Les follicules Awl/Auchene sont plus fins et plus courts que les précédents et constituent 25% des follicules pileux du tronc. Les follicules les plus abondants de la peau poilue des mammifères sont les follicules pileux zigzag qui représentent 70% des follicules, et sont associés aux plus fins et les plus courts des poils (Lechner and Lewin, 2013). Ces trois types de follicules pileux sont richement innervés par des fibres nerveuses sensorielles.

1. FIBRES A β -LTMR

Les fibres A β forment des terminaisons lancéolées et sont associées aux follicules pileux de garde et Awl/Auchene. Elles ont une réponse à adaptation rapide et sont sensibles à la déflexion du poil avec un site de mécanotransduction potentiellement localisé entre la fibre nerveuse et les kératinocytes du poil (Takahashi-Iwanaga, 2000). Des fibres A β à adaptation lente associées au complexe de Merkel ou aux dômes tactiles entourent également les follicules pileux de garde. Leurs propriétés électrophysiologiques sont identiques à celle des fibres innervant la peau glabre à adaptation lente (Woodbury and Koerber, 2007).

2. FIBRES A δ -LTMR

Egalement nommées D-hair (Down hair) chez le chat et le lapin, ces fibres à la terminaison lancéolée, sont associées aux follicules pileux zigzag et Awl/Auchene. Elles présentent une réponse à adaptation rapide aux stimuli supra liminaires (Li et al., 2011). Elles ont un champ récepteur assez large, l'un des plus faibles seuils d'activation mécanique et la plus importante sensibilité dynamique faisant de ces fibres les mécanorécepteurs les plus sensibles de la peau (Burgess and Perl, 1967).

En effet, la force minimale pour activer ces fibres est dix fois inférieure à celle nécessaire à l'activation des fibres A β (Lewin et al., 1992). Néanmoins bien que de nombreux marqueurs moléculaires spécifiquement exprimés par les fibres A δ -LTMR permettent de les distinguer des fibres A β , il reste encore difficile de déterminer quel est le rôle précis de ces récepteurs. Les résultats d'une étude suggèrent que ces fibres ne sont pas impliquées dans la transmission d'informations nécessaires au toucher discriminatif (Lechner and Lewin, 2013; Ziegler et al., 1999).

Les fibres A β et A δ à bas seuil, qu'elles innervent la peau poilue ou glabre, projettent dans les lamina III-IV de la moelle épinière avec, pour les fibres A δ , quelques extensions innervant la lamina II_i de la moelle épinière (**Figure 10**, Light and Perl, 1979; Roudaut et al., 2012).

3. FIBRES C-LTMR

La structure et le rôle de ces fibres sensorielles sont abordés de façon détaillée dans la partie III de cette introduction.

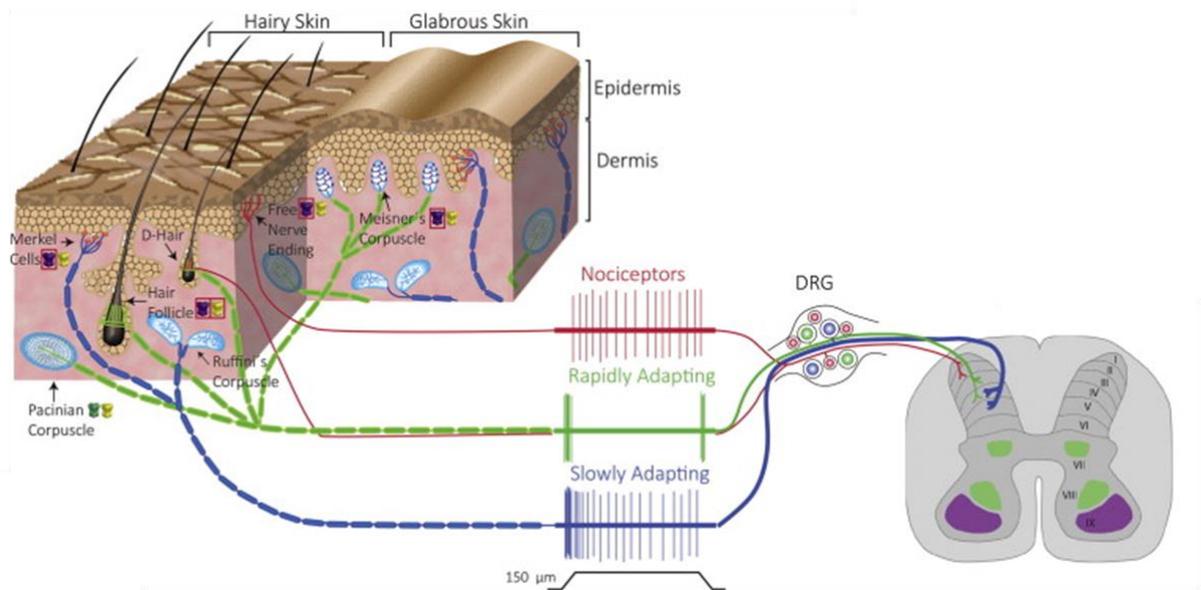


Figure 10: Schéma explicatif de la répartition des mécanorécepteurs dans la peau glabre et poilue. Les mécanorécepteurs (fibres vertes et bleues) ont leur terminaison centrale associée à un organe sensoriel. Leur terminaison centrale projette vers la corne dorsale de la moelle épinière Adaptée de (Omerbašić et al., 2015).

4. LA SENSIBILITE THERMIQUE

La détection thermique est essentielle pour maintenir l'homéostasie, les thermorécepteurs innervant la peau détectent des stimuli provenant de l'environnement et transmettent des informations thermiques situées dans un spectre large de température.

Les informations thermiques sont transmises de la périphérie à la moelle épinière via les fibres A δ et C (Dubin and Patapoutian, 2010). La température considérée comme neutre chez l'homme se situe aux alentours de 33°C. Au-dessus de 45°C et en dessous de 15°C l'information thermique est nocive et est donc associée à une perception douloureuse de la stimulation (Basbaum et al., 2009). Les thermorécepteurs répondent de façon phasique, ils vont s'activer de façon très importante lors de changements de température permettant une adaptation rapide de l'organisme aux variations environnementales. Ils s'adaptent rapidement lorsque la température se stabilise (Romanovsky, 2007). En fonction de la sensibilité de ces fibres à la température il est possible de distinguer quatre classes de thermorécepteurs. La première est constituée des neurones s'activant suite à l'application de stimuli non nocifs de basse température alors que la deuxième regroupe des neurones activés par une stimulation thermique non nocive de plus haute température. La troisième classe se compose de fibres qui s'activent spécifiquement pour des températures plus élevées avec une augmentation rapide et transitoire de la fréquence de leur décharge. Si la température diminue la fréquence de décharge diminuera également de façon transitoire (Hensel and Iggo, 1971).

La quatrième classe de fibres est sensible aux stimuli plus froids et présente une fréquence de décharge qui augmente transitoirement lors d'une diminution de température (Campero and Bostock, 2010).

5. CONNECTION DES FIBRES A BAS SEUIL DANS LA MOELLE EPINIÈRE

Les mécanorécepteurs à bas seuil sont glutamatergiques et vont pour la majorité former des glomérules dans moelle épinière (Todd et al., 2003). Les fibres A β et A δ reçoivent en présynaptique une innervation à la fois GABAergique et glycinergique renforçant l'hypothèse que les neurones glycinergiques se trouvent dans les laminae plus profondes de la corne dorsale là où projettent ces mécanorécepteurs (lamina III et IV, Todd et al., 1991). Les fibres A β forment des arrangements synaptiques moins complexes que les fibres A δ qui forment davantage de synapses axoaxoniques s'apparentant à des glomérules de type II (Réthelyi et al., 1982).

Les **mécanorécepteurs A δ** à bas seuil établissent des contacts synaptiques avec les cellules excitatrices exprimant la PKC γ qui sont activées par des stimuli non nocifs (Li et al., 2011; Neumann et al., 2008).

Au sein de la moelle épinière les cibles neuronales des **fibres A β** ne sont pas entièrement identifiées, cependant certaines études montrent un contact monosynaptique entre les fibres A β et des interneurons inhibiteurs dans la lamina III (Schneider and Lopez, 2002). Une autre étude a apporté des éléments supplémentaires en démontrant que les fibres A β contactent des interneurons GABAergiques localisés dans la corne dorsale superficielle de la moelle épinière. Cependant il semblerait que ces connections ne persistent pas au cours du développement. En effet certaines études indiquent que la réponse des neurones inhibiteurs à la stimulation des fibres A β a tendance à diminuer à partir de la troisième semaine post natale (Daniele and MacDermott, 2009; Park et al., 1999). De plus, une approche immunohistochimique a permis de montrer que seule une faible proportion des dendrites appartenant aux neurones inhibiteurs sont post synaptiques aux fibres A β et que la plupart sont glycinergiques (Todd et al., 1991). Des expériences supplémentaires sont donc nécessaires à l'identification claire des partenaires synaptiques des fibres A β dans la moelle épinière.

Néanmoins, en activant des interneurons inhibiteurs, les fibres A β pourraient interférer avec la transmission des informations nociceptives.

6. LA THEORIE DU PORTILLON

Cette théorie proposée par Melzack et Wall en 1965 est l'une des plus importantes dans le domaine de la douleur. En effet, les données expérimentales ont permis d'établir que la corne dorsale de la moelle épinière n'était pas seulement importante pour le relai des informations sensorielles mais permettait également un contrôle des informations provenant des afférences primaires. Ce modèle théorique de réseau neuronal se base sur un équilibre des informations reçues par les neurones nociceptifs de la corne dorsale de moelle épinière qui projettent dans les centres supra spinaux. Une partie de l'activité synaptique exercée sur ces neurones de transmission (T) est excitatrice et provient des fibres nociceptives (C-Fibres). La deuxième partie des informations neuronales reçues par les neurones T est inhibitrice et est transmise par les fibres non nociceptives (A-Fibres). Ces fibres ont une action inhibitrice sur les neurones T par l'intermédiaire de l'activation d'interneurones inhibiteurs situés dans la lamina II de la moelle épinière. La stimulation des fibres tactiles inhibe donc la transmission des informations nociceptives vers les centres supra spinaux. Les informations nociceptives sont transmises lorsque l'équilibre entre l'activité excitatrice et inhibitrice se déplace vers davantage d'activation des fibres nociceptives, ou vers une réduction de l'activité des fibres non nociceptives (**Figure 11**, Calvino and Grilo, 2006; Melzack and Wall, 1965).

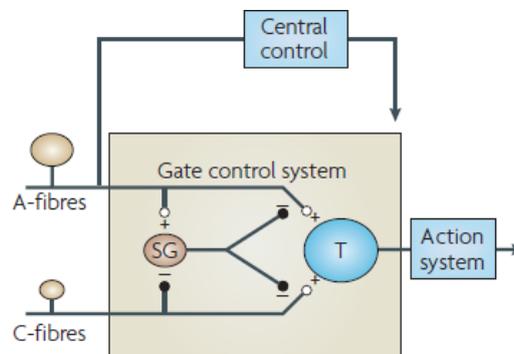


Figure 11 : La théorie du portillon proposée par Melzack et Wall (1965).

Les fibres nociceptives et non nociceptives contrôlent l'activité des neurones à transmission (T) au travers de la modulation de l'activité des interneurones inhibiteurs de la lamina II (SG, Perl, 2007).

7. INTERFERENCES ENTRE LES CIRCUITS DU TOUCHER ET DE LA NOCICEPTION

1. MECANISMES DE L'HYPERALGESIE ET DE L'ALLODYNIE MECANIQUE

En condition physiologique, les circuits neuronaux transmettant les informations nociceptives et le toucher sont bien distincts. Cependant en condition pathologique, une allodynie mécanique

peut se développer. Dans ce contexte la douleur perd sa fonction protectrice pour l'organisme qui peut percevoir le simple toucher comme étant douloureux.

1. ACTIVATION DES RESEAUX NOCICEPTIFS PAR LES AFFERENCES A BAS SEUIL

Suite à des études effectuées chez des patient atteints de syndrome douloureux régional complexe (associé à une forte allodynie mécanique), il a été observé qu'un blocage par compression des fibres A β provoque une abolition de la perception de la douleur suite à un stimulus tactile, tandis que le recrutement des fibres A β par stimulation électrique évoque une douleur (Gracely et al., 1992). Le premier mécanisme pouvant expliquer l'implication des fibres A β dans le développement de l'allodynie mécanique est la remontée des informations tactiles transmises par les fibres A β vers les laminae superficielles de la corne dorsale de la moelle épinière. En effet, Kohama et Al. (2000) ont montré que la lésion du nerf sciatique s'accompagne d'une redistribution des afférences sensorielles myélinisées A β (marquées par la toxine cholérique b) qui étendent leurs projections jusque dans les laminae I et II_o (Kohama et al., 2000). Cette extension s'accompagne de l'établissement de connections mono et polysynaptiques entre les afférences A β et les neurones de ces laminae (Kohama et al., 2000; Okamoto et al., 2001; Woolf et al., 1992). En conséquence, la stimulation des fibres à bas seuil A β pourrait conduire à l'activation du réseau neuronal transmettant les informations nociceptives et engendrer une réponse comportementale inadaptée à une stimulation mécanique non nocive (Woolf et al., 1992). Cependant, cette hypothèse a été remise en question par plusieurs études, notamment à cause de la technique de marquage des fibres utilisée. En effet la spécificité de la toxine cholérique b comme marqueur des fibres A β a été récemment discutée (Hughes et al., 2003).

Outre la possible extension des fibres A β vers les laminae superficielles en condition pathologique, Neumann et al. (1996) et Noguchi et al. (1994) ont démontré dans leurs études que lors d'une inflammation ou d'une neuropathie, la substance P habituellement libérée par les nocicepteurs C est également exprimée par les fibres A β . La substance P en se fixant sur son récepteur NK1, exprimé notamment dans la lamina I, augmente l'excitabilité neuronale et donc participe à la facilitation de la transmission des informations nociceptives au sein de la corne dorsale. Les fibres A β contribuent à l'hypersensibilité mécanique provoquée par cette libération de substance P (Neumann et al., 1996; Noguchi et al., 1994). Bien que cette augmentation de la libération de la substance P ait également été mesurée dans la corne dorsale suite à une stimulation électrique des fibres A β chez des animaux neuropathiques, ces résultats sont nuancés par d'autres observations. Par une approche immunohistochimique la substance P n'a pu être détectée dans les terminaisons centrales des fibres myélinisées suite à différents types de modèles de lésions de nerfs. De même la

stimulation électrique des fibres A β ne provoque pas l'internalisation de récepteurs NK1 dans les neurones de la corne dorsale (Hughes et al., 2007; Malcangio et al., 2000). Ces résultats semblent indiquer que la substance P libérée par les fibres A β en condition neuropathique ne serait pas impliquée dans le développement d'une allodynie mécanique. Des expériences supplémentaires sont nécessaires pour définir si en condition inflammatoire la substance P exprimée par les mécanorécepteurs à bas seuil est impliquée dans l'allodynie mécanique.

Comme précisé précédemment, en condition physiologique, les informations tactiles et nocives sont transmises par des réseaux distincts. Cependant, la suppression pharmacologique de la transmission inhibitrice par l'ajout d'antagonistes des récepteurs au GABA ou à la glycine au sein de la corne dorsale induit une allodynie tactile (Yaksh, 1989). Les circuits neuronaux localisés dans la corne dorsale de la moelle épinière sont donc nécessaires pour maintenir la séparation des circuits sensoriels notamment en inhibant les informations tactiles provenant des afférences à bas seuil (Takazawa and MacDermott, 2010). Ces études pharmacologiques suggèrent l'existence d'un circuit polysynaptique reliant les fibres mécanoréceptrices A β et les neurones nociceptifs des laminae I-II_o (Baba et al., 2003; Sivilotti and Woolf, 1994). Selon la théorie du portillon les cellules de transmission reçoivent un contact synaptique direct en provenance des fibres A β . Ces mêmes fibres activent des interneurons inhibiteurs qui contrôlent la transmission des informations nociceptives. Des études d'ablation génétique de certaines populations neuronales ont permis de montrer que les cellules à somatostatine des laminae I et II sont les cellules de transmission. Ces cellules à somatostatine reçoivent des informations sensorielles provenant des nocicepteurs (Baba et al., 2003; Duan et al., 2014).

La suppression des cellules somatostatine⁺ induit une perte du relai des informations transmises par les fibres A β aux interneurons de la corne dorsale entraînant donc une forte réduction de l'allodynie mécanique en condition inflammatoire ou neuropathique. Au sein de ce circuit, les interneurons inhibiteurs seraient des neurones exprimant la dynorphine. En effet la stimulation des fibres A β peut provoquer l'activation d'une partie des neurones dynorphine⁺. De plus la suppression spécifique de ces neurones entraîne le développement spontané d'une allodynie mécanique. Chez ces animaux déplétés des neurones à dynorphine, la stimulation des fibres à bas seuil provoque une activation des neurones somatostatine⁺ qui facilite la transmission des informations nociceptives, et donc la perception douloureuse lors d'une stimulation tactile. Ce résultat n'est pas observé chez les animaux contrôles (non déplétés), suggérant qu'en condition physiologique, les neurones à dynorphine inhibent les informations provenant des fibres à bas seuil qui ne peuvent pas activer les neurones à somatostatine (impliqués dans la transmission des informations nociceptives). Les fibres A β peuvent également innover directement les cellules

verticales, dont certaines expriment la somatostatine. Afin de prévenir la possible interaction entre les circuits de la douleur et du toucher cette connexion doit être modulée par des neurones inhibiteurs exprimant la dynorphine. Ces neurones ciblés par les fibres A β sont situés dans les lamina I et II_o ils inhibent les cellules verticales excitatrices et reçoivent cette innervation de façon directe ou indirecte via les neurones à somatostatine. Chez des souris chez lesquelles les neurones à dynorphine sont supprimés, 31% des neurones de la lamina II_o reçoivent une innervation des fibres A β . Cette inhibition n'est pas dépendant des récepteurs GABA_A et glycinergique puisque l'ajout de leurs antagonistes (bicuculline et la strychnine) n'altère pas la transmission synaptique entre les neurones à dynorphine et les fibres A β (**Figure 12**, Duan et al., 2014).

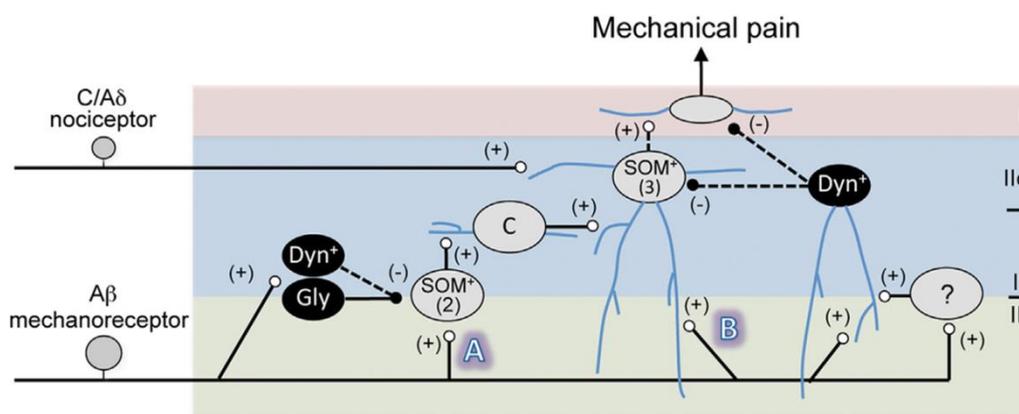


Figure 12: Circuit intégrant les informations nociceptives mécaniques dans la corne dorsale.

Les neurones à somatostatine de la lamina II_e reçoivent des informations provenant entre autre des fibres A β par l'intermédiaire de la voie indirecte « A » ou directe « B ». La transmission des informations provenant des fibres A β seraient régulées par les neurones à dynorphine (lignes en pointillés) (Duan et al., 2014).

Une autre population de neurones exprimant la dynorphine est également impliquée dans le contrôle de deux autres circuits reliant les fibres sensorielles A β et les neurones de la lamina I. Une étude de Lu et al. (2013) révèle la présence d'un circuit neuronal qui en condition physiologique est silencieux mais s'active en condition pathologique ou lors d'un blocage pharmacologique de la transmission glycinergique. Suite à une lésion du nerf sciatique, les fibres A β contactent de façon monosynaptique les cellules excitatrices PKC γ situées dans les laminae II_i et III. Ces mêmes cellules excitatrices sont en contact avec les cellules centrales et verticales de la lamina II qui transmettent leur signal aux neurones de projections de la lamina I. En condition physiologique cette connexion synaptique est sous le contrôle de cellules glycinergiques situées à la jonction entre les laminae II et III qui expriment pour 35% d'entre elles la dynorphine (Duan et al., 2014; Lu et al., 2013). Ces cellules inhibitrices sont indispensables pour que les informations transmises par les fibres A β n'interfèrent pas avec les circuits de la nociception. En cas de neuropathie ou de blocage pharmacologique de la

transmission glycinergique, il y a une levée de l'inhibition sur la transmission synaptique entre les fibres A β et les neurones à PKC γ générant une activation des circuits nociceptifs suite à la stimulation des mécanorécepteurs (**Figure 13**, Lu et al., 2013).

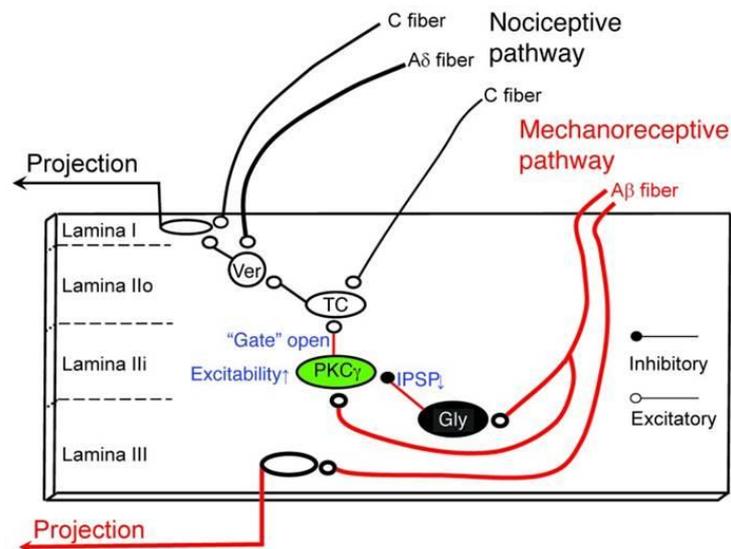


Figure 13 : Circuit neuronal impliqué dans l'allodynie mécanique en condition neuropathique.

La neuropathie induit la levée de l'inhibition qui pèse normalement sur les neurones à PKC γ . Ceci provoque l'activation des réseaux nociceptifs par les afférences à bas seuil (Lu et al., 2013).

Ces études démontrent la proche interaction entre les circuits du toucher et de la douleur et l'importante implication des mécanorécepteurs dans le développement de l'allodynie mécanique.

2. CONTROLE DE LA TRANSMISSION DES INFORMATIONS NOCICEPTIVES PAR LES MECANORECEPTEURS A BAS SEUIL

Les mécanorécepteurs à bas seuil peuvent également contrôler la neurotransmission à la terminaison centrale des fibres nociceptives par un mécanisme présynaptique appelé dépolarisation des afférences primaires (PAD, primary afferent depolarisation). En condition physiologique, l'activation des interneurons GABAergiques spinaux par les mécanorécepteurs à bas seuil permet le maintien d'un tonus GABAergique important. Les gradients de chlore étant inversés dans les afférences sensorielles primaires (du fait notamment d'une expression soutenue du co-transporteur Na K 2Cl, NKCC1, à l'état adulte), l'activation des récepteurs GABA ionotropiques (GABA_A) sur ces afférences entraîne une dépolarisation des terminaisons synaptiques. Cette dépolarisation, en inactivant partiellement les canaux sodiques (Zeilhofer et al., 2012) et en diminuant l'entrée de calcium dans la terminaison nociceptives, atténue la transmission entre les nocicepteurs et leurs cellules cibles.

En condition pathologique, les nocicepteurs contribuent également à l'activation des interneurons spinaux inhibiteurs, conduisant à une augmentation du tonus GABAergique. Il s'ensuit une sur-activation des récepteurs GABA_A sur les nocicepteurs primaires. Les PAD consécutifs à cette sur-activation peuvent alors donner naissance à des potentiels de racine dorsale (DDR, dorsal root reflex) qui se propagent en périphérie où ils peuvent provoquer une vasodilatation, une libération de substance P et de CGRP, et une activation des autres nocicepteurs (Cervero and Laird, 1996; Zeilhofer et al., 2012). L'amplitude des PAD en condition pathologique serait en outre renforcée par une augmentation de l'activité du transporteur NKCC1 dans les nocicepteurs, par un mécanisme dépendant des récepteurs AMPA et mGluR1 et de la Cam Kinase II (Schomberg et al., 2001).

Ce mécanisme est toutefois en désaccord avec les études menées chez l'homme, montrant que la stimulation électrique des fibres A β en condition neuropathique ne génère pas de potentiel d'action antidromique et ne provoque pas de vasodilatation.

IV. LES MECANORECEPTEURS C A BAS SEUIL

1. HISTORIQUE

L'existence des mécanorécepteurs C à bas seuil (C-LTMR, C low threshold mecanoreceptor), a été mise en évidence pour la première fois par Zotterman en 1939. Suite à un enregistrement chez le chat, ses travaux ont permis de montrer que les informations tactiles n'étaient pas seulement transmises par les fibres myélinisées de gros diamètre A β , mais également par des fibres non myélinisées de petit diamètre appartenant à la classe des fibres C. Ces observations lui ont permis de suggérer que ces fibres C activées par les stimuli tactiles seraient impliquées dans la réponse aux démangeaisons (Zotterman, 1939). Par la suite, Douglas et Ritchie (1957) démontrèrent sur une préparation composée du nerf saphène et de la peau chez le chat, qu'une stimulation tactile diminuait la réponse des fibres C activées simultanément par une stimulation électrique. Ces résultats s'expliquent par le fait qu'il y a une « collision » entre les potentiels d'action générés dans les sens opposés par les deux stimulations simultanées. Ces observations indiquent que les afférences tactiles à réponse lente ont une vitesse de conduction d'environ 1m/s correspondant à des fibres non myélinisées et que de plus ces fibres innervent préférentiellement la peau poilue chez le chat (Douglas and Ritchie, 1957). L'analyse en cellule unitaire des C-LTMRs a permis de définir les propriétés des réponses de ces fibres aux stimuli tactiles non nocifs. Ces fibres, qui ont une vitesse d'adaptation intermédiaire, ne répondent pas aux stimulations thermiques (chaleur) et ne déchargent que brièvement lors d'un refroidissement de la peau. Elles ont une importante sensibilité à la déformation de la peau ainsi qu'aux mouvements des poils (Iggo, 1960). Si ces observations ont permis de mettre en évidence l'existence de ces fibres innervant la peau poilue chez des modèles animaux tels que le singe et le chat (Bessou et al., 1971; Douglas and Ritchie, 1957; Kumazawa and Perl, 1977; Zotterman, 1939) l'existence de ces fibres chez l'homme a longtemps été sujette à débats. Cependant, une première étude a démontré la présence des C-LTMRs sur la face des sujets suggérant une possible implication de ces fibres dans la névralgie du trijumeau (Nordin, 1990). Quelques années plus tard, il a été montré que chez l'homme, les mécanorécepteurs C à bas seuil innervent la peau poilue (plus particulièrement les membres postérieurs et antérieurs), et semblent absents de la peau glabre. Une étude récente suggère la présence de fibres homologues fonctionnelles des C-LTMRs dans la peau glabre chez l'homme (Edin, 2001; Nagi and Mahns, 2013; Vallbo and Wessberg, 1993; Vallbo et al., 1999).

2. CARACTERISTIQUES FONCTIONNELLES DES MECANORECEPTEURS C A BAS SEUIL

1. CARACTERISTIQUES MORPHOLOGIQUES

Ces fibres, comme les autres afférences primaires, possèdent leur corps cellulaire dans les DRG. Elles représentent 19% des neurones des DRG thoraciques (T12) et 8% des neurones des DRG lombaires (L4, Delfini et al., 2013). Les fibres C-LTMRs sont de petit diamètre et non myélinisées, elles ont une morphologie de neurones pseudo unipolaires possédant une extrémité périphérique de forme lancéolée innervant la base des follicules pileux zigzag et Awl/Auchene. Leur terminaison centrale innerve uniquement et spécifiquement la lamina II_i de la moelle épinière (Li et al., 2011). Une même fibre C-LTMR peut avoir plusieurs terminaisons périphériques formant des champs récepteurs uniformes de forme ovoïde (approximativement 1mm² chez la souris). Les fibres forment également des arborisations proches de leur champ récepteur qui répondent de manière indépendante les unes par rapport aux autres (Iggo and Kornhuber, 1977; Liu et al., 2007; Seal et al., 2009).

2. VITESSE DE CONDUCTION

Ces fibres appartenant à la classe des fibres C, elles ont une vitesse de conduction de l'ordre de 1m/s assez lente en comparaison avec les fibres A (Vallbo and Wessberg, 1993; Vallbo et al., 1999). Cette différence entre les mécanorécepteurs A β et C est fondamentale pour expliquer la spécificité des réponses des fibres à certains stimuli tactiles. En effet, la réponse à des vibrations de la peau à haute fréquence nécessite des fibres sensorielles à adaptation rapide. Ces caractéristiques correspondent davantage aux propriétés des fibres A β . Les mécanorécepteurs C à bas seuil avec leur vitesse de conduction faible sont plus adaptés aux stimuli tactiles doux et aux mouvements lents de la peau poilue (Bessou and Perl, 1969; Douglas and Ritchie, 1957; Zotterman, 1939).

3. REPONSES AUX STIMULI

Les C-LTMRs ne sont pas sensibles aux stimuli thermiques de chaleur mais s'activent suite à un refroidissement de la peau, sauf si ce refroidissement est trop rapide (Bessou and Perl, 1969; Delfini et al., 2013; Iggo, 1960; Iggo and Kornhuber, 1977). De même, les C-LTMRs ne sont pas sensibles aux agents susceptibles d'être nocifs tels que la capsaïcine, le menthol, le sulfate de prégnénolone ainsi que la sérotonine (Delfini et al., 2013). Néanmoins une certaine hétérogénéité semble apparaître au sein des mécanorécepteurs C à bas seuil, puisque les signaux calciques des C-LTMRs enregistrés après l'application de l'agoniste du canal TrpA1, l'allyl isothiocyanate indiquent

qu'au sein des C-LTMRs les neurones sont plus ou moins sensibles à cet agent pharmacologique (Delfini et al., 2013). En réponse à une stimulation à haute fréquence pendant une longue durée, les C-LTMRs ne peuvent pas décharger durant toute la durée de la stimulation, ceci s'explique par une autre propriété importante de ces fibres : la fatigue (Bessou et al., 1971).

4. FATIGUE ET ADAPTATION DES C-LTMRs

La fatigue est un mécanisme caractérisé par la diminution de la réponse neuronale suite à une stimulation répétée. A l'inverse des fibres A δ à bas seuil qui ne montrent qu'un faible changement de leur réponse à la suite d'une stimulation répétée, la fréquence de décharge des C-LTMRs diminue quant à elle très fortement, même si l'adaptation des fibres au premier stimulus n'a pas encore eu lieu (Bessou et al., 1971; Iggo and Kornhuber, 1977; Kumazawa and Perl, 1977). Le temps nécessaire pour que le mécanisme de fatigue s'estompe et que la réponse des C-LTMRs au deuxième stimulus soit identique à celle du premier stimulus se situe entre 15 et 30 minutes en fonction de la durée et l'intensité de stimulation (Bessou et al., 1971; Iggo, 1960; Pitcher et al., 2016). Une seule fibre C-LTMR peut détecter des stimuli à peine perceptibles comme la flexion d'un seul follicule pileux de garde (Douglas and Ritchie, 1957; Iggo and Kornhuber, 1977). Ces fibres répondent de façon optimale à un stimulus doux (type caresse) entre 0.05 et 2 cm/s et leur fréquence de décharge maximale atteint 100 potentiel d'action/s, ce qui est trois fois moins élevé que la fréquence de décharge des fibres C nociceptives (Franz and Iggo, 1968; Kumazawa and Perl, 1977). L'adaptation de ces fibres à un stimulus est dite intermédiaire car suite à une stimulation elles déchargent tout d'abord brièvement puis leur fréquence va ralentir et devenir stable avant que leur décharge ne cesse (Iggo, 1960; Iggo and Kornhuber, 1977; Kumazawa and Perl, 1977).

5. DECHARGE POST STIMULATION DES C-LTMRs

L'une des caractéristiques importantes des fibres C-LTMRs est la capacité de ces fibres à décharger après l'arrêt de la stimulation. Plusieurs études ont démontré ce mécanisme après avoir stimulé les mécanorécepteurs C à bas seuil avec un stimulus apparenté à une caresse et particulièrement lorsque les fibres n'ont pas subi le phénomène de fatigue par des stimulations précédentes (Kumazawa and Perl, 1977; Zotterman, 1939). Etonnamment la décharge de ces fibres après la stimulation tactile se produit uniquement si le stimulus est appliqué au niveau du champ récepteur. Si le stimulus est appliqué au niveau des arborisations des C-LTMRs, aucune décharge n'est détectée à l'arrêt de la stimulation.

D'après les auteurs de ces études, ces observations suggèrent que la poursuite de la décharge neuronale suivant l'arrêt de la stimulation tactile serait dû au retour de la peau à sa position d'origine après déformation qui serait donc perçu par les C-LTMRs comme une stimulation inverse (Iggo, 1960; Iggo and Kornhuber, 1977; Pitcher et al., 2016).

Les C-LTMRs appartenant à la classe des fibres C elles partagent des caractéristiques électrophysiologiques communes avec les nocicepteurs C telles que la faible capacitance cellulaire et la forte résistance d'entrée. Elles expriment également des canaux Nav1.8 résistant à la tétrotoxine (TTX) ainsi que des canaux calciques à bas seuil de type T (ICa_T) qui provoquent l'émission des potentiels d'action en rebond lors d'une repolarisation du neurone. Par des enregistrements en patch clamp, il a également été mis en évidence dans ces neurones l'existence de courants potassiques de type A qui induisent un retard dans l'apparition des potentiels. Il est possible d'enregistrer un courant potassique activé par une hyperpolarisation (I_h , Delfini et al., 2013).

3. MECANORECEPTEURS C A BAS SEUIL DANS LE TOUCHER AFFECTIF

1. DIFFERENCIATION DES FIBRES A β ET C-LTMRs CHEZ LES PATIENTS

L'implication des C-LTMRs dans la sensation du toucher a été difficile à mettre en évidence de par la difficulté de les stimuler spécifiquement sans stimuler les fibres A β , elles aussi à bas seuil d'activation. Chez des sujets atteints d'une neuropathie sensorielle caractérisée par une absence de fibres A β , des expériences ont démontré que les patients détectent les stimuli légers tels que des caresses ou l'application d'un filament d'une faible force sur la peau poilue au niveau du bras. Ce stimulus n'est pas détecté par les patients au niveau de la peau glabre puisque cette zone est dépourvue de mécanorécepteur C à bas seuil (Olausson et al., 2008). De même, ils ne sont pas capables de détecter les vibrations puisque ce stimulus est détecté par les fibres A β et non par les C-LTMRs (Bessou et al., 1971; Olausson et al., 2008). Ces mêmes sujets éprouvent des difficultés à percevoir, décrire ou localiser les stimuli de type caresse. Bien que la description de la sensation perçue par les patients soit très peu détaillée, ils n'éprouvent cependant pas de sensation douloureuse ou de démangeaisons, mais ressentent plutôt une sensation agréable (Olausson et al., 2008). Chez les patients porteurs d'une mutation génétique affectant le facteur de croissance neuronal beta, ayant pour conséquence une dénervation et notamment une diminution de la densité des fibres myélinisées et non myélinisées, la perception de cette sensation plaisante induite par le toucher léger est réduite. Ceci s'explique par le fait que chez ces sujets, la dénervation affecte de façon plus importante les fibres C-LTMRs mais pas les fibres A β qui restent intactes, suggérant que

les fibres C-LTMRs sont fortement impliquées dans cette perception plaisante du toucher (Liljencrantz and Olausson, 2014; Löken et al., 2009; Morrison et al., 2011).

2. IMPLICATION DES C-LTMRs DANS L'ASPECT AFFECTIF DU TOUCHER

Des études menées chez des sujets sains par tomographie à émission de positron et imagerie par résonance magnétique fonctionnelle, indiquent qu'après intégration dans la moelle épinière les informations des C-LTMRs provenant de la peau poilue sont transmises aux structures du système limbique et plus particulièrement la partie postérieure du cortex insulaire qui est le siège des émotions. A contrario, les informations tactiles plaisantes provenant de la peau glabre détectées par les fibres A β sont transmises aux aires S1 et S2 du cortex somatosensoriel qui est impliqué dans la perception du toucher discriminatif et analyse ces informations en fonctions des expériences tactiles précédentes (Löken et al., 2009; McGlone et al., 2012; Olausson et al., 2002). Ces résultats viennent renforcer l'hypothèse que l'un des rôles fonctionnels des fibres C-LTMRs est la transmission d'informations liées au caractère affectif du toucher. Cet aspect hédonique du toucher ne se caractérise pas par une fonction sensorielle discriminative mais par un contexte social et une composante subjective. Le toucher affectif est essentiel dans la relation filiale, notamment entre la mère et ses petits. Ainsi, une absence de contact chez le singe entre la mère et les petits perturbe leur développement et les petits développent un stress (Harlow and Zimmermann, 1958; Liljencrantz and Olausson, 2014). D'autre part, cette composante émotionnelle peut être également importante dans l'établissement et le maintien de liens sociaux. Enfin c'est un moyen de communication des émotions non verbal (Morrison et al., 2010). Les fibres C-LTMRs favorisent donc les réponses comportementales et émotionnelles innées et adaptées dans un contexte d'interactions tactiles comme par exemple lors du toilettage (McGlone et al., 2012).

4. CARACTERISATION MOLECULAIRE DES MECANORECEPTEURS C A BAS SEUIL

Les récentes techniques d'ingénierie génétique ont permis de faire des avancées dans la caractérisation moléculaire des C-LTMRs. Ces fibres expriment les marqueurs moléculaires des nocicepteurs C c-Ret et Gfra2, récepteur du GDNF (glial cell line-derived neurotrophic factor) et de la neurturine jouant tous deux un rôle dans la survie et la différenciation neuronale. Cependant les C-LTMRs ne lient pas l'isolectine B4 ni n'expriment le récepteur MrgprD qui sont exprimés par les nocicepteurs non myélinisés (Delfini et al., 2013; Li et al., 2011). Ces fibres constituent donc une population neuronale sensorielle de petit diamètre unique (**Figure 14**). Enfin, si le marqueur MrgprB4 a pu être considéré un temps comme un marqueur des fibres C mécanosensibles à bas seuil (Liu et al., 2007), il est maintenant établi que les C-LTMRs n'expriment pas ce marqueur qui est quant à lui

spécifique d'une autre classe de neurones C mécanosensibles à bas seuil, impliqués dans la détection des stimuli de type massage (Vrontou et al., 2013).

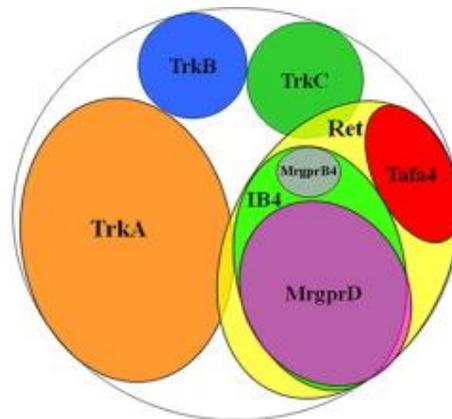


Figure 14: Diversité moléculaire des neurones sensoriels.

La taille des cercles représentés sur ce schéma est représentative de la densité des neurones exprimant les marqueurs moléculaires (Delfini et al., 2013).

Les mécanorécepteurs C à bas seuil constituent l'unique population neuronale au sein des DRG à exprimer trois marqueurs moléculaires spécifiques.

Tout d'abord la **tyrosine hydroxylase (TH)** qui est une enzyme participant à la synthèse de la *levo*-DOPA à partir de l'acide aminé tyrosine et qui participe à la voie de biosynthèse des catécholamines. Cette enzyme ne semble pas transportée jusque dans les terminaisons centrales des fibres et donc dans la moelle épinière puisque une rhizotomie dorsale ne modifie pas la répartition de l'expression de la TH dans la moelle épinière. La TH présente dans la moelle épinière provient donc des voies descendantes des centres supra spinaux (Brumovsky et al., 2006; Li et al., 2011). Bien que l'enzyme soit exprimée dans ce neurones il semble que les C-LTMRs ne synthétisent pas de dopamine ou de noradrénaline (Brumovsky et al., 2006).

Le deuxième marqueur moléculaire spécifiquement exprimé par les C-LTMRs est le transporteur vésiculaire au glutamate 3 qui permet l'empaquetage du glutamate dans les vésicules synaptiques (**VGlut3**, Seal et al., 2009). Contrairement à ses deux autres homologues VGlut1 et VGlut2 qui sont fortement exprimés dans la moelle épinière dorsale et ventrale, VGlut3 est exprimé dans un nombre restreint de neurones (Gras et al., 2002; Todd et al., 2003). A la suite d'une rhizotomie, l'immunomarquage de ce transporteur dans la moelle épinière disparaît du côté ipsilatéral alors qu'il persiste du côté controlatéral, indiquant son origine périphérique et son expression par les neurones sensoriels (Seal et al., 2009). Grâce à un modèle de souris transgénique dans laquelle la protéine fluorescente verte (GFP, Green Fluorescent Protein) s'exprime sous le contrôle du promoteur VGlut3, il a été possible de déterminer la zone de projection des fibres

exprimant ce transporteur dans la moelle épinière : les laminae I et II_i. Au sein de la lamina II_i, les terminaisons des fibres exprimant VGlut3 se situent dans la même aire que les interneurons à PKCγ mais elles ne forment pas pour autant de contacts synaptiques avec ceux-ci (Peirs et al., 2014). Récemment il a été mis en évidence que VGlut3 n'était pas uniquement exprimé par les afférences primaires puisqu'une population neuronale localisée dans la lamina III de la moelle épinière exprime VGlut3 de manière transitoire. Cette population neuronale apparaît dès le 5^{ème} jour post natal et se réduit significativement à partir du 20^{ème} jour post natal (Peirs et al., 2015).

Dans une étude récente, par hybridation *in situ* il a été démontré que la protéine apparentée aux chimiokines, **TFA4** est localisée dans les neurones Ret positifs exprimant la TH et VGlut3. Cette protéine sécrétée de 95 acides aminés (8-14 kDa) appartient à la famille TFAA composée de cinq homologues (TFAA1-5, Tom Tang et al., 2004). L'expression de cette chimiokine est restreinte aux neurones des DRG et du nerf trijumeau, des expériences supplémentaires sont néanmoins nécessaires afin de vérifier que cette protéine est bien libérée par les terminaisons centrales des C-LTMRs dans la moelle épinière. Son expression dans le reste du système nerveux central est assez faible. On la retrouve néanmoins dans l'habenula ainsi que dans certains noyaux du tronc cérébral et de l'hypothalamus (Delfini et al., 2013). Un récepteur putatif de TFA4 appartenant à la famille FPR (Formyl Peptide Receptor) le FPR1, a récemment été identifié sur les macrophages (Wang et al., 2015). Ce récepteur à sept segments transmembranaires couplé aux protéines G est fortement exprimé par les cellules microgliales, les macrophages et les neutrophiles. Lorsqu'il est activé par ses ligands, il favorise la migration, la phagocytose et la libération d'ions superoxyde (Gavins, 2010; Liu et al., 2012).

5. LES MECANORECEPTEURS C A BAS SEUIL ET LA REGULATION DE LA TRANSMISSION DES INFORMATIONS NOCICEPTIVES.

Le fait que les fibres C-LTMRs possèdent leurs terminaisons centrales dans la lamina II_i les place dans une situation privilégiée pour réguler la transmission des stimuli douloureux. Des études chez l'homme ont montré que l'inhibition des fibres C tactiles favorise le développement de l'allodynie alors que leur activation diminue la perception de la douleur chez les sujets sains (Krämer et al., 2007; Linde et al., 2004). Afin de définir la contribution des C-LTMRs dans la modulation de la transmission des informations nociceptives, Seal et al. (2009) utilisèrent un modèle murin chez lequel VGlut3 est absent. Nonobstant leur surdité, ces souris ne présentent pas de différence avec les souris contrôles concernant la coordination motrice ou la vision. Les souris déficientes pour le gène de VGlut3 présentent la même sensibilité que les souris contrôles pour les stimulations thermiques qu'elles soient froides ou chaudes. De même, l'application de filaments calibrés de force croissante sous la patte arrière de l'animal (test de Von Frey permettant de définir un seuil de retrait de la

patte), indique que les souris réagissent de la même manière que leurs homologues sauvages. Ces résultats suggèrent donc que l'absence de VGlut3 ne modifie pas la sensibilité mécanique des animaux pour des stimuli faiblement nocifs. Néanmoins lors de stimulations mécaniques de plus fortes intensités appliquées sur la queue de l'animal, on observe une modification du seuil de sensibilité des animaux qui tend à augmenter. De plus une diminution de la décharge des neurones WDR (Wide Dynamic Range, neurones répondant à la fois aux stimuli mécaniques nocifs et non nocifs) de la moelle épinière est également observée lors d'une stimulation mécanique de forte intensité appliquée au niveau de la patte alors qu'il n'y a aucun changement lors d'une stimulation de plus faible intensité. Enfin, la perte de VGlut3 provoque la diminution de l'hypersensibilité mécanique induite en condition pathologique (inflammation ou neuropathie). Cette étude indique que les mécanorécepteurs C à bas seuil régulent la transmission des stimuli mécaniques douloureux et participent au développement de l'allodynie et de l'hyperalgésie mécanique (**Figure 15**, Seal et al., 2009).

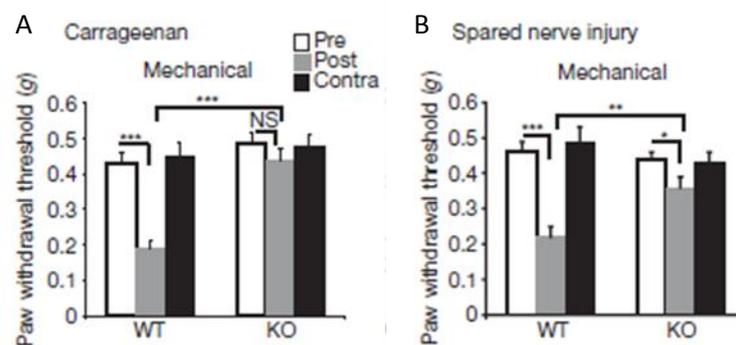


Figure 15: La perte de VGlut3^{-/-} chez les souris entraîne une diminution de l'hypersensibilité mécanique en condition inflammatoire et neuropathique.

A. 24h après une injection intraplantaire seules les souris contrôles (WT) développent une hypersensibilité mécanique en comparaison avec les souris VGlut3^{-/-} (KO).

B. 3 jours après une lésion du nerf sciatique, les souris contrôles développent une hypersensibilité mécanique beaucoup plus importante que les souris VGlut3^{-/-}.

Néanmoins une étude récente nuance les résultats obtenus par Seal et al. (2009). En effet, Lou et al., (2013) montrent que les neurones VGlut⁺ expriment également le facteur de transcription Runx1 (Runt domain transcription factor). Ce facteur de transcription contrôle l'expression de plusieurs gènes dont celui de VGlut 3 et de TH. Runx1 contrôle également la formation des terminaisons périphériques lancéolées des C-LTMRs via l'action de ce facteur de transcription sur le canal Piezo 2 nécessaire à la mécanotransduction du signal (Lou et al., 2013). De façon surprenante chez les souris ne possédant plus ce facteur de transcription (qui par conséquent montrent une importante diminution de l'expression de VGlut3), l'hypersensibilité mécanique induite par une lésion est identique à celle des souris contrôle. Ces résultats suggèrent que VGlut3 n'est pas nécessaire à la modulation de l'hyperalgésie mécanique induite par une neuropathie ou une

inflammation. Cependant, une inflammation provoquée par une injection de carragénine induit chez les souris sans Runx1 une légère augmentation du seuil de sensibilité mécanique. Ce résultat similaire à ceux de Seal et al., indique que les C-LTMRs pourraient avoir un rôle pronociceptif en cas de douleur inflammatoire persistante (Lou et al., 2013; Seal et al., 2009). Une étude récente renforce l'aspect pronociceptif des fibres C-LTMRs. En effet, dans un modèle murin transgénique où le canal calcique Cav3.2 est spécifiquement supprimé des mécanorécepteurs C à bas seuil, le phénotype douloureux est altéré. En condition physiologique ou neuropathique, les animaux présentent une augmentation de leur seuil de sensibilité mécanique et de leur seuil de détection des stimuli nocifs thermiques froids en comparaison avec les souris contrôles. De même, le seuil de sensibilité chimique suite au test de formaline augmente également traduisant un rôle des C-LTMRs dans phase de douleur aiguë et dans la phase plus persistante provoquée par la formaline (François et al., 2015). Les C-LTMRs peuvent donc favoriser la transmission des informations nociceptives provenant des afférences primaires activées par des stimuli sensoriels de différentes natures.

Dans le but d'aller plus loin dans la compréhension du rôle des C-LTMRs dans la modulation de la transmission des informations nociceptives une étude récente s'est portée sur le rôle d'un autre marqueur moléculaire spécifique de ces fibres : TAF4A. L'utilisation d'un modèle murin génétique permettant l'élimination de la protéine TAF4A et la visualisation des fibres C-LTMRs par l'expression de la GFP a permis de montrer que ces souris se développent comme les souris contrôles sans problème moteur ou anxiété. De même l'élimination de TAF4A n'induit pas de changement de seuil de sensibilité thermique ou mécanique chez ces souris. Cependant dans un cas d'inflammation induite par une injection intraplantaire de carragénine, les souris déficientes pour TAF4A présentent une hyperalgie mécanique qui perdure jusqu'à 21 jours, contre 3 pour les souris sauvages (**Figure 16**).

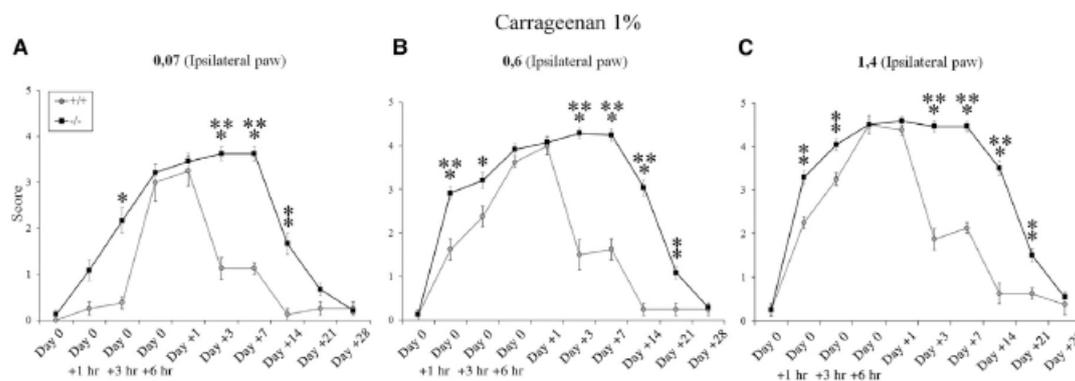


Figure 16: Hypersensibilité mécanique prolongée chez les souris TAF4A^{-/-} en condition inflammatoire. Etude de l'évolution de l'hypersensibilité mécanique au cours du temps (28 jours) avant (Day 0) et après injection de carragénine à l'aide de 3 filaments de Von Frey de force croissante (A 0.07, B 0.6 et C 1.4g, Delfini et al., 2013).

En outre, les souris déficientes pour TFAFA4 montrent une prolongation et une exacerbation des réponses douloureuses dans des modèles de douleurs pathologiques, aussi bien inflammatoire (injection intraplantaire de carragénine ou de formaline) que neuropathique (constriction chronique du nerf sciatique). Dans chacun de ces modèles, l'hypersensibilité mécanique des animaux déficients pour TFAFA4 peut être réduite par une injection intrathécale de TFAFA4 dont les effets s'estompent 8 heures après l'injection. Ces résultats indiquent que TFAFA4 est nécessaire au maintien du seuil de sensibilité mécanique ainsi qu'au maintien du seuil d'hypersensibilité chimique.

Si les effets analgésiques de TFAFA4 sont bien établis dans des modèles d'hyperexcitabilité mécanique ou chimique, son mode d'action au niveau des réseaux spinaux demeure inconnu. A l'aide d'enregistrements électrophysiologiques sur tranches de moelle épinière il a été possible de démontrer que chez les souris sans TFAFA4, les neurones de la lamina II_i sont plus excitables que chez les souris contrôles. En particulier, ces neurones présentent une moindre densité de courants potassiques de type I_A chez les souris déficientes pour TFAFA4. De façon intéressante, l'application de TFAFA4 permet de restaurer partiellement ces courants dans les neurones de la lamina II. Cette étude apporte un premier élément de mécanisme à l'appui d'une action antinociceptive de TFAFA4.

Ces résultats indiquent que VGlut3 et TFAFA4 ont des effets antagonistes et ceci peut expliquer les résultats obtenus avec les souris n'exprimant plus le facteur de transcription Runx1. En diminuant potentiellement à la fois l'expression de TFAFA4 et VGlut3 qui semblent avoir des effets opposés, le seuil de douleur mécanique des animaux n'exprimant plus Runx 1 est identique à celui des souris contrôle (Delfini et al., 2013; Lou et al., 2013). A partir des résultats obtenus dans cette étude sur TFAFA4, les auteurs suggèrent qu'en condition pathologique l'activité des fibres C-LTMRs augmenterait. Ceux-ci libéreraient en conséquence d'avantage de TFAFA4 qui pourrait atténuer la transmission des informations nociceptives aux neurones de la corne dorsale superficielle. Cette hypothèse est renforcée par le fait qu'en condition inflammatoire induite par une injection intraplantaire d'adjuvant complet de Freund (CFA), les enregistrements électrophysiologiques indiquent une augmentation de l'activité des fibres C-LTMRs lors d'un refroidissement de la peau des animaux (Takahashi et al., 2003).

Bien qu'étant principalement impliquées dans le toucher et les interactions sociales (Olausson et al., 2008), les fibres C-LTMRs jouent incontestablement un rôle central dans la transmission des informations douloureuse au sein de la moelle épinière. La mise en jeu des C-LTMRs permettrait donc de diminuer ou d'exacerber la sensibilité à des stimuli mécaniques, démontrant le rôle important de ces fibres dans la transmission des informations nociceptives. De ce fait, ces fibres

pourraient constituer une cible nouvelle pour le développement de nouvelles approches thérapeutiques ciblant les douleurs neuropathiques.

V. OBJECTIFS DE L'ETUDE

Le but de ce projet est de comprendre les mécanismes par lesquels les C-LTMRs contrôlent la décharge des neurones de la lamina II_i de la moelle épinière et la transmission des informations nociceptives vers le cerveau. Nous formulons l'hypothèse que la décharge des C-LTMRs entraîne une modification de l'excitabilité de certains neurones et/ou une altération de la transmission synaptique au sein des réseaux de la lamina II_i.

Pour explorer cette hypothèse, nous avons donc entrepris une première approche consistant à identifier les interneurons spinaux qui sont contactés par les fibres C-LTMRs. Pour cela nous avons tenté de développer une approche optogénétique permettant de stimuler précisément et spécifiquement les C-LTMRs, et d'enregistrer la réponse des neurones de la lamina II_i à une stimulation spécifique des C-LTMRs. Le principe de cette étude consistait à introduire le transgène de la ChannelRhodopsine 2 (ChR2) flanqué de séquences LoxP dans des modèles murins exprimant la Cre recombinase dans les C-LTMRs. Aucune des deux stratégies retenues dans le cadre de cette étude (stratégie virale ou croisement de modèles génétiques murins) n'a permis d'obtenir un marquage spécifique des fibres C-LTMRs (Partie Résultats expérimentaux : approche optogénétique). Afin de contourner ces difficultés, nous avons choisi d'étudier le rôle des C-LTMRs dans la transmission des informations douloureuses au travers d'une approche pharmacologique. En effet, les C-LTMRs expriment de façon spécifique un certain nombre de substances biologiquement actives, parmi lesquelles la chimiokine TFAFA4, dont les effets analgésiques ont été précédemment démontrés. Nous avons enregistré par des techniques d'électrophysiologie *in vitro* (patch-clamp) et *in vivo* les réponses cellulaires et synaptiques des neurones de la lamina II_i à une application exogène de TFAFA-4 recombinant. Cette approche pharmacologique, combinée à des études comportementales, immunohistochimiques et ultrastructurales, nous a permis de définir un circuit neuronal local pouvant en partie expliquer l'effet antinociceptif de TFAFA4 observé lors d'une précédente étude (Delfini et al., 2013).

Résultats expérimentaux : Approche optogénétique

I. INTRODUCTION

Afin de comprendre le rôle des C-LTMRs dans la transmission des informations douloureuses, d'identifier les différents interneurons relayant cette information au sein de la moelle épinière, et de caractériser le fonctionnement et la plasticité des réseaux neuronaux recrutés par les C-LTMRs, il est nécessaire de pouvoir manipuler spécifiquement et précisément ces derniers. Les techniques optogénétiques, permettant d'activer précisément les neurones au moyen d'une source de lumière, apparaissent comme une solution bien adaptée au contrôle des C-LTMRs. Nous avons donc entrepris une approche consistant à enregistrer la réponse des neurones de la lamina Iii à une stimulation spécifique des C-LTMRs obtenue par des techniques d'optogénétique (**Figure 17**). La spécificité de la stimulation est obtenue en infectant localement les DRG de souris exprimant la Cre-recombinase sous le contrôle du promoteur TH (marqueur spécifique des C-LTMRs), par des adénovirus recombinants ou des lentivirus porteurs du gène de la ChannelRhodopsine 2 (ChR2, un canal cationique activé par une longueur d'onde à 480nm) flanqué de séquences LoxP. Dans le cadre de ce travail, nous avons tout d'abord utilisé une souris TH-Cre, exprimant la Cre recombinase sous le contrôle du promoteur TH du rat. Pour cette souris, l'expression de la Cre recombinase dans les cellules dopaminergiques a été validée dans la rétine, le locus coeruleus et la substance noire (Savitt et al., 2005).

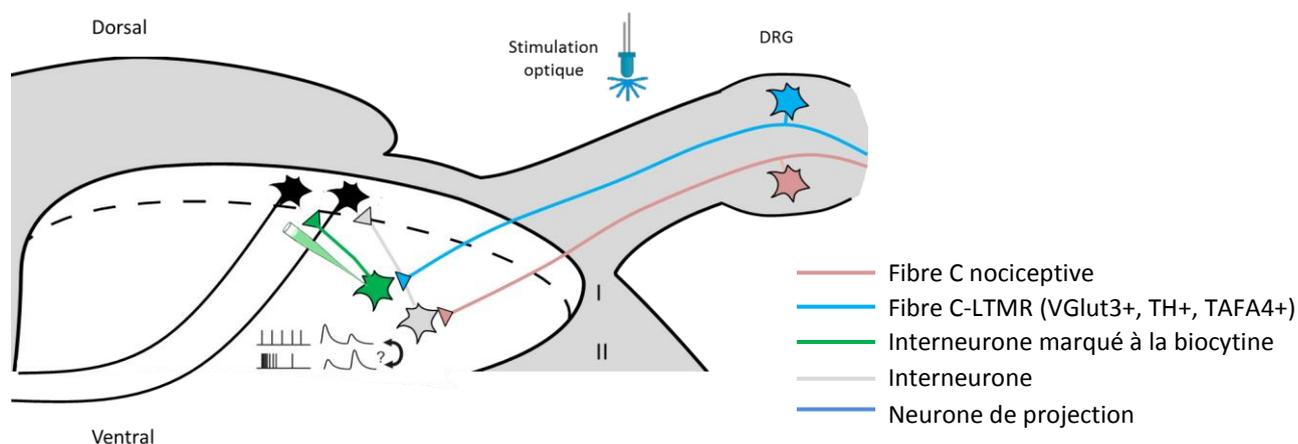


Figure 17: Schéma du principe de l'approche optogénétique utilisée.

En combinant une stimulation optogénétique des C-LTMRs avec des enregistrements en patch clamp et un marquage à la biocytine des interneurons spinaux, il sera possible d'identifier les neurones recevant des informations des C-LTMRs, de caractériser le fonctionnement et la plasticité de la synapse C-LTMR-interneurone en condition physiologique et pathologique, et de déterminer comment le recrutement des C-LTMRs module la transmission des informations nociceptives jusqu'aux neurones de projection.

La stratégie virale repose sur l'utilisation de virus Adeno-Associés (AAV) ou de lentivirus (non montré) intégrant dans leur génome le transgène ChR2 couplé à la protéine fluorescente venus (ChR2-venus), flanqué de séquences LoxP. Les virus sont injectés par voie intrathécale, intrasciatique ou intra DRG pour infecter les cellules sensorielles, parmi lesquelles les C-LTMRs.

Quatre sérotypes d'AAV et un lentivirus ont été testés afin de caractériser la virulence et le tropisme de chaque virus, puis de déterminer le sérotype le plus adapté à la transfection des fibres C-LTMRs. Dans le même temps, la spécificité d'expression de la Cre vis-à-vis des C-LTMRs a été testée expérimentalement en croisant la souris TH-Cre avec une souris reportrice Td-Tomato. L'ensemble de ces expériences ont conduit à montrer i) que les taux d'infections des C-LTMRs restent faibles, quels que soient les serotypes et voies d'infection utilisées, et ii) que la souris TH-Cre utilisée présentait une recombinaison aspécifique, en dehors des C-LTMRs, rendant cette souris inadaptée aux expériences envisagées.

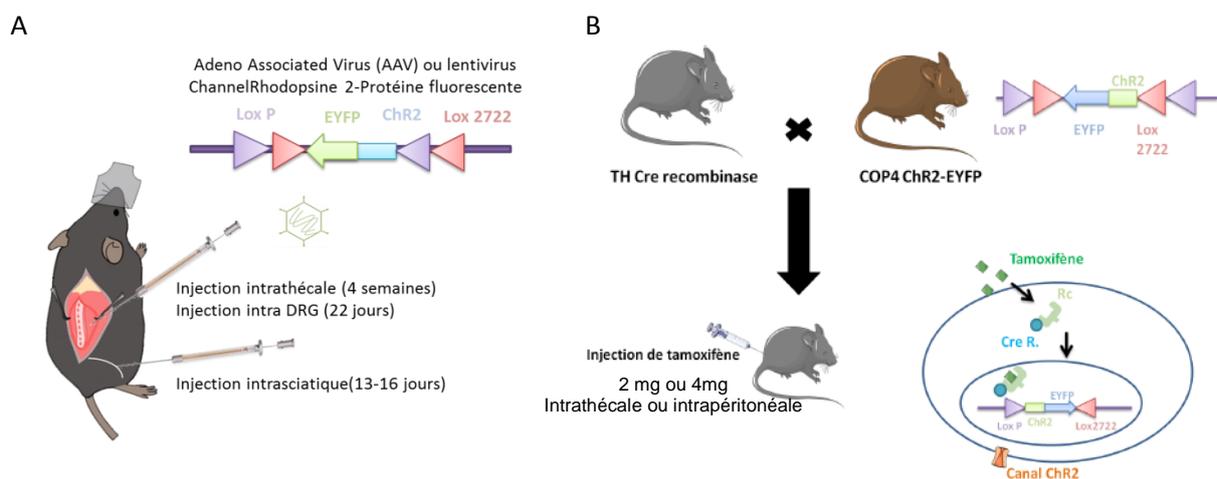


Figure 18: Représentation schématique des deux stratégies d'expression spécifique de la ChR2 dans les C-LTMRs mises en oeuvre

A. Dans la première stratégie, le transgène est introduit au moment propice par une injection de virus recombinant.

B. Dans la seconde stratégie, le transgène est présent constitutivement, mais la recombinaison permettant son expression n'est permise que par l'injection locale de Tamoxifène au moment approprié.

Nous avons mis en place une stratégie alternative, consistant à croiser deux souches de souris génétiquement modifiées. La première est une souris COP4 possédant une séquence codant pour la ChR2 fusionnée avec le marqueur EYFP et flanquée de sites loxP. Cette souris est croisée avec une souche exprimant la cre-recombinase sous le contrôle du promoteur TH. La TH est une enzyme pouvant être exprimée transitoirement au cours du développement. Les Souris TH-Cre sont donc susceptibles de présenter une expression développementale plus étendue que chez l'adulte.

Afin de pallier les phénomènes de recombinaison en dehors des C-LTMRs au cours du développement, il est nécessaire d'utiliser une Cre recombinase inducible. Nous avons donc utilisé une souche de souris exprimant sous le contrôle du promoteur TH une Cre recombinase fusionnée au récepteur aux œstrogènes (CreER). Dans ces souris, la Cre recombinase est exportée dans le cytosol et demeure donc inactive. L'injection de tamoxifène, un agoniste du récepteur aux oestrogènes, induit une translocation de la CreER dans le noyau, permettant ainsi la recombinaison des allèles floxés (**Figure 18**).

II. MATERIEL ET METHODES.

1. ANIMAUX

Les protocoles expérimentaux ont été validés par le comité d'éthique local sous le numéro 50120155A. Les animaux étaient maintenus en cycle jour-nuit normal (12h-12h), avaient un accès illimité à l'eau et à la nourriture et étaient régulièrement suivis par les animaliers et les personnes en charge des expériences. Aucun signe d'altération de l'état de santé des animaux (apparence du pelage, prostration) n'a pu être observé durant les expériences.

Pour les approches par croisement, les souris utilisées dans ces expériences sont issues d'un croisement TH CreER (Souris Jax : Th tm1.1 (cre/ERT2)Ddg) avec une souris COP4 (Souris Jax : Gt(ROSA)26Sortm32(CAG-COP4*H134R/EYFP)Hze). Chez ces souris, on injecte pendant 3 jours 2mg de tamoxifène en intrapéritonéal (IP) ou, 2 ou 4 mg en intrathécale (IT) à P13, P14 et P15 entre les vertèbres L5 et L6.

2. MODE D'INJECTION ET VIRUS UTILISES :

Les expériences sont réalisées sur des souris C57Bl6J âgées de 4 semaines afin de mettre au point le protocole d'injection des AAV et des lentivirus (Tableau 1). Une fois le protocole mis au point, les virus sont injectées chez des souris TH-Cre (Souris Jax: B6.Cg Tg (TH-Cre) 1Tmd/J), qui expriment la Cre recombinase sous le contrôle du promoteur à la TH. Les virus (Addgene) utilisés pour les expériences sont détaillés dans le tableau I. 11 souris âgées de 4 semaines sont anesthésiées avec de l'isoflurane 4% puis avec de l'isoflurane 2% durant l'injection. Dans certains cas (n=3), une injection intrapéritonéale (IP) de mannitol (300µl) facilitant l'ouverture de la barrière hémato-méningée est effectuée. Une incision est ensuite pratiquée au niveau lombaire et 5µl de solution contenant 10^{10} génomes viraux dilués dans du PBS 0,01M sont injectés par voie intrathécale entre les vertèbres lombaire 5 (L5) et lombaire 6 (L6) via une seringue Hamilton munie d'une aiguille de 26 gauge. La plaie est fermée par 1 point de suture et les animaux maintenus en cages collectives pendant 4 semaines après l'injection. Pour les injections réalisées chez les jeunes, les souris non anesthésiées (n=6) âgées de 8 jours sont maintenues par les crêtes iliaques et reçoivent 2,5 µl de solution contenant 10^{10} génomes viraux dilué dans du PBS 0,01M par injection intrathécale entre les vertèbres lombaires 5 et 6 (L5, L6) via une seringue Hamilton munie d'une aiguille 27 gauge. Les animaux sont maintenus en cage collective pendant 2 semaines après l'injection.

Pour les injections intra sciatique les expériences sont réalisées sur des souris de 13 à 16 jours. Les souris sont anesthésiées avec 4% d'isoflurane puis avec 2% pendant la durée de l'injection. Le site d'injection est ensuite rasé et désinfecté avec 70% d'éthanol. Une incision d'1 cm au niveau de

la cuisse droite de l'animal est ensuite effectuée afin d'exposer le muscle quadriceps et de permettre l'accès au nerf sciatique. A l'aide d'une micropipette en verre (30-40 µm de diamètre), connectée à une seringue de 2ml, 0.5-1 µl de solution virale contenant 5.10^{12} génomes viraux d'AAV sont injectés.

Pour les injections intra DRG les expériences sont réalisées chez des souris de 22 jours. Les souris sont anesthésiées avec 4% d'isoflurane (2% durant l'injection). Les animaux sont ensuite rasés et désinfectés au niveau de la zone à injectée. La peau est incisée au niveau des crêtes iliaques, les muscles paraspinaux sont ensuite délicatement séparés des processus épineux des vertèbres. Lorsque l'articulation entre les vertèbres L5 et L6 est dégagée des muscles, les faces articulaires des vertèbres sont coupées permettant l'accès au DRG. A l'aide d'une micropipette de verre (30-40 µm de diamètre) connectée à une seringue de 2ml, 2 µl de virus contenant 5.10^{12} génomes viraux sont injectés dans le DRG des animaux. La plaie est ensuite fermée par plusieurs points de suture et les animaux sont maintenus en cages collectives pendant 4 semaines.

Tableau 1: Virus utilisés lors des expériences

| Sérotype | Tag | Construction |
|-------------------|---------|--|
| AAV2/1 | venus | AAV2/1ChR2V:AAV2/1.CAG.ChR2-Venus.W.SV40;CS0118 |
| AAV2/1 | mcherry | AAV2/1ChR2 : AAV2/1.hsynapsine-hChR2(H134R)-mcherry |
| AAV2/5 | venus | AAV2/5ChR2V:AAV2/1.CAG.ChR2-Venus.W.SV40;V1774 |
| AAV2/6 | eGFP | AAV2/6ChR2 : AAV2/6. CMV.ChR2-eGFP. LEN-Vial 000944 |
| AAV2/9 | venus | AAV2/9ChR2V:AAV2/1.CAG.ChR2-Venus.W.SV40;V2060 |
| AAV2/9 | EYFP | AAV2/9ChR2E : AAV2/9.CAG.DIO-ChR2 (H134R)-EYFP; CS0124 |
| Lentivirus | GFP | Lentivirus ChR2-GFP |

3. OBTENTION DES COUPES DE TISSUS :

Les souris sont anesthésiées au pentobarbital (60 mg/kg Intrapéritonéal (IP)) puis fixées par perfusion intracardiaque de 10 ml de NaCl 0.9% pendant 2 minutes environ suivis par 40ml de PFA à 4% dans du PBS 0,01M pendant 10 minutes. Une dissection des animaux est ensuite effectuée afin de prélever les ganglions rachidiens dorsaux (DRG) entre les vertèbres lombaire L1 et sacrée 1 (S1) ainsi que la moelle épinière (au niveau du renflement lombaire). Les prélèvements sont ensuite post-fixés au froid (4°C) pendant une heure, cryoprotégés par immersion dans une solution de cryoprotection (30% sucrose, 0.05% azide de sodium dans du PBS 0,01M) pendant 24 heures minimum.

Les prélèvements sont alors congelés dans du tissue-Tek par immersion dans de l'isopentane à -60°C, puis conservés à -80°C. Des coupes de 30 µm sont ensuite effectuées à l'aide d'un cryostat (Microm HM 560). Les coupes de DRG sont collectées sur lames gélatinées et sont stockées à -20°C en attendant la réalisation des expériences d'immunohistochimie. Les coupes de moelle épinière sont quant à elles récupérées dans du PBS 0.01M puis placées dans une solution contenant du PBS 0,1M+10% de glycérol+25% de sucrose pour ensuite les conserver à -80°C en attendant la réalisation des expériences d'immunohistochimie.

4. IMMUNOHISTOCHIMIE SUR COUPES DE MOELLE EPINIÈRE ET DE DRG.

Les coupes de moelle épinière et de DRG sont rincées dans une solution de PBS 0,01M trois fois pendant 10 minutes puis rincées dans du PBST pendant 10 minutes. Les coupes sont incubées sous agitation lente avec l'anticorps primaire (Tableau 2), dilué dans du PBST+1% BSA durant une nuit. Le lendemain les coupes sont rincées trois fois dans du PBST et incubées 2 heures à l'obscurité avec les anticorps secondaires (Tableau 3) dilués dans du PBST 1% BSA. Après 3 rinçages de 10 minutes dans du PBS, les coupes sont montées entre lame et lamelle dans du DAKO. Les coupes sont ensuite conservées à -20°C jusqu'à la réalisation d'acquisitions confocales.

Pour les expériences de double marquage de la TH et de venus, les révélations immunohistochimiques ont été réalisées de façon séquentielle.

Tableau 2: Anticorps primaires utilisés

| Anticorps primaires | Espèce | Dilution |
|--|--------|----------|
| Anti-GFP (Invitrogen A6455) | Lapin | 1/1000 |
| Anti-Pan neuronal filaments (Sternberger SMI 311) | Souris | 1/500 |
| Anti-TH (Millipore A1542) | Mouton | 1/1000 |

Tableau 3: Anticorps secondaires utilisés

| Anticorps secondaires | Espèce d'origine | Dilution |
|---|------------------|----------|
| Anti-IgG de lapin Alexa 488 (Invitrogen A11015) | Chèvre | 1/500 |
| Anti-IgG de souris Alexa 568 (Invitrogen A-11004) | Chèvre | 1/500 |
| Anti-IgG de mouton Alexa 647 (Jackson 713-605-003) | Ane | 1/1000 |

5. ACQUISITION ET ANALYSE DES IMAGES.

Les observations microscopiques ont toutes été réalisées sur un microscope Zeiss Axoplan 2 équipé d'une camera CCD (DS-RI1 Nikon) couplé au logiciel NIS Elements (objectifs x40 x10) (moelle épinière) ou sur un microscope confocal Leica SPE (Objectifs x40, x63) (double marquage sur les coupes de ganglions rachidiens et sur les coupes de moelle épinière. Le pourcentage de cellules infectés et TH positives, le diamètre des neurones des DRG sont mesurés à l'aide du logiciel image J. Seules les cellules dont le noyau était visible ont été comptabilisées pour les quantifications.

III. RESULTATS

1. APPROCHE VIRALE

Le but de ces expériences est de recruter spécifiquement les fibres C-LTMRs par stimulation optogénétique. L'approche retenue dans un premier temps a été d'infecter les DRG de souris exprimant la Cre-recombinase sous le contrôle du promoteur TH, par des adénovirus ou lentivirus recombinants porteurs du gène de la Chr2 flanqué de séquences LoxP, limitant ainsi l'expression du transgène aux seuls C-LTMRs (TH positifs). Tout d'abord, nous avons cherché à mettre au point et valider les techniques de transfection virale au niveau des DRG de la région lombaire en réalisant chez des souris sauvages des injections intrathécales d'AAV recombinants porteurs d'un gène codant pour une protéine de fusion Chr2-venus. Ces expériences ont pour but de déterminer les sérotypes et l'âge des animaux les plus propices à une infection des C-LTMRs. Plus spécifiquement, nous avons vérifié i) la présence de cellules infectées au niveau des ganglions rachidiens, ii) l'efficacité de la transfection en dénombrant le nombre de cellules transfectées dans les DRG. iii) le transport de la protéine fusion jusque dans les terminaisons nerveuses au niveau de la moelle épinière, iv) l'expression du virus dans les C-LTMRs, identifiés par révélation immunohistochimique de la Tyrosine Hydroxylase (TH).

1. EXPRESSION DE CHR2-VENUS DANS LES DRG SUITE A UNE INJECTION VIRALE INTRA SCIATIQUE, INTRATHECALE OU INTRA DRG.

Dans le but de déterminer à quel stade du développement des animaux l'injection virale devait être effectuée, nous avons quantifié le nombre de neurones TH+ au sein des DRG à 9, 15, 21 et 38 jours post nataux (P9, P15, P21, P38). La **Figure 19(A-D)** illustre des exemples d'immunomarquages des cellules TH+ dans les DRG pour les quatre stades post nataux. Le nombre de neurones exprimant la TH augmente de façon importante entre le 9^{ème} et le 15^{ème} jour post nataux puis se stabilise entre les stades P21 et P38 (**Figure 19E**). Ces résultats suggèrent que le stade post natal le plus adapté pour que le taux de recombinaison dans les neurones TH+ soit maximal se situe à partir de P15.

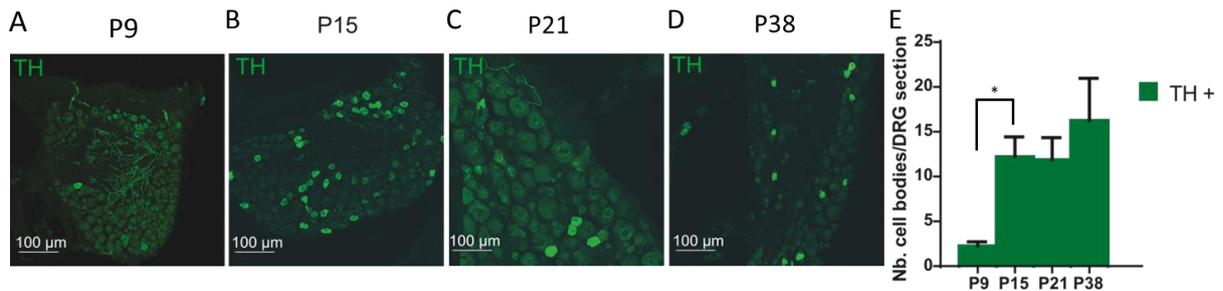


Figure 19: Expression post natale de l'expression de la tyrosine hydroxylase.

A-D Visualisation immunohistochimique des cellules TH+ (vert) dans les DRG lombaires à P9, P15, P21 et P38.

E. Moyenne du nombre de cellules TH+ observé par coupe de DRG lombaires à P9, P15, P21 et P39 (N=2). Les données sont représentées comme moyenne \pm SEM et analysées en utilisant le test t de Student non apparié. La différence est statistiquement significative lorsque le seuil (P) <0.05 (*).

Nous avons ensuite testé 3 voies d'injection des virus afin de définir celle qui permettait d'obtenir le meilleur taux d'infection. Chez des souris sauvages l'adénovirus associé AAV2/9-ChR2-Venus a été injecté dans le nerf sciatique, dans l'espace médullaire (intrathécale) et dans les DRG lombaires (Figure 20A-C). Après amplification immunohistochimique de Venus et quantification des corps cellulaires TH+ dans les DRG 15 jours après l'injection, les résultats indiquent que les taux de transduction les plus importants sont obtenus après injection intrathécale (Figure 20D). Bien que l'injection intra DRG permette également d'obtenir un nombre satisfaisant de cellules marquées (résultats non représentés), sa mise en œuvre est plus invasive l'injection intrathécale a été sélectionnée pour le reste de l'étude.

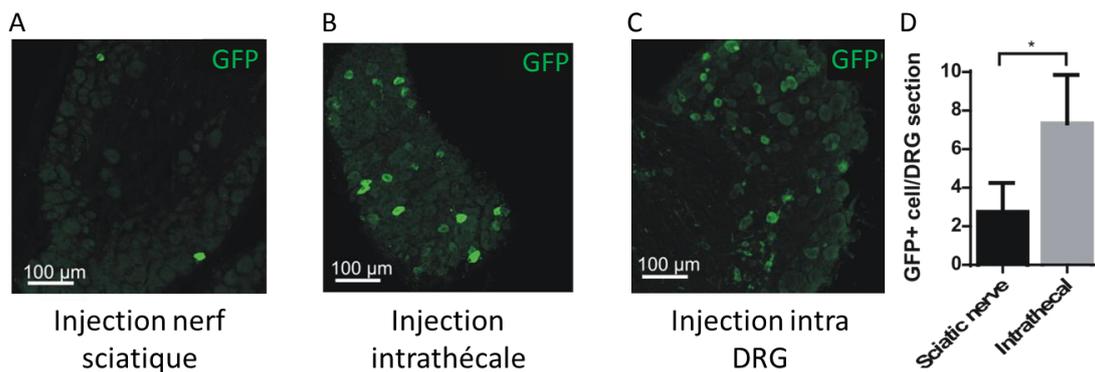


Figure 20: Efficacité de la transduction virale des neurones des DRG suivant trois modalités d'injection.

A-C Amplification immunohistochimique du marquage dans les DRG lombaires suite à une injection d'AAV recombinant intra sciatique (A), intrathécale (B) et intra DRG (C). D- Quantification du nombre moyen de cellules par coupe de DRG lombaire exprimant la ChR2 lorsque l'AAV est injecté en intra sciatique (N=7) ou en intrathécal (N=3). Les données sont représentées comme moyenne \pm SEM et analysées en utilisant le test t de Student non apparié. La différence est statistiquement significative lorsque le seuil (P) <0.05 (*).

2. EXPRESSION DU TRANSGÈNE CHR2-VENUS DANS LES NEURONES DES GANGLIONS RACHIDIENS.

Nous avons alors cherché à déterminer le sérotype viral présentant le meilleur taux de transfection. Pour ces expériences, 3 sérotypes (2/1, 2/5 et 2/9) ont été testés. Les virus ont tout d'abord été injectés par voie intrathécale chez des souris âgées de 4 semaines. Après visualisation immunohistochimique du marquage lié à l'expression de la protéine venus, nous avons observé de nombreux corps cellulaires infectés dans les DRG prélevés entre les vertèbres L5 et S1 (**Figure 21A-C**). Après décompte du nombre de cellules infectées, nos résultats indiquent que 22% de la population cellulaire est infectée par le virus AAV2/1. Les sérotypes 2/9 et 2/5 montrent des taux d'infection plus faibles, avec respectivement 12% et 7,5% de l'ensemble des cellules marquées (**Figure 21D**). Les taux d'infection étant peu élevés, nous avons cherché à augmenter ces taux en injectant le virus chez des souris âgées de 8 jours, comme cela est rapporté dans la littérature (Foust *et al.*, 2009). Nos résultats indiquent que l'injection chez ces souris n'induit qu'une augmentation de 3% du taux d'infection des cellules des DRG (non illustré). Finalement, afin de déterminer le caractère neuronal ou glial des cellules infectées, nous avons marqué l'ensemble de la population neuronale des DRG par révélation immunohistochimique des filaments neuronaux. Ces expériences révèlent que l'ensemble des cellules infectées apparaissent doublement marquées (**Figure 21D**), confirmant ainsi le tropisme neuronal des différents virus utilisés. L'injection intrathécale des virus, et notamment du sérotype 2/1, semble donc un moyen efficace de provoquer l'expression d'un transgène au niveau des neurones des DRG.

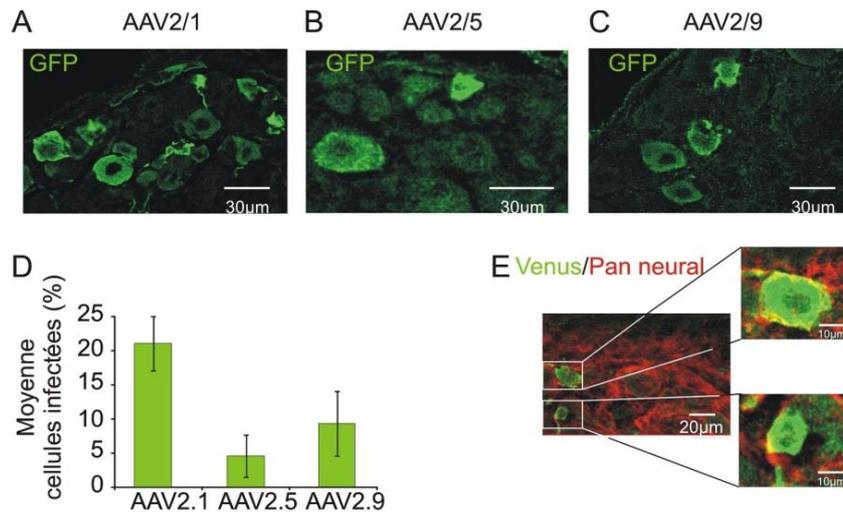


Figure 21: Efficacité et sélectivité de la transduction des neurones des DRG pour différents sérotypes d'AAV.

A-B-C Amplification immunocytochimique du marquage lié à la protéine venus dans les DRG au niveau L5 pour les sérotypes AAV2/1 (A), AAV2/5 (B), AAV2/9 (C).

D. Comparaison du pourcentage de cellules infectées pour les 3 sérotypes. AAV2/1 semble être le plus efficace pour les cellules des DRG.

E. Immunodétection du pan neuronal filaments (rouge) et visualisation des cellules infectées (vert) par le sérotipe AAV2/9. Le virus injecté infecte bien les neurones et non les cellules gliales. Les résultats sont exprimés comme moyenne \pm SEM, N=3.

3. EXPRESSION DU TRANSGENE CHR2-VENUS DANS LA MOELLE EPINIÈRE.

Nous avons dans un second temps déterminé si la protéine fusion exprimée par les neurones infectés était exportée au niveau des terminaisons nerveuses de la moelle épinière. Chez les animaux injectés AAV 2/1 La révélation immunohistochimique de la protéine fusion Chr2-venus révèle la présence de nombreuses fibres marquées dans la moelle dorsale (**Figure 22A**) et ventrale. Nos résultats montrent une extension rostro-caudale des fibres infectées allant de L3 jusqu'à S1 pour l'ensemble des sérotypes étudiés (AAV2/1 et 2/9 : **Figure 22B**, AAV 2/5: non illustré) avec une intensité de marquage plus importante pour les sérotypes AAV2/1 et AAV2/9. De façon intéressante, nous n'avons jamais observé de corps cellulaire marqué au niveau de la moelle, suggérant que le virus n'atteint pas directement les neurones de la moelle. Au final, nos résultats indiquent que la protéine fusion est bien adressée au niveau de la moelle par les afférences primaires infectées.

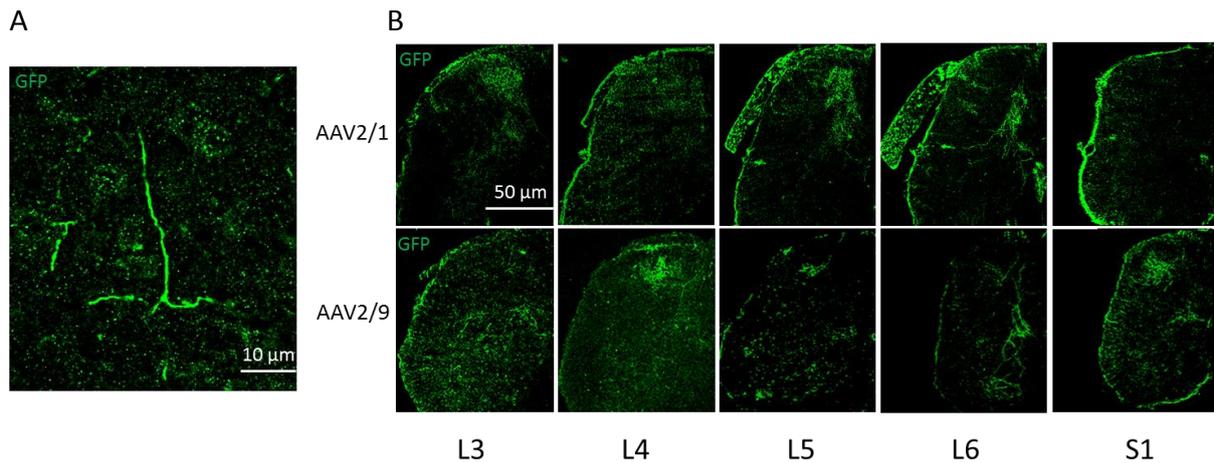


Figure 22: Expression du sérotype AAV2/1 dans les fibres sensorielles au niveau de la moelle épinière.

A. Immunomarquage des fibres nerveuses transfectées par le virus AAV2/1 au niveau des couches superficielles de la moelle épinière. La protéine de fusion ChR2-Venus est bien exportée au niveau de la moelle épinière.

B. Extension rostro-caudale du marquage observé dans la moelle épinière suite à l'injection des sérotypes AAV2/1 (haut) et 2/9 (bas). Le marquage s'étend du niveau L3 au niveau S1.

4. EXPRESSION DES VIRUS 2/1 ET 2/9 DANS LES C-LTMRS ?

Afin de caractériser les sous-types neuronaux marqués par les différents sérotypes utilisés, nous avons mesuré la taille des neurones infectés, et comparé ces diamètres avec ceux de la population neuronale des DRGs, et ceux des C-LTMRs caractérisés par révélation immunohistochimique de la TH (**Figure 23A**). Au niveau des DRGs, le sérotype AAV2/1 marque essentiellement des petits neurones (en moyenne $14,2 \mu\text{m} \pm 0,69$), bien que des neurones de diamètre plus important soient également marqués (**Figure 23A**). Le sérotype AAV 2/9 infecte aussi bien des petites que des moyennes cellules (en moyenne $16,03 \mu\text{m} \pm 0,84$, **Figure 23B**). Quant au sérotype AAV2/5, il infecte essentiellement des neurones de taille moyenne (en moyenne $18,84 \mu\text{m} \pm 2,59$, **Figure 23C**). La révélation immunohistochimique de la TH révèle que les C-LTMRs sont des cellules de petite taille (en moyenne $13,24 \mu\text{m} \pm 0,34$, **Figure 23A-C**), suggérant que les sérotypes AAV 2/1 et AAV2/9 pourraient en partie cibler cette population neuronale. Cependant, chez les souris adultes nous n'avons observé que de très rares cellules immuno positives pour la TH infectées par le sérotype 2/1 (**Figure 23D**), et aucune cellule exprimant le virus et la TH lorsque l'AAV2/9 est injecté. La même expérience effectuée chez les souris P8 n'induit pas d'augmentation du nombre de cellules doublement marquées pour AAV2/1. Cependant, pour le sérotype AAV2/9 l'immunohistochimie a permis de révéler la présence de quelques cellules doublement marquées puisque l'on peut dénombrer jusqu'à 10 % des cellules TH infectées par le sérotype AAV2/9 sur une coupe de DRG (**Figure 23E**).

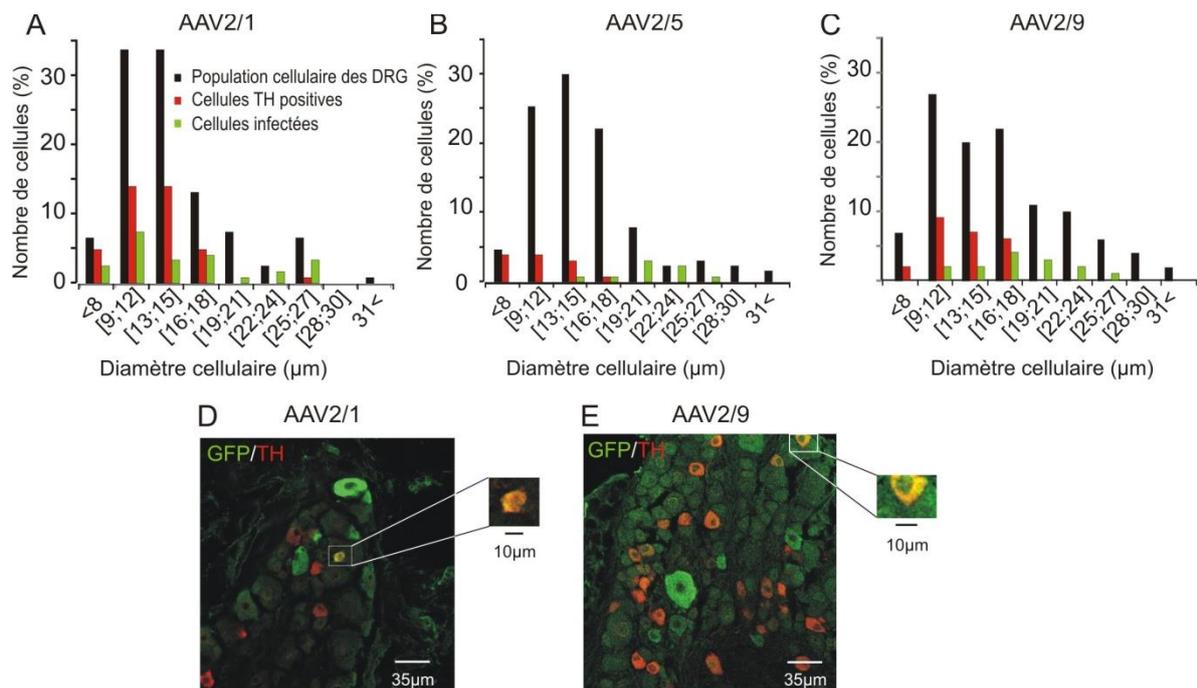


Figure 23: Expression du transgène dans les fibres C-LTMRs.

A. Distribution des diamètres cellulaires des neurones des DRG lombaires (noir) des cellules infectées (vert) et des cellules TH+ (rouge) suite à l'injection intrathécale de l'AAV2/1 (N=3). Ce sérotype infecte majoritairement les cellules de petit diamètre.

B. Distribution des diamètres cellulaires des cellules infectées suite à l'injection de l'AAV2/5 (N=3). Ce sérotype marque les neurones de grande taille.

C. Distribution des diamètres cellulaires des cellules infectées lorsque l'AAV2/9 est injecté (N=3). Ce sérotype marque de façon identique les cellules de petit et de moyen diamètre.

D-E. Double immunohistochimie TH/GFP montrant le double marquage entre les cellules infectées et TH+ pour le sérotype AAV2/1 (D) et pour AAV2/9 (E). Pour les 2 sérotypes le nombre de cellules doublement marquées est faible.

Le faible nombre de cellules TH positives infectées par les sérotypes 2/1 et 2/9 est confirmée par la quasi absence de fibres marquées par le virus au niveau de la lamina Iii (**Figure 24A et B**). En effet, une observation attentive de la distribution des fibres marquées par les virus au niveau de la moelle dorsale révèle un marquage important dans les lamina I et III-IV, ainsi que de la corne ventrale tandis que la lamina II apparaît très peu marquée (**Figure 24A et B**). Les résultats de ces expériences indiquent que les fibres infectées par le virus ne projettent pas dans la lamina Iii de la moelle épinière pour le sérotype AAV2/1 mais projettent essentiellement au sein des lamina I, III de la corne dorsale de la moelle épinière (**Figure 24A et B**).

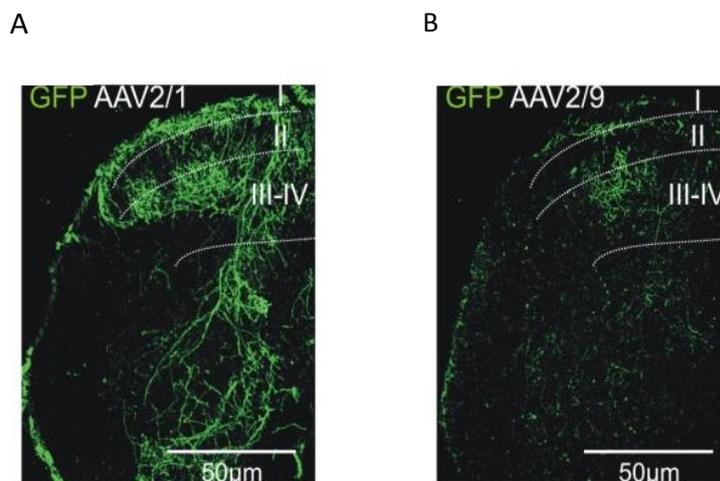


Figure 24: Distribution des fibres marquées par les sérotypes AAV2/1 et 2/9 dans la moelle épinière.

A-B. Répartition des fibres infectées projetant dans la moelle épinière lombaire, pour le sérotype AAV2/1 (A) et le sérotype AAV2/9 (B). La lamina II_i de la moelle épinière semble très peu marquée.

Au final, nos expériences nous ont permis de valider les techniques d'expression d'un transgène dans la population neuronale des DRG et les fibres sensorielles primaires au niveau de la moelle épinière. Il semble néanmoins qu'aucun des sérotypes testés n'infecte les C-LTMRs en quantité suffisante pour envisager leur utilisation chez les souris TH-Cre, et cibler ainsi l'expression de la channelrhodopsine2 dans les C-LMTRs.

5. VERIFICATION DU MODELE GENETIQUE

Dans le même temps, afin de déterminer si l'expression de la Cre recombinase se faisait uniquement dans les neurones TH⁺ ou si la recombinaison pouvait avoir lieu dans d'autres types cellulaires. La souris TH-Cre a été croisée avec une souris reportrice (Ai9Tomato). Cette dernière est porteuse d'un transgène codant pour la protéine fluorescente Tomato flanqué par deux séquences loxP. L'analyse immunohistochimique des coupes de DRG de souris issues du croisement TH-Cre X Ai9Tomato puis la quantification des neurones Tomato⁺ et TH⁺ ont permis de comparer l'expression de ces deux marqueurs aux différents stades post nataux. A tous les stades de développement, on observe des neurones exprimant le marqueur Tomato. Cependant, la très grande majorité de ces neurones ne sont pas immunopositifs pour la TH (74/76 cellules **Figure 25A-C**), alors que la majorité des cellules TH⁺ n'expriment pas le marqueur Tomato. De plus, contrairement aux neurones TH⁺ dont le nombre augmente entre P9 et P15 avant de se stabiliser, le nombre de neurones Tomato⁺ augmente de façon progressive jusqu'à atteindre un pic P21 puis diminue (**Figure 25E**). Ce résultat indique que l'expression du marqueur Tomato dans des cellules TH négatives ne résulte pas d'une expression transitoire de la Cre recombinase au cours du développement. Afin de confirmer que les populations neuronales Tomato⁺ et TH⁺ sont des populations distinctes, les diamètres des somas ont

été mesurés. Les neurones TH⁺ ont un soma dont la taille se situe aux alentours de 300 μm^2 , correspondant à celle des somas des fibres C-LTMRs (**Figure 25F**, Li et al., 2011). Les diamètres des somas des cellules Tomato⁺ sont à l'inverse très variés suggérant que la recombinaison ne s'effectue pas dans une population neuronale spécifique (**Figure 25F**).

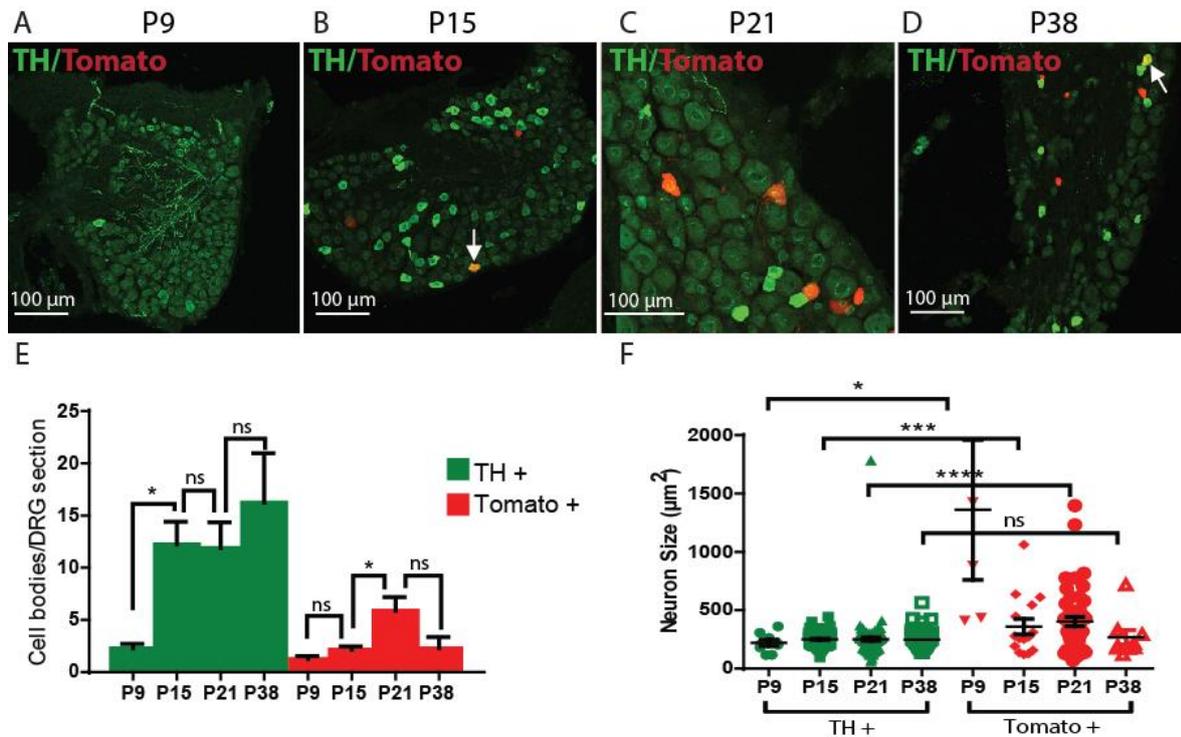


Figure 25: Expression de la Tomato et de la TH dans les DRG des souris issues du croisement THCre Ai9Tomato à différents stades post-nataux.

A-D. Visualisation immunohistochimique de la TH (vert) et du marqueur Tomato (rouge) sur des coupes de DRG lombaires de souris issues du croisement TH-Cre X Ai9Tomato à P9, P15, P21 et P39. La flèche indique la présence de cellule exprimant la TH et la Tomato.

E. Moyenne du nombre de neurones TH⁺ et Tomato⁺ par coupe de DRG à P9, P15, P21 et P38.

F. Distribution des tailles des neurones TH⁺ et Tomato⁺. Les résultats sont présentés comme moyenne \pm SEM. Les résultats sont comparés à l'aide du test t de Student et la différence est statistiquement significative lorsque le seuil observé (P) est <0.05 (*), <0.01 (**), <0.001 (***), <0.0001 (****).

L'ensemble de ces résultats indique que dans cette première souche de souris, l'expression aspécifique de la Cre recombinase dans ces cellules n'exprimant pas la TH ne permet pas de cibler spécifiquement l'expression d'un transgène dans les C-LTMRs. Nous avons donc entrepris une seconde approche par croisement de souris TH-CreER X COP4.

2. APPROCHE PAR CROISEMENT

1. EXPRESSION DE LA TH ET DE LA CHR2-EYFP DANS LES DRG THORACIQUES ET LOMBAIRES.

Nos résultats ne nous ont pas permis d'identifier un vecteur viral efficace pour exprimer le transgène ChannelRhodopsine dans les C-LTMRs. Une approche alternative à l'utilisation d'un vecteur viral réside alors dans l'utilisation de souches de souris transgéniques (COP4), possédant le transgène CHR2 fusionné à la protéine fluorescente EYFP (enhanced yellow fluorescent protein) flanqué de séquences LoxP (**Figure 18**). Ces souris peuvent être croisées avec une souris exprimant la Cre-recombinase sous le contrôle du promoteur TH. Dans le cas des C-LTMRs, cette stratégie présente 2 inconvénients majeurs : d'une part, il est possible que la TH (et donc la Cre recombinase) fasse l'objet d'une expression transitoire au cours du développement, conduisant à une recombinaison aspécifique des transgènes d'intérêt. D'autre part, la recombinaison est susceptible de se produire dans l'ensemble du système nerveux, affectant ainsi les neurones dopaminergiques du cerveau dont certains projettent sur la moelle épinière (locus, Coeruleus, aire hypothalamique A11).

Afin de contourner ces difficultés, nous avons utilisé une souris exprimant une cre recombinase inducible par le tamoxifène. Cette souris exprime sous le contrôle du promoteur TH une cre recombinase couplée au récepteur aux œstrogènes (CreER). Dans ces souris, la Cre recombinase est exportée dans le cytosol et demeure donc inactive. L'injection de tamoxifène dans ces souris induit une translocation de la CreER dans le noyau, permettant ainsi la recombinaison des allèles floxés. L'utilisation d'une telle souris permet donc de cibler temporellement (temps de l'injection de tamoxifène) et spatialement (site d'injection) les structures où s'effectue la recombinaison.

Dans les souris issues du croisement TH-CreER X COP4, l'expression de la Cre recombinase a été induite par l'injection de tamoxifène. Nous avons tout d'abord cherché à déterminer quelle dose et quelle voie d'administration du tamoxifène permettait d'obtenir le meilleur taux de recombinaison dans les DRG. Ainsi, suite à une injection de tamoxifène (2mg par voie intrathécale, 2mg par voie intrapéritonéale et 4mg par voie intrathécale), une amplification du signal de la protéine fluorescente EYFP révélant la présence de la Chr2 a été effectuée sur les coupes de DRG (**Figure 26A et E**). On observe la présence de cellules recombinées dans les DRG thoraciques et lombaires des souris indiquant l'expression de la Chr2-EYFP dans les cellules des DRG. Au niveau thoracique, le taux le plus élevé de recombinaison est obtenu suite à une injection de 4mg de tamoxifène en intrathécale (**Figure 26D et H**), alors qu'au niveau lombaire, la voie et la dose d'injection du Tamoxifène ne

semble pas influencer sur la proportion de cellules recombinées. De façon surprenante, la révélation immunocytochimique de la tyrosine hydroxylase sur ces coupes de DRG (**Figure 26 B et F**) n'a pas permis de mettre en évidence de cellules recombinée (EYFP⁺) positive pour la TH (**Figure 26C et G**). Il apparaît donc que dans ce croisement, une recombinaison aspécifique peut également se produire dans des neurones sensoriels autres que les fibres C-LTMRs.

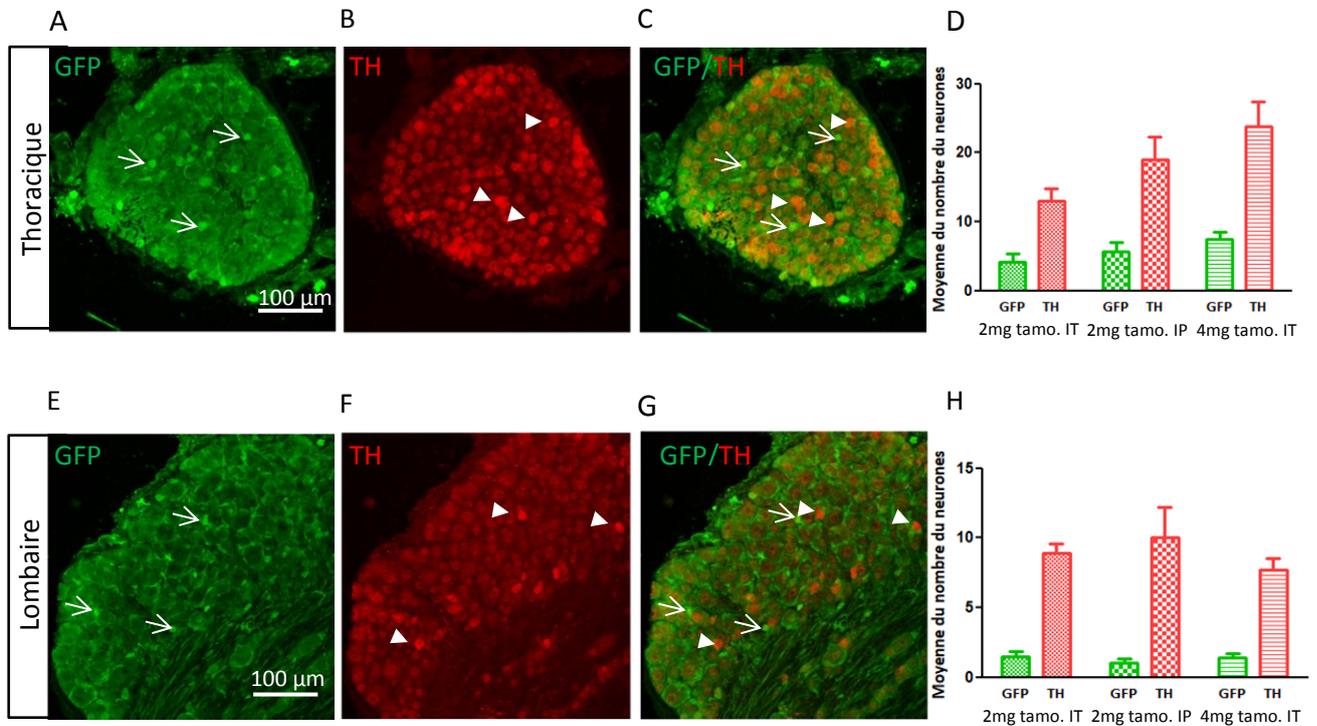


Figure 26: Expression de la Chr2 dans les neurones des DRG thoraciques et lombaires des souris issues du croisement ThCreER X COP4.

A-B-C. Visualisation immunohistochimique de la TH et de la GFP dans des coupes de DRG thoraciques de souris ayant reçu une injection intrathécale 4 mg de Tamoxifène.

D. Quantification de la moyenne du nombre de cellules TH⁺ et GFP⁺ sur des coupes de DRG thoraciques. Les cellules TH⁺ observées n'expriment pas la GFP.

E-F-G. Visualisation immunohistochimique des cellules TH⁺ et GFP⁺ sur des coupes de DRG lombaires de souris issues du croisement ThCreER X COP4 de souris injectées en intrathécal avec 4 mg de Tamoxifène. Aucune cellule n'exprime à la fois la GFP et la TH.

Les flèches blanches et l'extrémité de la flèche blanche représentent des exemples de cellules exprimant respectivement la GFP et la TH

H. Quantification de la moyenne du nombre de cellules GFP⁺ et TH⁺ dans des coupes de DRG lombaires. Les données sont représentées comme moyenne ±SEM.

2. EXPRESSION DE LA CHR2-EYFP AU NIVEAU DE LA MOELLE EPINIÈRE

Après amplification immunohistochimique de la Chr2-EYFP, sur les coupes de moelle épinière thoracique (**Figure 27A**) et lombaires (**Figure 27B**), on observe de façon surprenante un marquage localisé au niveau des corps cellulaires de neurones situés dans les laminae superficielles de la corne dorsale de la moelle ainsi que dans les cellules bordant le canal épendymaire. La Chr2-EYFP s'exprime donc dans la moelle épinière aussi bien au niveau thoracique que lombaire.

Cependant, dans la moelle épinière, la TH s'exprime principalement dans des fibres comme les C-LTMRs et non dans des corps cellulaires. Ces résultats permettent de conclure que la recombinaison du transgène Chr2-EYFP et son expression au sein de la moelle épinière n'est pas spécifique des cellules exprimant la TH.

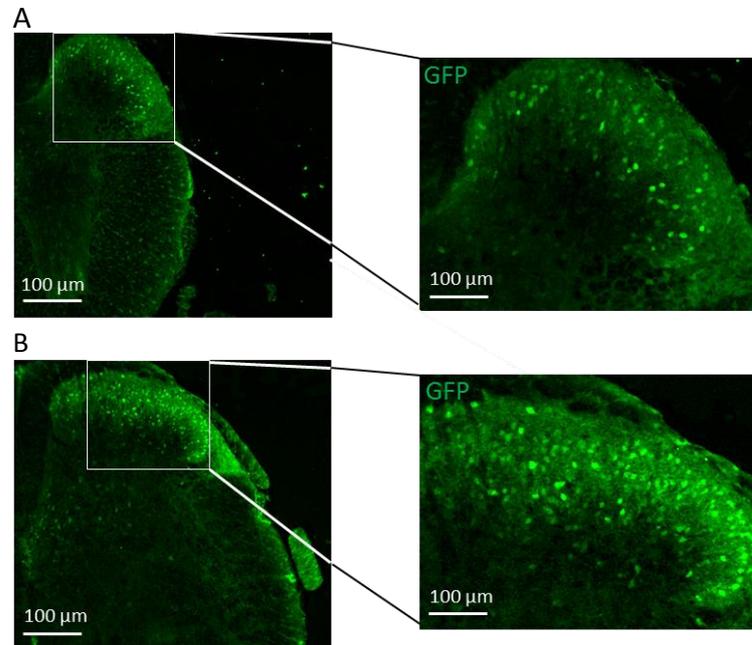


Figure 27: Expression de la Chr2-EYFP dans la moelle épinière.

A-B. Amplification immunohistochimique du marquage Chr2-EYFP sur coupe de moelle épinière thoracique (A), et lombaire (B) de souris issues du croisement THCrexCOP4. Noter la présence de nombreux corps cellulaires EYFP+ dans la lamina II de la moelle épinière.

L'approche par croisement n'a pas donné de résultats satisfaisants et n'a donc pas permis un marquage spécifique des C-LTMRs.

En conclusion, l'approche virale ne nous a pas permis d'obtenir un taux d'infection des neurones satisfaisant. De plus, parmi les cellules exprimant la Chr2, peu se sont révélées être des C-LTMRs. Les modèles génétiques que nous avons utilisés pour l'approche par croisement ne nous ont pas permis d'obtenir des résultats satisfaisants puisque la recombinaison ne s'effectue pas dans les C-LTMRs.

En conséquence, dans le but d'étudier le rôle des C-LTMRs, nous avons choisi une approche pharmacologique en tirant parti du fait qu'elles représentent l'unique population cellulaire à exprimer la protéine apparentée aux chimiokines : TAF4A.

Résultats expérimentaux :

Approche
pharmacologique

I. PRESENTATION DU PROJET TAF4

La douleur est un mécanisme de protection essentiel pour l'adaptation des animaux à leur environnement et le maintien de leur intégrité physique. Les informations nociceptives sont propagées par des afférences primaires à haut seuil d'activation possédant leur corps cellulaire dans les DRG. Ces informations sont ensuite transmises aux réseaux d'interneurons de la corne dorsale de la moelle épinière avant d'être relayées vers les structures cérébrales où s'élaborera la perception de la douleur. Certaines modalités sensorielles comme le toucher sont susceptibles d'altérer la transmission des stimulations nociceptives. Notamment, les informations liées au toucher léger semblent jouer un rôle prépondérant. Ces informations sont transmises par une classe spécialisée de mécanorécepteurs C à bas seuil (C-LTMR). Ces fibres innervent la peau poilue des animaux et projettent dans la lamina II_i de la moelle épinière. De récentes études ont montré que ces mécanorécepteurs constituaient l'unique population neuronale des DRG exprimant spécifiquement trois marqueurs moléculaires : la TH, VGlut3 et TAF4. TAF4 est une protéine sécrétée apparentée aux chimiokines. Un modèle génétique a permis de mettre en évidence que les animaux déficients pour la protéine TAF4 présentent une hypersensibilité mécanique qui est abolie suite à une injection intrathécale de TAF4 en condition de douleurs chroniques neuropathiques et inflammatoires (Delfini et al., 2013). Bien que son action anti nociceptive ait été étudiée sur le plan comportemental son mécanisme d'action dans la moelle épinière reste encore méconnu. L'objectif de ce projet est donc de comprendre comment les fibres C-LTMRs modifient la transmission des informations nociceptives dans la lamina II_i de la moelle épinière par l'intermédiaire de l'étude du mécanisme d'action de TAF4.

Pour explorer cette question, nous avons tout d'abord enregistré par des techniques de patch clamp, sur tranches aiguës de moelle épinière de souris C57Bl6J, les réponses synaptiques spontanées et évoquées des neurones de la lamina II_i à une application exogène de TAF4 recombinant. Nous avons démontré que la perfusion de TAF4 induit une diminution de la fréquence des courants post synaptiques excitateurs ainsi qu'une augmentation des courants post synaptiques inhibiteurs. Nous avons également montré que l'effet de TAF4 sur l'activité synaptique spontanée était préservé en présence de tétrotoxine (TTX), indiquant que le mécanisme d'action de TAF4 est principalement pré synaptique. Pour aller plus loin dans l'étude de l'effet de cette chimiokine sur l'activité des réseaux neuronaux de la lamina II_i, nous avons voulu vérifier que cette diminution de l'activité excitatrice était une conséquence de cette augmentation significative de l'activité inhibitrice. En appliquant des antagonistes des récepteurs GABAergiques ou glycinergiques nous avons démontré que l'action de TAF4 passait par une augmentation de la transmission

GABAergique. Ce résultat est renforcé par des expériences de microscopie électronique révélant la présence de contacts synaptiques directs entre les terminaisons GABAergiques et les fibres C-LTMRs. Cette augmentation de l'inhibition au sein du réseau pourrait être à l'origine d'une altération de la transmission synaptique entre les fibres C nociceptives et les interneurons de la lamina II. Afin de valider cette hypothèse nous avons mesuré la réponse synaptique des neurones de la lamina II, suite à une stimulation des fibres nerveuses à haut seuil d'activation. Nous sommes parvenus à démontrer que par l'intermédiaire de la transmission GABAergique, TFAFA4 induisait une diminution de la transmission synaptique entre les fibres nociceptives et les interneurons de la lamina II.

Pour aller plus loin dans notre étude, nous avons voulu savoir si ces effets de TFAFA4 étaient à l'origine de son action anti nociceptive précédemment observée chez les animaux en condition pathologique (Delfini et al., 2013). Nous avons donc choisi d'étudier l'effet de TFAFA4 chez des animaux ayant reçu une injection d'adjuvant complet de Freund (CFA) dans la patte arrière. Après avoir vérifié qu'en condition inflammatoire l'action de TFAFA4 sur l'activité synaptique spontanée était conservée, nous avons ensuite démontré grâce à des enregistrements extracellulaires *in vivo* dans la lamina II que TFAFA4 provoquait une diminution de l'activité neuronale. Cet effet de TFAFA4 dépend également de la transmission GABAergique puisque l'injection des antagonistes des récepteurs au GABA bloque cette diminution de l'activité neuronale. Dans ce modèle, TFAFA4 abolit également l'hypersensibilité mécanique induite par le CFA. Néanmoins, si TFAFA4 est co-injecté avec les antagonistes des récepteurs au GABA, n'induit plus d'augmentation du seuil de sensibilité mécanique.

Une étude récente ayant montré que l'un des récepteurs potentiels de TFAFA4, le formyl peptide récepteur 1, se situait sur les macrophages mais aussi sur les cellules microgliales, nous avons émis l'hypothèse que l'action de TFAFA4 sur les neurones pourrait être indirecte. En effet, TFAFA4 pourrait agir sur les cellules microgliales qui en conséquence pourraient interférer avec la transmission GABAergique dans la corne dorsale de la moelle épinière. A l'aide d'approches électrophysiologiques et immunohistochimiques nous avons démontré qu'en empêchant l'activation microgliale l'effet de TFAFA4 sur l'activité synaptique spontanée disparaissait. De plus, TFAFA4 induit une rétraction microgliale associée à une augmentation du nombre de synapses inhibitrices sur les somas neuronaux.

Ces résultats nous ont permis de définir l'un des mécanismes d'action du TFAFA4 sur les réseaux neuronaux de la corne dorsale de la moelle épinière.

Les résultats de cette étude ont fait l'objet d'une soumission d'article au journal Cell Report (Kambrun et al., En soumission).

Manuscrit

The C-LTMR derived chemokine TFAFA4 reverses mechanical allodynia through activation of GABAergic transmission and microglial process retraction.

Charline Kambrun^{1,2}, Olivier Roca-Lapirot^{1,2}, Chiara Salio³, Marc Landry^{1,2}, Aziz Moqrich⁴,
Yves Le Feuvre^{1,2}

¹University Bordeaux, Interdisciplinary Institute for Neuroscience, UMR 5297, 33000 Bordeaux, France

²CNRS, Interdisciplinary Institute for Neuroscience, UMR 5297, 33000 Bordeaux, France.

³Department of Veterinary Sciences, University of Turin, 10095 Grugliasco (TO), Italy

⁴Aix-Marseille-Université, CNRS, Institut de Biologie du Développement de Marseille, UMR 7288, case 907, 13288 Marseille Cedex 09, France

Author contributions:

C.K. and Y. L. F. designed the project. Y.L.F. and C.K performed *in vitro* electrophysiology, behavioral essays and immunofluorescence. O.R.L. and C.K. performed *in vivo* electrophysiology. C.S. and A.M. performed electron microscopy; Y.L.F., C.K., M.L., O.R.L. and C.S. analyzed data; Y.L.F. and C.K. wrote the paper.

Abstract

C-Low Threshold Mechano Receptors (C-LTMRs) are sensory neurons that, beyond conveying pleasant touch, modulate nociceptive transmission within spinal cord. However, pain alleviation by C-LTMRs remains misunderstood. Here, we show that the C-LTMR derived TFAFA4 chemokine induces a reinforcement of inhibitory synaptic transmission within spinal networks, which consequently depresses local excitatory synapses and impairs synaptic transmission from high threshold C-fibers. In Complete Freund's Adjuvant (CFA) inflamed animals, TFAFA4 decreases the neuronal response recorded *in vivo* following noxious stimulus, and alleviates mechanical pain, both effects being blocked by antagonists of GABAergic transmission. Furthermore, TFAFA4 promotes microglial retraction in CFA inflamed animals, together with an increase in the number of inhibitory synapses on lamina III somata. Altogether, these results identify GABAergic interneurons as the first integration relay for C-LTMRs and highlight a novel interplay between sensory neurons, microglial cells and spinal interneurons, fine tuning inhibitory activity and nociceptive transmission in pathological conditions.

Introduction

Acute pain is an alarm allowing individual to adapt their behavior in response to potentially harmful stimuli. However, under some pathological conditions, acute pain can turn into chronic maladaptive pain, which results from central sensitization of spinal networks (Latreoliere and Woolf, 2009; Woolf, 2011). A large body of work has been devoted to studying the mechanisms responsible for chronic pain, and among these, a classical view is that disinhibition within spinal networks plays a key role (Guo and Hu, 2014; Lin et al., 1996; Taylor, 2009). Specifically, nerve injury or inflammation can lead to a loss of GABAergic inhibition (Moore et al., 2002; Zhang et al., 2013). Several mechanisms have been shown to contribute to the impairment of GABAergic transmission leading to spinal networks disinhibition (Laffray et al., 2012; Moore et al., 2002). Among these, elegant studies demonstrated the involvement of microglial cells in the regulation of inhibitory synapses strength through an attenuation of chloride gradients in dorsal horn (Coull et al., 2005). Microglia also contributes to modulate inhibitory transmission within the spinal cord through the release of proinflammatory cytokines (Kawasaki et al., 2008). Thus many forms of pathological pain may result from an impairment of the fragile interplay between inhibitory synapses and surrounding glial cells, making its alleviation very challenging.

In spinal cord, since the pioneering work of Melzack and Wall (1965), inhibitory networks are thought to be tightly driven by low threshold peripheral inputs (Daniele and MacDermott, 2009; Takazawa and MacDermott, 2010). In pathological pain, this drive is thought to be deficient (Leitner et al., 2013; Lu et al., 2013; Sdrulla et al., 2015), thus leading to a weakening of inhibitory activity, which may in turn reinforce nociceptive transmission within spinal cord. Among the low threshold inputs, recent emphasis has been shed on C low-threshold Mechano Receptors (C-LTMRs). On top of conveying emotional aspect of touch sensation (Lôken et al., 2009; Olausson et al., 2002), C-LTMRs were also recently described as modulators of pain transmission (Delfini et al., 2013; Seal et al., 2009). These fibers innervate the hairy skin and were identified in cat and monkey (Zotterman, 1939) and

later in human and mice (Bessou et al., 1971; Douglas and Ritchie, 1957; Johansson et al., 1988; Li et al., 2011; Maruashi et al., 1952; Seal et al., 2009). C-LTMRs, whose cell bodies are located within dorsal root ganglia (DRG), project specifically toward the innermost layer of lamina II (lamina III) of the spinal cord to synapse with second-order neurons (Li et al., 2011; Lumpkin et al., 2010). Previous studies have demonstrated that C-LTMRs constitute a unique neuronal population, among DRG neurons, specifically expressing vesicular glutamate transporter 3 (VGLUT3, Seal et al., 2009) and TFAFA4, a chemokine-like secreted protein (Delfini et al., 2013). In persistent pain model, TFAFA4 null mice develop mechanical hypersensitivity which is reversed by an intrathecal injection of TFAFA4 (Delfini et al., 2013). Although A-type potassium channels were identified as a putative target of TFAFA4, the mechanisms underlying the control of sensori-nociceptive integration by TFAFA4 remains poorly understood. Surprisingly, TFAFA4 was recently identified as a ligand of formyl peptide receptor 1 (FPR1) expressed on macrophages (Wang et al., 2015), where it promotes the migration and phagocytosis, but also on microglial cells (Gavins, 2010).

In this study, we took advantage of the C-LTMRs restricted expression of TFAFA4 to inquire into the contribution of these neurons in the control of nociceptive information transmission. We demonstrate by whole-cell recordings of lamina III neurons that an exogenous application of TFAFA4, through presynaptic mechanisms, induces an increase of inhibitory synaptic activity which in turn dampens excitatory synaptic transmission. Moreover, this TFAFA4 mediated increase in inhibitory transmission is sufficient to impair transmission between nociceptive fibers and interneurons. In CFA inflamed animals, TFAFA4 induces a decrease of the neuronal activity evoked by noxious stimulation of hindpaw, which is dependent on GABAergic transmission integrity. Furthermore intrathecal administration of TFAFA4 provides analgesic effects, also blocked by GABA receptors antagonists, thus making GABAergic interneurons the first relay for the integration of information transmitted by C-LTMRs. Interestingly, ultrastructural studies revealed close interaction between TFAFA4 expressing primary afferent fibers and GABAergic terminals in lamina III. Investigating the

role of microglia in TFAFA4-induced inhibition, we demonstrate that TFAFA4 loses its effect on spontaneous synaptic activity when we prevent the activation of microglial cells. TFAFA4 also induces a microglial retraction which enables the specific restoration of inhibitory synapses on lamina III neurons, thus promoting the reinforcement of inhibitory transmission. Altogether these results highlight a novel interplay between sensory neurons, microglial cells and local spinal neurons, leading to a fine tuning of inhibitory activity and nociceptive transmission in pathological conditions.

Results

TAFA4 modulates spontaneous synaptic activity in dorsal spinal cord.

In a previous study, TAFA4 was reported to reverse injury-induced mechanical hypersensitivity (Delfini et al., 2013).

To gain further understanding of the effects of TAFA4 on synaptic transmission within the spinal cord, we recorded spontaneous synaptic events in Rexed lamina I/II neurons using whole cell patch clamp recordings (Fig 1 A1, top), and assessed the effects of TAFA4 superfusion on the frequency and amplitude of these events. We found that bath application of TAFA4 (20nM) induced a significant decrease of spontaneous Excitatory Post Synaptic Events (EPSCs) (Fig 1 A1, middle), as indicated by the shift in the interval cumulative distribution curve towards the left (Fig 1 A2, same cell as in 1A1, n=12 out of 16). This effect was long lasting as only 2 cells out of 7 showed a significant recovery upon washout. Although this decrease could be observed 20mn after the onset of TAFA4 superfusion, it became significant only after 40mn (Fig 1 A3). All in all, the average frequency of EPSCs was 57% smaller in the presence of TAFA4 than in control conditions (control: 0.868 ± 0.25 Hz n=16; TAFA4 20mn: 0.565 ± 0.15 Hz, n=16; TAFA4 40mn: 0.382 ± 0.08 Hz, n=16; wash: 0.587 ± 0.19 Hz, n=7; $p < 0.05$). The distribution of EPSCs decay was similar in control and TAFA4 conditions (Fig S1 A, n=16). Strikingly, the amplitude of EPSCs was not affected by TAFA4 superfusion (Fig 1 A4; control: 32.85 ± 4.97 pA; TAFA4 20mn: 31.99 ± 1.74 pA TAFA4 40mn: 27.47 ± 3.35 pA; wash: 29.98 ± 5.39 pA), suggesting the involvement of pre-synaptic mechanism.

By contrast, the frequency of spontaneous Inhibitory Post Synaptic Currents (IPSCs), recorded using chloride enriched solution (Fig 1 B1, top), exhibited a dramatic increase following TAFA4 superfusion, as indicated by the shift towards the right of the inter-event interval cumulative distribution curve (Fig 1 B1, middle, 1 B2, n=6 out of 8; 1 B1 and 1 B2 are the same cell). This increase was reversed upon rinsing in 3 cells out of 3. The distribution of

IPSCs decay was similar in control and TFAFA4 conditions (Fig S1 B, n=8). On average, after 40mn of application, TFAFA4 induced a 143% increase of IPSCs frequency (Fig 1 B3; control: 0.11 ± 0.016 Hz, n=8, TFAFA4 20mn: 0.19 ± 0.03 Hz, n=8, TFAFA4 40mn : 0.26 ± 0.06 Hz, n=8; wash: 0.13 ± 0.02 Hz, n=3; $p < 0.05$) without affecting IPSCs average amplitude (Fig 1 B4; control: 34.84 ± 7.21 pA, TFAFA4 20mn: 32.40 ± 3.66 pA: TFAFA4 40mn : 36.36 ± 3.56 pA: wash: 50.78 ± 8.93 pA), reinforcing the hypothesis of a pre-synaptic action of TFAFA4.

To demonstrate that the effects of TFAFA4 on EPSCs and IPSCs frequency are mediated by pre-synaptic mechanisms, we monitored the frequency of miniature synaptic events (mEPSC and mIPSC) in the presence of tetrodotoxin (TTX) to block action potential propagation, in control, following 40mn of TFAFA4 application and after washout (Fig 2A1). In presence of TTX, TFAFA4 induced a significant decrease of mEPSC frequency in 6 out of 14 neurons (Fig 2A2). On average, mEPSC frequency was 32% lower following TFAFA4 exposure than in control conditions (Fig 2A3; control: 0.35 ± 0.091 Hz, TFAFA4 40mn: 0.24 ± 0.06 Hz; $p < 0.05$). On the opposite, TFAFA4 induced a significant increase of mIPSCs recorded in presence of TTX in 6 cells out of 8 (Fig 2B1, 2B2). On average, the frequency of mIPSCs was 169% higher under TFAFA4 superfusion than in control conditions (Fig 2B3; control: 0.09 ± 0.01 Hz, TFAFA4 40 mn: 0.23 ± 0.04 Hz; wash: 0.18 ± 0.07 Hz; $p < 0.05$). Under TTX superfusion, TFAFA4 had no effect on the amplitude of mEPSC (data not shown; control: 26.78 ± 2.68 pA: TFAFA4 40mn 31.36 ± 3.01 pA) nor mIPSC (data not shown; control: 43.68 ± 9.01 pA: TFAFA4 40 mn 64.71 ± 13.77 pA). Therefore the effects of TFAFA4 on EPSC and IPSC frequencies are preserved in the presence of TTX, indicating a presynaptic regulation of synaptic transmission.

Taken together, our results demonstrate that TFAFA4, through presynaptic mechanisms, induces a shift in the synaptic excitatory/inhibitory balance towards reinforced inhibition.

We then hypothesized that the decrease in EPSC frequency could result from an increased inhibitory tonus exerted on excitatory neurons. To validate this hypothesis we recorded EPSCs frequency, while blocking inhibitory transmission (Fig 3A) with CGP55845A and

bicuculline (antagonists of GABA_B and GABA_A receptors respectively), and strychnine (antagonist of glycinergic receptors). In such experimental conditions, we found no differences in the average EPSC frequency between control condition and after an exogenous application of TFAFA4 (Fig 3B1; n=10; control: 2.80±1.04 Hz; TFAFA4: 2.16±0.61 Hz), indicating that the effect of TFAFA4 on EPSC frequency is dependent upon inhibitory transmission. Of note, TFAFA4 had no effect on mEPSC frequency when inhibitory transmission was blocked (Fig S2). More specifically, by blocking either GABAergic transmission alone or glycinergic transmission alone, we found that TFAFA4 no longer modulated EPSC frequency when GABAergic transmission alone was blocked (Fig 3B2; n=11 control: 0.63±0.32 Hz; TFAFA4: 0.80±0.42 Hz) whereas a decrease in EPSC frequency was still observed upon TFAFA4 application when only glycinergic transmission was blocked (Fig 3B3; n=17, control: 0.50±0.15 Hz, TFAFA4: 0.35±0.09 Hz; p<0.05). Thus, our experiments demonstrate that the effect of TFAFA4 on spontaneous excitatory synaptic transmission is indirect and mainly mediated by a modulation of GABAergic transmission.

TFAFA4 decreases synaptic transmission between high threshold fibers and lamina Ili neurons.

The reinforcement of inhibitory synaptic activity induced by TFAFA4 could also indirectly impair the transmission between nociceptive fibers and interneurons. To investigate this hypothesis, we performed paired maximal stimulations of dorsal roots while recording the synaptic responses evoked by these stimulations in lamina Ili neurons (Fig 4A and 4 B1). Following TFAFA4 application, the amplitude of the first evoked EPSC was greatly reduced (Fig 4B2; n=15; average: -36%; control: -355±109 pA, TFAFA4: -228±70 pA, p<0.05), while the paired pulse ratio (PPR) of the synaptic responses was significantly increased (Fig 4B3; n=15; average:+35.9%; control: 0.82±0.12; TFAFA4: 1.12±0.19), indicating a reinforcement of presynaptic inhibition exerted on high threshold nociceptive fibers. Strikingly, the addition of CGP55845A and bicuculline blocked the effects of TFAFA4 on the amplitude (Fig 4C1 and

4C2; n=11; average -3.3%; control: -493 ± 134 pA; TAF4: -477 ± 140 pA) and the PPR (Fig 4C1 and 4C3; n=11; average +1.1%; control: 0.88 ± 1.09 ; TAF4: 0.89 ± 0.15) of evoked synaptic responses, showing that TAF4 mediated increase in inhibitory transmission is sufficient to impair transmission between nociceptive fibers and interneurons.

C-LTMRs make direct contact onto GABAergic neurons.

Our experiments highlight a close functional interaction between TAF4 and inhibitory GABAergic transmission. As C-LTMRs are the only source of TAF4 within the spinal cord (Delfini et al., 2013), we investigated whether direct contact between C-LTMRs fibers and GABAergic neurons could be evidenced in spinal cord. We took advantage of TAF4^{Venus} knock-in mice (Delfini et al., 2013) to perform multiple immunolabeling ultrastructural experiments using GFP and VGLUT3 as markers of C-LTMRs and IB4 as a marker of non-peptidergic primary afferent fibers (PAFs). We found that Venus was specifically co-expressed with VGLUT3 in a population of non-peptidergic PAFs, but excluded from IB4 immunolabeled fibers (Fig 5A). The central terminal of Venus positive fibers formed typical type 1a glomeruli with an electron dense C bouton filled by small agranular synaptic vesicles surrounded by numerous dendrites (d) among which presynaptic vesicle-containing dendrite (V1), and few peripheral axons (V2, not shown; see also Fig S5). We then evaluated the synaptic connections between Venus-expressing PAFs and GABA immunolabeled lamina III interneurons. Venus+ fibers mostly formed contacts onto GABA-IR presynaptic vesicle-containing dendrites (V1, Fig 5B). After quantitative analysis of 150 GFP-IR-Gla (N=3 mice) we observed that all V1 in our preparations were GABA-immunolabeled, only a minority of V2 were GABA-IR, while no plain dendrites (d) were GABA-IR (Fig 5C). In particular, these data showed a net predominance of synaptic contacts between GFP-positive fibers and GABA-IR V1 (95.9%, Figure 5D), in respect to GABA-IR V2 (4.1%, Fig 5D). Thus, our data demonstrate that C-LTMR fibers establish direct synaptic contact with GABAergic interneurons within lamina III.

TAFA4 alleviates CFA induced pain through reinforcement of inhibitions within spinal cord.

Our patch clamp experiments have highlighted the importance of inhibitory transmission in mediating TAFA4 effects within spinal cord nociceptive networks. Indeed, we identified a mechanism by which TAFA4 increases inhibitory synaptic transmission within spinal cord, which in turns depresses excitatory transmission, including transmission of sensory information between primary afferent fibers and spinal interneurons. To assess if this mechanism may account for the antinociceptive effects of TAFA4, we used an inflammatory pain model consisting in an injection of Complete Freund's Adjuvant (CFA) in the rear paw.

Four days after CFA injection, we performed whole cell patch clamp recordings on spinal cord slices incubated 40 min in TAFA4 or in aCSF. Slices incubated in TAFA4 exhibited lower average EPSC frequency (Fig S3A1 and S3A2; aCSF: 0.70 ± 0.21 Hz, $n=19$, TAFA4: 0.20 ± 0.04 Hz, $n=25$; $p < 0.05$) and higher average IPSC frequency (Fig S3B1 and S3B2; aCSF: 0.083 ± 0.16 Hz, $n=13$, TAFA4: 0.13 ± 0.012 Hz, $n=13$; $p < 0.05$) than slices incubated in aCSF, suggesting that the effects of TAFA4 are preserved in slices of CFA animals. The average PPR of synaptic responses evoked by dorsal root stimulation was also higher in slices incubated in TAFA4, although this difference did not reach statistical significance (Fig S3C1 and S3C2; aCSF 0.84 ± 0.08 , $n=15$; TAFA4: 1.18 ± 0.17 , $n=19$; $p=0.056$). Altogether, these data suggest that the mechanisms identified in spinal slices of naïve animals are mostly conserved in slices of CFA animals.

We next used extracellular *in vivo* recordings of superficial spinal cord neurons to assess the effects of TAFA4 on the neuronal discharge evoked by Von Frey hair noxious stimulation of hindpaw. In naïve animals, intraspinal injection of TAFA4 or aCSF had no effect on the average discharge frequency of neurons during hindpaw stimulation (Fig S4A and S4B; $N=5$; control: 151.63 ± 38.13 Hz; TAFA4 40mn: 157.44 ± 35.50 Hz). By contrast, in CFA inflamed animals, TAFA4 induced a significant decrease of the neuronal discharge following a noxious stimulus (Fig 6A1 and A2; $N=5$ control: 152.39 ± 16.08 Hz, TAFA4 40mn: 109.55 ± 29.50 Hz;

$p < 0.05$) that was not observed when aCSF only was injected (Fig 6A1 and A2; N=5; control: 93.70 ± 22.89 Hz, TFAFA4 40mn: 128.41 ± 31.59 Hz). Furthermore, this decrease was abolished when TFAFA4 was co-injected with blockers of GABAergic synaptic transmission (Fig 6B1 and 6B2; N=5; control: 70.33 ± 5.06 Hz, TFAFA4 40mn: 76.36 ± 4.47 Hz). Taken together these results demonstrate that in inflammatory condition TFAFA4 impaired the integration of noxious input through GABAergic transmission.

Finally, we investigated if mechanical hypersensitivity developed by CFA inflamed animals could be reversed with an intrathecal injection of TFAFA4, and whether this reversal was dependent upon GABAergic transmission. We performed Von Frey's test using up and down method (see methods), before and 4 days after CFA injection. Animals inflamed with CFA exhibited a dramatic decrease of paw withdrawal threshold that could be partially reverted within one hour following an intrathecal injection of TFAFA4 (Fig 6C; N=16; control: 1.12 ± 0.13 g, CFA: 0.09 ± 0.03 g; CFA-TFAFA4: 0.50 ± 0.06 g; $p < 0.05$). However, no reversal of pain threshold was observed when TFAFA4 was coinjected with antagonists of GABA_A and GABA_B receptors bicuculline and phaclofen respectively (Fig 6C; N=12; 0.057 ± 0.006 g), indicating that the antinociceptive effect of TFAFA4 is mediated by GABAergic transmission.

TFAFA 4 induces microglial retraction in CFA animals.

Recent study (Wang et al., 2015) demonstrated that TFAFA4 binds the formylpeptide receptor (FPR1) expressed on macrophages and microglial cells. To assess if microglia is involved in the modulation of inhibitory transmission mediated by TFAFA4 we first recorded EPSCs and IPSCs in spinal cord slices pre incubated with minocycline which inhibits microglial activation. After TFAFA4 superfusion, no significant changes were detected neither in the EPSCs frequency (Fig 7A1 and 7A2; n=10; control: 0.38 ± 0.15 Hz; TFAFA4: 0.35 ± 0.18 Hz) nor the IPSCs frequency (Fig 7B1 and 7B2; n=10; control: 0.26 ± 0.10 Hz; TFAFA4: 0.12 ± 0.04 Hz) when the activation of microglia was inhibited. Thus, microglia is required for TFAFA4 to

induce a shift in inhibitory/excitatory balance (compare Fig 1A3 with 7A2 and Fig 1B3 with 7B2).

We then characterized microglial reactivity in dorsal horn in inflamed animals treated or not with TFAFA4 by quantifying with immunohistochemistry the surface labelled by the ionized calcium binding adaptor molecule 1 (Iba-1, Fig 7C1). CFA injection induced a significant increase of the surface labelled by Iba-1 which was partially reversed by the intrathecal injection of TFAFA4 (Fig 7C2, N=3, naïve: 1.55 ± 0.31 %, CFA: 6.99 ± 0.27 %; CFA+TFAFA: 5.39 ± 0.27 %; $p < 0.05$), showing that TFAFA4 reduces microglial activation. Strikingly, our EM data suggest that putative microglial cells may contact GABAergic V1 profiles surrounding C-LTMRs endings (Fig S5). To investigate if the interaction between microglial cells and inhibitory synapses is altered by TFAFA4, we performed immunohistochemistry to label gephyrin, a specific post synaptic marker of inhibitory synapses, and Iba-1 and quantified the number of inhibitory synapses in close apposition with microglial cells. Strikingly, the spreading of microglia in dorsal horn of CFA animals was accompanied by an increase of the number of inhibitory synapses in contact with microglial cells (yellow dots). Furthermore, this increase was partially reversed following intrathecal TFAFA4 injection (Fig 7D1 and 7D2, N=3, control: 1.76 ± 0.40 %; CFA: 5.31 ± 0.20 %; CFA+TFAFA4: 3.52 ± 0.43 %; $p < 0.05$). Altogether, our data provide evidence that TFAFA4 reverses the increased interaction between inhibitory synapses and microglial processes observed in inflammatory conditions. Furthermore, by quantifying the surface of neuronal soma (revealed by immunodetection of NeuN) occupied by inhibitory synapses (labelled by gephyrin, Fig 8A1, left and middle panel), we found that CFA inflammation induced a reduction in the soma surface co-labelled with gephyrin (Fig 8A2; N=3; control: 4.96 ± 0.50 %; CFA: 3.66 ± 0.33 %; $p < 0.05$) compared to naïve animals, suggesting a disruption of inhibitory synapses in dorsal spinal cord of CFA animals. In TFAFA4 treated inflamed mice the surface of neuronal somata occupied by inhibitory synapses was recovered (Fig 8A2; N=3; 5.26 ± 0.52 %; $p < 0.05$) and similar to the control level indicating a restoration of inhibitory contacts on dorsal spinal cord somata. Remarkably,

similar experiments quantifying the number of excitatory synapses, labelled with homer1 post synaptic excitatory synapse marker (Fig 8B1) revealed no difference in the neuron soma area covered by excitatory synapses between naïve animals, CFA inflamed animals, and CFA inflamed animals treated with TFAFA4 (Fig 8B2; N=3; control: 12.43 ± 1.75 %; CFA: 12.48 ± 1.05 %; CFA+TFAFA4 13.29 ± 1.04 %).

Altogether, our experiments highlight a new interplay between the C-LTMRs derived chemokine TFAFA4, microglial cells and inhibitory synapses. In CFA inflamed animals, microglial spreading promotes the synaptic stripping of inhibitory synapses, resulting in a weakened inhibitory tonus within spinal cord nociceptive networks. This weakened tone in turn reinforces both excitatory influences from local interneurons and excitatory transmission between high threshold nociceptive fibers and lamina Ili networks (Fig 8C1). The C-LTMRs derived TFAFA4 chemokine is able to partially reverse this microglial spreading, promoting the re-innervation of lamina Ili soma by inhibitory synapses and a reinforcement of inhibitory tonus that attenuates pain transmission within spinal cord (Fig 8C2).

Discussion

Recent findings have highlighted the role of C-LTMRs in fine tuning pain transmission within spinal cord networks, both in acute and pathological pain models (Delfini et al., 2013; Seal et al., 2009). However, the microcircuits involved in this modulation remain poorly understood. Here, we report that C-LTMRs contact directly GABAergic interneurons in Rexed lamina III of spinal cord. We demonstrate that C-LTMRs derived chemokine TFAFA4 increases synaptic inhibitory tone in spinal cord which in turn, through the recruitment of GABA receptors, decreases spontaneous excitatory transmission and weakens the transmission between primary afferent fibers and spinal interneurons. We further show that TFAFA4 reduces the response of dorsal spinal cord neurons to painful stimulation and alleviates CFA induced pain, both effects being mediated by the increase of GABAergic transmission. Finally, we demonstrate that TFAFA4 reverses the CFA induced microglial extension. This reversion is accompanied by an increase in the density of inhibitory synapses on lamina III neuronal soma. Altogether, our results suggest that, by releasing TFAFA4 in the vicinity of inhibitory neurons, C-LTMRs promote the retraction of microglial processes, thus enabling the restoration of inhibitory synapses within lamina III.

Low threshold fibers and nociceptive pathways.

According to the labelled lines theory, sensory information is transmitted to the somatosensory cortex through a set of modality specific sensory neurons and spinal cord microcircuits (Norrzell et al., 1999). However, the integration of all these modalities within the dorsal horn of the spinal cord may create interferences and crosstalk between these labelled lines, and modulates the transmission of these sensory stimuli (Craig and Bushnell, 1994; Mackenzie et al., 1975; Yarnitsky and Ochoa, 1990). For instance, in pathological pain, low threshold fibers involved in the transmission of touch elicit pain by activating superficial dorsal horn networks dedicated to the integration of noxious stimulus (Baba et al., 2003; Daniele and MacDermott, 2010; Miraucourt et al., 2007). On the contrary, low frequency

stimulation of low threshold fibers (A β) may alleviate pain by inducing a synaptic depression in *substantia gelatinosa* neurons (Sdrulla et al., 2015). The role of low threshold mechanoreceptors is further highlighted by genetic engineering of C-LTMR showing their role in the modulation of pain transmission (Delfini et al., 2013; Gaillard et al., 2014; Seal et al., 2009). Although recent studies have deciphered neuronal microcircuits through which touch neurons may alleviate pain transmission, (Duan et al., 2014; Lu et al., 2013), the spinal circuitry underlying this alleviation remains poorly understood. In our study, we demonstrate that C-LTMRs contact GABAergic interneurons. Based on Lu and Perl's findings (2005), who demonstrated that islet cells receive non noxious C fibers inputs, and previous studies showing that GABA+ V1 profiles in Gl_a configuration belong to islet cells (Bardoni et al. 2007; Ribeiro da Silva, 2004) we propose that C-LTMRs synapse onto islet cells within lamina II, thus providing a novel pathway between low threshold fibers and GABAergic neurons involved in the modulation of noxious stimuli transmission.

The effects of TFAFA4 are mediated through GABAergic transmission.

A large number of inhibitory neurons in lamina II exhibit both GABA and glycine immunoreactivity (Polgar et al., 2013), moreover some reports have demonstrated a co-release of both inhibitory transmitters at some mixed GABAergic/glycinergic synapses (Chéry and De Koninck, 1999; O'Brien and Berger, 1999). Surprisingly, we found that blocking GABAergic transmission is sufficient to prevent TFAFA4 effects, indicating a segregation of GABAergic and glycinergic inhibitory pathways. In rat spinal cord, co-release of GABA and glycine was found to be pronounced during development and cease by adulthood (Keller et al. 2001). This separation of GABA and glycinergic system is in line with recent studies, which showed segregation between glycinergic and GABAergic inputs on dorsal horn excitatory neurons, depending on their dorso-ventral location (Takazawa et al., 2017). Differences can also be observed in the distribution of glycine and GABA receptors (Harvey

et al., 2004; Todd et al., 1996), thus highlighting that GABAergic and glycinergic pathways are functionally distinct in spinal cord.

As mentioned earlier, our results together with Lu and Perl's findings suggest that C-LTMR may contact Islet cells. Islet cells are all GABAergic, but only some of them seem to co-express glycine (Spike and Todd, 1992). In addition, Lu and Perl demonstrated that the synapse between islet cells and central cells is blocked by GABA antagonists, which reinforce our finding that the effects of TFAFA4 are mediated mainly by GABAergic transmission.

Microglia is required for the effects of TFAFA4.

We demonstrate that the effects of TFAFA4 are blocked when the microglial activation is reduced. Furthermore, intrathecal injection of TFAFA4 decreases the CFA induced microglial activation within dorsal spinal cord, suggesting that microglia may constitute a major target of TFAFA4 chemokine. Microglia is known to be involved in regulating the efficacy of synaptic transmission and specifically inhibitory transmission in pathological pain conditions (Ji et al., 2013) through a wide range of mechanisms. For instance, brain-derived neurotrophic factor (BDNF) released by microglial cells within spinal cord induces an inversion of the polarity of currents activated by GABA contributing to a tactile allodynia after nerve injury (Coull et al., 2005). Moreover in their study, proinflammatory cytokines such as interleukin-1 β , interleukin-6 and tumor necrosis factor- α are involved in central sensitization by increasing excitatory synaptic transmission or reducing inhibitory synaptic transmission (Clark et al., 2015; Kawasaki et al., 2008). Although many studies have highlighted the activation of microglial cells in neuropathic pain models, (Beggs and Salter, 2007; Coyle, 1998; Eriksson et al., 1993; Stuesse et al., 2000; Zhang and De Koninck, 2006), the involvement of microglia in inflammatory pain remains much more controversial. Some studies have reported a lack of spinal microglial activation when CFA is injected in the rear paw (Lin et al., 2007; Sun et al., 2007), while some others have reported clear indicators of

microglial activation following CFA hindpaw inflammation. (Hui et al., 2013 ; Liao et al., 2017 ; Qi et al., 2016 ; Raghavendra et al., 2004 ; Xu et al., 2014). We found that CFA induced a major increase in the surface immunostained by Iba-1 within lamina II of spinal cord. Surprisingly, intrathecal injection of TFAFA4 reduced the Iba-1 labelled area in CFA animals, suggesting that TFAFA4 exerts its antinociceptive action by triggering a reduction of microglial activation

Our finding that TFAFA4 acts through microglia is further reinforced by the recent identification of one putative receptor of TFAFA4, the formyl peptide receptor 1 (Wang et al., 2015), which is located on cells deriving from myeloid lineage (Dorward et al., 2015; Gavins, 2010). Surprisingly however, in most studies (Dorward et al., 2015; Hauser et al., 2010; Raof et al., 2010; Wang et al., 2015), activation of FRP1 is believed to promote macrophage activation, reinforce macrophage phagocytosis and production of reactive oxygen species. In our experiments, we found that TFAFA4 rather promotes a decrease in the surface occupied by microglia in lamina II, suggesting a reduction of microglial activation. Several factors may account for this paradoxical effect: first, the effects of TFAFA4 on macrophage activation are known to be highly dependent upon its concentration (Wang et al., 2015). Second, discrepancies in the reaction of macrophages and microglia to a given stimulus can often be observed (Hooper et al., 2009; Durafourt et al., 2011).

Displacing inhibitory synapses with microglia?

Disruption of GABAergic transmission is a well-known phenomenon in pathological pain. However, the mechanisms involved in this disinhibition are still a matter of debate. In neuropathic pain models, a loss of GABAergic neurons has been suggested by several studies (for review see Todd, 2015; Taylor 2009), but other mechanisms such as a down regulation of the GABA synthesis enzyme (Moore et al., 2002), or a decrease in synaptic strength due to a shift in chloride reversal potential (Coull et al., 2005). Although some of these mechanisms have also been demonstrated in inflammatory pain models (Zhang et al.,

2013), much less is known about the mechanisms involved in GABAergic disinhibition in these models. Several studies have reported a direct effect of inflammatory mediators on glycinergic transmission (Ahmadi et al., 2002; Kawasaki et al., 2008). This reduction in glycinergic inhibitory transmission may be accompanied by a shift of inhibitory transmission towards GABAergic transmission. Our immunocytochemical analysis highly suggest that, in addition to these mechanisms, CFA inflammation induces a decrease in the density of inhibitory synapses on lamina III somata which is reversed by TFAFA4 intrathecal injection. Interestingly, no change in excitatory synapse marker Homer was observed, underlining the specificity of this mechanism to inhibitory inputs. Given that in our experimental conditions, the density of inhibitory synapses mirrors the extension of microglial cells, it is tempting to speculate that the extension of microglial cells in CFA inflamed animals induces a displacement of Inhibitory synapses (synaptic stripping), and that the chemokine TFAFA4, by reducing microglial spreading, enables the restoration of this inhibitory synapses in lamina III, thus reinforcing inhibitory tonus and providing antinociception. Synaptic stripping was first identified in facial nerve injury model by Blinzinger and Kreuzberg (1968), before the phenomenon was generalized to other structures and pathological models (Chen et al., 2014; Trapp et al., 2007). Although the release of pro-inflammatory substances may also be involved in the regulation of inhibitory transmission by microglia under the control of TFAFA4 chemokine (Ahmadi et al., 2002; Kawasaki et al., 2008), our data highlight a novel mechanism in the regulation of pain transmission by microglial cells.

Acknowledgments:

Confocal microscopy studies were performed at the Bordeaux Imaging Center, a Core facility of the national infrastructure "France BioImaging (ANR-10-INBS-04 FranceBioImaging). This work was supported by ANR C-LTMR, a doctoral fellowship from the French ministry of Higher Education and Research and a Labex BRAIN fellowship to C.K..

Conflict of interest: The authors declare no competing financial interests.

Correspondence should be addressed to yves.le-feuvre@u-bordeaux.fr

References

- Ahmadi, S., Lippross, S., Neuhuber, W.L., and Zeilhofer, H.U. (2002). PGE(2) selectively blocks inhibitory glycinergic neurotransmission onto rat superficial dorsal horn neurons. *Nat. Neurosci.* 5, 34–40.
- Baba, H., Ji, R.-R., Kohno, T., Moore, K.A., Ataka, T., Wakai, A., Okamoto, M., and Woolf, C.J. (2003). Removal of GABAergic inhibition facilitates polysynaptic A fiber-mediated excitatory transmission to the superficial spinal dorsal horn. *Molecular and Cellular Neuroscience* 24, 818–830.
- Bardoni R., Ghirri A., Salio C., Prandini M., and Merighi A. (2007). BDNF-mediated modulation of GABA and glycine release in dorsal horn lamina II from postnatal rats. *Dev Neurobiol.* 67, 960-75.
- Beggs, S., and Salter, M.W. (2007). Stereological and somatotopic analysis of the spinal microglial response to peripheral nerve injury. *Brain Behav. Immun.* 21, 624–633.
- Blinzinger, K., and Kreutzberg, G. (1968). Displacement of synaptic terminals from regenerating motoneurons by microglial cells. *Z. Zellforsch.* 85, 145–157.
- Bessou, P., and Perl, E.R. (1969). Response of cutaneous sensory units with unmyelinated fibers to noxious stimuli. *J. Neurophysiol.* 32, 1025–1043.
- Chaplan, S.R., Bach, F.W., Pogrel, J.W., Chung, J.M., and Yaksh, T.L. (1994). Quantitative assessment of tactile allodynia in the rat paw. *J. Neurosci. Methods* 53, 55–63.
- Chéry, N., and de Koninck, Y. (1999). Junctional versus extrajunctional glycine and GABA(A) receptor-mediated IPSCs in identified lamina I neurons of the adult rat spinal cord. *J. Neurosci.* 19, 7342–7355.

Chen, Z., Jalabi, W., Hu, W., Park, H.-J., Gale, J.T., Kidd, G.J., Bernatowicz, R., Gossman, Z.C., Chen, J.T., Dutta, R., et al. (2014). Microglial displacement of inhibitory synapses provides neuroprotection in the adult brain. *Nat Commun* 5, 4486.

Clark, A.K., Gruber-Schoffnegger, D., Drdla-Schutting, R., Gerhold, K.J., Malcangio, M., and Sandkühler, J. (2015). Selective Activation of Microglia Facilitates Synaptic Strength. *J Neurosci* 35, 4552–4570.

Coull, J.A.M., Beggs, S., Boudreau, D., Boivin, D., Tsuda, M., Inoue, K., Gravel, C., Salter, M.W., and De Koninck, Y. (2005). BDNF from microglia causes the shift in neuronal anion gradient underlying neuropathic pain. *Nature* 438, 1017–1021.

Coyle, D.E. (1998). Partial peripheral nerve injury leads to activation of astroglia and microglia which parallels the development of allodynic behavior. *Glia* 23, 75–83.

Craig, A.D., and Bushnell, M.C. (1994). The thermal grill illusion: unmasking the burn of cold pain. *Science* 265, 252–255.

Daniele, C.A., and MacDermott, A.B. (2009). Low threshold primary afferent drive onto GABAergic interneurons in the superficial dorsal horn of the mouse. *J Neurosci* 29, 686–695.

Delfini, M.-C., Mantilleri, A., Gaillard, S., Hao, J., Reynders, A., Malapert, P., Alonso, S., François, A., Barrere, C., Seal, R., et al. (2013). TFAFA4, a Chemokine-like Protein, Modulates Injury-Induced Mechanical and Chemical Pain Hypersensitivity in Mice. *Cell Reports* 5, 378–388.

Dorward, D.A., Lucas, C.D., Chapman, G.B., Haslett, C., Dhaliwal, K., and Rossi, A.G. (2015). The role of formylated peptides and formyl peptide receptor 1 in governing neutrophil function during acute inflammation. *Am. J. Pathol.* 185, 1172–1184.

Douglas, W.W., and Ritchie, J.M. (1957). Nonmedullated fibers in the saphenous nerve which signal touch. *J. Physiol. (Lond.)* 139, 385–399.

Duan, B., Cheng, L., Bourane, S., Britz, O., Padilla, C., Garcia-Campmany, L., Krashes, M., Knowlton, W., Velasquez, T., Ren, X., et al. (2014). Identification of spinal circuits transmitting and gating mechanical pain. *Cell* 159, 1417–1432.

Durafourt, B.A., Moore, C.S., Zammit, D.A., Johnson, T.A., Zaguia, F., Guiot, M.-C., Bar-Or, A., and Antel, J.P. (2012). Comparison of polarization properties of human adult microglia and blood-derived macrophages. *Glia* 60, 717–727.

Eriksson, N.P., Persson, J.K., Svensson, M., Arvidsson, J., Molander, C., and Aldskogius, H. (1993). A quantitative analysis of the microglial cell reaction in central primary sensory projection territories following peripheral nerve injury in the adult rat. *Exp Brain Res* 96, 19–27.

Gaillard, S., Lo Re, L., Mantilleri, A., Hepp, R., Urien, L., Malapert, P., Alonso, S., Deage, M., Kambrun, C., Landry, M., et al. (2014). GINIP, a Gai-Interacting Protein, Functions as a Key Modulator of Peripheral GABAB Receptor-Mediated Analgesia. *Neuron* 84, 123–136.

Gavins, F.N.E. (2010). Are formyl peptide receptors novel targets for therapeutic intervention in ischaemia-reperfusion injury? *Trends Pharmacol. Sci.* 31, 266–276.

Guo, D., and Hu, J. (2014). Spinal presynaptic inhibition in pain control. *Neuroscience* 283, 95–106.

Harvey, K., Duguid, I.C., Alldred, M.J., Beatty, S.E., Ward, H., Keep, N.H., Lingenfelter, S.E., Pearce, B.R., Lundgren, J., Owen, M.J., et al. (2004). The GDP-GTP exchange factor collybistin: an essential determinant of neuronal gephyrin clustering. *J. Neurosci.* 24, 5816–5826.

Hauser CJ, Sursal T, Rodriguez EK, Appleton PT, Zhang Q, Itagaki K. (2010). Mitochondrial damage associated molecular patterns from femoral reamings activate neutrophils through formyl peptide receptors and P44/42 MAP kinase. *J Orthop Trauma* 24, 24, 534, 534–538.

Hooper, C., Pinteaux-Jones, F., Fry, V.A.H., Sevastou, I.G., Baker, D., Heales, S.J., and Pocock, J.M. (2009). Differential effects of albumin on microglia and macrophages; implications for neurodegeneration following blood-brain barrier damage. *J. Neurochem.* 109, 694–705.

Hui, J., Zhang, Z.-J., Zhang, X., Shen, Y., and Gao, Y.-J. (2013). Repetitive hyperbaric oxygen treatment attenuates complete Freund's adjuvant-induced pain and reduces glia-mediated neuroinflammation in the spinal cord. *J Pain* 14, 747–758.

Ji, R.-R., Berta, T., and Nedergaard, M. (2013). Glia and pain: Is chronic pain a gliopathy? *Pain* 154, S10–S28.

Johansson, R.S., Trulsson, M., Olsson, K.A., and Abbs, J.H. (1988). Mechanoreceptive afferent activity in the infraorbital nerve in man during speech and chewing movements. *Exp Brain Res* 72, 209–214.

Kawasaki, Y., Zhang, L., Cheng, J.-K., and Ji, R.-R. (2008). Cytokine Mechanisms of Central Sensitization: Distinct and Overlapping Role of Interleukin-1 β , Interleukin-6, and Tumor Necrosis Factor- α in Regulating Synaptic and Neuronal Activity in the Superficial Spinal Cord. *J. Neurosci.* 28, 5189–5194.

Keller, A.F., Coull, J.A., Chery, N., Poisbeau, P., and De Koninck, Y. (2001). Region-specific developmental specialization of GABA-glycine cosynapses in laminae I-II of the rat spinal dorsal horn. *J. Neurosci.* 21, 7871–7880.

Laffray, S., Bouali-Benazzouz, R., Papon, M.-A., Favereaux, A., Jiang, Y., Holm, T., Spriet, C., Desbarats, P., Fossat, P., Le Feuvre, Y., et al. (2012). Impairment of GABAB receptor dimer by endogenous 14-3-3 ζ in chronic pain conditions. *EMBO J* 31, 3239–3251.

Latremoliere, A., and Woolf, C.J. (2009). Central sensitization: a generator of pain hypersensitivity by central neural plasticity. *J Pain* 10, 895–926.

Leitner, J., Westerholz, S., Heinke, B., Forsthuber, L., Wunderbaldinger, G., Jäger, T., Gruber-Schoffnegger, D., Braun, K., and Sandkühler, J. (2013). Impaired Excitatory Drive to Spinal Gabaergic Neurons of Neuropathic Mice. *PLoS One* 8.

Li, L., Rutlin, M., Abaira, V.E., Cassidy, C., Kus, L., Gong, S., Jankowski, M.P., Luo, W., Heintz, N., Koerber, H.R., et al. (2011). The functional organization of cutaneous low-threshold mechanosensory neurons. *Cell* 147, 1615–1627.

Liao, H.-Y., Hsieh, C.-L., Huang, C.-P., and Lin, Y.-W. (2017). Electroacupuncture Attenuates CFA-induced Inflammatory Pain by suppressing Nav1.8 through S100B, TRPV1, Opioid, and Adenosine Pathways in Mice. *Sci Rep* 7, 42531.

Lin, Q., Peng, Y.B., and Willis, W.D. (1996). Possible role of protein kinase C in the sensitization of primate spinothalamic tract neurons. *J. Neurosci.* 16, 3026–3034.

Lin, T., Li, K., Zhang, F.-Y., Zhang, Z.-K., Light, A.R., and Fu, K.-Y. (2007). Dissociation of spinal microglia morphological activation and peripheral inflammation in inflammatory pain models. *J Neuroimmunol* 192, 40–48.

Löken, L.S., Wessberg, J., Morrison, I., McGlone, F., and Olausson, H. (2009). Coding of pleasant touch by unmyelinated afferents in humans. *Nat. Neurosci.* 12, 547–548.

Lu, Y., Dong, H., Gao, Y., Gong, Y., Ren, Y., Gu, N., Zhou, S., Xia, N., Sun, Y.-Y., Ji, R.-R., et al. (2013). A feed-forward spinal cord glycinergic neural circuit gates mechanical allodynia. *J Clin Invest* 123, 4050–4062.

Lu, Y., and Perl, E.R. (2005). Modular organization of excitatory circuits between neurons of the spinal superficial dorsal horn (laminae I and II). *J. Neurosci.* 25, 3900–3907.

Luby-Phelps, K., Ning, G., Fogerty, J., and Besharse, J.C. (2003). Visualization of identified GFP-expressing cells by light and electron microscopy. *J. Histochem. Cytochem.* 51, 271–274.

Lumpkin, E.A., Marshall, K.L., and Nelson, A.M. (2010). The cell biology of touch. *J Cell Biol* 191, 237–248.

Mackenzie, R.A., Burke, D., Skuse, N.F., and Lethlean, A.K. (1975). Fibre function and perception during cutaneous nerve block. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatr.* 38, 865–873.

Maruhashi, J., Mizuguchi, K., and Tasaki, I. (1952). Action currents in single afferent nerve fibers elicited by stimulation of the skin of the toad and the cat. *J. Physiol. (Lond.)* 117, 129–151.

Melzack, R., and Wall, P.D. (1965). Pain mechanisms: a new theory. *Science* 150, 971–979.

Merighi A, Polak JM. Post-embedding immunogold staining. In: Cuello AC, editor. *Immunohistochemistry II*. John Wiley & Sons; Chichester: 1993. pp. 229–264.

Miraucourt, L.S., Dallel, R., and Voisin, D.L. (2007). Glycine Inhibitory Dysfunction Turns Touch into Pain through PKC γ Interneurons. *PLoS ONE* 2.

Moore, K.A., Kohno, T., Karchewski, L.A., Scholz, J., Baba, H., and Woolf, C.J. (2002). Partial Peripheral Nerve Injury Promotes a Selective Loss of GABAergic Inhibition in the Superficial Dorsal Horn of the Spinal Cord. *J. Neurosci.* 22, 6724–6731.

Mourof, A., Fehrentz, T., Feuvre, Y.L., Smith, C.M., Herold, C., Dalkara, D., Nagy, F., Trauner, D., and Kramer, R.H. (2012). Rapid optical control of nociception with an ion channel photoswitch. *Nat Methods* 9, 396–402.

Norrzell, U., and Craig, A.D. (1999). Behavioral thermosensitivity after lesions of thalamic target areas of a thermosensory spinothalamic pathway in the cat. *J. Neurophysiol.* 82, 611–625.

O'Brien, J.A., and Berger, A.J. (1999). Cotransmission of GABA and glycine to brain stem motoneurons. *J. Neurophysiol.* 82, 1638–1641.

Olausson, H., Lamarre, Y., Backlund, H., Morin, C., Wallin, B.G., Starck, G., Ekholm, S., Strigo, I., Worsley, K., Vallbo, A.B., et al. (2002). Unmyelinated tactile afferents signal touch and project to insular cortex. *Nat. Neurosci.* 5, 900–904.

Polgár, E., Durrieux, C., Hughes, D.I., and Todd, A.J. (2013). A Quantitative Study of Inhibitory Interneurons in Laminae I-III of the Mouse Spinal Dorsal Horn. *PLoS One* 8.

Qi, J., Chen, C., Meng, Q.-X., Wu, Y., Wu, H., and Zhao, T.-B. (2016). Crosstalk between Activated Microglia and Neurons in the Spinal Dorsal Horn Contributes to Stress-induced Hyperalgesia. *Sci Rep* 6, 39442.

Raghavendra, V., Tanga, F.Y., and DeLeo, J.A. (2004). Complete Freund's adjuvant-induced peripheral inflammation evokes glial activation and proinflammatory cytokine expression in the CNS. *Eur. J. Neurosci.* 20, 467–473.

Raouf, M., Zhang, Q., Itagaki, K., and Hauser, C.J. (2010). Mitochondrial peptides are potent immune activators that activate human neutrophils via FPR-1. *J Trauma* 68, 1328-1332; discussion 1332-1334.

Ribeiro-da-Silva, A., and Cuello, A.C. (1995). Organization of peptidergic neurons in the dorsal horn of the spinal cord: anatomical and functional correlates. *Prog. Brain Res.* 104, 41–59.

Sdrulla, A.D., Xu, Q., He, S.-Q., Tiwari, V., Yang, F., Zhang, C., Shu, B., Shechter, R., Raja, S.N., Wang, Y., et al. (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, 1008–1017.

Seal, R.P., Wang, X., Guan, Y., Raja, S.N., Woodbury, C.J., Basbaum, A.I., and Edwards, R.H. (2009). Injury-induced mechanical hypersensitivity requires C-low threshold mechanoreceptors. *Nature* 462, 651–655.

Spike, R.C., and Todd, A.J. (1992). Ultrastructural and immunocytochemical study of lamina II islet cells in rat spinal dorsal horn. *J. Comp. Neurol.* 323, 359–369.

Stuesse, S.L., Cruce, W.L., Lovell, J.A., McBurney, D.L., and Crisp, T. (2000). Microglial proliferation in the spinal cord of aged rats with a sciatic nerve injury. *Neurosci. Lett.* 287, 121–124.

Sun, S., Cao, H., Han, M., Li, T.-T., Pan, H.-L., Zhao, Z.-Q., and Zhang, Y.-Q. (2007). New evidence for the involvement of spinal fractalkine receptor in pain facilitation and spinal glial activation in rat model of monoarthritis. *Pain* 129, 64–75.

Takazawa, T., Choudhury, P., Tong, C.-K., Conway, C.M., Scherrer, G., Flood, P.D., Mukai, J., and MacDermott, A.B. (2017). Inhibition Mediated by Glycinergic and GABAergic

Receptors on Excitatory Neurons in Mouse Superficial Dorsal Horn Is Location-Specific but Modified by Inflammation. *J. Neurosci.* 37, 2336–2348.

Takazawa, T., and MacDermott, A.B. (2010). Glycinergic and GABAergic tonic inhibition fine tune inhibitory control in regionally distinct subpopulations of dorsal horn neurons. *J Physiol* 588, 2571–2587.

Taylor, B.K. (2009). Spinal Inhibitory Neurotransmission in Neuropathic Pain. *Curr Pain Headache Rep* 13, 208–214.

Todd, A.J., Watt, C., Spike, R.C., and Sieghart, W. (1996). Colocalization of GABA, glycine, and their receptors at synapses in the rat spinal cord. *J. Neurosci.* 16, 974–982.

Todd, A.J. (2015). Plasticity of inhibition in the spinal cord. *Handb Exp Pharmacol* 227, 171–190.

Trapp, B.D., Wujek, J.R., Criste, G.A., Jalabi, W., Yin, X., Kidd, G.J., Stohlman, S., and Ransohoff, R. (2007). Evidence for synaptic stripping by cortical microglia. *Glia* 55, 360–368.

Wang, W., Li, T., Wang, X., Yuan, W., Cheng, Y., Zhang, H., Xu, E., Zhang, Y., Shi, S., Ma, D., et al. (2015). FAM19A4 is a novel cytokine ligand of formyl peptide receptor 1 (FPR1) and is able to promote the migration and phagocytosis of macrophages. *Cell. Mol. Immunol.* 12, 615–624.

Woolf, C.J. (2011). Central sensitization: Implications for the diagnosis and treatment of pain. *Pain* 152, S2-15.

Xu, F., Li, Y., Li, S., Ma, Y., Zhao, N., Liu, Y., Qian, N., Zhao, H., and Li, Y. (2014). Complete Freund's adjuvant-induced acute inflammatory pain could be attenuated by triptolide via inhibiting spinal glia activation in rats. *J. Surg. Res.* 188, 174–182.

Yarnitsky, D., and Ochoa, J.L. (1990). Release of cold-induced burning pain by block of cold-specific afferent input. *Brain* 113 (Pt 4), 893–902.

Zhang, J., and De Koninck, Y. (2006). Spatial and temporal relationship between monocyte chemoattractant protein-1 expression and spinal glial activation following peripheral nerve injury. *J. Neurochem.* 97, 772–783.

Zhang, Z., Wang, X., Wang, W., Lu, Y.-G., and Pan, Z.Z. (2013). Brain-Derived Neurotrophic Factor–Mediated Downregulation of Brainstem K⁺–Cl[–] Cotransporter and Cell-Type–Specific GABA Impairment for Activation of Descending Pain Facilitation. *Mol Pharmacol* 84, 511–520.

Zotterman, Y. (1939). Touch, pain and tickling: an electro-physiological investigation on cutaneous sensory nerves. *J. Physiol. (Lond.)* 95, 1–28.

Figure 1

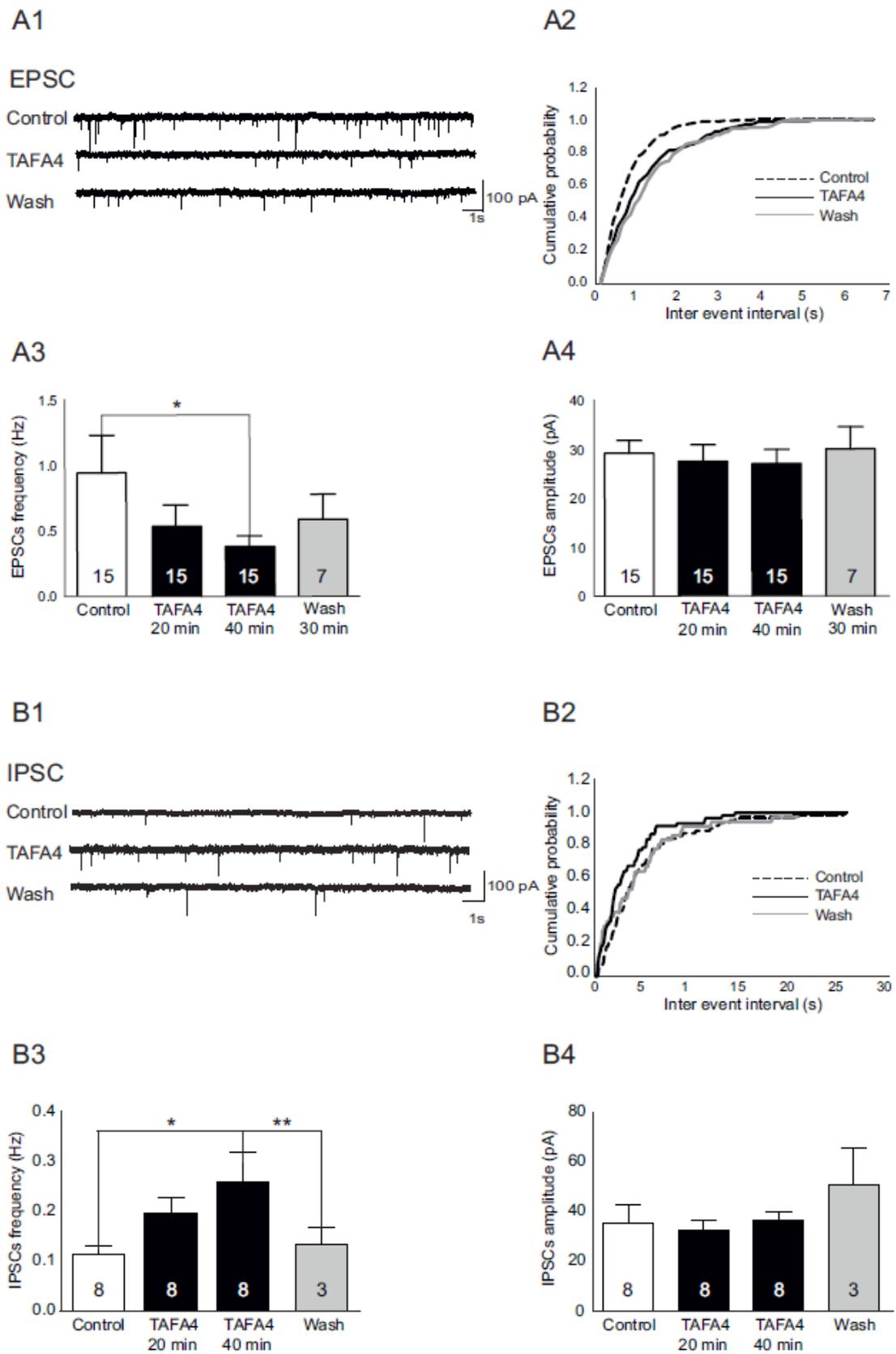


Figure 2

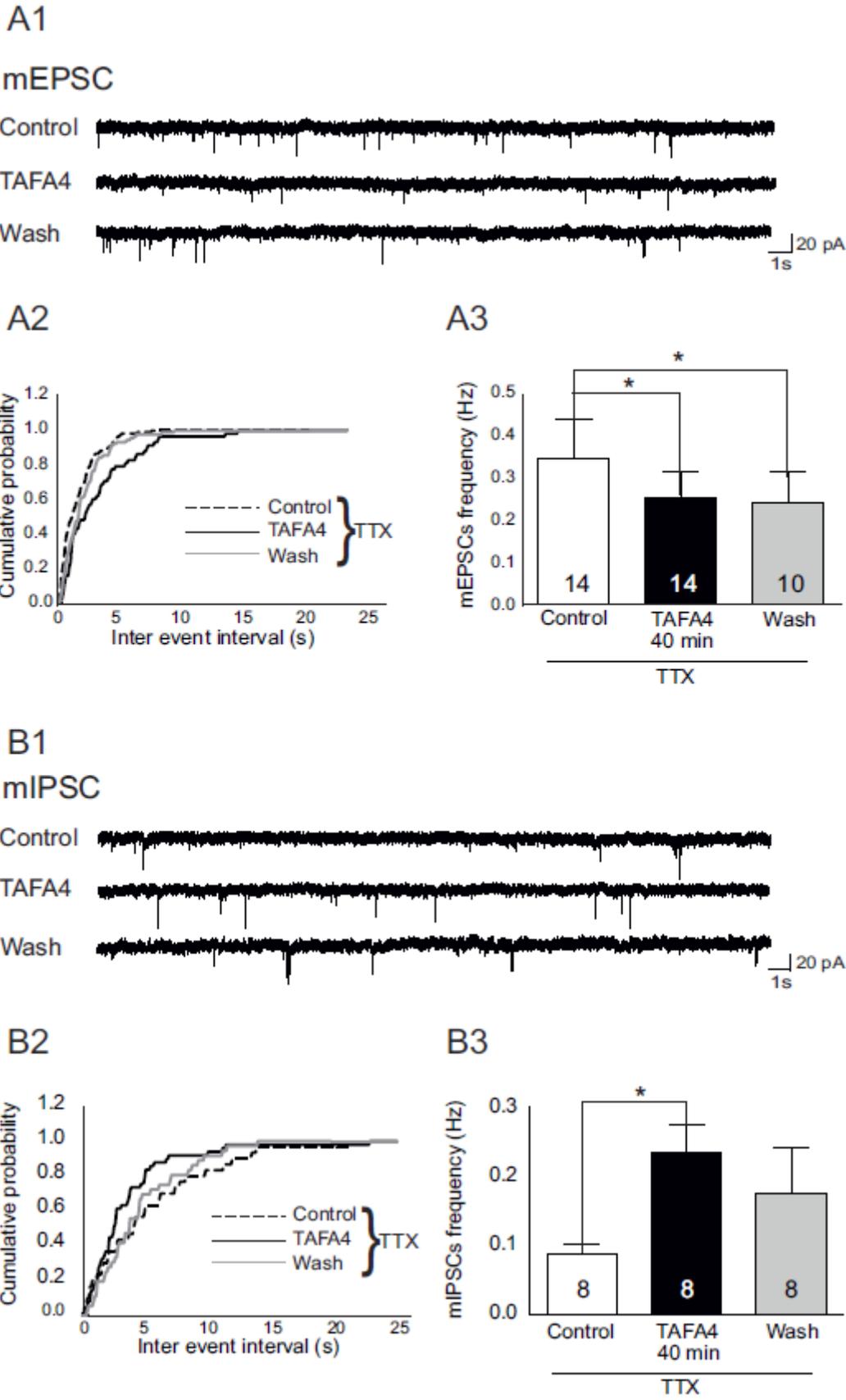


Figure 3

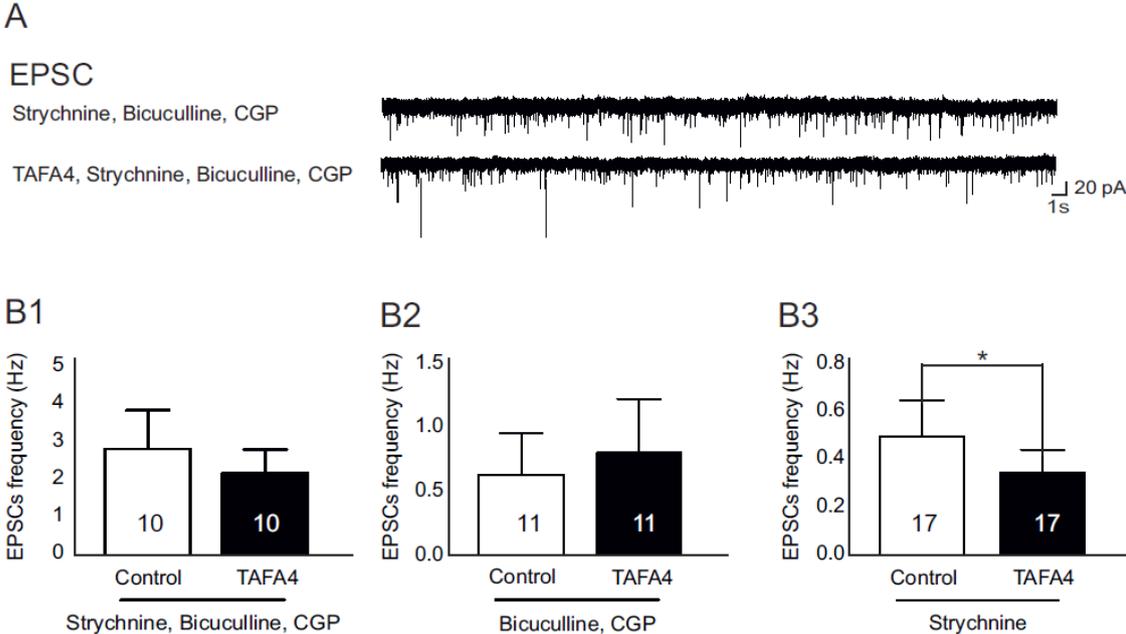


Figure 4

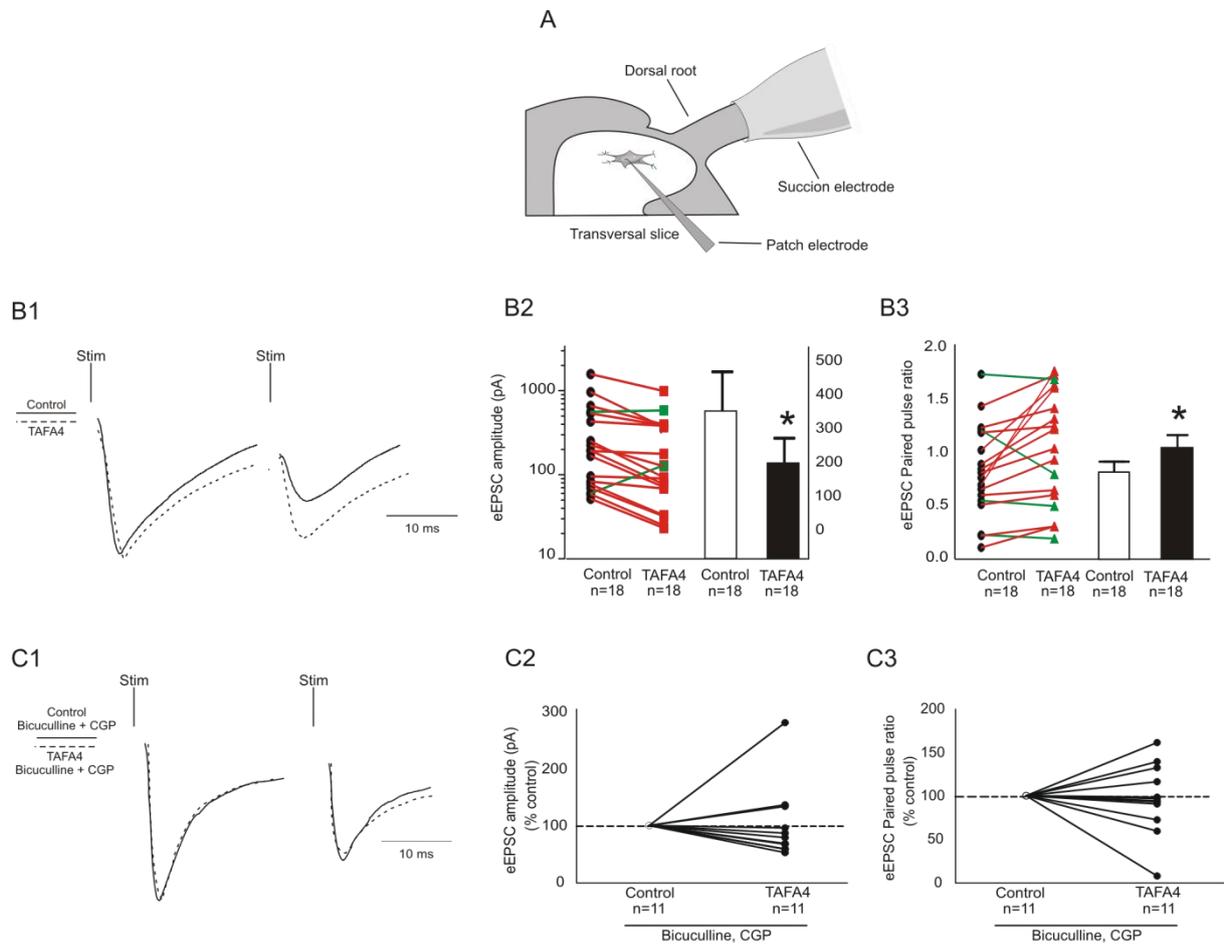


Figure 5

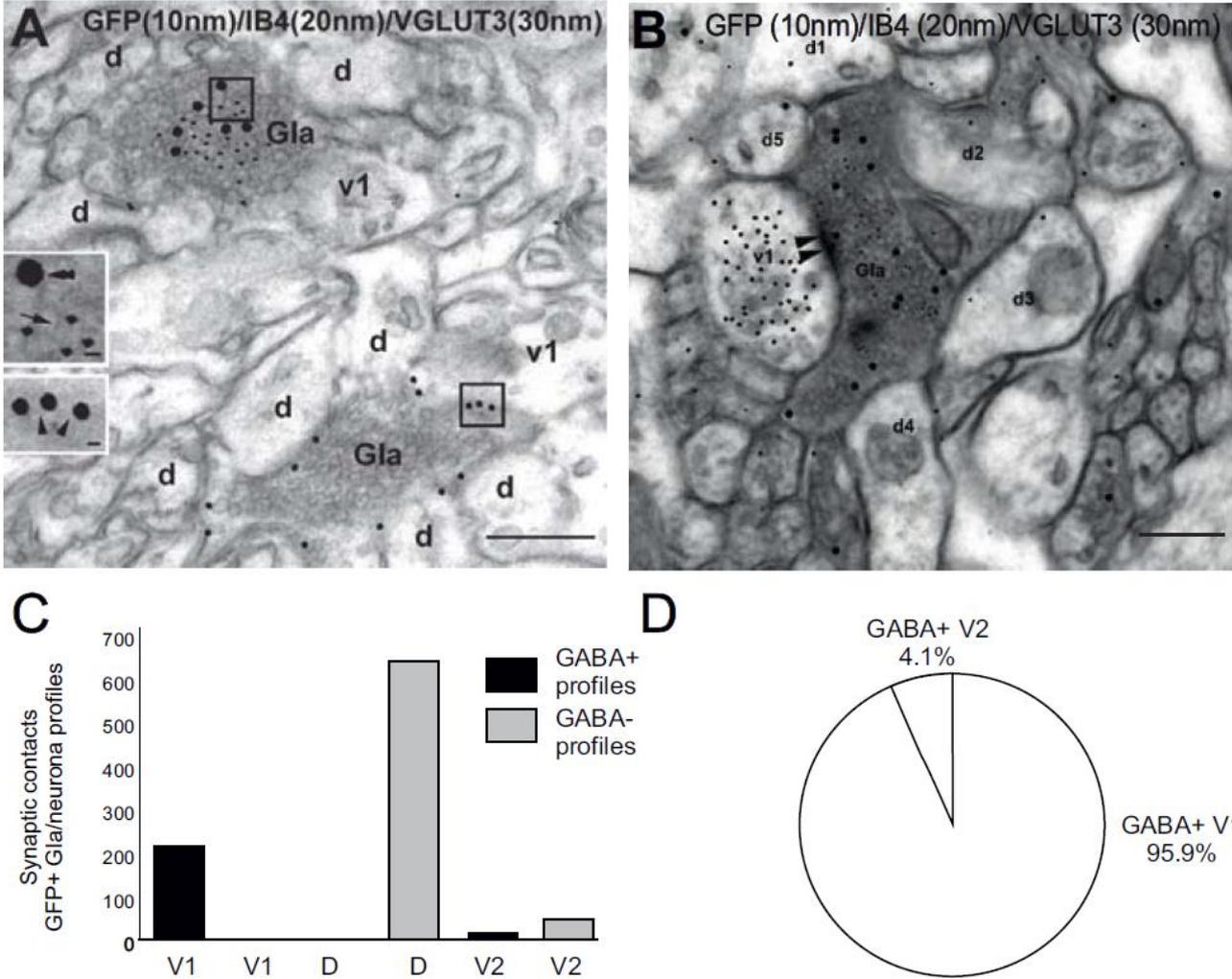


Figure 6

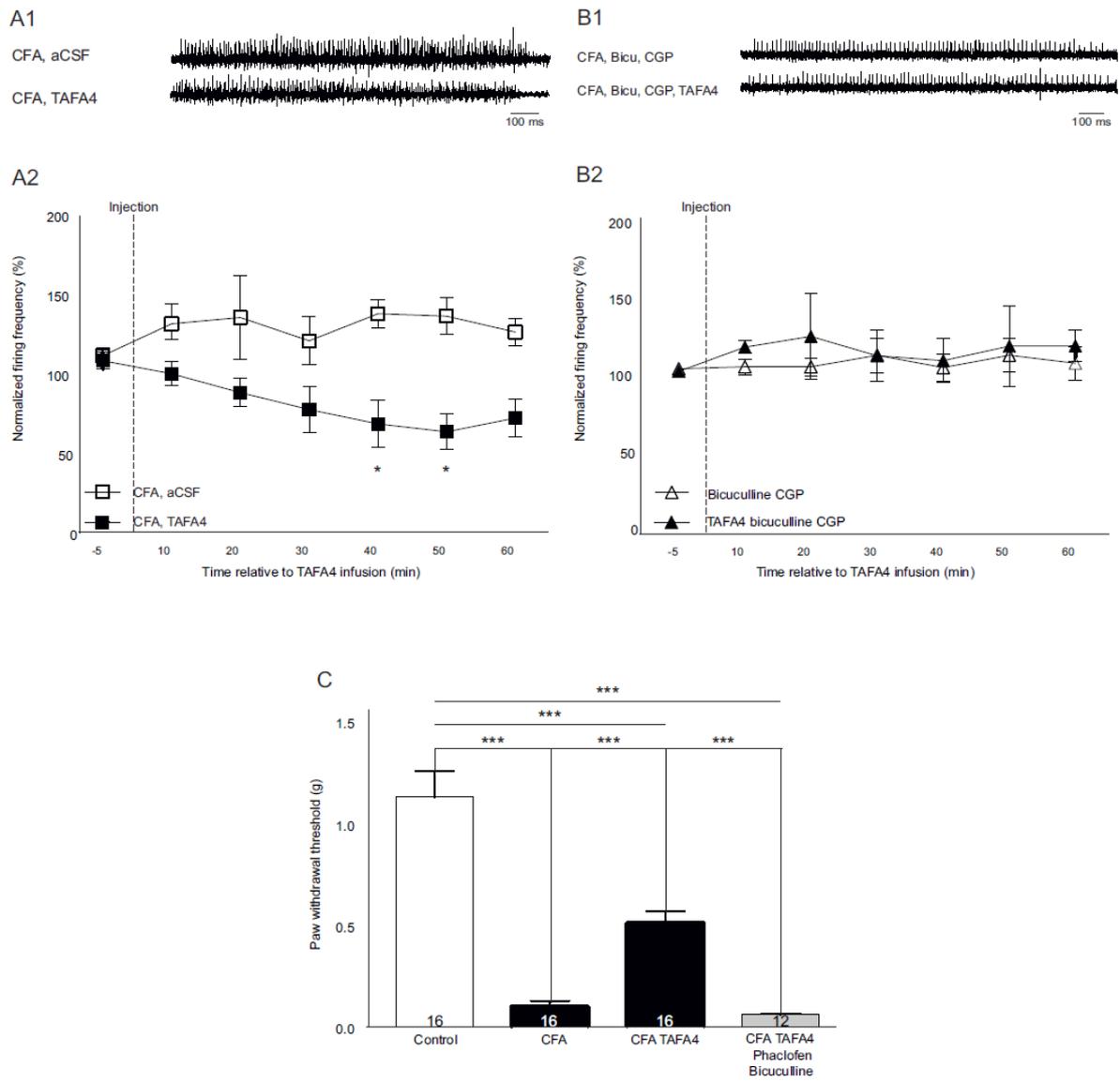
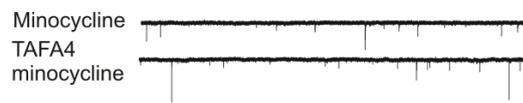


Figure 7

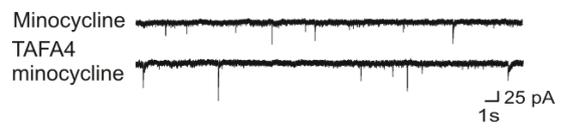
A1

EPSC

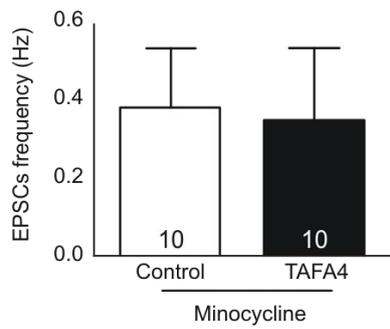


B1

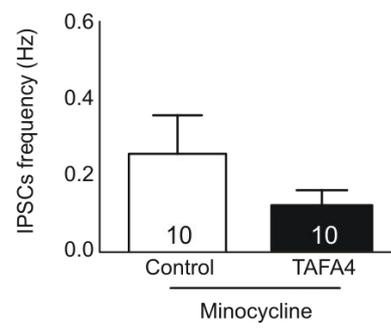
IPSC



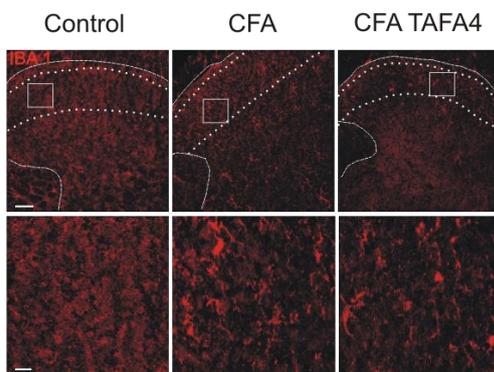
A2



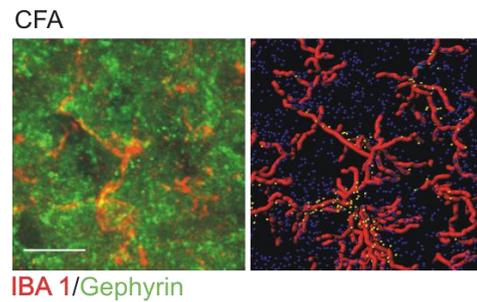
B2



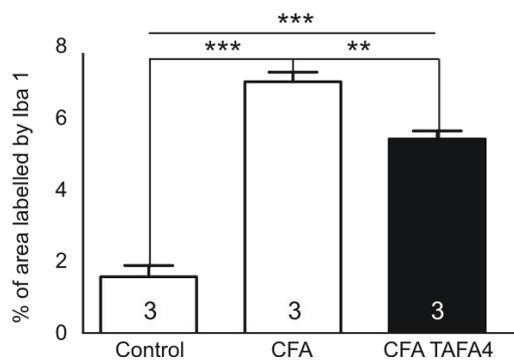
C1



D1



C2



D2

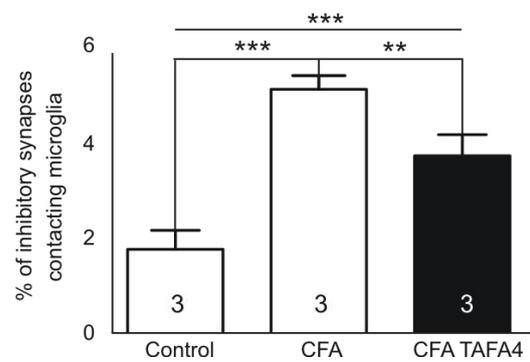


Figure 8

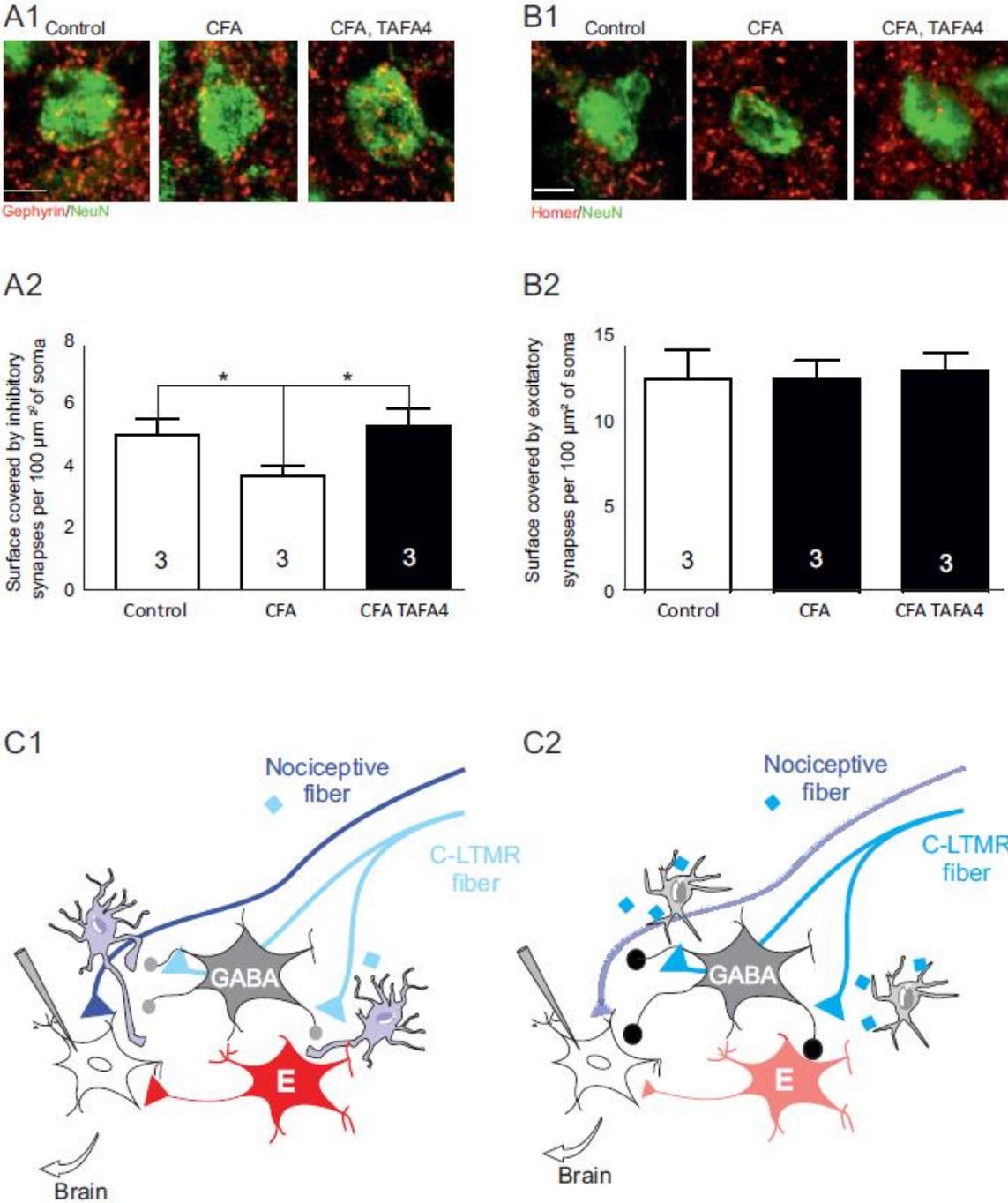


Figure Legends

Figure 1 Effects of TAF4A on spontaneous synaptic activity of lamina III neuronal networks.

(A1) Representative current traces of spontaneous excitatory synaptic activity obtained from a neuron within the lamina III in control condition, after 40 min of TAF4A superfusion and after washout. (A2) Cumulative distribution of inter EPSCs interval corresponding to traces in A1. (A3-A4) Quantification of EPSCs mean frequency (A3) and amplitude (A4) measured over 3 min and recorded from lamina III neurons in control (n=16), following 20 and 40 min TAF4A superfusion (n=16), and after washout (n=7). (B1) Representative recordings of spontaneous inhibitory synaptic activity obtained from a neuron within lamina III in control condition, after 40 min of TAF4A superfusion and after washout. (B2) Cumulative distribution of inter IPSCs interval corresponding to traces in B1. (B3-B4) Quantification of IPSCs mean frequency (B3) and IPSCs amplitude (B4) measured over 3 min and recorded in lamina III neurons in control (n=8), following 20 and 40 min TAF4A superfusion (n=8), and after washout (n=3). Data are represented as mean \pm SEM *p<0.05.

Figure 2 Presynaptic action of TAF4A on synaptic activity

(A1-B1) Representative current traces of miniature EPSCs (A1) and IPSCs (B1) recorded from a lamina III neuron under tetrodotoxin in control condition, following 40 min of TAF4A superfusion and after wash. (A2-B2) Cumulative distribution of inter mEPSCs (A2) and mIPSCs (B2) interval corresponding to traces in A1-B1. (A3-B3) Quantification of lamina III neuron mEPSCs (A3) and mIPSCs (B3) mean frequency measured over 3 min in control (mEPSC n=14 and mIPSC n=8), following 40 min TAF4A superfusion (mEPSC n=14 and mIPSC n=8), and after washout (mEPSC n=14 and mIPSC n=8). Data are represented as mean \pm SEM *p<0.05.

Figure 3 The effect of TFAFA4 on excitatory transmission is mediated by inhibitory transmission

(A) Representative traces of EPSCs recorded with antagonists of GABA_A (Bicuculline), GABA_B (CGP55845A) and glycinergic receptors (Strychnine), before and after 40 min of TFAFA4 exogenous application. (B1) Histogram comparing EPSCs frequency in presence of bicuculline, CGP and strychnine, before and after application of TFAFA4 (n=10). (B2) Quantification of EPSCs mean frequency with antagonists of GABAergic transmission only, before and after superfusion of TFAFA4 (n=11). (B3) Comparison of EPSCs mean frequency, recorded with antagonist of glycinergic transmission only, before and after superfusion of TFAFA4 (n=17). Data are represented as mean ± SEM. *p<0.05

Figure 4 TFAFA4 alters sensory transmission through reinforcement of GABAergic presynaptic inhibition.

(A) Schematic representation of experimental procedure used to record evoked EPSCs from lamina Ili neurons. Suction electrode is placed on spinal cord dorsal root to evoke synaptic responses recorded within the lamina Ili. (B1) Normalized representative traces of evoked excitatory synaptic responses obtained before and after bath application of TFAFA4. (B2-B3) Quantification of normalized amplitude of the first evoked EPSC (B2, n=15) and normalized paired pulse ratio of synaptic responses between control and TFAFA4 conditions (B3). (C1) Normalized representative traces of evoked excitatory synaptic obtained with antagonists of GABA_A (Bicuculline) and GABA_B receptors (CGP55845A). (C2-C3) Quantification of normalized amplitude of the first evoked EPSC (C2, n=11) and normalized paired pulse ratio of synaptic responses in control and TFAFA4 condition (C3). Data are represented for each cell as the percentage of control values *p<0.05.

Figure 5 Ultrastructural localization of TFAFA4-expressing C-LTMRs and relationship with lamina II GABA-IR interneurons.

(A) Two immunoreactive type Ia non-peptidergic glomeruli (Gla) in lamina II. The Gla at top in the figure is double labeled for GFP (10-nm gold particles; top left insert, arrow) and VGLUT3 (30-nm gold particles; top left insert, double-arrowhead), while the Gla at bottom is only labeled for IB4 (20-nm gold particles; bottom left insert; arrowheads). GFP and VGLUT3 are scattered over Gla central terminal, while IB4 is exclusively localized over the Gla plasma membrane. Scale bars: 300 nm; inserts, 20 nm.

(B) A GFP + VGLUT3-immunoreactive Gla is surrounded by different unlabeled dendrites (d) and make synapse with a GABA-immunolabeled vesicle-containing dendrite (V1, arrowhead). GFP (10-nm gold particles) and VGLUT3 (30-nm gold particles) are scattered over the Gla central terminal (top left insert; arrow and double-arrowhead, respectively). GABA (20-nm gold particles) is distributed in the intracellular aspect of the V1 (bottom insert, arrowhead). Scale bars: 300 nm; inserts, 20 nm.

(C) Histogram showing the synaptic contacts between GFP-immunolabeled Gla and the different surrounding neuronal profiles (vesicle-containing dendrites, V1; plain dendrites, D; peripheral axons, V2) engaged in the glomerular configuration (black bars: synaptic contacts GFP-IR Gla/ GABA-positive V1 and V2 profiles; grey bars: synaptic contacts GFP-IR Gla/GABA-negative D and V2 profiles).

(D) Pie chart showing the percentage of synaptic contacts between GFP+ Gla/GABA-IR V1 (black, 95.9%) and GFP+ Gla/GABA-IR V2 (black and white squares, 4.1%).

Figure 6 TFAFA4 decreases neuronal discharge elicited by noxious stimulation in CFA animals.

(A1) Representative traces of extracellular *in vivo* recordings obtained from neurons located in superficial laminae activated by a noxious mechanical stimulus (Von Frey hair filament 15g) in CFA animals after an infusion of either aCSF or TFAFA4. (A2) Quantification of action

potential mean frequency measured in control condition (-5 min) and every 10 min after injection of aCSF (N=5) or TAFA4 (N=5) until 60 min. (B1) Representative neuronal responses to a mechanical noxious stimulus recorded with antagonists of GABA_A and GABA_B receptors (Bicuculline and CGP55845A) co-injected with either aCSF or TAFA4. (B2) Quantification of action potential frequency before and after intra spinal injection of aCSF or TAFA4, in the presence of GABA_A and GABA_B antagonists (N=5). Data are represented as mean (in percentage of control values) ± SEM. (C) Histogram of mechanical sensitivity assessed with Von Frey hairs in naïve (N=16) or CFA animals (N=16) intrathecally injected with TAFA4 (N=16) and TAFA4 with phaclofen and bicuculline (N=12). Data are represented as mean ± SEM. *p<0.05; **p<0.01; ***p<0.001.

Figure 7 The effect of TAFA4 is mediated by microglia which undergoes process retraction upon TAFA4 application.

(A1) Representative current traces of spontaneous excitatory synaptic activity recorded in lamina Ili neurons before and after TAFA4 superfusion, in slices incubated within minocycline 1h30 before recordings. (A2) Comparison of EPSCs mean frequency recorded in control condition (minocycline, n=10) and TAFA4 condition (minocycline + TAFA4, n=10). (B1) Representative recordings of spontaneous inhibitory synaptic activity obtained from lamina Ili neurons recorded in slices incubated with minocycline, before and 40min after TAFA superfusion. (B2) Quantification of IPSCs mean frequency before and after superfusion with TAFA4, in minocycline incubated slices (n=10). (C1) Immunohistochemistry for Iba 1 in lumbar dorsal spinal cord sections. (top, scale bar: 60µm) and in lamina Ili (bottom, scale bar 20µm) in control, CFA inflamed and CFA inflamed with intrathecal TAFA4 animals (C2) Quantification of the lamina II surface labelled with iba 1 (percentage of the total surface of the confocal acquisition) in control, inflamed and TAFA4 injected inflamed animals (N=3 each). (D1) Immunohistochemistry for Iba 1 (red) and gephyrin (green) in lumbar spinal cord section (Left panel, CFA mouse), and 3D reconstruction of the immunostaining (right panel) allowing the quantification of colocalisation between inhibitory synapses and microglial cells

(yellow dots). (D2) Quantification of colocalisation between gephyrin and Iba 1 within lamina II in naïve, inflamed and TFAFA4 injected animals (N=3 each). Data are represented as mean \pm SEM **p<0.01; ***p<0.001.

Figure 8 Restoration of inhibitory contacts on dorsal spinal cord neurons by TFAFA4

(A1) High magnification view of a lamina Ili neuronal soma, immunolabeled for NeuN and surrounding inhibitory synapses, labelled with Gephyrin, in CFA and TFAFA4 injected CFA animals. (A2) Quantification of neuronal soma surface occupied by gephyrin in naïve (N=3), CFA (N=3) and CFA TFAFA4 injected (N=3) animals. (B1). High magnification view of a lamina Ili neuronal soma, immunolabeled for NeuN and surrounding excitatory synapses, labelled with Homer, in CFA and TFAFA4 injected CFA animals (B2) Quantification of neuronal soma surface occupied by excitatory synapses in naïve (N=3), CFA (N=3) and CFA TFAFA4 injected mice (N=3). (C) Schematic representation of the proposed mechanism of action of TFAFA4. (C1) In inflammatory condition activated microglia displace inhibitory synapses from neuronal soma leading to an increase of the excitatory transmission and thus a CFA induced hypersensitivity. (C2) By inducing a reduction of the microglial spreading TFAFA4 promotes the partial restoration of the inhibitory transmission. Data are represented as mean \pm SEM *p<0.05.

Supplemental Figures Legends

S1 Effect of TFAFA4 on decay time of spontaneous synaptic events.

Related to Figure 1

(A-B) Histogram comparing the decays of EPSCs (A) and IPSCs (B) recorded from 16 (A) and 8(B) lamina Ili neurons, before and after exogenous application of TFAFA4.

S2 Presynaptic action of TFAFA4 is mediated by inhibitory transmission.

Related to Figure 3

(A1) Representative current traces of miniatures EPSCs recorded from lamina Ili neurons with antagonists GABA_A (Bicuculline), GABA_B (CGP55845A) and glycinergic receptors (Strychnine). (A2) Cumulative distribution of inter EPSCs interval corresponding to traces in A1. (A3) Quantification of EPSCs mean frequency measured over 3 min in control condition (n=11) and following 40 min of TFAFA4 superfusion (n=11). Data are represented as mean ± SEM

S3 Effect of TFAFA4 on spontaneous synaptic activity recorded in spinal slices in inflammatory condition.

Related to Figure 6

(A1) Representative current traces of spontaneous excitatory synaptic activity recorded from neurons located in lamina Ili in control condition or after incubation in TFAFA4. (A2) Comparison of EPSCs mean frequency measured over 3 min in control (CFA, n=19) and TFAFA4 condition (n=25). (B1) Representative recordings of spontaneous inhibitory synaptic activity obtained from neurons within the lamina Ili in control (CFA, n=13) and TFAFA4 condition (n=13). (B2) Quantification of IPSCs mean frequency measured over 3 min in

control condition and 40 min of incubation in TFAFA4. Data are represented as mean \pm SEM * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$. (C1) Normalized representative traces of evoked EPSC obtained from a lamina lii neuron in control condition or after incubation in TFAFA4. (C2) Quantification of normalized paired pulse ratio of synaptic responses in control (CFA, $n=15$) or TFAFA4 condition ($n=18$). Data are represented for each cell as the percentage of control values.

S4 Effect of TFAFA4 on neuronal discharge following a mechanical stimulus.

Related to Figure 6

(A) Representative traces of *in vivo* recordings obtained from a neuron in superficial laminae activated by a mechanical stimulus applied on the hindpaw (15g) in naïve mice after an intra spinal injection of either aCSF or TFAFA4. (B) Quantification of action potential mean frequency recorded during control condition (-5) and every 10 min after the injection ($N=5$) until 60min. Data are represented as mean (in percentage of control values) \pm SEM * $p < 0.05$.

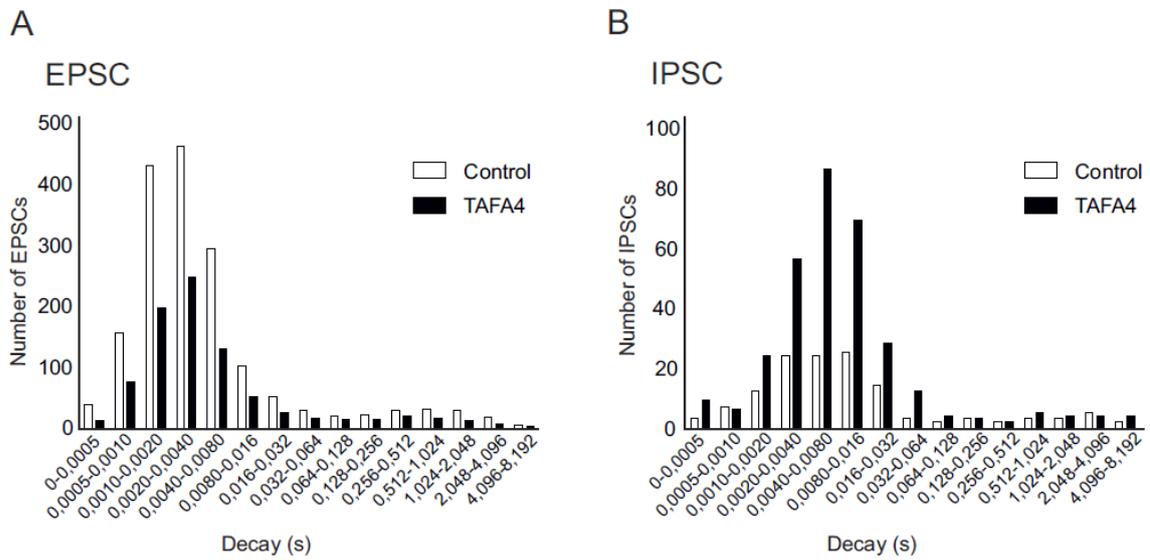
S5 Microglia interacts with GABAergic V1 profiles at C-LTMR Gla endings.

Related to Figure 7

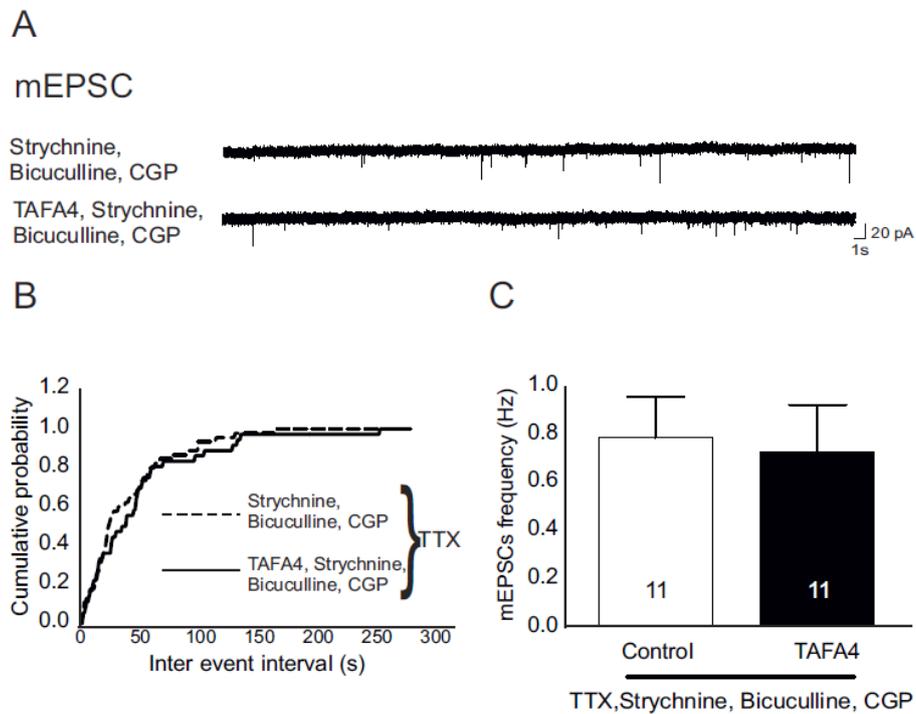
Electron micrograph showing a C-LTMR Gla profile labelled with GFP and VGLUT3 (left insert: GFP 10 nm gold particles, arrow; VGLUT3 30 nm gold particles double-arrowhead), contacting a GABA-immunolabeled vesicle-containing dendrite (V1, right insert, 20 nm gold particles, arrowhead), a V2 peripheral axon and different unlabeled dendrites (d). Notice the presence of glial processes (g,m), among which a putative microglial process (m) surrounding the V1 profile. Scale bar: 300nm; inserts 20nm

Supplemental figures

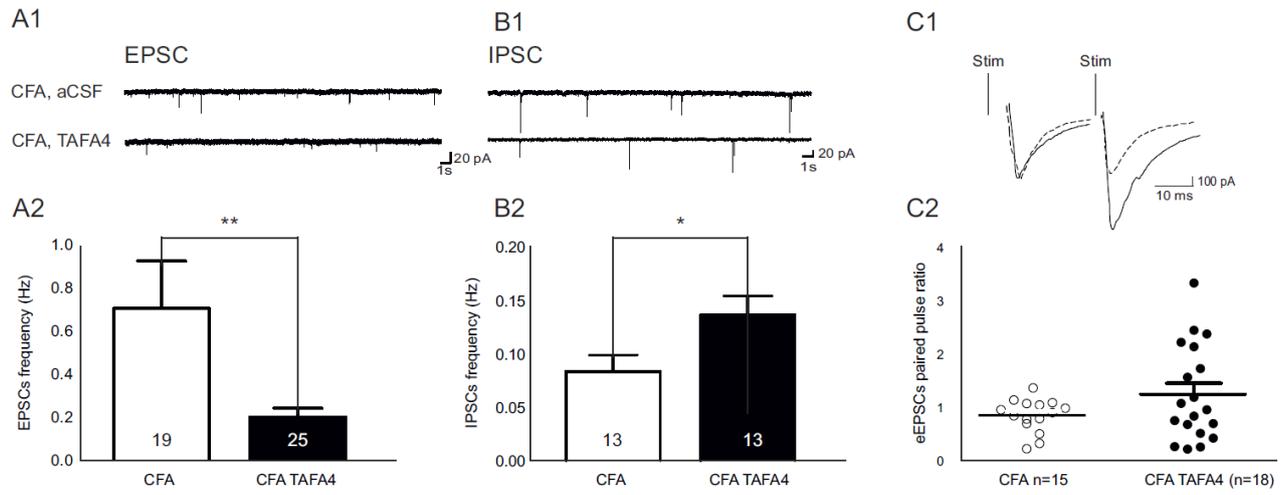
S 1



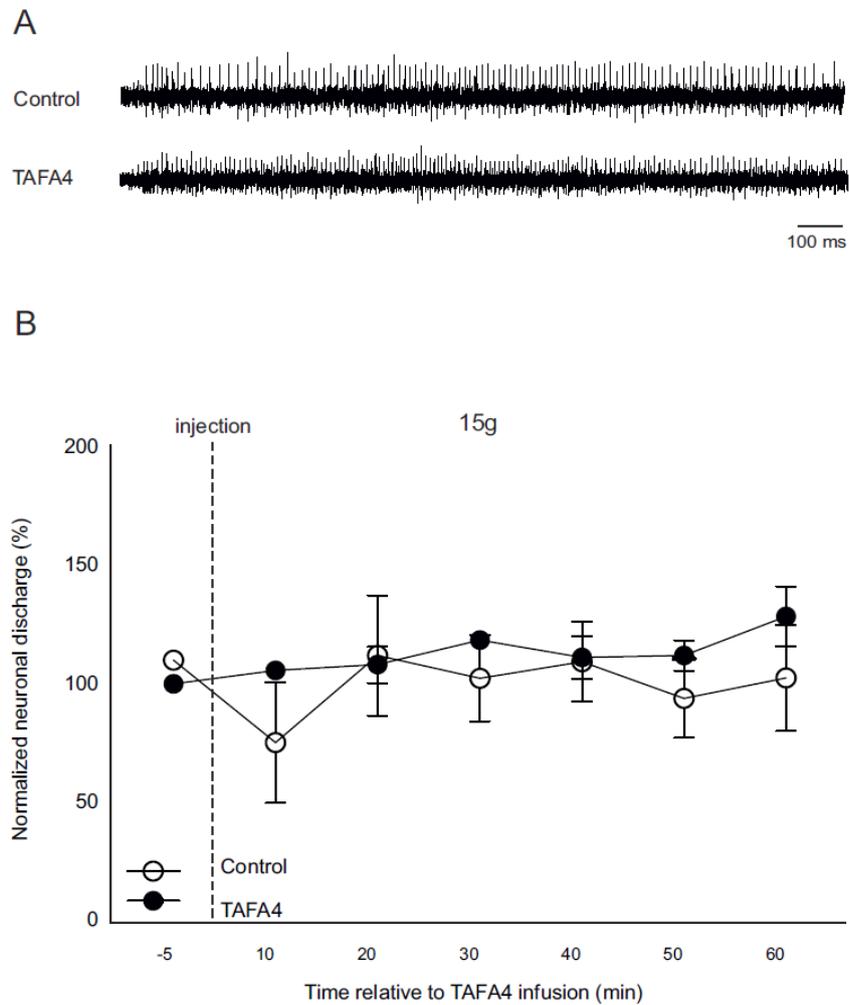
S2

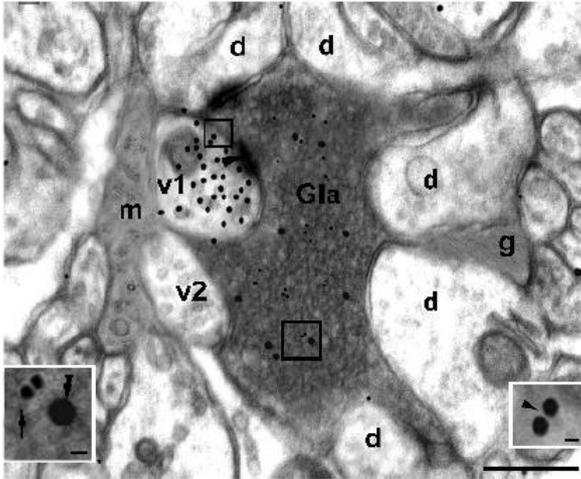


S3



S4





STAR Methods

KEY RESOURCES TABLE

| REAGENT or RESOURCE | SOURCE | IDENTIFIER |
|--------------------------------|-----------------------------|--|
| Antibodies | | |
| Mouse monoclonal anti GABA | Sigma Aldrich | Cat# A0310 RRID:AB_476667 |
| Mouse monoclonal anti Gephyrin | Synaptic System | Cat#147011; RRID: AB_887717 |
| Chicken polyclonal anti GFP | Aves Labs | Cat# GFP-1020 RRID:AB_1000024 0 |
| Rabbit polyclonal anti Homer1 | Synaptic System | Cat#160003; RRID: AB_887730 |
| Rabbit polyclonal anti Iba1 | Wako | Cat# 019-19741; RRID: AB_839504 |
| Chicken polyclonal anti NeuN | Abcam | Cat#ABN91; RRID: AB_11212808 |
| Rabbit polyclonal anti VGLUT3 | Abcam | Cat# ab23977 RRID:AB_2270290 |
| Donkey anti mouse Alexa 488 | Thermo Fisher Scientific | Cat#A-21202; RRID: AB_141607 |
| Goat anti chicken Alexa 488 | Thermo Fisher Scientific | Cat#A-11039 RRID: AB_2534096 |
| Goat anti rabbit Alexa 568 | Molecular Probes | Cat#A-11011 RRID: AB_143157 |

| | | |
|--|-----------------------------|---|
| Goat anti mouse Alexa 568 | Thermo Fisher Scientific | Cat#A-11004 RRID: AB_2534072 |
| Chemicals, Peptides, and Recombinant Proteins | | |
| DL-2-Amino-5-phosphonopentanoic acid solid | Sigma Aldrich | CAS: 76326-31-3 |
| (-)-Bicuculline methiodide | Tocris Bioscience | CAS: 40709-69-1 |
| CGP 55845 hydrochloride | Tocris Bioscience | CAS: 149184-22-5 |
| CNQX disodium salt | Tocris Bioscience | CAS: 479347-85-8 |
| Minocycline hydrochloride | Sigma Aldrich | CAS: 13614-98-7 |
| Freund's Adjuvant Complete | Sigma Aldrich | CAS: 009007-81-2 |
| Phaclofen | Tocris Bioscience | CAS: 114012-12-3 |
| Recombinant Human TFAFA4/FAM19A4 protein | R&D Systems | Accession#: NP_001005527 |
| Strychnine hydrochloride | Sigma Aldrich | CAS: 1421-86-9 |
| Tetrodotoxin citrate | Tocris Bioscience | CAS: 18660-81-6 |
| Experimental Models: Organisms/Strains | | |
| TFAFA4 ^{Venus} heterozygous (+/-) knock in mice | Delfini et al., 2013 | |
| Software and Algorithms | | |
| Adobe Photoshop CS2 | Adobe Photoshop Software | |
| Axon pCLAMP 2 clampfit | Molecular Devices | |
| Ced Spike 2 | Cambridge Electronic Design | |
| GraphPad Prism 5 | GraphPad Software | http://www.graphpad.com/scientificsoftware/prism/ |

| | | |
|---------|-----|---|
| Image J | NIH | https://imagej.nih.gov/ij/ |
|---------|-----|---|

Contact for reagent and resource sharing

Further information and requests for reagents may be directed to and will be fulfilled by the Lead Contact, Dr Le Feuvre (Yves.le-feuvre@u-bordeaux.fr)

Experimental model and subject details

Experimental protocols were assessed by the local ethic committee (50120155A). Mice were maintained under standard housing condition (22°C, 40% humidity) with 12h light cycles and free access to food and water. No deterioration sign of mice state of health (coat appearance, lethargy) were observed during experiments.

All electron microscopy experiments conducted on adult male TAF4A^{Venus} heterozygous (+/-) mice (N=3, Delfini et al., 2013) were approved by the Italian Ministry of Health, in accordance with the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals and the European Union and Italian regulations on animal welfare. Mice were housed in a temperature-controlled room (22°C, 40% humidity), under a 12 h light-dark cycles, and free access to food and water.

Method details

Whole-cell patch clamp recordings from lamina III

Spinal cord slice preparation

Transverse spinal cord slices with dorsal roots attached from C57Bl6J juvenile (P17-P30) mice of either sex were prepared following the protocol described in Mourots et al., 2012. Briefly, Mice were anesthetised with isoflurane 4% then beheaded. The backbone was quickly removed and placed in a low calcium medium (in mM: NaCl 101, KCl 3.8, MgCl₂ 18.7, MgSO₄ 1.3, KH₂PO₄ 1,2; HEPES 10; CaCl₂ 1; Glucose 1) to limit the discharge of the cells during the production of the slices maintained at 4°C and oxygenated with O₂. After a

laminectomy the meninges were removed from the spinal cord. The lumbar bulge was placed in an agarose wedge (3% in the sampling medium) which was then glued to the vibratome tank (Leica VT 1000S). Cross sections of 300 μm thickness were then made between lumbar levels L3 and L5 and placed in artificial cerebrospinal fluid (aCSF) (in mM: NaCl 130.5, KCl 2.4, CaCl_2 2.4, NaHCO_3 19.5, MgSO_4 1.3, KH_2PO_4 1.2, HEPES 1.25, Glucose 10, pH 7.4) maintained at 31 ° C and equilibrated with O_2 (95%) / CO_2 (5%) for 1 to 2 hours before electrophysiological recordings started. Slices were then placed in a recording chamber and perfused with oxygenated aCSF heated to 31 ° C.

Patch-clamp recordings

Electrical activity of the neurons of the lamina III was recorded by a patch clamp technique in a whole-cell configuration. The synaptic activity was recorded at a potential imposed at -60mV throughout the duration of the experiment. To record the spontaneous synaptic activity as well as evoked excitatory post-synaptic currents (EPSCs), recording electrodes were filled with an internal K-gluconate solution (in mM: K-Glu 120, 0.1 KCl CaCl_2 20, MgCl_2 1.3, EGTA 1, HEPES 10, GTP 0.1, cAMP 0.2, leupeptin 0.1, Na²-ATP 3, PO=290 adjusted with D-Mannitol, pH 7.3). For the post-synaptic inhibitory currents (IPSCs) the recording electrodes were filled with an internal solution enriched with chloride ions (in mM: KCl 120, 0.1 CaCl_2 , KCl 20, MgCl_2 1.3, EGTA 1, HEPES 10 GTP 0.1, cAMP 0.2, leupeptin 0.1, Na²-ATP3, PO=290 adjusted with D-Mannitol pH 7.3). Recording electrodes were drawn from borosilicate glass (GC150TF-10, Harvard Apparatus) using a P-97 (Sutter Instrument) pipette puller and had an average resistance of 5M Ω . They were placed at the lamina III of the dorsal horn of the spinal cord under the control of an Olympus BX51 microscope equipped with an Hamamatsu infrared camera (Orca II/Olympus). The signals were amplified by a Multicamp 700A, digitized and then recorded on a computer with the Spike 2 software. Throughout the experiment, the access resistance was regularly checked. Twenty minutes after the beginning of recordings, the extracellular solution was supplemented with TAF4A

(20nM, human recombinant R&D systems) for 40 minutes. The IPSCs were recorded in the presence of AMPA / Kainate glutamatergic synaptic blockers CNQX (10mM) and NMDA antagonist DL-AP5 (25mM) in order to differentiate inhibitory events, inward with Cl⁻ enriched, solution from excitatory events. In order to block the influence of inhibitory connections on recorded neurons, bicuculline (10 μM), GABA_A receptor antagonist, strychnine (5 μM), glycinergic receptor antagonist as well as CGP55845A (10 μM), GABA_B receptor antagonist were added to the aSCF in some experiments. In order to evoke EPSCs, electrical stimuli were applied on dorsal roots through a borosilicate glass suction electrode connected to a Master 8 (A.M.P. Instrument Ltd) stimulator through an iso-flex stimulus isolation unit. To recruit nociceptive fibers high-intensity and duration stimulations were used (300 μs, 500 μA). For experiments done with spinal cord of mice inflamed with Complete Freund's Adjuvant (described below), spinal cord slices were incubated 40 min either in aCSF or in TAFA4 before recordings.

To inactivate the microglial cells spinal cord slices were preincubated 1h30 in 100μM of minocycline before recordings and then superfused with 20μM of minocycline during recordings.

Liquid junction potentials are not corrected for.

Data analysis

EPSCs and IPSCs were detected and analyzed using Spike 2 (Cambridge Electronic Design Limited). Synaptic events whose amplitude exceeds 3 times the standard deviation of the background noise were extracted during 3 minutes by Spike 2 and visually checked. The amplitude and period of each synaptic event were measured. All data are presented as mean ± S.E.M. n represents the number of recorded cell. For each cell variation of amplitude and frequency were compared using Kolmogorov-Smirnov test (KS-Test). Others statistical analysis used one-way ANOVA, Student's paired and unpaired T test and P<0.05 was considered statistically different. Tests were run using PRISM 5.0 (Graph Pad).

Drugs

TAF4A was purchased from R&D systems. Bicuculline, CGP, DL-AP5, CNQX, tetrodotoxin and phaclofen were purchased from Tocris Bioscience (Ellesville, MO). All salt, Strychnine and minocycline were purchased from Sigma-Aldrich (St.Louis, MO).

Electronic microscopy

Tissue preparation for ultrastructural morphology

Mice were deeply anaesthetized with sodium pentobarbital (60mg/100g) and perfused with Ringer solution followed by 4% paraformaldehyde + 0.5% glutaraldehyde in 0.1 M phosphate buffer, pH 7.4. Lumbar spinal cord segments were dissected out and postfixed for 2 h in the same aldehyde mixture. Coronal sections were cut on a vibratome (VT1000 S, Leica Microsystems) at a thickness of 100 μ m.

In order to preserve GFP antigenicity and perform post-embedding immunogold labeling, LR White acrylic resin was used (Luby-Phelps et al., 2003). Sections were postfixed in osmium ferrocyanide (1 volume of 2% aqueous osmium tetroxide : 1 volume of 3% potassium ferrocyanide) for 1 h at 4°C and dehydrated in 50% ethanol (1x15 min) and 70% ethanol (2x30 min). Sections were then incubated for 1 h at room temperature in 2:1 resin (LR White resin + benzoyl peroxide; Sigma)/70% ethanol and in 100% resin (1x10 min, 1x30 min, 1x overnight). Finally, sections were embedded in resin/accelerator (0.2%) in capped 00 BEEM capsules (Electron Microscopy Sciences) at room temperature for 24 h. Ultrathin sections were cut with an ultramicrotome (EM UC6, Leica) and collected on uncoated nickel grids (200 mesh).

Post-Embedding Immunostaining protocol

Sections were single, double and/or triple stained following a conventional post-embedding protocol (Merighi and Polak, 1993). Specifically, sections were treated for 3 min with a saturated aqueous solution of sodium metaperiodate, rinsed in 1% Triton X-100 in Tris buffered saline (TBS) 0.5 M, and then incubated for 1 h in 10% normal serum. Grids were then incubated overnight on drops of a mixture of primary antibodies at optimal dilutions. After rinsing in TBS, they were incubated in a mixture of the appropriate gold conjugates

(1:15; BBI Solutions, Cardiff, United Kingdom). They were then transferred into drops of 2.5% glutaraldehyde in cacodylate buffer 0.05 M pH 7.4, and finally washed in distilled water. Sections were further counterstained with lead citrate for 10 minutes before observation with a JEM-1010 transmission electron microscope (Jeol, Tokyo, Japan) equipped with a side-mounted CCD camera (Mega View III, Olympus Soft Imaging System, Brandeburg, Germany).

The following primary antibodies were used: chicken anti-GFP (1:20, Aves Labs, Cat# GFP-1020 RRID:AB_10000240); rabbit anti-VGLUT3 (1:20, Abcam, Cat# ab23977 RRID:AB_2270290), mouse anti-GABA (1:100; Sigma, Cat# A0310 RRID:AB_476667). Lectin from *Bandeiraea simplicifolia* (*Griffonia simplicifolia*), biotin conjugated (IB4; 1:20; Sigma) was also used. Routine immunohistochemical controls consisted in omission of primary antibodies.

Quantification and statistical analysis

To assess the type and number of synaptic contacts between GFP-immunopositive afferents and GABA-immunolabeled neuronal profiles engaged in the glomerular configuration, quantification of immunoreactive (IR) profiles was directly performed under the electron microscope. 30 randomly selected ultrathin sections, obtained from adult male TFAFA4^{Venus} heterozygous (+/-) mice (n=3), were subjected to analysis. Ultrathin sections had a preservation of the morphology allowing a non-ambiguous recognition of the neuronal profiles. The density of gold particles over endothelial cells was chosen as index of background staining and subtracted from values obtained for the other neuronal profiles considered. A total of 150 IR-profiles were subjected to analysis.

Complete Freund's Adjuvant (CFA) injection

10µl of Complete Freund's Adjuvant (Sigma-Adrich) was injected into the mouse right hindpaw using a 27 Gauge needle connected to an Hamilton syringe.

***In vivo* electrophysiological recordings.**

After a 7-day habituation period in the animal facility, mice were deeply anaesthetized with isoflurane 2.5% (vol/vol) through a mask mounted on a stereotaxic frame. T13 and L1 vertebrae were fixed with bars, laminectomized and dura matter was removed. A recording electrode was placed on the right side, close to the central vessel. Neurons located in superficial laminae were recorded while stimulating with Von Frey hair filaments (Bioseb instruments) the right hindpaw of mice. Once a neuron activated by a mechanical stimulus was identified, a glass electrode filled either with TAFA4 (N=5), aCSF (N=5), bicuculline+CGP (N=5) or TAFA4+bicuculline+CGP (N=5) was inserted on the opposite left side close to the central vessel. Von Frey hair filaments of different bending forces (0.07, 0.16, 0.4, 0.6, 1, 1.4, 2, 4, 8, 10, 15 g) were applied three consecutive times on the plantar surface region of the right hindpaw with an interval of 1 second. Then, 100 nL of the pipette solution (TAFA4 (20nM)/aCSF) were manually injected (2 min) using an air pressure system and mechanical stimulations were applied 10 min after injection and then every 10 min. Thus, one measurement was analyzed every 10 min before injection (-10 and -5) and 0, 10, 20, 30, 40, 50 and 60 min after injection. The mean frequency of Action potentials (APs) evoked by mechanical stimulation was measured for each stimulation. The analysis was done on Spike 2 software (Cambridge Electronic Design). The 2 values before injection were averaged and values at time -5, 0, 10, 20, 30, 40, 50 and 60 min were expressed as percentage of the average before injection values. To compare data two-way ANOVA test was used followed by a Newman-Keuls post-hoc test and $p < 0.05$ was considered statistically different. Test was run using Sigma Plot.

Behavioral essays

Mechanical allodynia and hyperalgesia were assessed before and after injection using the Von Frey hair filaments of seven different bending forces (0.07, 0.16, 0.4, 0.6, 1, 1.4, 2 g) using “up and down method” described by Chaplan et al., 1994 starting with Von Frey

filament 1g. Briefly, the strength of the filament was decreased or increased following a negative or positive response respectively. A positive response was counted as withdrawal during or immediately following the stimulus. The up-down procedure was applied 4 times following the first change in response.

Data are presented as paw withdrawal threshold (PWT) for each group \pm SEM and were compared using T test and $p < 0.05$ was considered as statistically different.

Intrathecal injection of human recombinant TFAA4, CGP and phaclofen

Intrathecal injection of 10 μ l of TFAA4 (200 μ g/ml), vehicle (PBS), bicuculline (10 μ g/ml) + phaclofen (1.1 μ g/ml), bicuculline+phaclofen+TFAA4 was done 1 h before Von Frey test or perfusion. Mice were maintained with one hand by the pelvic girdle and a 27-gauge needle connected to a 10 μ l Hamilton syringe was inserted in subarachnoidal space between vertebrae L5 and L6.

Tissue sections and immunofluorescence

Mice were anesthetized with pentobarbital (60 mg/kg) and then perfused transcardially with 0.9% saline solution followed by 4% paraformaldehyde in Phosphate Buffer Saline (PBS)-cold. Spinal cord was excised, post fixed in ice during 1h, washed 1h in PBS and immersed in a cryoprotection solution (30% sucrose, 0.05% sodium azide, PBS) during at least 24h. Spinal cord were then frozen in O.C.T embedding compound and stored at -80°C. Tissues were sectioned (30 μ m) using a cryostat (Microm HM 560). Slices were then fixed on Superfrost slides.

For immunofluorescence, primary antibodies were diluted in PBS, 4% horse or goat serum (Sigma-Aldrich), 0.3% Triton X-100 and incubated overnight at 4°C. Primary antibody concentrations and references are rabbit anti-ionized calcium binding adapter molecule-1 (Iba 1) 1:1000 (Wako), chicken anti-NeuN 1:500 (Merck Millipore), mouse anti-gephyrin 1:500 (Synaptic System), and rabbit anti-homer 1:500 (Synaptic System). Corresponding

donkey or goat anti-chicken anti-mouse and anti-rabbit coupled to Alexa 488, 568 (Thermo Fisher Scientific and Molecular Probes) were used for secondary detection. Slices were coverslipped with Dako fluorescent mounting medium (Agilent technologies) and visualized under a Leice SPE confocal microscope (Objectives x20, x63 oil immersion). Quantitative assessment of Iba-1 immunostaining in spinal cord sections was performed by measuring the surface occupied by microglial cell on spinal cord slices (N=3 per condition, 5 slices from each animal) with Image J software. The surface is then expressed as the mean percentage of the surface labelled with Iba-1 on a spinal cord slice. The percentage of the number of Gephyrin spots, a specific marker of inhibitory synapses, colocalised with the surface occupied by Iba 1 labelling, was calculated by dividing the number of colocalised spots by the total number of Gephyrin spots on the confocal acquisition (N=3, 5 slices per conditions). The percentage of neuronal soma covered by inhibitory or excitatory synapses (N=3, 5 slices per conditions, 21 somata per slice) was calculated by dividing the surface occupied by Gephyrin, or Homer, a specific marker of excitatory synapses by the neuronal soma surface with Imaris software (Bitplane). Acquisitions and analysis were performed blind to experimental condition. To compare data one way ANOVA test and T test were used and $p < 0.05$ was considered statistically different.

Discussion

De récentes études ont mis en avant le rôle des fibres C-LTMRs dans la modulation de la transmission des informations nociceptives en condition pathologique (Delfini et al., 2013; Seal et al., 2009). Néanmoins les cibles neuronales de ces fibres restent cependant méconnues. L'objectif de ce projet était de déterminer si la mise en jeu des fibres C-LTMRs entraînaient une altération des réseaux des interneurons de la lamina Ili de la moelle épinière. Pour étudier cette hypothèse nous avons utilisé en parallèle une approche optogénétique ainsi qu'une approche pharmacologique.

APPROCHE OPTOGENETIQUE

APPROCHE VIRALE

Afin d'étudier plus précisément l'effet de la stimulation des fibres C-LTMRs sur les interneurons de la lamina Ili nous avons élaboré une stratégie de stimulation spécifique, basée sur la stimulation optogénétique des C-LTMRs. Nous avons validé les outils viraux permettant d'exprimer le transgène ChRh2-venus dans les neurones des DRG et leurs projections au niveau spinal. Le protocole établi permet d'obtenir un marquage des neurones au sein des DRG pour les trois sérotypes AAV2/1, 2/5, et 2/9. Cependant le tropisme diffère en fonction des sérotypes ; l'AAV2/5 semble infecter majoritairement les cellules de taille moyenne ce qui ne correspond pas aux C-LTMRs dont le diamètre est faible. Les sérotypes AAV2/1 et 2/9 infectent quant à eux les cellules de petit diamètre et pourraient être de bons candidats pour l'infection des fibres C. Le nombre de cellules infectées au sein des DRG pour les trois sérotypes est plus faible que celui espéré puisque dans la littérature le taux d'infection se rapproche de 30% si on considère le sérotype AAV2/1 (Mason et al., 2010). De même, l'injection du sérotype AAV2/6 a été décrite comme permettant l'infection de 60% des cellules des DRG et semble infecter de façon spécifique des fibres projetant dans la lamina II_i (Towne et al., 2009). Cependant, au cours d'expériences menées avec l'AAV2/6, il ne nous a pas été possible d'atteindre un nombre satisfaisant de neurones dans les DRG. Nos résultats indiquent que quel que soit le sérotype viral testé injecté par voie intrathécale, le taux d'infection observé dans les DRG n'a pas atteint 20% contrairement aux résultats de la littérature. Dans le but d'augmenter le taux d'infection dans les DRG nous avons comparé 2 voies d'administration autres que l'injection intrathécale. Tout d'abord suite à une injection intra sciatique nos résultats indiquent des taux de transfection des DRG inférieurs à 10%. De façon surprenante ce taux est bien plus faible que celui décrit dans une précédente étude. En effet dans l'étude de Towne et al., l'injection intra sciatique permet une transfection de 30% des neurones des DRG (Towne et al., 2009). Nous avons ensuite testé l'injection intra DRG qui permet d'injecter spécifiquement dans certains DRG et d'obtenir un nombre de cellules infectées plus important qu'avec les autres voies d'administration (Mason et al.,

2010). Avec cette technique nous obtenons un taux d'infection équivalent à celui obtenu avec l'injection intrathécale.

VALIDATION DU MODELE GENETIQUE

En parallèle nous avons caractérisé la souris TH Cre dans le but de déterminer si l'expression de la Cre recombinase se faisait dans les cellules TH+. Nous avons donc croisé cette souche de souris avec une souche souris reportrice. Ce croisement nous a tout d'abord permis de constater que contrairement à des structures cérébrales comme le noyau olfactif antérieur l'expression de la TH n'est pas transitoire durant les stades post natal du développement dans les DRG (Nagatsu et al., 1990). En effet, notre étude dans les DRG montrent que le nombre de cellules TH augmente jusqu'à se stabiliser à partir de P21. Néanmoins le nombre de cellules recombinées est très faible et les diamètres de ces cellules sont assez variés laissant supposés que la recombinaison de la Cre recombinase ne se déroule pas dans une population cellulaire spécifique. Bien que cette souris TH-Cre ait été décrite comme permettant l'expression de la Cre recombinase uniquement au sein des structures exprimant la TH, une activité Cre a été détectée dans des structures qui ne sont pas connues pour exprimer la TH comme le noyau septal latéral, le bulbe olfactif accessoire et le thalamus parafasciculaire (Savitt et al., 2005). Ce résultat tout d'abord interprété comme une activité du promoteur à la TH dans les cellules précurseurs peut également avoir pour origine une expression ectopique du promoteur exogène de la TH. De plus, la recombinaison induite par la Cre recombinase n'est pas observée dans toutes les cellules TH+ (Savitt et al., 2005). Cette expression pourrait être due à l'absence des séquences régulatrices du promoteur à la TH et au fait que le promoteur soit un promoteur de rat et non de souris. C'est pourquoi nous avons décidé d'utiliser une approche par croisement entre une souris TH-CreER et une souris COP4.

APPROCHE PAR CROISEMENT

La souris TH-CreER est une souris knock-in donc contrairement à la souris TH-Cre précédemment utilisée, le promoteur de la TH est endogène. La souris TH-CreER possède l'avantage de permettre un contrôle pharmacologique de la recombinaison induite par la Cre recombinase, puisque la Cre est fusionnée à un récepteur aux œstrogènes muté qui à la place de lié les estrogènes lie le 4-hydroxytamoxifène (4HT, Badea et al., 2009). La protéine fusionnée CreER est séquestrée dans le cytosol jusqu'à l'injection de 4HT. Cette approche permet d'induire l'expression de la Cre recombinase au stade post natal durant lequel le nombre de cellules TH se stabilise afin de favoriser une recombinaison spécifiquement dans les C-LTMRs. Ce croisement de modèles murins avaient dans une précédente étude permis d'obtenir un marquage des fibres TH+ dans la lamina II₁ et des

corps cellulaires dans les DRG. Ces résultats sont en accord avec la distribution de l'enzyme dans la moelle épinière puisque la TH se retrouve dans les fibres et non dans le corps cellulaires des neurones (Brumovsky et al., 2006). Ces fibres TH correspondent également avec les fibres qui innervent les follicules pileux de la peau poilue confirmant le fait que la recombinaison induite par la Cre recombinase s'effectue dans les fibres C-LTMRs. Cependant dans nos expériences les révélations immunohistochimiques de la TH et la ChR2-EYFP effectués dans les DRG indiquent que les cellules recombinées n'expriment pas la TH. De plus, l'amplification de la GFP dans la moelle épinière révèle l'expression de la ChR2 dans les corps cellulaires dans les laminae superficielles et dans des neurones proches du canal épendymaire et donc hors des C-LTMRs. Il est à noter que la présence des cellules TH+ dans la corne dorsale de la moelle épinière a été mentionnée chez d'autres vertébrés, notamment chez le poulet (Wallace et al., 1996). De plus, l'expression de la ChR2 semble être spécifique à une population cellulaire puisque la répartition de l'expression de la TH est obtenu quel que soit la dose de tamoxifène injectée ou la voie d'administration et l'expression de la ChR2 est bien dépendante de l'injection du tamoxifène (les souris contrôles auxquelles nous n'avons pas injecté de Tamoxifène ne présentent pas de recombinaison). Il serait maintenant intéressant de caractériser cette population d'un point de vue neurochimique afin de déterminer si l'ensemble des cellules de cette population présente un même profil neurochimique, et de caractériser le rôle de ces cellules dans la perception et le traitement des informations douloureuses.

Ces expériences ne nous ayant pas permis d'avoir une recombinaison spécifique dans les C-LTMRs, nous avons étudié le rôle des C-LTMRs dans la modulation de la transmission des informations douloureuses par l'intermédiaire d'une approche pharmacologique en utilisant le marqueur spécifique des C-LTMRs : TFAFA4. Les résultats de notre étude montrent une augmentation de l'activité synaptique inhibitrice induite par l'application exogène de TFAFA4 qui provoque en conséquence une diminution de l'activité synaptique excitatrice passe par un changement de la balance excitation/inhibition vers un renforcement de la transmission GABAergique. De plus, l'effet de TFAFA4 sur la transmission synaptique serait indirect et passerait par la diminution de l'activation microgliale ainsi que par l'augmentation du nombre de synapses inhibitrices sur les somas neuronaux permettant en condition inflammatoire de restaurer la transmission inhibitrice au sein de la lamina II de la moelle épinière.

ACTION DE TAF4 SUR LES PROPRIETES INTRINSEQUES DES NEURONES

Nos enregistrements électrophysiologiques réalisés sur les interneurons de la lamina II indiquent que l'application de TAF4 n'a pas d'influence significative sur la résistance cellulaire (**Figure 28**).

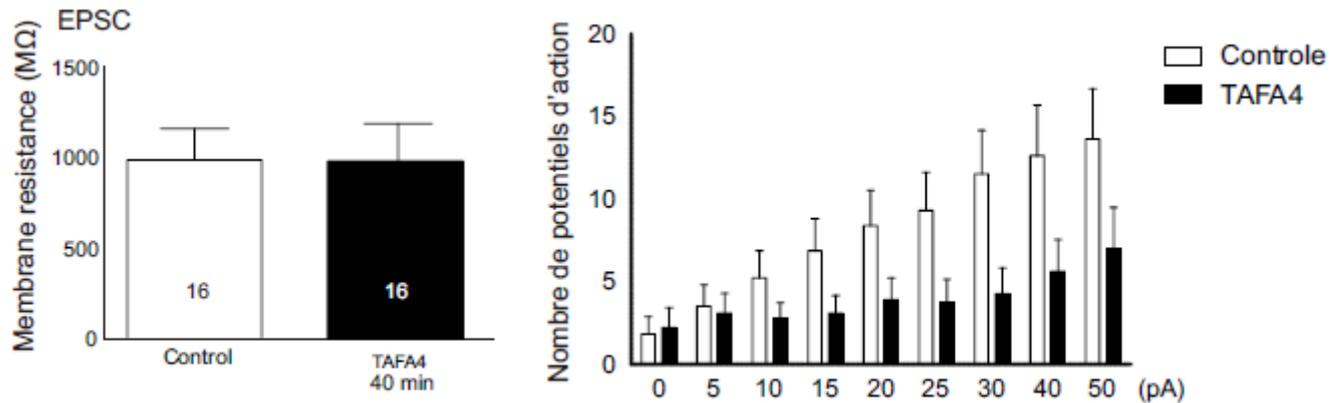


Figure 28: Effet de tafa4 sur la résistance et l'excitabilité cellulaire des neurones de la lamina II.

A. Résistance cellulaire moyenne des neurones en condition contrôle et en présence de TAF4.

B. Nombre de potentiels d'action émis par les neurones en réponse à l'injection de courant dépolarisant en condition contrôle et sous TAF4.

Néanmoins, l'application de TAF4 a un effet sur le nombre de potentiels d'action émis par les neurones en réponse à l'injection de créneaux (2s) de courant d'intensité croissante (de 0 à 50pA, **Figure 28**). En effet, en comparaison avec la condition contrôle, l'application exogène de TAF4 provoque une diminution du nombre de potentiel d'action émis par les interneurons enregistrés. Ces enregistrements n'ayant pas été réalisés sur des neurones isolés synaptiquement, il est néanmoins difficile de conclure quant à l'origine de cette diminution d'excitabilité. En effet, on peut tout à fait envisager que cette diminution soit une conséquence directe de l'augmentation des IPSCs notamment via une activation des récepteurs GABA_B et de leur couplage aux canaux potassiques (Laffray et al., 2012). Une autre hypothèse est que le TAF4 module, directement ou via la microglie, les propriétés intrinsèques des neurones de la lamina II. Ces résultats sont en accord avec les résultats précédemment publiés montrant que les cellules enregistrées dans la moelle épinière de souris déficientes pour TAF4 étaient plus excitables que les interneurons des souris naïves (Delfini et al., 2013). Dans cette même étude, la différence d'excitabilité neuronale entre les souris TAF4^{-/-} et les souris contrôles, s'explique par l'absence d'un courant potassique de pharmacologie IA chez les souris TAF4^{-/-}. De façon intéressante, l'application de TAF4 permet de restaurer ce courant chez les souris TAF4^{-/-}. Il serait ici intéressant de vérifier si l'activation de ce courant se retrouve chez les souris sauvages, et si cette activation est préservée chez des animaux douloureux (modèle

inflammatoire ou neuropathique). Une autre piste à étudier serait de vérifier si la modification d'excitabilité des neurones (et éventuellement le courant de type IA) dépendent eux aussi d'un intermédiaire microglial. En effet, la microglie activée libère de nombreuses substances qui peuvent fortement moduler les propriétés intrinsèques des neurones spinaux ou des DRG, que ce soit par exemple par l'intermédiaire d'une régulation des conductances chlorures (Ferrini and De Koninck, 2013) ou potassiques (Stenkowski et al., 2015; Takeda et al., 2008).

ABSENCE D'EFFET DU TFAFA4 CHEZ LES ANIMAUX NAÏFS *IN VIVO*

Nos résultats indiquent un effet de TFAFA4 sur la transmission synaptique dans la moelle épinière des souris naïves alors qu'aucun effet n'est observé lors des enregistrements de l'activité neuronale *in vivo*. Plusieurs hypothèses permettent de rendre compte de ces effets contradictoires. D'une part, on peut envisager que les effets de TFAFA4 sur la transmission synaptique soient présents *in vivo* chez des animaux naïfs, mais que la modulation de l'activité synaptique n'impacte pas la décharge des neurones *in vivo* chez ces mêmes animaux. Ce résultat peut également s'expliquer par le fait que les cellules microgliales peuvent s'activer suite au protocole permettant d'obtenir des tranches aiguës de tissus. En effet, en condition de lésion tissulaire il y a une augmentation de la libération d'ATP provenant notamment des astrocytes en réponse à cette lésion (Abbracchio et al., 2009; Wang et al., 2004). Or, des études ont montré que le chimiotactisme des processus microgliaux est augmenté en présence d'ATP (Haynes et al., 2006; Koizumi et al., 2013). Lorsque nous utilisons le vibratome pour effectuer des tranches aiguës de moelle épinière nous sommes donc susceptibles d'activer les cellules microgliales qui pourront libérer des cytokines pouvant moduler la transmission synaptique (Galic et al., 2012; Kettenmann et al., 2011). Cette réaction des cellules gliales est visible dès 90 minutes après la préparation des tranches en suivant une procédure de préparation standard. Néanmoins les mesures électrophysiologiques des neurones ne sont pas nécessairement impactées par cette activation gliale, indiquant que les neurones supportent mieux la procédure de coupes que les cellules gliales (Takano et al., 2014). Ces éléments sont susceptibles d'expliquer le fait que l'effet de TFAFA4 est observé suite aux enregistrements électrophysiologiques *in vitro* puisque les cellules microgliales sont dans un état d'activation qui pourrait s'apparenter à celui observé lorsque les animaux sont injectés avec du CFA. Les enregistrements *in vivo* de la moelle épinière n'impliquent pas de mettre en place un protocole provoquant une lésion tissulaire ce qui expliquerait pourquoi l'effet de TFAFA4 n'est pas observé dans une condition non inflammatoire. A l'appui de ces hypothèses, on notera que les effets du TFAFA4 *in vitro* chez les animaux inflammés sont supprimés en présence d'inhibiteurs microgliaux.

Il devrait être possible de confirmer cette hypothèse en empêchant l'activation de la microglie lors de la réalisation des tranches aigües chez les animaux naïfs, par exemple en travaillant en présence de minocycline durant toute la durée de la préparation des tranches.

ACTION DE TAF4 SUR LES INTERNEURONES GABAÉRIQUES

Dans une étude de Lu et Perl (2003), les auteurs démontrent qu'une partie des fibres C projettent sur les interneurones islet et donc des interneurones GABAérgiques. Les auteurs émettent l'hypothèse que les fibres C-LTMRs pourraient avoir des contacts synaptiques directs avec ces cellules inhibitrices et en les activant provoqueraient une inhibition de la transmission des informations nociceptives véhiculées par les afférences primaires. Sans en apporter de preuves directes morphologiques, le modèle neuronal théorique défini par les auteurs apporte les premiers éléments permettant une première description des cibles neuronales des fibres C-LTMRs. Nos expériences démontrent que l'effet de TAF4 sur l'activité synaptique passe par une modulation de la transmission inhibitrice et plus particulièrement par la transmission GABAérgique. Ce résultat est renforcé par les expériences de microscopie électronique montrant un contact synaptique direct entre les fibres C-LTMRs et les neurones GABAérgiques. Ces données indiquent que le premier relais des informations transmises par les C-LTMRs seraient les interneurones GABAérgiques localisés dans la lamina II_i de la moelle épinière. Sur la base de ces résultats, on pourrait postuler que le TAF4 agit différemment sur les neurones excitateurs et les neurones inhibiteurs.

Dans le but de corréler les enregistrements électrophysiologiques obtenus avec le phénotype de neurotransmetteur des neurones enregistrés, nous avons tenté de marquer ces neurones à la biocytine et réaliser une immunohistochimie contre la GAD 65/67 qui est l'enzyme permettant la synthèse du GABA. Les résultats obtenus n'ont pas permis d'identifier les phénotypes de neurotransmetteur des neurones enregistrés. La lamina II_i comptant environ 30% des cellules GABAérgiques (Yasaka et al., 2010b), il est probable que l'anticorps utilisé ne marque que les dendrites et non les somas des neurones. De plus, l'étude morphologique est rendue difficile du fait que les enregistrements ont été réalisés sur des coupes transversales. Or dans moelle épinière les interneurones de la lamina II sont majoritairement orientés dans le sens rostro-caudal. Leur morphologie est donc mieux préservée sur des coupes parasagittales. De la même façon, nous avons cherché à mettre en évidence des effets différentiels de TAF4 en fonction du pattern de décharge des neurones enregistrés. En classant les cellules selon leur type de décharge (tonique ou phasique), nous avons ainsi pu comparer l'effet de TAF4 en fonction du pattern de décharge. Les résultats que nous avons obtenus ne permettent pas de révéler de différence significative concernant l'effet de TAF4 sur l'activité synaptique en fonction des patterns de décharge. Ces résultats sont en

adéquation avec l'étude montrant que TFAFA4 agit de façon similaire sur les cellules exprimant ou non la GAD 65/67 dans la lamina II de la moelle épinière des souris TFAFA4^{-/-} (Delfini et al., 2013).

Tous ces résultats indiquent donc que TFAFA4 ne semble pas avoir une action sur une population d'interneurones spécifique bien que les fibres C-LTMRs contactent directement des interneurones GABAergiques. Il est toutefois possible que le fonctionnement *in vivo* du système diffère de celui présenté ici. En effet, au cours de nos expériences, le TFAFA4 a été appliqué globalement. Si le TFAFA4 semble agir indifféremment sur toutes les populations neuronales de la moelle, il est toutefois possible que sa libération par les C-LTMRs soit beaucoup plus restreinte spatialement, limitant les effets de TFAFA4 à certaines catégories de neurones.

MODIFICATION DES CONNEXIONS ENTRE LES FIBRES A BAS SEUIL ET LES INTERNEURONES INDUITE PAR TFAFA4

Les études de Duan et al. (2014) et Lu et al. (2013), ont démontré qu'en condition pathologique les fibres A β sont capables d'activer les circuits transmettant les informations nociceptives dans la corne dorsale de la moelle épinière, et sont ainsi impliquées dans l'induction d'une hypersensibilité mécanique. Il a de plus été observé, grâce à des enregistrements *in vitro* des neurones de la corne dorsale de la moelle épinière, une augmentation du nombre d'interneurones répondant à une stimulation des fibres A β chez des animaux injectés avec du CFA en comparaison avec les animaux contrôles (Baba et al., 1999). A partir de ces éléments nous avons émis l'hypothèse qu'en renforçant la transmission inhibitrice au sein de la moelle épinière, TFAFA4 pourrait diminuer le nombre de neurones répondant à la stimulation des fibres A β et donc diminuer l'activation des réseaux nociceptifs par les mécanorécepteurs. Nous avons utilisé un protocole de stimulation des fibres A β similaire à celui de l'étude de Baba et al, (1999), et nous avons enregistré les réponses synaptiques des interneurones de la lamina II. Nos résultats n'indiquent aucune différence significative de l'occurrence des réponses synaptiques des neurones suite à une stimulation des fibres A β , en comparant les souris injectées avec du CFA en présence ou non de TFAFA4 (**Figure 29**).

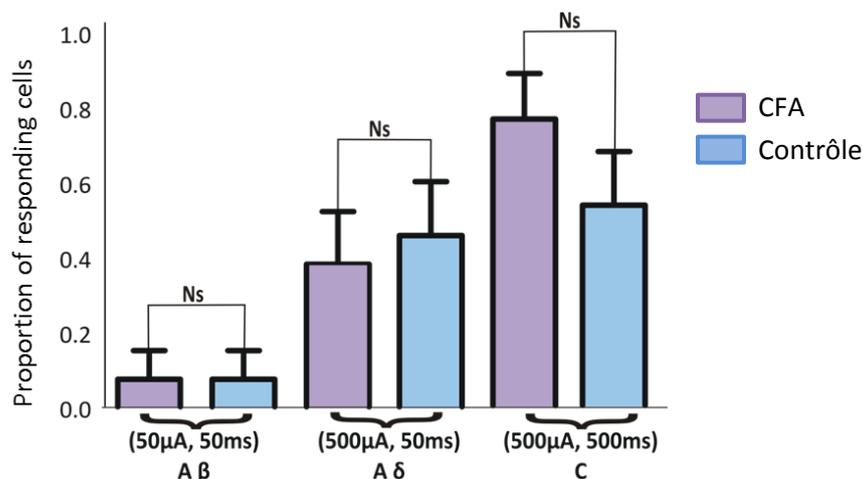


Figure 29: Occurrence des réponses synaptiques aux stimulations des fibres Aβ, Aδ et C.

La proportion d'interneurones enregistrés dans la lamina II répondant à la stimulation des différentes classes d'afférences primaires ne diffèrent pas entre la condition contrôle et en présence de TFAFA4.

Cependant, à la différence de l'étude de Baba et al., (1999), nos résultats indiquent qu'en condition contrôle (CFA) nous n'obtenons pas un nombre de cellules répondant à la stimulation des fibres Aβ aussi important. De fait, si le TFAFA4 a un effet sur la proportion de cellules répondant à la stimulation des fibres Aβ, il est difficile de le détecter. De même le nombre total de neurones enregistrés par Baba et al., est beaucoup plus important (n=57) que le nombre de cellules que nous avons nous même enregistré (n=15). Il serait donc intéressant d'augmenter le nombre d'enregistrements électrophysiologiques et de peut-être adapter notre protocole de stimulation à notre modèle puisque nous travaillons sur des tranches de moelle épinière de souris et non de rat. Nous pourrions également tenter d'obtenir des tranches de moelle épinière avec des racines dorsales plus longues permettant de mieux préserver les afférences que nous stimulons.

ACTION DIFFERENTIELLE DE TFAFA4 SUR LES CELLULES MICROGLIALES ET LES MACROPHAGES

Nos expériences indiquent que TFAFA4 agit sur les cellules microgliales en entraînant une rétraction des processus microgliaux et donc une diminution de l'activation microgliale. Ce résultat peut apparaître surprenant car dans l'étude de Wang et al., TFAFA4 entraîne une augmentation de la mobilité des macrophages (qu'ils proviennent d'une lignée cellulaire humaine ou murine) ainsi que l'augmentation des phénomènes de phagocytose en se fixant sur le récepteur FPR1 (Formyl peptide receptor 1, Wang et al., 2015). Néanmoins plusieurs études ont apporté les preuves des différences de signature génétique et transcriptomiques entre les cellules microgliales et les macrophages. Ces différences sont observées aussi bien en condition physiologique qu'en condition pathologique, et confèrent aux macrophages et aux cellules microgliales des fonctions pouvant être différentes

(Butovsky et al., 2014; Gosselin et al., 2014; Lavin et al., 2014). En effet, en cas de sénescence les macrophages sécrètent moins de cytokines pro inflammatoires, et leurs capacités de phagocytose, prolifération ainsi que de chemotaxisme diminuent (Shaw et al., 2013). A l'inverse, les cellules microgliales vont augmenter leur sécrétion de cytokines pro inflammatoires ainsi que leur capacité de prolifération (Perry and Holmes, 2014). Cependant leur mobilité ainsi que leur capacité de phagocytose diminuent (Njie et al., 2012). Ces études apportent des éléments de réponses pouvant expliquer pourquoi TFAA4 provoque des effets pro ou anti inflammatoires suivant qu'il agisse sur les macrophages (Wang et al., 2015) ou les cellules microgliales (Kambrun et al.). Enfin rien ne nous permet d'affirmer que les effets observés de TFAA4 passent bien par le FPR1, et on peut tout à fait envisager qu'un autre récepteur activant d'autres voies de transduction soit mis en jeu dans le cadre de nos expériences.

De plus, l'étude de Wang et al. (2015) indique que l'activation des lignées cellulaires de macrophages par du lipopolysaccharide (LPS) provoque une sécrétion de TFAA4 provenant des macrophages. Nous avons utilisé des souris déficientes pour TFAA4, dans lesquelles la séquence codante du gène TFAA4 est remplacée par la séquence codante de la Green Fluorescent Protein (GFP). Chez ces souris, des marquages immunohistologiques n'ont pas permis de mettre en évidence une expression du marqueur GFP au niveau de la microglie, indiquant que la microglie n'exprime pas TFAA4 chez les animaux naïfs (non montré). Ces éléments renforcent notre hypothèse selon laquelle l'effet de TFAA4 serait différentiel en fonction du type cellulaire sur lequel il agit.

INTERACTION DES CELLULES MICROGLIALES PREFERENTIELLEMENT AVEC LA TRANSMISSION INHIBITRICE

De nombreuses études ont démontré la modulation de la transmission synaptique glutamatergique par les facteurs microgliaux. Ainsi les cytokines libérées par les cellules microgliales provoquent une augmentation de la transmission excitatrice. A titre d'exemple le TNF α permet une augmentation du nombre de récepteur AMPA qui, en favorisant l'influx calcique dans les neurones, renforce la transmission glutamatergique en condition inflammatoire (Stellwagen and Malenka, 2006). De plus en plus d'études montrent que les facteurs microgliaux sont également capables d'interférer avec la transmission inhibitrice. En effet les interleukines IL-1 β et IL-6 provoquent une diminution de la fréquence des courants post synaptiques inhibiteurs spontanés ainsi que les courants GABAergiques et glycinergiques évoqués (Kawasaki et al., 2008). Nous avons donc émis l'hypothèse qu'en agissant par l'intermédiaire de la microglie, il pouvait également réguler la libération des médiateurs microgliaux. Nos résultats montrent une rétractation des processus microgliaux en réponse à une application exogène de TFAA4 et donc une diminution de l'activation

de la microglie et une possible diminution de la libération des interleukines. Pour répondre à cette question nous avons tenté de doser l'IL-1 β dans la moelle épinière par la méthode ELISA, en comparant la quantité d'IL1 β chez des souris contrôles et chez des souris injectées avec du CFA. Cependant, notre protocole n'a pas permis d'extraire une quantité suffisante d'IL-1 β à partir des moelles épinières des souris contrôles et CFA pour permettre l'étude de l'effet de TFAFA4 sur la libération de cette interleukine. Il serait intéressant d'utiliser une méthode plus sensible que le test ELISA telle que la cytométrie en flux, qui permettrait de plus de caractériser les effets de TFAFA4 sur la libération d'autres médiateurs microgliaux. Si les résultats de ces expériences indiquent une modification significative d'expression de ces médiateurs, nous pourrions ensuite effectuer des enregistrements électrophysiologiques en présence des antagonistes et donc aller plus loin dans l'étude de la cascade de signalisation activée par TFAFA4.

Conclusion générale et perspectives

La douleur est un signal permettant de protéger les individus des stimulations environnementales potentiellement dangereuses pour leur intégrité physique. En condition pathologique, la douleur peut devenir chronique et ainsi perdre toute valeur protectrice. Les douleurs chroniques touchent 20 à 25% de la population mondiale et restent encore difficiles à traiter. Il est donc important d'approfondir nos connaissances sur les mécanismes impliqués dans la transmission des informations nociceptives dans le but de trouver de nouvelles cibles thérapeutiques. Ces informations nociceptives sont transmises par les afférences primaires et intégrées dans la corne dorsale de la moelle épinière avec des informations sensorielles non nocives provenant de fibres spécialisées, et notamment les C-LTMRs.

Notre étude s'est donc concentrée sur l'identification des cibles neuronales des fibres C-LTMRs par l'intermédiaire de deux approches : optogénétique et pharmacologique. En démontrant que TFAFA4 renforce l'inhibition GABAergique et déplace l'équilibre excitation/inhibition vers davantage d'inhibition, nous avons apporté des éléments pouvant expliquer l'effet analgésique de TFAFA4. Nous avons également apporté des éléments montrant que l'effet de TFAFA4 sur les neurones est indirect et passe par la microglie. En effet, TFAFA4 provoque une diminution de l'activation microgliale corrélée avec une augmentation du nombre de synapses inhibitrices localisées sur les somas neuronaux. Ces résultats nous permettent de définir un réseau local pouvant être modulé par les cellules microgliales au sein duquel les interneurons GABAergiques sont les premiers relais de l'intégration des informations transmises par les C-LTMRs. Ce réseau permet une régulation fine de la transmission inhibitrice en condition inflammatoire.

Pour aller plus loin dans l'étude du rôle des C-LTMRs, il serait intéressant de définir si ces fibres jouent le même rôle chez les mâles et les femelles. En effet, chez l'Homme, il a été démontré que pour une même stimulation nociceptive, les femmes présentent des seuils de sensibilité plus bas et une moindre tolérance pour les stimuli nocifs en comparaison aux hommes (Berkley, 1997). De plus, les femmes sont également plus sujettes au développement de douleurs chroniques et présentent des douleurs post chirurgicales persistant plus longtemps en comparaison avec les sujets masculins (pour revue, voir Fillingim, 2000). De même, chez les rongeurs, en condition inflammatoire (CFA), il a été démontré que, pour une intensité de stimulation identique, les femelles développent une hypersensibilité accrue en comparaison avec les mâles (Kandasamy et al., 2016; Patil et al., 2013). Ces données indiquent que la perception de la douleur diffère en fonction du sexe des individus. De plus, les traitements proposés pour traiter la douleur ne présentent pas la même efficacité en fonction du sexe des sujets. Notamment, on observe à la fois chez l'Homme et chez les animaux des différences liées au genre dans l'efficacité des traitements opioïdes. Par exemple

l'analgésie induite par la morphine est plus importante chez les femmes que chez les hommes (Sarton et al., 2000).

Nos enregistrements électrophysiologiques *in vitro* indiquant une modulation de l'activité synaptique en présence de TFAFA4 ont été effectués sur des tranches de moelle épinière de souris mâles et femelles entre 17 et 30 jours post nataux. A ce stade, les animaux ne sont pas sexuellement matures, les hormones n'influent pas encore sur l'activité neuronale. Ces résultats ne sont donc pas suffisants pour conclure quant à un effet de TFAFA4 identique ou différent chez les mâles et les femelles. Dans notre étude, les expériences comportementales ainsi que les enregistrements électrophysiologiques *in vivo* ont été effectués avec des souris mâles et non des souris femelles. De même, les effets de TFAFA4 sur le comportement douloureux n'ont été caractérisés que chez des animaux mâles (Delfini et al., 2013). Il serait important de comparer les effets de TFAFA4 sur l'hypersensibilité mécanique chez les mâles et chez les femelles afin de déterminer si la réduction de l'hyperalgésie observée chez les animaux mâles est également observée chez les femelles, et si elle obéit aux mêmes mécanismes.

Les mécanismes d'action du TFAFA4 présentés dans ce manuscrit sont susceptibles de montrer une forte dépendance au genre des animaux. En effet, il a été montré que les cellules microgliales sont impliquées dans le développement de l'hypersensibilité mécanique uniquement chez les mâles. Chez les femelles les mécanismes sont différents et mettent en jeu les cellules du système immunitaire adaptatif qui sont les lymphocytes T périphériques (Sorge et al., 2015). L'effet du TFAFA4 passant notamment par la microglie, on peut émettre l'hypothèse que son effet sur le comportement douloureux dépendra du sexe de l'animal. Libéré au niveau central, il agirait chez les mâles sur la microglie selon le mécanisme décrit dans ce manuscrit. Libéré en périphérie (à l'instar de la substance P ou du CGRP qui montrent des libérations à la fois centrales et périphériques, Franco-Cereceda et al., 1987; Karanth et al., 1991), le TFAFA4 pourrait agir chez les femelles sur les macrophages (exprimant le récepteur FRP1, Wang et al., 2015) ou les lymphocytes T périphériques (impliquées dans le développement de l'hypersensibilité mécanique observée chez les femelles en condition pathologique, Sorge et al., 2015). Ces derniers peuvent en effet dans certaines conditions pathologiques exprimer le récepteur FRP1 (Suga et al., 1997). Ces cellules immunitaires agirait en retour sur les neurones sensoriels, altérant la transmission des informations douloureuses. En agissant sur les cellules du système immunitaire périphérique, le TFAFA4 entraînerait chez les femelles un niveau d'analgésie similaire à celui observé chez les mâles, bien que les mécanismes mis en jeu soient différents.

Un autre mécanisme pourrait intervenir dans une éventuelle différence liée au genre concernant les effets antinociceptifs de TFAFA4. En effet, des différences hormonales entre les sujets

masculins et féminins peuvent entraîner des différences dans la perception de la douleur. Ainsi, la perception de la douleur chez les femmes diffère en fonction de son cycle hormonal (Anderberg et al., 1998). Ceci peut s'expliquer par le fait que les œstrogènes sont capables de réguler l'activité neuronale dans la moelle épinière grâce à une production locale des œstrogènes et notamment le 17 β -œstradiol produit par l'enzyme aromatasase présente dans les neurones de la moelle épinière (Evrard and Balthazart, 2004; Vincent and Tracey, 2008). Au niveau périphérique, les œstrogènes peuvent moduler directement la réponse des fibres sensorielles à certains stimuli chimiques (Payrits et al., 2017; Rowan et al., 2010). De même, la sensibilisation des récepteurs TRPV1 par la prolactine est plus importante chez les femelles que chez les mâles, entraînant une hyperexcitabilité des neurones sensoriels chez ces dernières (Patil et al., 2013). En altérant l'excitabilité neuronale, les hormones sexuelles pourraient ainsi modifier la libération de TAF4A ou l'effet de TAF4A sur la transmission inhibitrice, minimisant ainsi le rôle des C-LTMRs dans la modulation de la transmission nociceptive chez les femelles.

Etant donné que ces fibres sont essentielles pour établir le lien entre la mère et ses petits, on pourrait alors émettre l'hypothèse que chez les femelles l'aspect émotionnel du toucher transmis par les fibres C-LTMRs soit plus important que chez les mâles au détriment de leur rôle dans la diminution de la perception douloureuse. Des expériences préliminaires menées en collaboration avec le groupe d'Aziz Moqrich indiquent que la modulation de la transmission douloureuse par les LTMRs (au sens large) pourrait être dépendante du sexe des animaux (Reynders et al., données non publiées). De façon surprenante, les études portant sur le rôle des C-LTMRs dans la transmission douloureuse n'ont-elles pas montré de différence entre hommes et femmes (Habig et al., 2017; Nagi et al., 2011). A l'inverse, plusieurs études ont démontré que les réponses évoquées par le recrutement des C-LTMRs pouvaient différer chez l'Homme et la femme. Ainsi, des études d'imagerie fonctionnelle par résonance magnétique ont montré chez l'Homme que les réponses corticales évoquées par un recrutement des fibres C-LTMR diffèrent entre hommes et femmes après la puberté (Björnsdotter et al., 2014). De même, le recrutement des C-LTMRs entraîne une satisfaction plus importante chez les femmes que chez les hommes (Jönsson et al., 2017), indiquant que la physiologie des réponses médiées par les C-LTMRs dépend du genre des individus.

Les C-LTMRs représentent une classe de neurones sensoriels jouant un rôle central dans la régulation des émotions. Ils interviennent dans des fonctions aussi variées que la régulation de la douleur, l'attachement maternel, le développement du lien social. Si certains aspects de leur physiologie commencent à être bien connus, de nombreux points restent à éclaircir pour mieux appréhender le rôle et les multiples fonctions de cette population de neurones sensoriels énigmatiques.

Annexe

I. PRESENTATION DU PROJET GINIP

En parallèle du projet principal de ma thèse visant à étudier le rôle des C-LTMRs et de la chemokine de TFAA4, marqueur spécifique des C-LTMRs, sur la transmission des informations sensori-nociceptives dans les réseaux neuronaux de la corne dorsale de la moelle épinière, nous avons également eu l'opportunité de collaborer avec l'équipe d'Aziz Moqrich sur deux autres études permettant d'approfondir l'étude du rôle des mécanorécepteurs à bas seuil dans la modulation de la transmission des informations nociceptives.

La première étude (Gaillard et al., 2014) a permis d'identifier le marqueur moléculaire la Galpha INteracting Inhibitory protein (GINIP) et d'identifier son rôle dans l'inhibition presynaptique GABAergique qui pèse sur les afférences primaires à bas seuil.

En condition neuropathique que ce soit dans un modèle de lésions ou de constriction du nerf sciatique, l'étude de Moore et al. (2002) a démontré une réduction de la transmission GABAergique (Moore et al., 2002). De plus, il a été également démontré que l'agoniste du récepteur GABA_B, le baclofène, réduit l'amplitude des courants post synaptiques excitateurs enregistrés dans la lamina II, évoqués par les stimulations des fibres A δ et C. Le baclofène inhibe la libération de L-glutamate par les afférences primaires par l'intermédiaire de l'activation du récepteur GABA_B localisés sur les fibres A δ et C. Les résultats de cette étude indiquent également que l'effet du baclofène est plus important sur les fibres C que sur les fibres A δ (Ataka et al., 2000). L'inhibition GABAergique étant altérée en conditions pathologiques, l'étude vise à explorer les mécanismes possibles de la perte de l'inhibition GABAergique au niveau d'une sous population d'afférences primaires.

Cette étude a permis d'identifier la protéine GINIP et de caractériser son expression dans deux sous classes de fibres sensorielles non peptidergiques: les fibres cutanées exprimant MRGPRD, ainsi que les fibres C-LTMRs. Cette protéine interagit avec la forme active de la sous unité inhibitrice des protéines G hétérotrimériques G α . Afin d'étudier la fonction de la protéine GINIP l'équipe d'Aziz Moqrich a généré une souris déficiente pour cette protéine. Dans ce modèle, en condition pathologique neuropathique et inflammatoire les souris développent une hypersensibilité mécanique prolongée. Néanmoins leur sensibilité thermique n'est quant à elle pas affectée. Cette hypersensibilité est réversible si les agonistes des récepteurs aux opioïdes mu et delta (DAMGO et SNC80 respectivement) sont injectés chez les souris GINIP^{-/-}, alors que ces mêmes souris sont résistantes à une injection de baclofène. Dans cette étude, nous avons contribué à la compréhension du mécanisme à l'origine de l'hypersensibilité mécanique chez les souris déficientes pour GINIP ainsi que leur résistance au baclofène.

Pour cela nous avons étudié par patch clamp la transmission synaptique sur des tranches aigües de moelle épinière de souris GINIP^{-/-} ainsi que de souris naïves en présence de baclofène, de SNC80 ou de DAMGO. Nous avons enregistré les réponses synaptiques des neurones de la lamina II à des stimulations des racines dorsales de la moelle épinière (**Figure 7**). Après application de baclofène dans le bain de perfusion, le rapport des réponses synaptiques aux stimulations d'impulsion pairées est augmenté chez les souris contrôles et GINIP^{-/-} indiquant une inhibition présynaptique des afférences sensorielles primaires. Cependant l'augmentation est plus importante chez les souris contrôles que chez les souris GINIP^{-/-} (Figure 7A). Ces résultats indiquent que les souris GINIP^{-/-} présentent une altération de l'inhibition pré synaptique médiée par les récepteurs GABAB présents sur les afférences sensorielles à bas seuil et donc que la protéine GINIP est impliquée dans régulation de la voie de signalisation activée par le récepteur GABA_B.

Cette diminution de l'inhibition présynaptique des afférences primaires s'explique en partie par une diminution de l'inhibition des canaux calciques voltage dépendant à haut seuil normalement exercée par l'activation du récepteur GABA_B. Cette étude apporte donc des éléments renforçant le rôle important des fibres C non myélinisées dans la transmission des informations douloureuses en condition pathologique. Elle permet aussi d'identifier GINIP comme un potentialisateur de la voie de signalisation activée par les récepteurs GABA_B localisés sur les afférences sensorielles primaires.

Article

Bibliographie

BIBLIOGRAPHIE

- Abbracchio, M.P., Burnstock, G., Verkhratsky, A., and Zimmermann, H. (2009). Purinergic signalling in the nervous system: an overview. *Trends Neurosci.* 32, 19–29.
- Abraira, V.E., and Ginty, D.D. (2013). The Sensory Neurons of Touch. *Neuron* 79.
- Ahmadi, S., Lippross, S., Neuhuber, W.L., and Zeilhofer, H.U. (2002). PGE(2) selectively blocks inhibitory glycinergic neurotransmission onto rat superficial dorsal horn neurons. *Nat. Neurosci.* 5, 34–40.
- Albuquerque, C., Lee, C.J., Jackson, A.C., and MacDermott, A.B. (1999). Subpopulations of GABAergic and non-GABAergic rat dorsal horn neurons express Ca²⁺-permeable AMPA receptors. *Eur. J. Neurosci.* 11, 2758–2766.
- Almarestani, L., Waters, S.M., Krause, J.E., Bennett, G.J., and Ribeiro-da-Silva, A. (2007). Morphological characterization of spinal cord dorsal horn lamina I neurons projecting to the parabrachial nucleus in the rat. *J. Comp. Neurol.* 504, 287–297.
- Alvarez, F.J., Taylor-Blake, B., Fyffe, R.E., De Blas, A.L., and Light, A.R. (1996). Distribution of immunoreactivity for the beta 2 and beta 3 subunits of the GABA_A receptor in the mammalian spinal cord. *J. Comp. Neurol.* 365, 392–412.
- Anderberg, U.M., Marteinsdottir, I., Hallman, J., and Bäckström, T. (1998). Variability in Cyclicity Affects Pain and Other Symptoms In Female Fibromyalgia Syndrome Patients. *J. Musculoskelet. Pain* 6, 5–22.
- Ataka, T., Kumamoto, E., Shimoji, K., and Yoshimura, M. (2000). Baclofen inhibits more effectively C-afferent than Delta-afferent glutamatergic transmission in substantia gelatinosa neurons of adult rat spinal cord slices. *Pain* 86, 273–282.
- Audinat, É., and Arnoux, I. (2014). La microglie : des cellules immunitaires qui sculptent et contrôlent les synapses neuronales. *médecine/sciences* 30, 153–159.
- Baba, H., Doubell, T.P., and Woolf, C.J. (1999). Peripheral inflammation facilitates Abeta fiber-mediated synaptic input to the substantia gelatinosa of the adult rat spinal cord. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 19, 859–867.
- Baba, H., Ji, R.-R., Kohno, T., Moore, K.A., Ataka, T., Wakai, A., Okamoto, M., and Woolf, C.J. (2003). Removal of GABAergic inhibition facilitates polysynaptic A fiber-mediated excitatory transmission to the superficial spinal dorsal horn. *Mol. Cell. Neurosci.* 24, 818–830.
- Badea, T.C., Hua, Z.L., Smallwood, P.M., Williams, J., Rotolo, T., Ye, X., and Nathans, J. (2009). New Mouse Lines for the Analysis of Neuronal Morphology Using CreER(T)/loxP-Directed Sparse Labeling. *PLoS ONE* 4.
- Bailey, A.L., and Ribeiro-da-Silva, A. (2006). Transient loss of terminals from non-peptidergic nociceptive fibers in the substantia gelatinosa of spinal cord following chronic constriction injury of the sciatic nerve. *Neuroscience* 138, 675–690.
- Basbaum, A.I., Bautista, D.M., Scherrer, G., and Julius, D. (2009). Cellular and molecular mechanisms of pain. *Cell* 139, 267–284.

Beaulieu, P. (2005). *Pharmacologie de la douleur (PUM)*.

Bennett, G.J., Abdelmoumene, M., Hayashi, H., and Dubner, R. (1980). Physiology and morphology of substantia gelatinosa neurons intracellularly stained with horserdise peroxidase. *J. Comp. Neurol.* *194*, 809–827.

Berkley, K.J. (1997). Sex differences in pain. *Behav. Brain Sci.* *20*, 371-380; discussion 435-513.

Bernard, J.F., and Besson, J.M. (1990). The spino(trigemino)pontoamygdaloid pathway: electrophysiological evidence for an involvement in pain processes. *J. Neurophysiol.* *63*, 473–490.

Bessou, P., and Perl, E.R. (1969). Response of cutaneous sensory units with unmyelinated fibers to noxious stimuli. *J. Neurophysiol.* *32*, 1025–1043.

Bessou, P., Burgess, P.R., Perl, E.R., and Taylor, C.B. (1971). Dynamic properties of mechanoreceptors with unmyelinated (C) fibers. *J. Neurophysiol.* *34*, 116–131.

Björnsdotter, M., Gordon, I., Pelphrey, K.A., Olausson, H., and Kaiser, M.D. (2014). Development of brain mechanisms for processing affective touch. *Front. Behav. Neurosci.* *8*, 24.

Blinzinger, K., and Kreutzberg, G. (1968). Displacement of synaptic terminals from regenerating motoneurons by microglial cells. *Z. Für Zellforsch. Mikrosk. Anat.* *85*, 145–157.

Bouhassira, D., and Attal, N. (2012). *Douleurs neuropathiques (Arnette)*.

Breivik, H., Collett, B., Ventafridda, V., Cohen, R., and Gallacher, D. (2006). Survey of chronic pain in Europe: prevalence, impact on daily life, and treatment. *Eur. J. Pain Lond. Engl.* *10*, 287–333.

Brown, A.G., and Iggo, A. (1967). A quantitative study of cutaneous receptors and afferent fibres in the cat and rabbit. *J. Physiol.* *193*, 707–733.

Brumovsky, P., Villar, M.J., and Hökfelt, T. (2006). Tyrosine hydroxylase is expressed in a subpopulation of small dorsal root ganglion neurons in the adult mouse. *Exp. Neurol.* *200*, 153–165.

Burgess, P.R., and Perl, E.R. (1967). Myelinated afferent fibres responding specifically to noxious stimulation of the skin. *J. Physiol.* *190*, 541–562.

Burstein, R., Cliffer, K.D., and Giesler, G.J. (1987). Direct somatosensory projections from the spinal cord to the hypothalamus and telencephalon. *J. Neurosci.* *7*, 4159–4164.

Butovsky, O., Jedrychowski, M.P., Moore, C.S., Cialic, R., Lanser, A.J., Gabriely, G., Koeglsperger, T., Dake, B., Wu, P.M., Doykan, C.E., et al. (2014). Identification of a unique TGF- β -dependent molecular and functional signature in microglia. *Nat. Neurosci.* *17*, 131–143.

Cain, D.M., Khasabov, S.G., and Simone, D.A. (2001). Response properties of mechanoreceptors and nociceptors in mouse glabrous skin: an in vivo study. *J. Neurophysiol.* *85*, 1561–1574.

Calvino, B., and Grilo, R.M. *Le contrôle central de la douleur.*
</data/revues/11698330/00730001/05001560/>.

Campbell, J.N., Meyer, R.A., and LaMotte, R.H. (1979). Sensitization of myelinated nociceptive afferents that innervate monkey hand. *J. Neurophysiol.* *42*, 1669–1679.

- Campero, M., and Bostock, H. (2010). Unmyelinated afferents in human skin and their responsiveness to low temperature. *Neurosci. Lett.* *470*, 188–192.
- Caterina, M.J., Schumacher, M.A., Tominaga, M., Rosen, T.A., Levine, J.D., and Julius, D. (1997). The capsaicin receptor: a heat-activated ion channel in the pain pathway. *Nature* *389*, 816–824.
- Cavanaugh, D.J., Lee, H., Lo, L., Shields, S.D., Zylka, M.J., Basbaum, A.I., and Anderson, D.J. (2009). Distinct subsets of unmyelinated primary sensory fibers mediate behavioral responses to noxious thermal and mechanical stimuli. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *106*, 9075–9080.
- Cervero, F., and Laird, J.M. (1996). Mechanisms of touch-evoked pain (allodynia): a new model. *Pain* *68*, 13–23.
- Chan, W.Y., Kohsaka, S., and Rezaie, P. (2007). The origin and cell lineage of microglia: new concepts. *Brain Res. Rev.* *53*, 344–354.
- Chen, Z., Jalabi, W., Hu, W., Park, H.-J., Gale, J.T., Kidd, G.J., Bernatowicz, R., Gossman, Z.C., Chen, J.T., Dutta, R., et al. (2014). Microglial displacement of inhibitory synapses provides neuroprotection in the adult brain. *Nat. Commun.* *5*, 4486.
- Chéry, N., and de Koninck, Y. (1999). Junctional versus extrajunctional glycine and GABA(A) receptor-mediated IPSCs in identified lamina I neurons of the adult rat spinal cord. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* *19*, 7342–7355.
- Cho, H.J., and Basbaum, A.I. (1989). Ultrastructural analysis of dynorphin B-immunoreactive cells and terminals in the superficial dorsal horn of the deafferented spinal cord of the rat. *J. Comp. Neurol.* *281*, 193–205.
- Choi, J.I., Svensson, C.I., Koehn, F.J., Bhuskute, A., and Sorkin, L.S. (2010). Peripheral inflammation induces tumor necrosis factor dependent AMPA receptor trafficking and Akt phosphorylation in spinal cord in addition to pain behavior. *Pain* *149*, 243–253.
- Costigan, M., Scholz, J., and Woolf, C.J. (2009). Neuropathic Pain. *Annu. Rev. Neurosci.* *32*, 1–32.
- Coull, J.A.M., Boudreau, D., Bachand, K., Prescott, S.A., Nault, F., Sîk, A., De Koninck, P., and De Koninck, Y. (2003). Trans-synaptic shift in anion gradient in spinal lamina I neurons as a mechanism of neuropathic pain. *Nature* *424*, 938–942.
- Coull, J.A.M., Beggs, S., Boudreau, D., Boivin, D., Tsuda, M., Inoue, K., Gravel, C., Salter, M.W., and De Koninck, Y. (2005). BDNF from microglia causes the shift in neuronal anion gradient underlying neuropathic pain. *Nature* *438*, 1017–1021.
- Cox, J.J., Reimann, F., Nicholas, A.K., Thornton, G., Roberts, E., Springell, K., Karbani, G., Jafri, H., Mannan, J., Raashid, Y., et al. (2006). An SCN9A channelopathy causes congenital inability to experience pain. *Nature* *444*, 894–898.
- Cox, J.J., Sheynin, J., Shorer, Z., Reimann, F., Nicholas, A.K., Zubovic, L., Baralle, M., Wraige, E., Manor, E., Levy, J., et al. (2010). Congenital insensitivity to pain: novel SCN9A missense and in-frame deletion mutations. *Hum. Mutat.* *31*, E1670-1686.
- Craig, A.D. (2000). The functional anatomy of lamina I and its role in post-stroke central pain. *Prog. Brain Res.* *129*, 137–151.

- Craig, A.D., and Kniffki, K.D. (1985). Spinothalamic lumbosacral lamina I cells responsive to skin and muscle stimulation in the cat. *J. Physiol.* *365*, 197–221.
- Dalsgaard, C.-J., Haegerstrand, A., Theodorsson-Norheim, E., Brodin, E., and Hökfelt, T. (1985). Neurokinin A-like immunoreactivity in rat primary sensory neurons; coexistence with substance P. *Histochemistry* *83*, 37–39.
- Daniele, C.A., and MacDermott, A.B. (2009). Low threshold primary afferent drive onto GABAergic interneurons in the superficial dorsal horn of the mouse. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* *29*, 686–695.
- Davis, E.J., Foster, T.D., and Thomas, W.E. (1994). Cellular forms and functions of brain microglia. *Brain Res. Bull.* *34*, 73–78.
- De Biasi, S., and Rustioni, A. (1988). Glutamate and substance P coexist in primary afferent terminals in the superficial laminae of spinal cord. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *85*, 7820–7824.
- De Koninck, Y., and Henry, J.L. (1991). Substance P-mediated slow excitatory postsynaptic potential elicited in dorsal horn neurons in vivo by noxious stimulation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *88*, 11344–11348.
- Delfini, M.-C., Mantilleri, A., Gaillard, S., Hao, J., Reynders, A., Malapert, P., Alonso, S., François, A., Barrere, C., Seal, R., et al. (2013). TFAFA4, a Chemokine-like Protein, Modulates Injury-Induced Mechanical and Chemical Pain Hypersensitivity in Mice. *Cell Rep.* *5*, 378–388.
- Djoughri, L., and Lawson, S.N. (2004). Abeta-fiber nociceptive primary afferent neurons: a review of incidence and properties in relation to other afferent A-fiber neurons in mammals. *Brain Res. Brain Res. Rev.* *46*, 131–145.
- Dong, X., Han, S., Zylka, M.J., Simon, M.I., and Anderson, D.J. (2001). A diverse family of GPCRs expressed in specific subsets of nociceptive sensory neurons. *Cell* *106*, 619–632.
- Douglas, W.W., and Ritchie, J.M. (1957). Nonmedullated fibres in the saphenous nerve which signal touch. *J. Physiol.* *139*, 385–399.
- Duan, B., Cheng, L., Bourane, S., Britz, O., Padilla, C., Garcia-Campmany, L., Krashes, M., Knowlton, W., Velasquez, T., Ren, X., et al. (2014). Identification of spinal circuits transmitting and gating mechanical pain. *Cell* *159*, 1417–1432.
- Dubin, A.E., and Patapoutian, A. (2010). Nociceptors: the sensors of the pain pathway. *J. Clin. Invest.* *120*, 3760–3772.
- Eaton, M.J., Plunkett, J.A., Karmally, S., Martinez, M.A., and Montanez, K. (1998). Changes in GAD- and GABA- immunoreactivity in the spinal dorsal horn after peripheral nerve injury and promotion of recovery by lumbar transplant of immortalized serotonergic precursors. *J. Chem. Neuroanat.* *16*, 57–72.
- Edin, B. (2001). Cutaneous afferents provide information about knee joint movements in humans. *J. Physiol.* *531*, 289–297.
- Evrard, H.C., and Balthazart, J. (2004). Rapid regulation of pain by estrogens synthesized in spinal dorsal horn neurons. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* *24*, 7225–7229.

- Fang, X., Djouhri, L., McMullan, S., Berry, C., Waxman, S.G., Okuse, K., and Lawson, S.N. (2006). Intense isolectin-B4 binding in rat dorsal root ganglion neurons distinguishes C-fiber nociceptors with broad action potentials and high Nav1.9 expression. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* *26*, 7281–7292.
- Färber, K., and Kettenmann, H. (2005). Physiology of microglial cells. *Brain Res. Brain Res. Rev.* *48*, 133–143.
- Ferrini, F., and De Koninck, Y. (2013). Microglia Control Neuronal Network Excitability via BDNF Signalling. *Neural Plast.* *2013*.
- Fillingim, R.B. (2000). Sex, gender, and pain: Women and men really are different. *Curr. Rev. Pain* *4*, 24–30.
- Franco-Cereceda, A., Henke, H., Lundberg, J.M., Petermann, J.B., Hökfelt, T., and Fischer, J.A. (1987). Calcitonin gene-related peptide (CGRP) in capsaicin-sensitive substance P-immunoreactive sensory neurons in animals and man: distribution and release by capsaicin. *Peptides* *8*, 399–410.
- François, A., Schüetter, N., Laffray, S., Sanguesa, J., Pizzoccaro, A., Dubel, S., Mantilleri, A., Nargeot, J., Noël, J., Wood, J.N., et al. (2015). The Low-Threshold Calcium Channel Cav3.2 Determines Low-Threshold Mechanoreceptor Function. *Cell Rep.*
- Franz, D.N., and Iggo, A. (1968). Conduction failure in myelinated and non-myelinated axons at low temperatures. *J. Physiol.* *199*, 319–345.
- Galic, M.A., Riazi, K., and Pittman, Q.J. (2012). Cytokines and brain excitability. *Front. Neuroendocrinol.* *33*, 116–125.
- Gavins, F.N.E. (2010). Are formyl peptide receptors novel targets for therapeutic intervention in ischaemia-reperfusion injury? *Trends Pharmacol. Sci.* *31*, 266–276.
- Gobel, S., Falls, W.M., Bennett, G.J., Abdelmoumene, M., Hayashi, H., and Humphrey, E. (1980). An EM analysis of the synaptic connections of horseradish peroxidase-filled stalked cells and islet cells in the substantia gelatinosa of adult cat spinal cord. *J. Comp. Neurol.* *194*, 781–807.
- Gosselin, D., Link, V.M., Romanoski, C.E., Fonseca, G.J., Eichenfield, D.Z., Spann, N.J., Stender, J.D., Chun, H.B., Garner, H., Geissmann, F., et al. (2014). Environment drives selection and function of enhancers controlling tissue-specific macrophage identities. *Cell* *159*, 1327–1340.
- Gracely, R.H., Lynch, S.A., and Bennett, G.J. (1992). Painful neuropathy: altered central processing maintained dynamically by peripheral input. *Pain* *51*, 175–194.
- Gras, C., Herzog, E., Bellenchi, G.C., Bernard, V., Ravassard, P., Pohl, M., Gasnier, B., Giros, B., and Mestikawy, S.E. (2002). A Third Vesicular Glutamate Transporter Expressed by Cholinergic and Serotonergic Neurons. *J. Neurosci.* *22*, 5442–5451.
- Grudt, T.J., and Perl, E.R. (2002). Correlations between neuronal morphology and electrophysiological features in the rodent superficial dorsal horn. *J. Physiol.* *540*, 189–207.
- Guirimand, F., and Le Bars, D. (1996). Physiologie de la nociception. *Ann. Fr. Anesth. Réanimation* *15*, 1048–1079.

- Habig, K., Schänzer, A., Schirner, W., Lautenschläger, G., Dassinger, B., Olausson, H., Birklein, F., Gizewski, E.R., and Krämer, H.H. (2017). Low threshold unmyelinated mechanoafferents can modulate pain. *BMC Neurol.* *17*, 184.
- Halata, Z., Grim, M., and Bauman, K.I. (2003). Friedrich Sigmund Merkel and his “Merkel cell”, morphology, development, and physiology: review and new results. *Anat. Rec. A. Discov. Mol. Cell. Evol. Biol.* *271*, 225–239.
- Han, Z.S., Zhang, E.T., and Craig, A.D. (1998). Nociceptive and thermoreceptive lamina I neurons are anatomically distinct. *Nat. Neurosci.* *1*, 218–225.
- Hantman, A.W., van den Pol, A.N., and Perl, E.R. (2004). Morphological and physiological features of a set of spinal substantia gelatinosa neurons defined by green fluorescent protein expression. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* *24*, 836–842.
- Hardingham, G.E., Fukunaga, Y., and Bading, H. (2002). Extrasynaptic NMDARs oppose synaptic NMDARs by triggering CREB shut-off and cell death pathways. *Nat. Neurosci.* *5*, 405–414.
- Harlow, H.F., and Zimmermann, R.R. (1958). The Development of Affectional Responses in Infant Monkeys. *Proc. Am. Philos. Soc.* *102*, 501–509.
- Harvey, K., Duguid, I.C., Alldred, M.J., Beatty, S.E., Ward, H., Keep, N.H., Lingenfelter, S.E., Pearce, B.R., Lundgren, J., Owen, M.J., et al. (2004). The GDP-GTP exchange factor collybistin: an essential determinant of neuronal gephyrin clustering. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* *24*, 5816–5826.
- Haynes, S.E., Hollopeter, G., Yang, G., Kurpius, D., Dailey, M.E., Gan, W.-B., and Julius, D. (2006). The P2Y₁₂ receptor regulates microglial activation by extracellular nucleotides. *Nat. Neurosci.* *9*, 1512–1519.
- Henry, J.L. (1976). Effects of substance P on functionally identified units in cat spinal cord. *Brain Res.* *114*, 439–451.
- Hensel, H., and Iggo, A. (1971). Analysis of cutaneous warm and cold fibres in primates. *Pflugers Arch.* *329*, 1–8.
- Hodge, C.J., and Apkarian, A.V. (1990). The spinothalamic tract. *Crit. Rev. Neurobiol.* *5*, 363–397.
- Huang, J., Chen, J., Wang, W., Wang, W., Koshimizu, Y., Wei, Y.-Y., Kaneko, T., Li, Y.-Q., and Wu, S.-X. (2010). Neurochemical properties of enkephalinergic neurons in lumbar spinal dorsal horn revealed by preproenkephalin-green fluorescent protein transgenic mice. *J. Neurochem.* *113*, 1555–1564.
- Hughes, D.I., Scott, D.T., Todd, A.J., and Riddell, J.S. (2003). Lack of evidence for sprouting of Aβ afferents into the superficial laminae of the spinal cord dorsal horn after nerve section. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* *23*, 9491–9499.
- Hughes, D.I., Scott, D.T., Riddell, J.S., and Todd, A.J. (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. Off. J. Soc. Neurosci.* *27*, 2035–2044.
- Hughes, D.I., Sikander, S., Kinnon, C.M., Boyle, K.A., Watanabe, M., Callister, R.J., and Graham, B.A. (2012). Morphological, neurochemical and electrophysiological features of parvalbumin-expressing cells: a likely source of axo-axonic inputs in the mouse spinal dorsal horn. *J. Physiol.* *590*, 3927–3951.

- Hussein, M.A. (1971). The overall pattern of hair follicle arrangement in the rat and mouse. *J. Anat.* *109*, 307–316.
- Ibuki, T., Hama, A.T., Wang, X.T., Pappas, G.D., and Sagen, J. (1997). Loss of GABA-immunoreactivity in the spinal dorsal horn of rats with peripheral nerve injury and promotion of recovery by adrenal medullary grafts. *Neuroscience* *76*, 845–858.
- Iggo, A. (1960). Cutaneous mechanoreceptors with afferent C fibres. *J. Physiol.* *152*, 337–353.
- Iggo, A., and Kornhuber, H.H. (1977). A quantitative study of C-mechanoreceptors in hairy skin of the cat. *J. Physiol.* *271*, 549–565.
- Imai, Y., Ibata, I., Ito, D., Ohsawa, K., and Kohsaka, S. (1996). A novel gene *iba1* in the major histocompatibility complex class III region encoding an EF hand protein expressed in a monocytic lineage. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *224*, 855–862.
- Inoue, K., Koizumi, S., and Tsuda, M. (2007). The role of nucleotides in the neuron–glia communication responsible for the brain functions. *J. Neurochem.* *102*, 1447–1458.
- Ji, R.-R., Berta, T., and Nedergaard, M. (2013). Glia and pain: is chronic pain a gliopathy? *Pain* *154 Suppl 1*, S10-28.
- Jia, H., Rustioni, A., and Valtschanoff, J.G. (1999). Metabotropic glutamate receptors in superficial laminae of the rat dorsal horn. *J. Comp. Neurol.* *410*, 627–642.
- Johnson, K.O. (2001). The roles and functions of cutaneous mechanoreceptors. *Curr. Opin. Neurobiol.* *11*, 455–461.
- Johnson, K.O., and Hsiao, S.S. (1992). Neural mechanisms of tactual form and texture perception. *Annu. Rev. Neurosci.* *15*, 227–250.
- Jönsson, E.H., Bendas, J., Weidner, K., Wessberg, J., Olausson, H., Wasling, H.B., and Croy, I. (2017). The relation between human hair follicle density and touch perception. *Sci. Rep.* *7*, 2499.
- Kandasamy, R., Calsbeek, J.J., and Morgan, M.M. (2016). Home cage wheel running is an objective and clinically relevant method to assess inflammatory pain in male and female rats. *J. Neurosci. Methods* *263*, 115–122.
- Karanth, S.S., Springall, D.R., Kuhn, D.M., Levene, M.M., and Polak, J.M. (1991). An immunocytochemical study of cutaneous innervation and the distribution of neuropeptides and protein gene product 9.5 in man and commonly employed laboratory animals. *Am. J. Anat.* *191*, 369–383.
- Kawasaki, Y., Zhang, L., Cheng, J.-K., and Ji, R.-R. (2008). Cytokine Mechanisms of Central Sensitization: Distinct and Overlapping Role of Interleukin-1 β , Interleukin-6, and Tumor Necrosis Factor- α in Regulating Synaptic and Neuronal Activity in the Superficial Spinal Cord. *J. Neurosci.* *28*, 5189–5194.
- Kerr, R.C.S.R., Maxwell, and Todd (1998). GluR1 and GluR2/3 subunits of the AMPA-type glutamate receptor are associated with particular types of neurone in laminae I–III of the spinal dorsal horn of the rat. *Eur. J. Neurosci.* *10*, 324–333.

- Kettenmann, H., Hanisch, U.-K., Noda, M., and Verkhratsky, A. (2011). Physiology of Microglia. *Physiol. Rev.* *91*, 461–553.
- Kim, D., Kim, M.A., Cho, I.-H., Kim, M.S., Lee, S., Jo, E.-K., Choi, S.-Y., Park, K., Kim, J.S., Akira, S., et al. (2007). A critical role of toll-like receptor 2 in nerve injury-induced spinal cord glial cell activation and pain hypersensitivity. *J. Biol. Chem.* *282*, 14975–14983.
- Kohama, I., Ishikawa, K., and Kocsis, J.D. (2000). Synaptic Reorganization in the Substantia Gelatinosa After Peripheral Nerve Neuroma Formation: Aberrant Innervation of Lamina II Neurons by A β Afferents. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* *20*, 1538–1549.
- Koizumi, S., Ohsawa, K., Inoue, K., and Kohsaka, S. (2013). Purinergic receptors in microglia: functional modal shifts of microglia mediated by P2 and P1 receptors. *Glia* *61*, 47–54.
- Krämer, H.H., Lundblad, L., Birklein, F., Linde, M., Karlsson, T., Elam, M., and Olausson, H. (2007). Activation of the cortical pain network by soft tactile stimulation after injection of sumatriptan. *Pain* *133*, 72–78.
- Kumazawa, T., and Perl, E.R. (1977). Primate cutaneous sensory units with unmyelinated (C) afferent fibers. *J. Neurophysiol.* *40*, 1325–1338.
- Laffray, S., Bouali-Benazzouz, R., Papon, M.-A., Favereaux, A., Jiang, Y., Holm, T., Spriet, C., Desbarats, P., Fossat, P., Le Feuvre, Y., et al. (2012). Impairment of GABAB receptor dimer by endogenous 14-3-3 ζ in chronic pain conditions. *EMBO J.* *31*, 3239–3251.
- Latremoliere, A., and Woolf, C.J. (2009). Central sensitization: a generator of pain hypersensitivity by central neural plasticity. *J. Pain Off. J. Am. Pain Soc.* *10*, 895–926.
- Lavin, Y., Winter, D., Blecher-Gonen, R., David, E., Keren-Shaul, H., Merad, M., Jung, S., and Amit, I. (2014). Tissue-resident macrophage enhancer landscapes are shaped by the local microenvironment. *Cell* *159*, 1312–1326.
- Lechner, S.G., and Lewin, G.R. (2013). Hairy sensation. *Physiol. Bethesda Md* *28*, 142–150.
- Lee, C.J., Mannaioni, G., Yuan, H., Woo, D.H., Gingrich, M.B., and Traynelis, S.F. (2007). Astrocytic control of synaptic NMDA receptors. *J. Physiol.* *581*, 1057–1081.
- Lewin, G.R., Ritter, A.M., and Mendell, L.M. (1992). On the role of nerve growth factor in the development of myelinated nociceptors. *J. Neurosci.* *12*, 1896–1905.
- Lewis, C., Neidhart, S., Holy, C., North, R.A., Buell, G., and Surprenant, A. (1995). Coexpression of P2X2 and P2X3 receptor subunits can account for ATP-gated currents in sensory neurons. *Nature* *377*, 432–435.
- Li, L., Rutlin, M., Abaira, V.E., Cassidy, C., Kus, L., Gong, S., Jankowski, M.P., Luo, W., Heintz, N., Koerber, H.R., et al. (2011). The functional organization of cutaneous low-threshold mechanosensory neurons. *Cell* *147*, 1615–1627.
- Light, A.R., and Perl, E.R. (1979). Reexamination of the dorsal root projection to the spinal dorsal horn including observations on the differential termination of coarse and fine fibers. *J. Comp. Neurol.* *186*, 117–131.

- Light, A.R., and Willcockson, H.H. (1999). Spinal Laminae I-II Neurons in Rat Recorded In Vivo in Whole Cell, Tight Seal Configuration: Properties and Opioid Responses. *J. Neurophysiol.* *82*, 3316–3326.
- Liljencrantz, J., and Olausson, H. (2014). Tactile C fibers and their contributions to pleasant sensations and to tactile allodynia. *Front. Behav. Neurosci.* *8*.
- Lima, D., and Coimbra, A. (1983). The neuronal population of the marginal zone (lamina I) of the rat spinal cord. A study based on reconstructions of serially sectioned cells. *Anat. Embryol. (Berl.)* *167*, 273–288.
- Lima, D., and Coimbra, A. (1986). A Golgi study of the neuronal population of the marginal zone (lamina I) of the rat spinal cord. *J. Comp. Neurol.* *244*, 53–71.
- Lima, D., Avelino, A., and Coimbra, A. (1993). Morphological characterization of marginal (Lamina I) neurons immunoreactive for substance P, enkephalin, dynorphin and gamma-aminobutyric acid in the rat spinal cord. *J. Chem. Neuroanat.* *6*, 43–52.
- Linde, M., Elam, M., Lundblad, L., Olausson, H., and Dahlöf, C.G.H. (2004). Sumatriptan (5-HT_{1B/1D}-agonist) causes a transient allodynia. *Cephalalgia Int. J. Headache* *24*, 1057–1066.
- Linley, J.E., Rose, K., Ooi, L., and Gamper, N. (2010). Understanding inflammatory pain: ion channels contributing to acute and chronic nociception. *Pflugers Arch.* *459*, 657–669.
- Liu, M., Chen, K., Yoshimura, T., Liu, Y., Gong, W., Wang, A., Gao, J.-L., Murphy, P.M., and Wang, J.M. (2012). Formylpeptide receptors are critical for rapid neutrophil mobilization in host defense against *Listeria monocytogenes*. *Sci. Rep.* *2*, 786.
- Liu, Q., Vrontou, S., Rice, F.L., Zylka, M.J., Dong, X., and Anderson, D.J. (2007). Molecular genetic visualization of a rare subset of unmyelinated sensory neurons that may detect gentle touch. *Nat. Neurosci.* *10*, 946–948.
- Löken, L.S., Wessberg, J., Morrison, I., McGlone, F., and Olausson, H. (2009). Coding of pleasant touch by unmyelinated afferents in humans. *Nat. Neurosci.* *12*, 547–548.
- Lou, S., Duan, B., Vong, L., Lowell, B.B., and Ma, Q. (2013). Runx1 controls terminal morphology and mechanosensitivity of VGLUT3-expressing C-mechanoreceptors. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* *33*, 870–882.
- Lu, Y., and Perl, E.R. (2003). A specific inhibitory pathway between substantia gelatinosa neurons receiving direct C-fiber input. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* *23*, 8752–8758.
- Lu, Y., and Perl, E.R. (2005). Modular organization of excitatory circuits between neurons of the spinal superficial dorsal horn (laminae I and II). *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* *25*, 3900–3907.
- Lu, W.Y., Xiong, Z.G., Lei, S., Orser, B.A., Dudek, E., Browning, M.D., and MacDonald, J.F. (1999). G-protein-coupled receptors act via protein kinase C and Src to regulate NMDA receptors. *Nat. Neurosci.* *2*, 331–338.
- Lu, Y., Dong, H., Gao, Y., Gong, Y., Ren, Y., Gu, N., Zhou, S., Xia, N., Sun, Y.-Y., Ji, R.-R., et al. (2013). A feed-forward spinal cord glycinergic neural circuit gates mechanical allodynia. *J. Clin. Invest.* *123*, 4050–4062.

- Lumpkin, E.A., Marshall, K.L., and Nelson, A.M. (2010). The cell biology of touch. *J. Cell Biol.* *191*, 237–248.
- Ma, Q. (2010). Labeled lines meet and talk: population coding of somatic sensations. *J. Clin. Invest.* *120*, 3773–3778.
- Malan, T.P., Mata, H.P., and Porreca, F. (2002). Spinal GABA(A) and GABA(B) receptor pharmacology in a rat model of neuropathic pain. *Anesthesiology* *96*, 1161–1167.
- Malcangio, M., Ramer, M.S., Jones, M.G., and McMahon, S.B. (2000). Abnormal substance P release from the spinal cord following injury to primary sensory neurons. *Eur. J. Neurosci.* *12*, 397–399.
- Malmberg, A.B., Chen, C., Tonegawa, S., and Basbaum, A.I. (1997). Preserved acute pain and reduced neuropathic pain in mice lacking PKCgamma. *Science* *278*, 279–283.
- Mannion, R.J., Costigan, M., Decosterd, I., Amaya, F., Ma, Q.P., Holstege, J.C., Ji, R.R., Acheson, A., Lindsay, R.M., Wilkinson, G.A., et al. (1999). Neurotrophins: peripherally and centrally acting modulators of tactile stimulus-induced inflammatory pain hypersensitivity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *96*, 9385–9390.
- Margeta-Mitrovic, M., Mitrovic, I., Riley, R.C., Jan, L.Y., and Basbaum, A.I. (1999). Immunohistochemical localization of GABA(B) receptors in the rat central nervous system. *J. Comp. Neurol.* *405*, 299–321.
- Maricich, S.M., Wellnitz, S.A., Nelson, A.M., Lesniak, D.R., Gerling, G.J., Lumpkin, E.A., and Zoghbi, H.Y. (2009). Merkel cells are essential for light-touch responses. *Science* *324*, 1580–1582.
- Mason, M.R.J., Ehlert, E.M.E., Eggers, R., Pool, C.W., Hermening, S., Huseinovic, A., Timmermans, E., Blits, B., and Verhaagen, J. (2010). Comparison of AAV serotypes for gene delivery to dorsal root ganglion neurons. *Mol. Ther. J. Am. Soc. Gene Ther.* *18*, 715–724.
- Maxwell, D.J., Belle, M.D., Cheunsuang, O., Stewart, A., and Morris, R. (2007). Morphology of inhibitory and excitatory interneurons in superficial laminae of the rat dorsal horn. *J. Physiol.* *584*, 521–533.
- McCarthy, P.W., and Lawson, S.N. (1990). Cell type and conduction velocity of rat primary sensory neurons with calcitonin gene-related peptide-like immunoreactivity. *Neuroscience* *34*, 623–632.
- McGlone, F., Olausson, H., Boyle, J.A., Jones-Gotman, M., Dancer, C., Guest, S., and Essick, G. (2012). Touching and feeling: differences in pleasant touch processing between glabrous and hairy skin in humans. *Eur. J. Neurosci.* *35*, 1782–1788.
- McLeod, A.L., Krause, J.E., and Ribeiro-Da-Silva, A. (2000). Immunocytochemical localization of neurokinin B in the rat spinal dorsal horn and its association with substance P and GABA: an electron microscopic study. *J. Comp. Neurol.* *420*, 349–362.
- McMahon, S.B., and Wall, P.D. (1984). Receptive fields of rat lamina 1 projection cells move to incorporate a nearby region of injury. *Pain* *19*, 235–247.
- Melnick, I. (2008). Morphophysiological properties of islet cells in substantia gelatinosa of the rat spinal cord. *Neurosci. Lett.* *446*, 65–69.
- Melzack, R., and Wall, P.D. (1965). Pain mechanisms: a new theory. *Science* *150*, 971–979.

Mendelson, M., and Lowenstein, W.R. (1964). MECHANISMS OF RECEPTOR ADAPTATION. *Science* *144*, 554–555.

Meyer, R.A., and Campbell, J.N. (1981). Myelinated nociceptive afferents account for the hyperalgesia that follows a burn to the hand. *Science* *213*, 1527–1529.

Milligan, E.D., O'Connor, K.A., Nguyen, K.T., Armstrong, C.B., Twining, C., Gaykema, R.P., Holguin, A., Martin, D., Maier, S.F., and Watkins, L.R. (2001). Intrathecal HIV-1 envelope glycoprotein gp120 induces enhanced pain states mediated by spinal cord proinflammatory cytokines. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* *21*, 2808–2819.

Miracourt, L.S., Dallel, R., and Voisin, D.L. (2007). Glycine Inhibitory Dysfunction Turns Touch into Pain through PKCgamma Interneurons. *PLoS ONE* *2*.

Mishra, S.K., and Hoon, M.A. (2010). Ablation of TrpV1 neurons reveals their selective role in thermal pain sensation. *Mol. Cell. Neurosci.* *43*, 157–163.

Mitchell, K., Spike, R.C., and Todd, A.J. (1993). An immunocytochemical study of glycine receptor and GABA in laminae I–III of rat spinal dorsal horn. *J. Neurosci.* *13*, 2371–2381.

Molliver, D.C., Radeke, M.J., Feinstein, S.C., and Snider, W.D. (1995). Presence or absence of TrkA protein distinguishes subsets of small sensory neurons with unique cytochemical characteristics and dorsal horn projections. *J. Comp. Neurol.* *361*, 404–416.

Moore, K.A., Kohno, T., Karchewski, L.A., Scholz, J., Baba, H., and Woolf, C.J. (2002). Partial Peripheral Nerve Injury Promotes a Selective Loss of GABAergic Inhibition in the Superficial Dorsal Horn of the Spinal Cord. *J. Neurosci.* *22*, 6724–6731.

Morrison, I., Löken, L.S., and Olausson, H. (2010). The skin as a social organ. *Exp. Brain Res.* *204*, 305–314.

Morrison, I., Löken, L.S., Minde, J., Wessberg, J., Perini, I., Nennesmo, I., and Olausson, H. (2011). Reduced C-afferent fibre density affects perceived pleasantness and empathy for touch. *Brain J. Neurol.* *134*, 1116–1126.

Morton, C.R., and Hutchison, W.D. (1989). Release of sensory neuropeptides in the spinal cord: studies with calcitonin gene-related peptide and galanin. *Neuroscience* *31*, 807–815.

Nagasako, E.M., Oaklander, A.L., and Dworkin, R.H. (2003). Congenital insensitivity to pain: an update. *Pain* *101*, 213–219.

Nagatsu, I., Komori, K., Takeuchi, T., Sakai, M., Yamada, K., and Karasawa, N. (1990). Transient tyrosine hydroxylase-immunoreactive neurons in the region of the anterior olfactory nucleus of pre- and postnatal mice do not contain dopamine. *Brain Res.* *511*, 55–62.

Nagi, S.S., and Mahns, D.A. (2013). C-tactile fibers contribute to cutaneous allodynia after eccentric exercise. *J. Pain Off. J. Am. Pain Soc.* *14*, 538–548.

Nagi, S.S., Rubin, T.K., Chelvanayagam, D.K., Macefield, V.G., and Mahns, D.A. (2011). Allodynia mediated by C-tactile afferents in human hairy skin. *J. Physiol.* *589*, 4065–4075.

Neumann, S., Doubell, T.P., Leslie, T., and Woolf, C.J. (1996). Inflammatory pain hypersensitivity mediated by phenotypic switch in myelinated primary sensory neurons. *Nature* *384*, 360–364.

- Neumann, S., Braz, J.M., Skinner, K., Llewellyn-Smith, I.J., and Basbaum, A.I. (2008). Innocuous, not noxious, input activates PKC γ interneurons of the spinal dorsal horn via myelinated afferent fibers. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* *28*, 7936–7944.
- Njie, E.G., Boelen, E., Stassen, F.R., Steinbusch, H.W.M., Borchelt, D.R., and Streit, W.J. (2012). Ex vivo cultures of microglia from young and aged rodent brain reveal age-related changes in microglial function. *Neurobiol. Aging* *33*, 195.e1-12.
- Noguchi, K., Dubner, R., De Leon, M., Senba, E., and Ruda, M.A. (1994). Axotomy induces preprotachykinin gene expression in a subpopulation of dorsal root ganglion neurons. *J. Neurosci. Res.* *37*, 596–603.
- Nordin, M. (1990). Low-threshold mechanoreceptive and nociceptive units with unmyelinated (C) fibres in the human supraorbital nerve. *J. Physiol.* *426*, 229–240.
- O'Brien, J.A., and Berger, A.J. (1999). Cotransmission of GABA and glycine to brain stem motoneurons. *J. Neurophysiol.* *82*, 1638–1641.
- Ogawa, T., Kanazawa, I., and Kimura, S. (1985). Regional distribution of substance P, neurokinin alpha and neurokinin beta in rat spinal cord, nerve roots and dorsal root ganglia, and the effects of dorsal root section or spinal transection. *Brain Res.* *359*, 152–157.
- Okamoto, M., Baba, H., Goldstein, P.A., Higashi, H., Shimoji, K., and Yoshimura, M. (2001). Functional reorganization of sensory pathways in the rat spinal dorsal horn following peripheral nerve injury. *J. Physiol.* *532*, 241–250.
- Olausson, H., Lamarre, Y., Backlund, H., Morin, C., Wallin, B.G., Starck, G., Ekholm, S., Strigo, I., Worsley, K., Vallbo, A.B., et al. (2002). Unmyelinated tactile afferents signal touch and project to insular cortex. *Nat. Neurosci.* *5*, 900–904.
- Olausson, H., Cole, J., Rylander, K., McGlone, F., Lamarre, Y., Wallin, B.G., Krämer, H., Wessberg, J., Elam, M., Bushnell, M.C., et al. (2008). Functional role of unmyelinated tactile afferents in human hairy skin: sympathetic response and perceptual localization. *Exp. Brain Res.* *184*, 135–140.
- Ottersen, O.P., and Storm-Mathisen, J. (1984). Glutamate- and GABA-containing neurons in the mouse and rat brain, as demonstrated with a new immunocytochemical technique. *J. Comp. Neurol.* *229*, 374–392.
- Pan, Y.-Z., and Pan, H.-L. (2004). Primary Afferent Stimulation Differentially Potentiates Excitatory and Inhibitory Inputs to Spinal Lamina II Outer and Inner Neurons. *J. Neurophysiol.* *91*, 2413–2421.
- Park, J.S., Nakatsuka, T., Nagata, K., Higashi, H., and Yoshimura, M. (1999). Reorganization of the primary afferent termination in the rat spinal dorsal horn during post-natal development. *Brain Res. Dev. Brain Res.* *113*, 29–36.
- Patil, M.J., Ruparel, S.B., Henry, M.A., and Akopian, A.N. (2013). Prolactin regulates TRPV1, TRPA1, and TRPM8 in sensory neurons in a sex-dependent manner: Contribution of prolactin receptor to inflammatory pain. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* *305*, E1154-1164.
- Payrits, M., Ságghy, É., Cseko, K., Pohóczky, K., Bölcskei, K., Ernszt, D., Barabás, K., Szolcsányi, J., Ábrahám, I.M., Helyes, Z., et al. (2017). Estradiol Sensitizes the Transient Receptor Potential Vanilloid 1 Receptor in Pain Responses. *Endocrinology* *158*, 3249–3258.

- Peirs, C., Patil, S., Bouali-Benazzouz, R., Artola, A., Landry, M., and Dallel, R. (2014). Protein kinase C gamma interneurons in the rat medullary dorsal horn: Distribution and synaptic inputs to these neurons, and subcellular localization of the enzyme. *J. Comp. Neurol.* *522*, 393–413.
- Peirs, C., Williams, S.-P.G., Zhao, X., Walsh, C.E., Gedeon, J.Y., Cagle, N.E., Goldring, A.C., Hioki, H., Liu, Z., Marell, P.S., et al. (2015). Dorsal Horn Circuits for Persistent Mechanical Pain. *Neuron* *87*, 797–812.
- Perry, V.H., and Holmes, C. (2014). Microglial priming in neurodegenerative disease. *Nat. Rev. Neurol.* *10*, 217–224.
- Persohn, E., Malherbe, P., and Richards, J.G. (1991). In situ hybridization histochemistry reveals a diversity of GABAA receptor subunit mRNAs in neurons of the rat spinal cord and dorsal root ganglia. *Neuroscience* *42*, 497–507.
- Petitjean, H., Pawlowski, S.A., Fraine, S.L., Sharif, B., Hamad, D., Fatima, T., Berg, J., Brown, C.M., Jan, L.-Y., Ribeiro-da-Silva, A., et al. (2015). Dorsal Horn Parvalbumin Neurons Are Gate-Keepers of Touch-Evoked Pain after Nerve Injury. *Cell Rep.* *13*, 1246–1257.
- Pitcher, M., Pichon, C.E.L., and Chesler, A. (2016). Functional Properties of C-Low Threshold Mechanoreceptors (C-LTMRs) in Nonhuman Mammals. In *Affective Touch and the Neurophysiology of CT Afferents*, (Springer, New York, NY), pp. 31–48.
- Polgár, E., Fowler, J.H., McGill, M.M., and Todd, A.J. (1999). The types of neuron which contain protein kinase C gamma in rat spinal cord. *Brain Res.* *833*, 71–80.
- Polgár, E., Hughes, D.I., Riddell, J.S., Maxwell, D.J., Puskár, Z., and Todd, A.J. (2003). Selective loss of spinal GABAergic or glycinergic neurons is not necessary for development of thermal hyperalgesia in the chronic constriction injury model of neuropathic pain. *Pain* *104*, 229–239.
- Polgár, E., Hughes, D.I., Arham, A.Z., and Todd, A.J. (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. Off. J. Soc. Neurosci.* *25*, 6658–6666.
- Polgár, E., Al-Khater, K.M., Shehab, S., Watanabe, M., and Todd, A.J. (2008). Large projection neurons in lamina I of the rat spinal cord that lack the neurokinin 1 receptor are densely innervated by VGLUT2-containing axons and possess GluR4-containing AMPA receptors. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* *28*, 13150–13160.
- Polgár, E., Durrieux, C., Hughes, D.I., and Todd, A.J. (2013). A Quantitative Study of Inhibitory Interneurons in Laminae I-III of the Mouse Spinal Dorsal Horn. *PLoS ONE* *8*.
- Prescott, S.A., and Koninck, Y.D. (2002). Four cell types with distinctive membrane properties and morphologies in lamina I of the spinal dorsal horn of the adult rat. *J. Physiol.* *539*, 817–836.
- Puskár, Z., Polgár, E., and Todd, A.J. (2001). A population of large lamina I projection neurons with selective inhibitory input in rat spinal cord. *Neuroscience* *102*, 167–176.
- Raghavendra, V., Tanga, F., and DeLeo, J.A. (2003). Inhibition of microglial activation attenuates the development but not existing hypersensitivity in a rat model of neuropathy. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* *306*, 624–630.

- Randić, M., Jiang, M.C., and Cerne, R. (1993). Long-term potentiation and long-term depression of primary afferent neurotransmission in the rat spinal cord. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* *13*, 5228–5241.
- Reinisch, C.M., and Tschachler, E. (2005). The touch dome in human skin is supplied by different types of nerve fibers. *Ann. Neurol.* *58*, 88–95.
- Réthelyi, M., Light, A.R., and Perl, E.R. (1982). Synaptic complexes formed by functionally defined primary afferent units with fine myelinated fibers. *J. Comp. Neurol.* *207*, 381–393.
- Rexed, B. (1952). The cytoarchitectonic organization of the spinal cord in the cat. *J. Comp. Neurol.* *96*, 414–495.
- Ribeiro-da-Silva, A. (1995). Ultrastructural features of the colocalization of calcitonin gene related peptide with substance P or somatostatin in the dorsal horn of the spinal cord. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* *73*, 940–944.
- Ribeiro-Da-Silva, A. (2015). Chapter 7 - Substantia Gelatinosa of the Spinal Cord. In *The Rat Nervous System (Fourth Edition)*, G. Paxinos, ed. (San Diego: Academic Press), pp. 97–114.
- Ribeiro-da-Silva, A., and Coimbra, A. (1982). Two types of synaptic glomeruli and their distribution in laminae I-III of the rat spinal cord. *J. Comp. Neurol.* *209*, 176–186.
- Ribeiro-da-Silva, A., and De Koninck, Y. (2008). 5.23 - Morphological and Neurochemical Organization of the Spinal Dorsal Horn. In *The Senses: A Comprehensive Reference*, R.H. Masland, T.D. Albright, T.D. Albright, R.H. Masland, P. Dallos, D. Oertel, S. Firestein, G.K. Beauchamp, M.C. Bushnell, A.I. Basbaum, et al., eds. (New York: Academic Press), pp. 279–310.
- Ribeiro-da-Silva, A., Pioro, E.P., and Cuello, A.C. (1991). Substance P- and enkephalin-like immunoreactivities are colocalized in certain neurons of the substantia gelatinosa of the rat spinal cord: an ultrastructural double-labeling study. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* *11*, 1068–1080.
- Ringkamp, M., and Meyer, R.A. (2008). 5.08 - Physiology of Nociceptors. In *The Senses: A Comprehensive Reference*, R.H. Masland, T.D. Albright, T.D. Albright, R.H. Masland, P. Dallos, D. Oertel, S. Firestein, G.K. Beauchamp, M.C. Bushnell, A.I. Basbaum, et al., eds. (New York: Academic Press), pp. 97–114.
- Rogers, J.H. (1987). Calretinin: a gene for a novel calcium-binding protein expressed principally in neurons. *J. Cell Biol.* *105*, 1343–1353.
- Romanovsky, A.A. (2007). Thermoregulation: some concepts have changed. Functional architecture of the thermoregulatory system. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* *292*, R37-46.
- Roudaut, Y., Lonigro, A., Coste, B., Hao, J., Delmas, P., and Crest, M. (2012). Touch sense. *Channels* *6*, 234–245.
- Rowan, M.P., Berg, K.A., Milam, S.B., Jeske, N.A., Roberts, J.L., Hargreaves, K.M., and Clarke, W.P. (2010). 17beta-estradiol rapidly enhances bradykinin signaling in primary sensory neurons in vitro and in vivo. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* *335*, 190–196.
- Sandkühler, J. (2009). Models and mechanisms of hyperalgesia and allodynia. *Physiol. Rev.* *89*, 707–758.

- Sardella, T.C.P., Polgár, E., Garzillo, F., Furuta, T., Kaneko, T., Watanabe, M., and Todd, A.J. (2011). Dynorphin is expressed primarily by GABAergic neurons that contain galanin in the rat dorsal horn. *Mol. Pain* 7, 76.
- Sarton, E., Olofsen, E., Romberg, R., den Hartigh, J., Kest, B., Nieuwenhuijs, D., Burm, A., Teppema, L., and Dahan, A. (2000). Sex differences in morphine analgesia: an experimental study in healthy volunteers. *Anesthesiology* 93, 1245–1254; discussion 6A.
- Savitt, J.M., Jang, S.S., Mu, W., Dawson, V.L., and Dawson, T.M. (2005). Bcl-x is required for proper development of the mouse substantia nigra. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 25, 6721–6728.
- Schepers, R.J., and Ringkamp, M. (2010). Thermoreceptors and thermosensitive afferents. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 34, 177–184.
- Schmidt, R., Schmelz, M., Forster, C., Ringkamp, M., Torebjörk, E., and Handwerker, H. (1995). Novel classes of responsive and unresponsive C nociceptors in human skin. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 15, 333–341.
- Schneider, S.P., and Lopez, M. (2002). Immunocytochemical localization of glutamic acid decarboxylase in physiologically identified interneurons of hamster spinal laminae III-V. *Neuroscience* 115, 627–636.
- Schoffnegger, D., Heinke, B., Sommer, C., and Sandkühler, J. (2006). Physiological properties of spinal lamina II GABAergic neurons in mice following peripheral nerve injury. *J. Physiol.* 577, 869–878.
- Schomberg, S.L., Su, G., Haworth, R.A., and Sun, D. (2001). Stimulation of Na-K-2Cl cotransporter in neurons by activation of Non-NMDA ionotropic receptor and group-I mGluRs. *J. Neurophysiol.* 85, 2563–2575.
- Seal, R.P., Wang, X., Guan, Y., Raja, S.N., Woodbury, C.J., Basbaum, A.I., and Edwards, R.H. (2009). Injury-induced mechanical hypersensitivity requires C-low threshold mechanoreceptors. *Nature* 462, 651–655.
- Shaw, A.C., Goldstein, D.R., and Montgomery, R.R. (2013). Age-dependent dysregulation of innate immunity. *Nat. Rev. Immunol.* 13, 875–887.
- Silos-Santiago, I., Molliver, D.C., Ozaki, S., Smeyne, R.J., Fagan, A.M., Barbacid, M., and Snider, W.D. (1995). Non-TrkA-expressing small DRG neurons are lost in TrkA deficient mice. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 15, 5929–5942.
- Simone, D.A., Baumann, T.K., Collins, J.G., and LaMotte, R.H. (1989). Sensitization of cat dorsal horn neurons to innocuous mechanical stimulation after intradermal injection of capsaicin. *Brain Res.* 486, 185–189.
- Sivilotti, L., and Woolf, C.J. (1994). The contribution of GABAA and glycine receptors to central sensitization: disinhibition and touch-evoked allodynia in the spinal cord. *J. Neurophysiol.* 72, 169–179.
- Sorge, R.E., Mapplebeck, J.C.S., Rosen, S., Beggs, S., Taves, S., Alexander, J.K., Martin, L.J., Austin, J.-S., Sotocinal, S.G., Chen, D., et al. (2015). Different immune cells mediate mechanical pain hypersensitivity in male and female mice. *Nat. Neurosci.* 18, nn.4053.

Stellwagen, D., and Malenka, R.C. (2006). Synaptic scaling mediated by glial TNF- α . *Nature* 440, 1054–1059.

Stemkowski, P.L., Noh, M.-C., Chen, Y., and Smith, P.A. (2015). Increased excitability of medium-sized dorsal root ganglion neurons by prolonged interleukin-1 β exposure is K(+) channel dependent and reversible. *J. Physiol.* 593, 3739–3755.

Suga, S., Tsurudome, M., Ito, M., Ohgimoto, S., Tabata, N., Nishio, M., Kawano, M., Komada, H., Ito, M., Sakurai, M., et al. (1997). Human immunodeficiency virus type-1 envelope glycoprotein gp120 induces expression of fusion regulatory protein (FRP)-1/CD98 on CD4+ T cells: a possible regulatory mechanism of HIV-induced syncytium formation. *Med. Microbiol. Immunol. (Berl.)* 185, 237–243.

Sun, S., Cao, H., Han, M., Li, T.-T., Pan, H.-L., Zhao, Z.-Q., and Zhang, Y.-Q. (2007). New evidence for the involvement of spinal fractalkine receptor in pain facilitation and spinal glial activation in rat model of monoarthritis. *Pain* 129, 64–75.

Takahashi, K., Sato, J., and Mizumura, K. (2003). Responses of C-fiber low threshold mechanoreceptors and nociceptors to cold were facilitated in rats persistently inflamed and hypersensitive to cold. *Neurosci. Res.* 47, 409–419.

Takahashi-Iwanaga, H. (2000). Three-dimensional microanatomy of longitudinal lanceolate endings in rat vibrissae. *J. Comp. Neurol.* 426, 259–269.

Takano, T., He, W., Han, X., Wang, F., Xu, Q., Wang, X., Oberheim Bush, N.A., Cruz, N., Dienel, G.A., and Nedergaard, M. (2014). Rapid manifestation of reactive astrogliosis in acute hippocampal brain slices. *Glia* 62, 78–95.

Takazawa, T., and MacDermott, A.B. (2010). Glycinergic and GABAergic tonic inhibition fine tune inhibitory control in regionally distinct subpopulations of dorsal horn neurons. *J. Physiol.* 588, 2571–2587.

Takeda, M., Kitagawa, J., Takahashi, M., and Matsumoto, S. (2008). Activation of interleukin-1beta receptor suppresses the voltage-gated potassium currents in the small-diameter trigeminal ganglion neurons following peripheral inflammation. *Pain* 139, 594–602.

Tanga, F.Y., Raghavendra, V., and DeLeo, J.A. (2004). Quantitative real-time RT-PCR assessment of spinal microglial and astrocytic activation markers in a rat model of neuropathic pain. *Neurochem. Int.* 45, 397–407.

Tanga, F.Y., Natile-McMenemy, N., and DeLeo, J.A. (2005). The CNS role of Toll-like receptor 4 in innate neuroimmunity and painful neuropathy. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 102, 5856–5861.

Thompson, S.W., King, A.E., and Woolf, C.J. (1990). Activity-Dependent Changes in Rat Ventral Horn Neurons in vitro; Summation of Prolonged Afferent Evoked Postsynaptic Depolarizations Produce a d-2-Amino-5-Phosphonovaleric Acid Sensitive Windup. *Eur. J. Neurosci.* 2, 638–649.

Tiong, S.Y.X., Polgár, E., van Kralingen, J.C., Watanabe, M., and Todd, A.J. (2011). Galanin-immunoreactivity identifies a distinct population of inhibitory interneurons in laminae I-III of the rat spinal cord. *Mol. Pain* 7, 36.

Toda, K. (2007). The terms neurogenic pain and psychogenic pain complicate clinical practice. *Clin. J. Pain* 23, 380–381.

- Todd, A.J. (1996). GABA and glycine in synaptic glomeruli of the rat spinal dorsal horn. *Eur. J. Neurosci.* *8*, 2492–2498.
- Todd, A.J. (2010). Neuronal circuitry for pain processing in the dorsal horn. *Nat. Rev. Neurosci.* *11*, 823–836.
- Todd, A.J., and McKenzie, J. (1989). GABA-immunoreactive neurons in the dorsal horn of the rat spinal cord. *Neuroscience* *31*, 799–806.
- Todd, A.J., and Sullivan, A.C. (1990). Light microscope study of the coexistence of GABA-like and glycine-like immunoreactivities in the spinal cord of the rat. *J. Comp. Neurol.* *296*, 496–505.
- Todd, A.J., Maxwell, D.J., and Brown, A.G. (1991). Relationships between hair-follicle afferent axons and glycine-immunoreactive profiles in cat spinal dorsal horn. *Brain Res.* *564*, 132–137.
- Todd, A.J., Spike, R.C., and Polgár, E. (1998). A quantitative study of neurons which express neurokinin-1 or somatostatin sst2a receptor in rat spinal dorsal horn. *Neuroscience* *85*, 459–473.
- Todd, A.J., Puskar, Z., Spike, R.C., Hughes, C., Watt, C., and Forrest, L. (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. Off. J. Soc. Neurosci.* *22*, 4103–4113.
- Todd, A.J., Hughes, D.I., Polgár, E., Nagy, G.G., Mackie, M., Ottersen, O.P., and Maxwell, D.J. (2003). The expression of vesicular glutamate transporters VGLUT1 and VGLUT2 in neurochemically defined axonal populations in the rat spinal cord with emphasis on the dorsal horn. *Eur. J. Neurosci.* *17*, 13–27.
- Tölle, T.R., Berthele, A., Zieglgänsberger, W., Seeburg, P.H., and Wisden, W. (1993). The differential expression of 16 NMDA and non-NMDA receptor subunits in the rat spinal cord and in periaqueductal gray. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* *13*, 5009–5028.
- Tom Tang, Y., Emtage, P., Funk, W.D., Hu, T., Arterburn, M., Park, E.E.J., and Rupp, F. (2004). TFAFA: a novel secreted family with conserved cysteine residues and restricted expression in the brain. *Genomics* *83*, 727–734.
- Towne, C., Pertin, M., Beggah, A.T., Aebischer, P., and Decosterd, I. (2009). Recombinant adeno-associated virus serotype 6 (rAAV2/6)-mediated gene transfer to nociceptive neurons through different routes of delivery. *Mol. Pain* *5*, 52.
- Treede, R.D., Meyer, R.A., Raja, S.N., and Campbell, J.N. (1992). Peripheral and central mechanisms of cutaneous hyperalgesia. *Prog. Neurobiol.* *38*, 397–421.
- Treede, R.D., Meyer, R.A., Raja, S.N., and Campbell, J.N. (1995). Evidence for two different heat transduction mechanisms in nociceptive primary afferents innervating monkey skin. *J. Physiol.* *483* (Pt 3), 747–758.
- Treede, R.D., Meyer, R.A., and Campbell, J.N. (1998). Myelinated mechanically insensitive afferents from monkey hairy skin: heat-response properties. *J. Neurophysiol.* *80*, 1082–1093.
- Tremblay, M.-È., Lowery, R.L., and Majewska, A.K. (2010). Microglial interactions with synapses are modulated by visual experience. *PLoS Biol.* *8*, e1000527.

- Tremblay, M.-È., Stevens, B., Sierra, A., Wake, H., Bessis, A., and Nimmerjahn, A. (2011). The role of microglia in the healthy brain. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* *31*, 16064–16069.
- Tsuda, M., Shigemoto-Mogami, Y., Koizumi, S., Mizokoshi, A., Kohsaka, S., Salter, M.W., and Inoue, K. (2003). P2X4 receptors induced in spinal microglia gate tactile allodynia after nerve injury. *Nature* *424*, 778–783.
- Uta, D., Furue, H., Pickering, A.E., Rashid, M.H., Mizuguchi-Takase, H., Katafuchi, T., Imoto, K., and Yoshimura, M. (2010). TRPA1-expressing primary afferents synapse with a morphologically identified subclass of substantia gelatinosa neurons in the adult rat spinal cord. *Eur. J. Neurosci.* *31*, 1960–1973.
- Vallbo, A.B., and Wessberg, J. (1993). Organization of motor output in slow finger movements in man. *J. Physiol.* *469*, 673–691.
- Vallbo, A.B., Olausson, H., and Wessberg, J. (1999). Unmyelinated afferents constitute a second system coding tactile stimuli of the human hairy skin. *J. Neurophysiol.* *81*, 2753–2763.
- Vincent, K., and Tracey, I. (2008). Hormones and their Interaction with the Pain Experience. *Rev. Pain* *2*, 20–24.
- Vrontou, S., Wong, A.M., Rau, K.K., Koerber, H.R., and Anderson, D.J. (2013). Genetic identification of C fibres that detect massage-like stroking of hairy skin in vivo. *Nature* *493*, 669–673.
- Wallace, J.A., Romero, A.A., Gabaldon, A.M., Roe, V.A., Saavedra, S.L., and Lobner, J. (1996). Tyrosine hydroxylase-containing neurons in the spinal cord of the chicken. I. Development and analysis of catecholamine synthesis capabilities. *Cell. Mol. Neurobiol.* *16*, 625–648.
- Wang, W., Li, T., Wang, X., Yuan, W., Cheng, Y., Zhang, H., Xu, E., Zhang, Y., Shi, S., Ma, D., et al. (2015). FAM19A4 is a novel cytokine ligand of formyl peptide receptor 1 (FPR1) and is able to promote the migration and phagocytosis of macrophages. *Cell. Mol. Immunol.* *12*, 615–624.
- Wang, X., Arcuino, G., Takano, T., Lin, J., Peng, W.G., Wan, P., Li, P., Xu, Q., Liu, Q.S., Goldman, S.A., et al. (2004). P2X7 receptor inhibition improves recovery after spinal cord injury. *Nat. Med.* *10*, 821–827.
- Watkins, L.R., Milligan, E.D., and Maier, S.F. (2001). Glial activation: a driving force for pathological pain. *Trends Neurosci.* *24*, 450–455.
- Woodbury, C.J., and Koerber, H.R. (2007). Central and peripheral anatomy of slowly adapting type I low-threshold mechanoreceptors innervating trunk skin of neonatal mice. *J. Comp. Neurol.* *505*, 547–561.
- Woolf, C.J. (1983). Evidence for a central component of post-injury pain hypersensitivity. *Nature* *306*, 686–688.
- Woolf, C.J., and King, A.E. (1989). Subthreshold components of the cutaneous mechanoreceptive fields of dorsal horn neurons in the rat lumbar spinal cord. *J. Neurophysiol.* *62*, 907–916.
- Woolf, C.J., and Ma, Q. (2007). Nociceptors--noxious stimulus detectors. *Neuron* *55*, 353–364.
- Woolf, C.J., and Mannion, R.J. (1999). Neuropathic pain: aetiology, symptoms, mechanisms, and management. *Lancet Lond. Engl.* *353*, 1959–1964.

Woolf, C.J., and Salter, M.W. (2000). Neuronal plasticity: increasing the gain in pain. *Science* 288, 1765–1769.

Woolf, C.J., and Thompson, S.W. (1991). The induction and maintenance of central sensitization is dependent on N-methyl-D-aspartic acid receptor activation; implications for the treatment of post-injury pain hypersensitivity states. *Pain* 44, 293–299.

Woolf, C.J., Shortland, P., and Coggeshall, R.E. (1992). Peripheral nerve injury triggers central sprouting of myelinated afferents. *Nature* 355, 75–78.

Xu, Z.-Z., Zhang, L., Liu, T., Park, J.Y., Berta, T., Rong-Yang, Serhan, C.N., and Ji, R.-R. (2010). Resolvins RvE1 and RvD1 Attenuate Inflammatory Pain via Central and Peripheral Actions. *Nat. Med.* 16, 592–597.

Yaksh, T.L. (1989). Behavioral and autonomic correlates of the tactile evoked allodynia produced by spinal glycine inhibition: effects of modulatory receptor systems and excitatory amino acid antagonists. *Pain* 37, 111–123.

Yamamoto, T., and Yaksh, T.L. (1992). Comparison of the antinociceptive effects of pre- and posttreatment with intrathecal morphine and MK801, an NMDA antagonist, on the formalin test in the rat. *Anesthesiology* 77, 757–763.

Yamashita, Y., Akaike, N., Wakamori, M., Ikeda, I., and Ogawa, H. (1992). Voltage-dependent currents in isolated single Merkel cells of rats. *J. Physiol.* 450, 143–162.

Yasaka, T., Kato, G., Furue, H., Rashid, M.H., Sonohata, M., Tamae, A., Murata, Y., Masuko, S., and Yoshimura, M. (2007). Cell-type-specific excitatory and inhibitory circuits involving primary afferents in the substantia gelatinosa of the rat spinal dorsal horn in vitro. *J. Physiol.* 581, 603–618.

Yasaka, T., Tiong, S.Y.X., Hughes, D.I., Riddell, J.S., and Todd, A.J. (2010a). Populations of inhibitory and excitatory interneurons in lamina II of the adult rat spinal dorsal horn revealed by a combined electrophysiological and anatomical approach. *Pain* 151, 475–488.

Yasaka, T., Tiong, S.Y.X., Hughes, D.I., Riddell, J.S., and Todd, A.J. (2010b). Populations of inhibitory and excitatory interneurons in lamina II of the adult rat spinal dorsal horn revealed by a combined electrophysiological and anatomical approach. *Pain* 151, 475–488.

Ying, B., Lü, N., Zhang, Y.-Q., and Zhao, Z.-Q. (2006). Involvement of spinal glia in tetanically sciatic stimulation-induced bilateral mechanical allodynia in rats. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 340, 1264–1272.

Yu, X.H., Zhang, E.T., Craig, A.D., Shigemoto, R., Ribeiro-da-Silva, A., and De Koninck, Y. (1999). NK-1 receptor immunoreactivity in distinct morphological types of lamina I neurons of the primate spinal cord. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 19, 3545–3555.

Yu, X.H., da Silva, A.R., and De Koninck, Y. (2005). Morphology and neurokinin 1 receptor expression of spinothalamic lamina I neurons in the rat spinal cord. *J. Comp. Neurol.* 491, 56–68.

Zeilhofer, H.U., Wildner, H., and Yévenes, G.E. (2012). Fast synaptic inhibition in spinal sensory processing and pain control. *Physiol. Rev.* 92, 193–235.

Zhang, E.-T., and Craig, A.D. (1997). Morphology and Distribution of Spinothalamic Lamina I Neurons in the Monkey. *J. Neurosci.* 17, 3274–3284.

Zhang, E.T., Han, Z.S., and Craig, A.D. (1996). Morphological classes of spinothalamic lamina I neurons in the cat. *J. Comp. Neurol.* *367*, 537–549.

Zhuang, Z.-Y., Kawasaki, Y., Tan, P.-H., Wen, Y.-R., Huang, J., and Ji, R.-R. (2007). Role of the CX3CR1/p38 MAPK pathway in spinal microglia for the development of neuropathic pain following nerve injury-induced cleavage of fractalkine. *Brain. Behav. Immun.* *21*, 642–651.

Ziegler, E.A., Magerl, W., Meyer, R.A., and Treede, R.-D. (1999). Secondary hyperalgesia to punctate mechanical stimuli: Central sensitization to A-fibre nociceptor input. *Brain* *122*, 2245–2257.

Zotterman, Y. (1939). Touch, pain and tickling: an electro-physiological investigation on cutaneous sensory nerves. *J. Physiol.* *95*, 1–28.

Zylka, M.J., Dong, X., Southwell, A.L., and Anderson, D.J. (2003). Atypical expansion in mice of the sensory neuron-specific Mrg G protein-coupled receptor family. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *100*, 10043–10048.

La perception de la douleur résulte de l'intégration dans la moelle épinière des informations sensorielles et nociceptives transmises par les afférences primaires. Parmi celles-ci, les Mécanorécepteurs C à bas seuil (C-LTMR), exprimant la chimiokine TFAFA4, ont été identifiés comme des modulateurs de la douleur. Cependant, les mécanismes sous-jacents au contrôle de l'intégration sensori-nociceptive par TFAFA4 restent mal compris. Grâce aux enregistrements obtenus *in vitro* par patch clamp chez des souris naïves, nous montrons que l'application exogène de TFAFA4 induit une diminution de la fréquence des courants post-synaptiques excitateurs spontanés (CPSE). À l'inverse nous observons une augmentation de la fréquence des événements synaptiques inhibiteurs spontanés (CPSI). Cette modulation de l'activité synaptique est préservée avec TTX, indiquant que TFAFA4 modifie la transmission synaptique par des mécanismes présynaptiques. En stimulant les fibres nociceptives à haut seuil d'activation, nous démontrons que TFAFA4 induit une augmentation du ratio des réponses synaptiques des interneurons évoquées par des stimulations d'impulsions paires. Par conséquent, TFAFA4 renforce l'inhibition présynaptique des fibres nociceptives. Nous démontrons également que les effets de TFAFA4 sur la transmission excitatrice spontanée et évoquée sont bloqués par des antagonistes des récepteurs GABA, indiquant que les C-LTMRs interagissent principalement avec les neurones GABAergiques. De plus, des expériences de microscopie électronique ont révélé la présence de contacts synaptiques directs entre les C-LTMRs et les terminaisons GABAergiques dans la lamina Iii. Pour aller plus loin dans la caractérisation des effets de TFAFA4 sur la transmission de la douleur, nous avons induit une inflammation de la patte arrière des souris (modèle CFA). Chez ces souris, l'effet de TFAFA4 sur la fréquence EPSC et IPSC est conservé. Nous constatons que chez les souris CFA, TFAFA4 diminue la décharge neuronale enregistrée *in vivo* suite à une stimulation mécanique nociceptive de la patte inflammée. Cet effet est bloqué par une injection d'antagonistes des récepteurs GABA. En effectuant le test Von Frey sur des souris inflammées, nous montrons que l'action anti-allodymique induite par l'injection intrathécale de TFAFA4 est bloquée par les antagonistes des récepteurs GABA. Nous avançons l'hypothèse que les C-LTMRs contactent directement les interneurons GABAergiques de la corne dorsale et que, via la libération de TFAFA4, renforcent l'activité synaptique inhibitrice participant à l'effet anti-nociceptif de TFAFA4. En outre, TFAFA4 favorise la rétraction microgliale chez les animaux inflammés, ainsi qu'une augmentation du nombre de synapses inhibitrices sur les somas des neurones de la lamina Iii. En conclusion, ces résultats identifient les interneurons GABAergiques comme premier relais d'intégration pour les C-LTMRs et mettent en évidence une nouvelle interaction entre les neurones sensoriels, les cellules microgliales et les interneurons de la moelle épinière, permettant une modulation fine de l'activité inhibitrice et de la transmission nociceptive en situation pathologique.

Pain elaboration results from the integration within dorsal spinal cord of sensory and nociceptive information conveyed by primary afferents. Among these, C low-threshold Mechano Receptors (C-LTMR), expressing the chemokine TFAFA4, were identified as modulators of pain. However, mechanisms underlying the control of sensori-nociceptive integration by TFAFA4 remains poorly understood. Using *in vitro* patch clamp recording on spinal cord slices of naïve mice we show that, bath application of TFAFA4 induces a decrease in frequency of spontaneous excitatory post synaptic currents (EPSCs). This effect is mirrored by an increase in frequency of spontaneous inhibitory synaptic events (IPSCs). This modulation of synaptic activity is preserved with TTX, indicating that TFAFA4 alters synaptic transmission through presynaptic mechanisms. By recruiting high threshold nociceptive fibers, we demonstrate that TFAFA4 induces an increase in the paired pulse ratio of evoked synaptic responses in interneurons, and thus, reinforces presynaptic inhibition of nociceptive fibers. We also demonstrate that the effects of TFAFA4 on spontaneous and evoked excitatory transmission are blocked by antagonists of GABA receptors, indicating that C-LTMRs mainly interact with GABAergic neurons. Moreover, Electron Microscopy provides evidence of direct synaptic contacts between C-LTMRs and GABAergic terminals in lamina Iii. To further characterize the effects of TFAFA4 on pain transmission, we inflamed mice using Complete Freund Adjuvant (CFA). In CFA mice, the effect of TFAFA4 on EPSC and IPSC frequency is preserved. We find that in CFA mice, TFAFA4 decreases the neuronal discharge recorded *in vivo* following a nociceptive mechanical stimulation in inflamed hindpaw. This effect is blocked by an injection of GABA receptors antagonists. By performing Von Frey test on inflamed mice, we show that intrathecal injection of TFAFA4 provides anti-allodynic effects blocked by GABA receptors antagonists. We propose that C-LTMR directly contact GABAergic interneurons in dorsal horn, and, through the liberation of TFAFA4 reinforce inhibitory synaptic activity which may in turn promote their anti-nociceptive activity. Furthermore, TFAFA4 promotes microglial retraction in CFA inflamed animals, together with an increase in the number of inhibitory synapses on lamina Iii somata. Altogether, these results identify GABAergic interneurons as the first integration relay for C-LTMRs and highlight a novel interplay between sensory neurons, microglial cells and spinal interneurons leading to a fine tuning of inhibitory activity and nociceptive transmission in pathological conditions.

