



HAL
open science

Modulation de la transmission synaptique inhibitrice par les récepteurs NMDA dans la corne dorsale de la moelle épinière de souris

Benjamin Leonardon

► To cite this version:

Benjamin Leonardon. Modulation de la transmission synaptique inhibitrice par les récepteurs NMDA dans la corne dorsale de la moelle épinière de souris. Neurosciences [q-bio.NC]. Université de Strasbourg, 2020. Français. NNT : 2020STRAJ006 . tel-03154803

HAL Id: tel-03154803

<https://theses.hal.science/tel-03154803>

Submitted on 1 Mar 2021

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

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

ÉCOLE DOCTORALE DES SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTÉ
UPR 3212 CNRS

THÈSE présentée par :
Benjamin LEONARDON

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

Discipline : **Sciences de la vie et de la santé**

Spécialité : **Neurosciences**

**Modulation de la transmission synaptique inhibitrice
par les récepteurs NMDA dans la corne dorsale de la
moelle épinière de souris.**

THÈSE dirigée par :

M Rémy SCHLICHTER Professeur, Université de Strasbourg

Encadrée par :

Mme Perrine INQUIMBERT Maître de conférences, Université de Strasbourg

RAPPORTEURS EXTERNES :

M Mariano CASADO Maître de Conférences, Institut de Biologie de l'Ecole Normale Supérieure

M Daniel VOISIN Professeur, Université de Bordeaux

EXAMINATRICE INTERNE :

Mme Ipek YALCIN Chargée de recherche, Université de Strasbourg

Cette thèse a été effectuée à l'Institut des Neurosciences Cellulaire et Intégratives, dans l'équipe « Signalisation nociceptive dans la moelle épinière ». Ce travail a été réalisé grâce au soutien financier de la région Grand Est et du fond Paul-Mandel pour les neurosciences.

Remerciements

Je voudrais d'abord adresser mes remerciements aux Dr. Daniel Voisin, Ipek Yalcin, Mariano Casado, Rémy Schlichter et Perrine Inquimbert, pour m'avoir fait l'honneur de faire partie de mon jury de thèse. Recevez ma profonde gratitude pour l'intérêt que vous avez porté à mon travail.

Ces trois années de thèse ont été riches d'enseignements et je tiens à remercier les personnes ayant contribué de près ou de loin à les rendre aussi intéressantes, en commençant par les membres de mon équipe.

Je tiens à remercier mon encadrante de thèse, le Dr. Perrine Inquimbert, qui m'a accompagné pendant ces trois années. Je vous suis très reconnaissant de m'avoir permis de réaliser ce travail de thèse et d'avoir partagé avec moi votre passion pour les neurosciences, ainsi que votre expertise d'électrophysiologiste. Merci également d'avoir suivi de près mon travail et la rédaction de ma thèse.

J'exprime toute ma gratitude à mon directeur de thèse, le Dr. Rémy Schlichter. Vos connaissances approfondies dans notre domaine de recherche, ainsi que vos qualités humaines ont été grandement appréciées.

Sylvain, merci beaucoup pour tes conseils avisés et tes remarques toujours judicieuses.

Catherine et Chantal, merci pour votre aide quotidienne qui a contribué à la bonne réalisation de ce travail de thèse.

Lou, Louise et Lucien, j'ai été très heureux de travailler à vos côtés. J'ai particulièrement apprécié nos pauses café aux sujets de discussions imprévisibles.

A mes autres amis rencontrés en thèse, Charlotte, Baptiste, Taddy, Varen, Federica, Théo, Ludo, Xavier, Léa, Gilles, Clémence, Géraldine... : Merci pour tous les moments partagés au labo et surtout en dehors. Grâce à vous, j'ai vécu d'excellentes années à Strasbourg. Merci à mes amis de plus longue date et aux membres du « crew », pour avoir été à mes côtés toutes ces années.

J'adresse enfin mes remerciements à ma famille. A mes grands-parents, Pierre, Michelle, Jean et Claudie, merci d'avoir été pour moi une source d'inspiration et pour tout votre amour. Merci aux autres membres de ma famille, mes oncles, mes tantes, mes cousins et cousines : Quentin, Hugo, Thibaut, Toinou, Jordi, Rafaël, Tomas, Valentine et Bébé pierre.

A mes parents, François et Suzy, et à ma sœur, Sarah, je vous remercie de tout mon cœur, pour avoir toujours été présents, positifs et de bons conseils. Merci d'avoir rendu tout cela possible.

Enfin, merci à toi, Shani, pour ton soutien et tout l'amour que l'on partage. Je te remercie d'être présente à mes côtés.

Résumé

Les nocicepteurs détectent les stimuli nocifs en périphérie (peau, muscles, viscères) et les transmettent aux cornes dorsales de la moelle épinière. Celles-ci jouent un rôle fondamental dans l'intégration, la modulation et la transmission des informations nociceptives. Cette intégration implique un réseau d'interneurones excitateurs et inhibiteurs. L'équilibre entre l'excitation et l'inhibition détermine l'intensité du message transmis aux centres supraspinaux où la sensation douloureuse est élaborée.

Au sein du réseau de la corne dorsale, la transmission synaptique inhibitrice met en jeu l'acide γ -aminobutyrique (GABA) et la glycine et joue un rôle important dans le traitement des informations nociceptives. Suite à une lésion nerveuse, cette inhibition peut présenter des changements plastiques menant à une diminution de l'inhibition synaptique spinale aussi appelée désinhibition. Cette plasticité fonctionnelle de l'inhibition spinale est un des mécanismes à l'origine du développement et du maintien des douleurs neuropathiques. D'autre part, les récepteurs du glutamate de type N-méthyl D-aspartate (NMDA) sont largement exprimés et recrutés suite à une lésion nerveuse. Bien que leur rôle dans les phénomènes de plasticité de la synapse excitatrice soit bien étudié, leur implication dans la plasticité de l'inhibition spinale reste peu connue. Notre objectif était donc d'étudier l'effet de l'activation des récepteurs NMDA sur l'inhibition synaptique spinale.

Pour cela nous avons utilisé des approches d'électrophysiologie sur tranches aiguës de moelle épinière de souris adulte dans lesquelles nous avons analysé l'effet d'une application de NMDA sur les courants postsynaptiques inhibiteurs spontanés, miniatures et évoqués (sCPSIs, mCPSIs et eCPSIs).

Nos résultats montrent que l'activation des récepteurs NMDA induit une facilitation de la libération synaptique de GABA dans une sous-population neuronale mais n'a aucun effet sur la transmission glycinergique. Par une approche pharmacologique, nous avons mis en évidence que l'activation des récepteurs NMDA contenant les sous-unités GluN2C/D était responsable de l'effet observé. L'utilisation de souris transgéniques GAD65::EGFP nous a ensuite permis de révéler que la quasi-totalité des neurones GABAergiques enregistrés reçoit une inhibition synaptique GABAergique facilitée par l'activation des récepteurs NMDA ce qui pourrait mener à la désinhibition du réseau spinal. Nous avons ensuite montré qu'un maillon glial est requis pour obtenir l'effet facilitateur à un type spécifique de synapse constitué d'un neurone présynaptique inhibiteur et d'un neurone postsynaptique excitateur. Ce maillon glial permet l'activation des récepteurs NMDA, en partie via la libération de D-sérine. Enfin, sur le modèle de douleur neuropathique périphérique du Spared nerve injury (SNI), nos résultats indiquent que 2 semaines après la réalisation de la lésion nerveuse, la transmission GABAergique spontanée est potentialisée et l'effet facilitateur du NMDA est augmenté. De plus, en condition miniature, la proportion de neurones recevant une inhibition synaptique GABAergique potentialisée par l'activation des récepteurs NMDA tend à être augmentée.

En conclusion, la réalisation de ce projet de thèse a permis d'améliorer la compréhension du rôle des récepteurs NMDA dans la modulation et la plasticité de la transmission synaptique GABAergique au sein du réseau nociceptif spinal. La modulation de la transmission GABAergique par l'activation de ces récepteurs NMDA pourrait jouer un rôle important à la fois dans le traitement des informations nociceptives et dans le développement et la chronicisation des états douloureux.

Table des matières

Résumé	3
Table des matières	4
Tables des illustrations et tableaux.....	8
Abréviations	11
<i>Introduction</i>	13
Avant-propos	14
Première partie : Les cornes dorsales de la moelle épinière au sein du système somatosensoriel spinal.	16
1. Organisation des cornes dorsales de la moelle épinière.....	16
1.1 Cytoarchitecture	17
1.2 Neurochimie des laminae superficielles de la cornes dorsale (Laminae I-III).....	18
1.2.1 Neurones excitateurs	19
1.2.2 Neurones inhibiteurs	21
2. Les fibres afférentes primaires	22
2.1 Classification et propriétés des fibres afférentes.....	22
2.2 Projection des fibres afférentes dans la corne dorsale de la moelle épinière	23
3. Connectivité des neurones des laminae I à III.....	24
4. Plasticité des réseaux neuronaux dans les cornes dorsales de la moelle épinière	25
5. Les cellules gliales dans le système nociceptif spinal.....	26
5.1 Rôle physiologique.....	26
5.2 Rôle dans la plasticité du système nociceptif spinal	27
6. Communication avec les structures supra-spinales.....	28
6.1 Les voies de sortie de l'information.....	28
6.2 Les contrôles descendants	29
Seconde partie : La transmission synaptique inhibitrice dans la corne dorsale.	30
1. Caractéristique de la transmission synaptique inhibitrice rapide	30
1.1 Les trois types de transmission inhibitrice	30
1.2 Synthèse, stockage et recapture du GABA et de la glycine	31
1.3 Les récepteurs GABA _A et glycine.....	32
1.3.1 Le récepteur GABA _A	32
1.3.2 Le récepteur de la glycine	33

2. Rôle de la transmission synaptique inhibitrice dans le système nociceptif au sein des cornes dorsales	34
2.1 Modulation pharmacologique de la transmission synaptique inhibitrice.....	34
2.2 Les fonctions de la transmission synaptique inhibitrice dans le système nociceptif au seins des cornes dorsales	36
3. Plasticité de la transmission synaptique inhibitrice en condition pathologique.....	38
3.1 Les modèles animaux de douleur neuropathique suite à une lésion du nerf sciatique.....	38
3.2 Modification de l'inhibition spinale suite à une lésion nerveuse	39
3.2.1 La réduction de l'excitation des interneurons inhibiteurs.	39
3.2.2 La perte d'interneurones inhibiteurs	39
3.2.3 Modification de la synthèse, de la recapture et de la libération de GABA.....	41
3.2.4 Changement du gradient chlorure	42
4. Plasticité activité-dépendante de la transmission inhibitrice dans le système nerveux central.....	43
4.1 Plasticité présynaptique de la transmission GABAergique induite par un messenger rétrograde	44
4.2 Plasticité exprimée sur l'élément postsynaptique	46
4.3 Plasticité de la transmission inhibitrice impliquant un maillon glial	48
Troisième partie : Le récepteur NMDA.	50
1. Découverte des récepteurs NMDA	50
2. Propriétés des récepteurs NMDA.....	51
2.1 Structure des récepteurs NMDA	51
2.2 Activation des récepteurs NMDA	52
2.3 Propriétés biophysique du récepteur NMDA	52
2.3.1 Activité pharmacologique des ligands	52
2.3.2 Cinétiques d'activation, de désactivation, perméabilité et sensibilité au magnésium et probabilité d'ouverture.....	55
2.3.3 Désensibilisation, endocytose et déphosphorylation des récepteurs NMDA.....	56
3. Distribution des récepteurs NMDA.....	57
3.1 : Expression des sous-unités du récepteur NMDA.....	57
3.2. Localisation cellulaire et subcellulaire des récepteurs NMDA et rôle physiologique	60
3.2.1 Sur les neurones excitateurs	60
3.2.2 Sur les interneurons inhibiteurs	62

3.2.3 Sur les cellules gliales	63
4. Sources des ligands endogènes dans la ME	65
5. Rôle physiopathologique des récepteurs NMDA dans la ME.....	66
5.1 Rôle physiologique.....	66
5.2 Rôle dans le développement et le maintien de douleurs neuropathiques.....	67
5.2.1 La sensibilisation centrale	68
5.2.2 Effet d'un blocage ou d'une délétion spécifique des récepteurs NMDA.....	69
Objectif de la thèse.....	72
<i>Matériels et méthodes</i>	73
I. Animaux et traitements	74
1. Animaux utilisés.....	74
2. Induction de la neuropathie	74
II. Préparation des tranches transversales de moelle épinière.....	74
1. Prélèvement de la moelle épinière par laminectomie	75
2. Réalisation des coupes transversales	75
III. Enregistrements électrophysiologiques.....	75
1. Dispositif expérimental.....	76
2. Types d'enregistrements réalisés	76
3. Pipettes et milieux intracellulaire.....	78
4. Déroulement des enregistrements	78
5. Acquisition et stockage de données	79
IV. Substances pharmacologiques et utilisation du fluorocitrate.....	79
1. Préparation des substances pharmacologiques	79
2. Préparation et utilisation du fluorocitrate	79
V. Analyse des données	80
1. Détection des courants postsynaptiques.....	80
2. Analyse de la fréquence d'apparition des CPS	80
3. Analyse de l'amplitude des CPS.....	81
4. Ajustement des courants postsynaptiques inhibiteurs miniatures.....	81
5. Statistiques et représentation des données	82
<i>Résultats</i>	83
Résultat partie I	84
Résultat partie II.....	113
Discussion partie II.....	121

Résultat partie III.....	128
Discussion partie III	134
<i>Discussion et Perspectives</i>	139
Conclusion.....	154
<i>Bibliographie</i>	157

Tables des illustrations et tableaux

INTRODUCTION

Figure 1 : Système somatosensoriel

Figure 2 : Histologie d'un segment lombaire de la ME humaine

Figure 3 : Illustration obtenue par imagerie confocale des quatre types neuronaux observés dans la lamina II sur des tranches de moelle épinières de rat adulte

Figure 4 : Représentation schématique d'une synapse glutamatergique du SNC où les familles de récepteurs au glutamate sont représentées

Figure 5 : Proportions des différentes populations d'interneurones en fonction des marqueurs neurochimiques exprimés

Figure 6 : Projection des fibres afférentes A β , A δ et C dans la corne dorsale de la moelle épinière

Figure 7 : Représentation schématique simplifiée des principaux réseaux neuronaux identifiés à ce jour au niveau des laminae I à III

Figure 8 : Représentation des interactions entre neurone et cellules gliales suite à une lésion nerveuse périphérique

Figure 9 : Représentation schématique des trois types de terminaisons synaptiques inhibitrices

Figure 10 : Structure des récepteurs GABAA et glycine et diversité des sous-unités

Figure 11 : Distribution des neurones GABAergiques et glycinergiques dans la CDME

Figure 12 : Distribution laminaire des sous-unités des récepteurs GABAA et de la glycine

Figure 13 : Schéma du contrôle du portillon (Gate-control theory of pain) de Melzack et Wall.

Tableau 1 : Les quatre principales fonctions de l'inhibition dans le système nociceptif

Figure 14 : Modèles animaux fréquemment utilisés dans l'étude des douleurs neuropathiques suite à une lésion du nerf sciatique

Figure 15 : Schéma des modulations potentielles de la transmission synaptique inhibitrice suite à une lésion nerveuse

Figure 16 : Représentation des différentes formes de plasticités de la synapse GABAergique exprimées à l'élément présynaptique

Figure 17 : Représentation de certaines formes de plasticité de la synapse GABAergique et glycinergique exprimées à l'élément postsynaptique

Figure 18 : Contribution des récepteurs ionotropiques du glutamate à la transmission synaptique

Figure 19 : Structure et comparaison des sept sous-unités des récepteurs NMDA

Figure 20 : Structure du récepteur NMDA

Figure 21 : Mode d'activation classique du récepteur NMDA

Tableau 2 : Pharmacologie des récepteurs NMDA

Figure 22 : Propriétés biophysiques des récepteurs NMDA en fonction de la composition en sous-unités

Figure 23 : Expression des sous-unités des récepteurs NMDA dans la moelle épinière

Figure 24 : Sources de glutamate et des co-agonistes glycine et D-sérine dans la moelle épinière de souris adulte

Figure 25 : Rôle physiopathologique des récepteurs NMDA dans les neurones de la CDME et mécanismes de plasticités

Figure 26 : La sensibilisation centrale

Figure 27 : La délétion conditionnelle de la sous-unité GluN1 des récepteurs NMDA dans la corne dorsale empêche la transition de l'allodynie aigüe à chronique

MATERIELS ET METHODES

Figure 28 : Le modèle du "spared nerve injury" (SNI)

Figure 29 : Prélèvement de la moelle épinière de souris par laminectomie et réalisation des tranches transversales de 300 µm d'épaisseur

Figure 30 : Schéma du montage expérimental

Figure 31 : Observation d'une tranche transversale de moelle épinière lombaire visualisée en lumière transmise

Figure 32 : Obtention de la configuration appelée « cellule entière »

Tableau 3 : Composition en mM du sucrose-ACSF et de l'ACSF (2 et 0mM de Mg²⁺)

Tableau 4 : Composition en mM du milieu intracellulaire

Tableau 5 : Substances pharmacologiques utilisées en perfusion en bain et en incubation pour le fluorocitrate

RESULTATS

Article 1 : NMDA receptor activation modulates GABAergic synaptic transmission in the dorsal horn of the spinal cord

PARTIE II

Figure 33 : Effet du fluorocitrate et de la D-sérine sur la transmission GABAergique spontanée de base

Figure 34 : Effet du fluorocitrate et de la D-sérine sur la transmission GABAergique miniature de base

Figure 35 : Effet de l'application de NMDA sur la transmission GABAergique spontanée après incubation des tranches avec du FC (100µM ; 30min) et perfusion avec la D-sérine (50µM ; 20min)

Figure 36 : Effet de l'application de NMDA sur la transmission GABAergique miniature après incubation des tranches dans le FC et perfusion avec la D-sérine

Figure 37 : Effet de la perfusion de DAAO sur la transmission GABAergique spontanée dans des tranches de ME non traitées

Figure 38 : Etude de l'effet du FC et d'une application de NMDA au niveau de la population des neurones GABAergiques

Tableau 6 : Caractéristiques des CPSI spontanée et miniature dans les différentes conditions présentés dans la partie II en absence ou en présence de NMDA.

Figure 39 : Hypothèses de régulations de la transmission synaptique GABAergique par les cellules gliales dans la lamina II

Figure 40 : Quelles sont les possibles sources de co-agoniste des récepteurs NMDA ?

PARTIE III

Figure 41 : Effet de la neuropathie sur la transmission GABAergique spontanée

Figure 42 : Effet de la neuropathie sur la fréquence et les cinétiques des mCPSIs GABAergiques

Figure 43 : Activation endogène des récepteurs NMDA durant la neuropathie

Figure 44 : Effet de l'application de NMDA sur la transmission GABAergique spontanée pendant la neuropathie

Figure 45 : Effet de l'application de NMDA sur la transmission GABAergique miniature suite au développement de la neuropathie

Tableau 7 : Caractéristiques des CPSI spontanée et miniature dans les différentes conditions présentés dans la partie III en absence ou en présence de NMDA

Figure 46 : Modulation de la transmission GABAergique en condition neuropathique et activation endogène des récepteurs NMDA

DISCUSSIONS ET PERSPECTIVES

Figure 47 : Effet de l'activation des récepteurs NMDA dans la lamina II et rôle de la glie dans leurs activations

Figure 48 : Conséquence de l'activation des récepteurs NMDA sur la libération spontanée ou évoquée de GABA

Figure 49 : Fonction possible des récepteurs NMDA localisés à la terminaison des neurones GABAergiques dans la lamina II en condition physiologique

Figure 50 : Hypothèses sur l'implication des récepteurs NMDA dans le développement et le maintien d'un état neuropathique

Abréviations

2-AG : 2-arachidonoylglycérol

ACSF : solution cérébro-spinale artificielle

sACSF : solution cérébro-spinale artificielle enrichie en sucrose

AMPA : acide α -amino-3-hydroxy-5-méthyl-4-isoxalone-propionique

AP5: acide 2-amino-5-phosphonoalérique

ARNm : acide ribonucléique messenger

ATP : adénosine triphosphate

BDNF : facteur neurotrophique issu du cerveau

CaMKII : protéine kinase 2 dépendante du complexe Ca^{2+} /calmoduline

CCI : “chronic constriction injury”

CD : corne dorsale

CDME: corne dorsale de la moelle épinière

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

CPS : courants postsynaptiques

CPSE : courant postsynaptique excitateur

CPSI : courant postsynaptique inhibiteur

sCPSI : courant postsynaptique inhibiteur spontané

mCPSI : courant postsynaptique inhibiteur miniature

DAAO : D-Aminoacide oxydase

DNQX : 6,7-dinitroquinoxaline-2,3-dione

EAAT : transporteur des acides aminés excitateurs

EGFP : “Enhance green fluorescent protein”

FC : DL-Fluorocitric acid barium salt (Fluorocitrate)

GABA : acide γ -aminobutyrique

GABA_AR : récepteur au GABA de type A

GAD 65 : glutamate décarboxylase 65

GAD 67 : glutamate décarboxylase 67

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

GAT (1-4) : transporteur membranaire du GABA

GLT : transporteur membranaire du glutamate
GluN : sous-unité du récepteur NMDA
vGLUT : transporteur vésiculaires du glutamate
iGluRs : récepteurs ionotropes du glutamate
mGluRs : récepteurs métabotropes du glutamate
GlyR : récepteur à la glycine
GlyT : transporteur membranaire de la glycine
KCC2 : co-transporteur potassium-chlorure
LTD : dépression à long terme de la transmission synaptique
LTP : potentialisation à long terme de la transmission synaptique
ME : moelle épinière
MK-801 : Dizocilpine
NBQX : 2,3-dihydroxy-6-nitro-7-sulfamoyl-benzo[f]quinoxaline
NMDA : N-méthyl-D-aspartate
NMDAR : récepteur NMDA
NO : monoxyde d'azote
nNOS : forme neuronale de la synthase du monoxyde d'azote
PKA : protéine kinase A
PKC : protéine kinase C
PKC γ : protéine kinase C de type gamma
PPR : "paired-pulse ratio"
PV+ : Neurones positifs à la parvalbumine
SNC : système nerveux central
SNI : "spared nerve injury"
SNL : "spinal nerve ligation"
SOM+ : neurones positifs à la somatostatine
SP : substance P
 τ activation : cinétique d'activation d'un courant synaptique exprimée en ms
 τ désactivation : cinétique de désactivation d'un courant synaptique exprimée en ms
TTX : tétrodotoxine
VIAAT : transporteur vésiculaire des acides aminés inhibiteur

Introduction

Avant-propos

Les cornes dorsales (CD) de la moelle épinière (ME) jouent un rôle fondamental dans le traitement des informations nociceptives. Celles-ci reçoivent l'information nociceptive détectée en périphérie (peau, muscles, viscères) par les nocicepteurs. L'information est ensuite intégrée au sein de la CD, grâce à des réseaux d'interneurones excitateurs, inhibiteurs et de cellules gliales. L'équilibre entre l'excitation et l'inhibition définit l'intensité du message transmis aux centres supraspinaux où la sensation douloureuse est élaborée. Dans la CD, des mécanismes de plasticité peuvent avoir lieu en condition de douleur chronique et modifier le traitement de l'information nociceptive.

Dans la CD, la transmission synaptique inhibitrice met en jeu deux neurotransmetteurs : l'acide γ -aminobutyrique (GABA) et la glycine. Cette transmission joue un rôle clef dans la régulation de l'équilibre excitation/inhibition. Par exemple, un blocage pharmacologique des récepteurs GABA_A et/ou de la glycine induit le développement d'hyperalgésie thermique et d'allodynie mécanique. On définit l'hyperalgésie comme l'augmentation de l'efficacité d'un stimulus nociceptif et l'allodynie comme la perception d'une douleur en réponse à un stimulus non nociceptif. Dans certains cas pathologiques, par exemple suite à une lésion nerveuse, la transmission synaptique inhibitrice peut présenter des changements plastiques menant à une diminution de l'inhibition synaptique spinale aussi appelée désinhibition. Cette plasticité fonctionnelle de l'inhibition spinale est un des mécanismes à l'origine du développement et du maintien des douleurs neuropathiques. La plasticité de la synapse inhibitrice joue donc un rôle clef dans le traitement des informations nociceptives. Dans plusieurs régions du système nerveux central, des mécanismes de plasticité de la synapse inhibitrice ont été observés, en revanche très peu d'études ont porté sur la plasticité activité dépendante de la synapse inhibitrice au sein de la CD.

Dans la CD, le principal neurotransmetteur libéré par les fibres afférentes est le glutamate. L'activité de ces fibres est augmentée en condition neuropathique, ce qui entraîne une augmentation de la libération de glutamate dans la CD. Cette augmentation de libération de glutamate induit le recrutement de récepteurs NMDA. Ce récepteur joue un rôle important dans les mécanismes de modulations des synapses excitatrices et dans le développement des douleurs neuropathiques, cependant son implication dans la modulation de la transmission synaptique inhibitrice dans la ME n'est pas connue.

L'hypothèse à la base de notre étude est que l'activation des récepteurs NMDA au sein du réseau de la CD pourrait induire une modulation et une plasticité fonctionnelle de la transmission synaptique inhibitrice et jouer un rôle dans le développement et le maintien des douleurs neuropathiques.

Durant ma thèse, je me suis donc intéressé aux changements de la transmission synaptique inhibitrice dans la corne dorsale de la moelle épinière et en particulier dans la lamina II qui est une zone recevant une grande partie des informations nociceptives provenant de la périphérie. J'ai caractérisé l'effet de l'activation des récepteurs NMDA sur la transmission synaptique inhibitrice chez des animaux sains et chez des animaux présentant une douleur neuropathique induite par une lésion partielle du nerf sciatique.

D'autres part, les cellules gliales de la CD expriment une grande variété de récepteurs pour des neurotransmetteurs dont les récepteurs NMDA. En plus de leur rôle de soutien, il est maintenant connu que ces cellules modulent la transmission synaptique par la libération de gliotransmetteurs tels que le glutamate, la D-sérine, l'ATP ou le GABA. Ces raisons nous ont amené à étudier le rôle des cellules gliales dans l'effet induit par une application de l'acide N-méthyl-D-aspartique (NMDA) sur la transmission synaptique inhibitrice.

L'introduction de ma thèse sera divisée en trois parties. Je commencerai par faire le point sur la structure anatomo-fonctionnelle des cornes dorsales de la moelle épinière en portant un intérêt particulier à **la lamina II**. Dans la seconde partie je présenterai les caractéristiques générales de **la transmission synaptique inhibitrice** ainsi que les modifications de celle-ci observées suite à une lésion nerveuse. Un bref point sera aussi fait sur les mécanismes de plasticité de la transmission inhibitrice observée dans la ME et dans d'autres régions du SNC. Enfin la troisième partie sera consacrée au **récepteur NMDA**. Ses caractéristiques, sa distribution spinale, et son rôle dans les mécanismes de plasticité et de mise en place de douleurs neuropathiques dans la ME seront décrits.

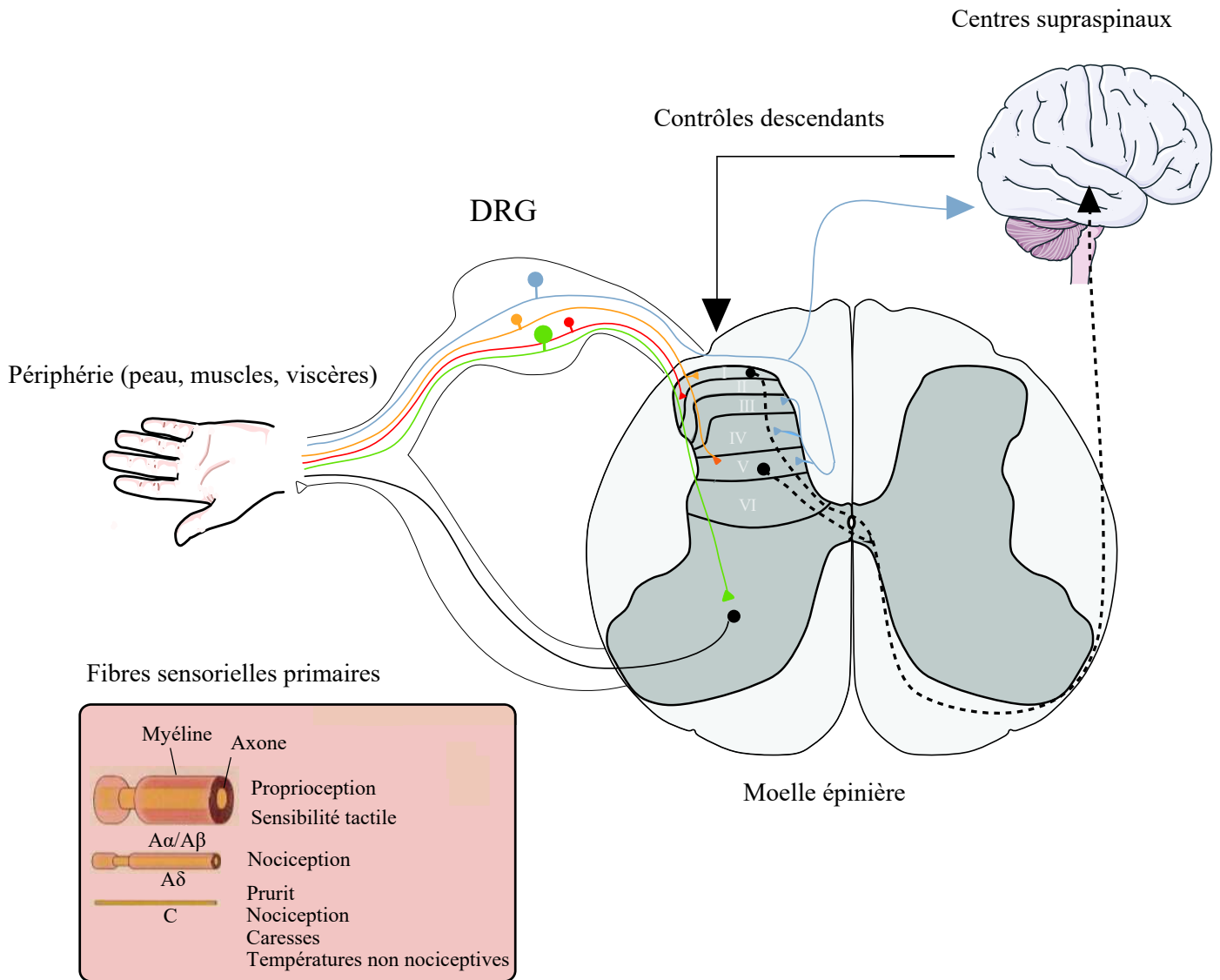


Figure 1 : Système somatosensoriel.

Les fibres sensorielles primaires détectent les stimuli en périphérie (peau, muscles, viscères) et les transmettent à la ME. Les informations sont traitées dans la ME avant d'être transmises aux centres supraspinaux qui peuvent, en réponse à ces informations, émettre des contrôles descendants pour moduler le traitement spinal. Les fibres bleues représentent les fibres Aβ proprioceptives, les fibres jaunes représentent les fibres Aδ nociceptives et mécaniques, les fibres rouges représentent les fibres C nociceptives et les fibres vertes représentent les fibres A contactant les motoneurones de la corne ventrale. Les chiffres romains indiquent les différentes laminae de la CD. DRG : Ganglion dorso-rachidiens

Première partie :

Les cornes dorsales de la moelle épinière au sein du système somatosensoriel spinal.

La moelle épinière (ME) et plus particulièrement les cornes dorsales (CD) jouent un rôle central au sein du système somatosensoriel dont la fonction est de détecter les stimuli sensoriels reçus par notre organisme. En effet les informations somatosensorielles détectées en périphérie (peau, muscles et viscères) sont acheminées jusqu'aux CDME par les axones des neurones sensoriels primaires dont les corps cellulaires se trouvent dans les ganglions rachidiens. Ces axones aussi appelés fibres afférentes primaires transmettent l'information nociceptive et non nociceptive. L'information dite nociceptive résulte d'un stimulus menaçant l'intégrité de l'organisme. Les fibres $A\alpha/\beta$ empruntent la voie des cordons dorsaux et projettent des collatérales vers la CD, ces fibres transmettent généralement des informations proprioceptives et mécaniques non nociceptives. Les fibres $A\delta$ et C font synapses dans la CD et sont décrites comme majoritairement nociceptives (Brown, 1982; Todd, 2010). Il y a donc au niveau des CD un premier relais de l'information nociceptive entre afférences primaires et neurones spinaux (Brown et al., 1987; Millan, 1999). Les CDME ne sont cependant pas qu'une simple structure relais, elles jouent aussi un rôle majeur dans la modulation de l'information grâce à un réseau local d'interneurones excitateurs et inhibiteurs (Millan, 1999). L'équilibre entre l'excitation et l'inhibition au sein de ce réseau définit l'intensité du message transmis par les neurones de projection aux centres supra spinaux où la sensation de douleur est élaborée suite à l'intégration entre différentes régions corticales. Ces structures peuvent émettre en réponse des projections descendantes modulant le traitement des informations spinales (Figure 1).

1. Organisation des cornes dorsales de la moelle épinière

D'un point de vue anatomique, la ME s'étend en direction caudale par rapport au tronc cérébral. Chez l'homme et les rongeurs, elle est divisée en région cervicale, thoracique, lombaire, sacrée et coccygienne. Sur une coupe transversale de tranche de ME, les corps cellulaires des neurones constituent la substance grise et sont entourés par la substance blanche. On divise la substance grise en cornes dorsales (CD) (ou postérieures) et cornes ventrales (ou antérieures). Les neurones des CD reçoivent les informations sensorielles provenant des fibres afférentes primaires qui passent par les racines dorsales puis projettent dans la CD. Les cornes ventrales contiennent les corps cellulaires des neurones moteurs dont les axones, sortants par les racines ventrales, innervent les muscles. Ces divisions principales de la

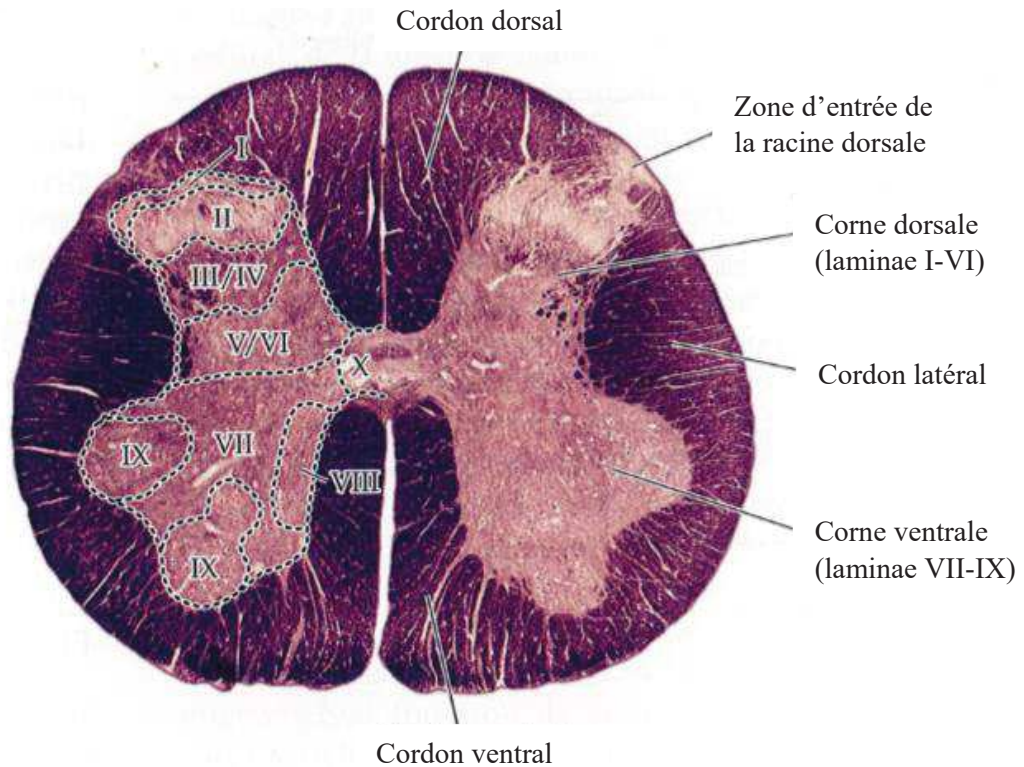


Figure 2 : Histologie d'un segment lombaire de la ME humaine.

Photographie d'une coupe retouchée afin de simuler une coloration de la myéline. Les zones foncées indiquent la présence de fibres myélinisées à l'inverse des zones claires, faiblement myélinisées. On remarque que les axones myélinisés se trouvent principalement dans la substance blanche tandis que la substance grise, et en particulier la lamina II, est faiblement myélinisée. A gauche, les lignes en pointillés indiquent les délimitations des laminae de Rexed. D'après Purves et al., 2012.

substance grise ont fait l'objet de subdivisions supplémentaires en fonction des différents types neuronaux. Ainsi Rexed a montré chez le chat, en se basant sur des différences de taille et de densité des corps cellulaires des neurones, que ceux-ci présentent une organisation en couches dans la CD et en colonnes longitudinales dans la corne ventrale (Rexed, 1954). Il proposa un système de classification en 10 laminae qui comprend les laminae de la CD (I à VI), de la corne ventrale (VII à IX) et la lamina X qui entoure le canal de l'épendyme. Cette classification a depuis été étendue à d'autres espèces dont les primates, les rongeurs et l'homme (Figure 2).

1.1 Cytoarchitecture

Afin de mieux comprendre l'organisation des CDME, une brève description de la composition neuronale des différentes laminae est donnée ci-dessous. Il faut noter qu'il n'y a pas de frontières nettes entre deux laminae adjacentes mais plutôt des zones de transitions.

La lamina I est une couche fine recevant principalement des informations nociceptives transmises par les fibres C. Cette lamina contient la plus dense population de neurone de projection de la CD qui représente environ 5% des neurones de cette lamina (Zhang et Craig, 1997; Saeed et Ribeiro-da-Silva, 2013). Les neurones de la lamina I comprennent des neurones possédant des récepteurs NK1 des neurokinines qui représentent pour la plupart des neurones de projections (Al-Khater et al., 2008). Ils ont un arbre dendritique localisé au sein de la lamina I qui s'étend dans l'axe rostrocaudal. Les autres neurones de la lamina I sont des interneurones (Spike et al., 2003), ils ont un arbre dendritique qui s'étend vers la partie ventrale et pénètre dans la lamina II (Almarestani et al., 2007; Cordero-Erausquin et al., 2009) voire même les laminae III-IV (Kosugi et al., 2013).

La lamina II, aussi appelée substance gélatineuse de Rolando dû à son aspect translucide en microscopie optique en lumière transmise, est une des principales zones d'entrée des informations nociceptives provenant de fibres C principalement et de fibres A δ . Cette lamina a la particularité d'être composée uniquement d'interneurones locaux excitateurs et inhibiteurs de petit diamètre ce qui fait de cette lamina un lieu dédié à l'intégration et à la modulation de l'information nociceptive (Lorenzo et al., 2008; Todd, 2015). La lamina II peut être divisée en deux zones en fonction de la répartition des types neuronaux. La lamina II externe (côté dorsal) et la lamina II interne (côté ventral). Il existe quatre types morphologiques de neurones décrit chez les rongeurs : les neurones en îlots, centraux, radiaux et verticaux (Figure 3). Cependant cette classification ne permet pas de décrire tous les types de neurones (Grudt et Perl, 2002; Yasaka et al., 2007). **Les neurones en îlots** sont principalement localisés dans la partie interne de la lamina II et possèdent une arborisation dendritique s'étendant dans l'axe rostrocaudal sur plus de 400 μ m chez le rat tandis que **les neurones centraux**, aussi localisés dans la lamina II interne, ont une arborisation dendritique rostrocaudale plus courte. **Les neurones radiaux** se retrouvent dans

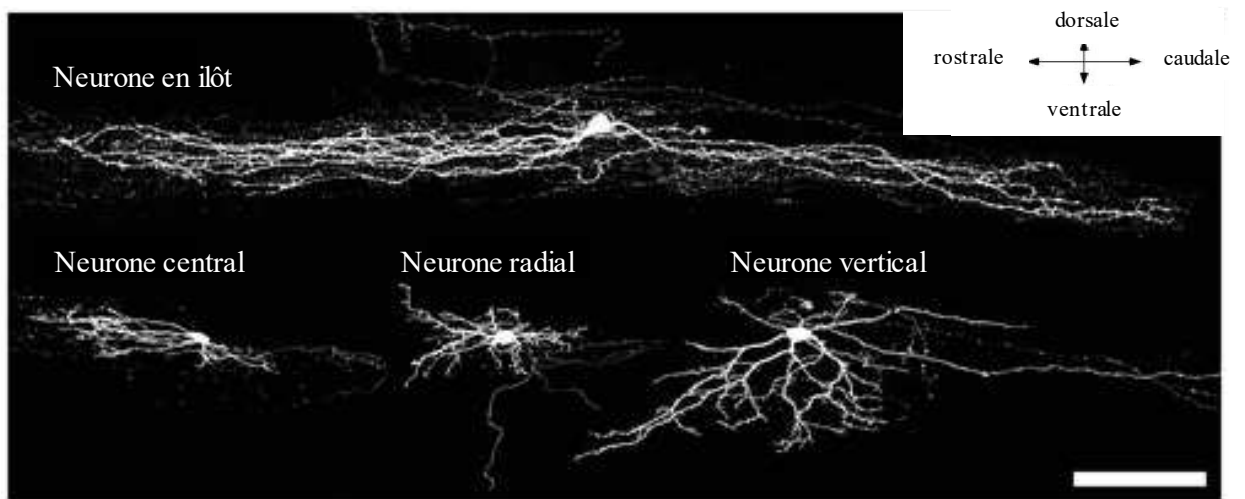


Figure 3 : Illustration obtenue par imagerie confocale des quatre types neuronaux observés dans la lamina II sur des tranches de moelle épinières de rat adulte.

Ces différents types neuronaux ont été identifiés par Grudt et Perl (2002) en fonction de leur morphologie et arborisation dendritique. De la neurobiotine dans la pipette d'enregistrement a permis de marquer les neurones avec de l'avidine fluorescente après les enregistrements. Barre d'échelle : 100 μ M. D'après Yasaka et al., 2010.

toute la lamina II avec une arborisation en étoile. Enfin, **les neurones verticaux** ont leurs corps cellulaires dans la lamina II externe et ont une arborisation dendritique dorsoventrale qui peut atteindre la lamina III.

Les neurones de la lamina II possèdent différents motifs de décharge de potentiels d'action suite à leur activation par injection d'un courant dépolarisant. On retrouve ainsi des neurones avec un profil de décharge « tonique », défini comme une décharge régulière de potentiels d'action tout au long de la stimulation. Des neurones dit « phasiques » caractérisés par une décharge transitoire de potentiels d'actions. On retrouve aussi des neurones avec un profil de décharge « unique » qui ne génère qu'un seul potentiel d'action pendant la stimulation. Les neurones dont le profil de décharge est dit « avec délai » présentent un temps de latence entre le début de la stimulation et l'apparition du premier potentiel d'action (Grudt et Perl, 2002).

Pour récapituler, la lamina II est la principale zone d'entrée des fibres afférentes nociceptives de type C et A δ . De plus, le réseau de cette lamina est constitué exclusivement d'interneurones locaux, aucun neurone de projection n'est retrouvé au sein de cette lamina. La lamina II est donc dédié à la modulation de l'information nociceptive avant la transmission de l'information aux autres laminae.

Les laminae III–IV possèdent une densité de corps cellulaires faible comparé aux laminae plus superficielles et reçoivent des informations directes provenant principalement des fibres A β et A δ . Ces laminae sont composées de neurones de projections et d'interneurones locaux divisés en deux groupes. Les interneurones à axones locaux et les interneurones à axones profonds (Schneider, 2003; Schneider et Walker, 2007). Ces neurones ont une arborisation dendritique dorsoventrale limitée pour les interneurones à axones locaux et au contraire étendue pour les interneurones à axones profonds qui peuvent pénétrer dans les laminae superficielles et profondes. Le territoire axonal des interneurones à axones locaux s'étend de façon rostrocaudal aux seins des laminae III-IV tandis que les interneurones à axones profonds projettent ventralement et innervent les laminae IV à VI (Schneider, 1992, 2003).

Les laminae V-VI possèdent des neurones de projection et des interneurones qui peuvent être multi-modaux (Wide dynamic range) et qui reçoivent à la fois des informations nociceptives et non nociceptives. Leur arborisation dendritique s'étend de la lamina III à la lamina VII dans l'axe rostrocaudale et mediolatérale. Certains neurones de la lamina V ont des dendrites atteignant la lamina II (Braz et al., 2005).

1.2 Neurochimie des laminae superficielles de la cornes dorsale (Laminae I-III)

Dans la CD, on retrouve des neurones de projection à destination supraspinales et des interneurones locaux. Les neurones de projection sont exclusivement excitateurs et utilisent le glutamate

comme neurotransmetteur. Les interneurons locaux qui constituent la grande majorité des neurones des CDME peuvent être séparés en deux groupes fonctionnels principaux : les interneurons excitateurs et les interneurons inhibiteurs.

1.2.1 Neurones excitateurs

Quantification des neurones excitateurs

L'identification des interneurons excitateurs par des approches d'immunohistochimie classiques a été compliquée par le fait que le glutamate est retrouvé dans de nombreux types cellulaires. Par élimination, il est donc généralement considéré que les interneurons excitateurs sont les interneurons ne contenant pas d'acide γ -aminobutyrique (GABA) et/ou de glycine qui sont les deux neurotransmetteurs rapides inhibiteurs dans les CDME. Les interneurons excitateurs représentent plus de la moitié des neurones de la CD et comptent pour environ 60-70% des neurones des laminae I à III (Todd, 2010).

Marqueurs des neurones excitateurs

Plusieurs marqueurs neurochimiques ont permis d'établir des sous-populations de neurones excitateurs comme la calrétinine et la calbindine qui lient le calcium, la protéine kinase C γ (PKC γ), la somatostatine (SOM⁺), la neurokinine B (NKB), la neurotensine, le « gastrin-releasing peptide » (GRP) (Gutierrez-Mecinas et al., 2016) (Pour une revue récente voir Todd (2017)).

L'utilisation de marqueurs spécifiques des transporteurs vésiculaires du glutamate (vGLUT1, vGLUT2 et vGLUT3) pour marquer les axones de neurones glutamatergiques a permis de révéler que virtuellement tous les neurones de la CD reçoivent des entrées synaptiques glutamatergiques. vGLUT1 apparait plus exprimé dans les laminae III et IV tandis que vGLUT2 est retrouvé dans les laminae I et II (Todd et al., 2003; Alvarez et al., 2004). Enfin il apparait que vGLUT3 peut être exprimé transitoirement à la bordure des laminae II et III.

Types neuronaux excitateurs

S'il n'y a pas de corrélation exacte entre neurochimie et morphologie, les neurones verticaux, radiaux ainsi que les neurones centraux (avec un profil de décharge transitoire) sont majoritairement excitateurs (Grudt et Perl, 2002; Yasaka et al., 2010). Il existe cependant des exceptions montrant que certains neurones radiaux peuvent être inhibiteurs (Maxwell et al., 2007) et il en va de même pour les neurones verticaux. Par exemple, par des approches immunohistochimiques, 2 neurones verticaux sur 6 testés ou 3 sur 15 selon l'étude ont été montrés de nature inhibitrice (Lu et Perl, 2005; Maxwell et al., 2007; Yasaka et al., 2010).

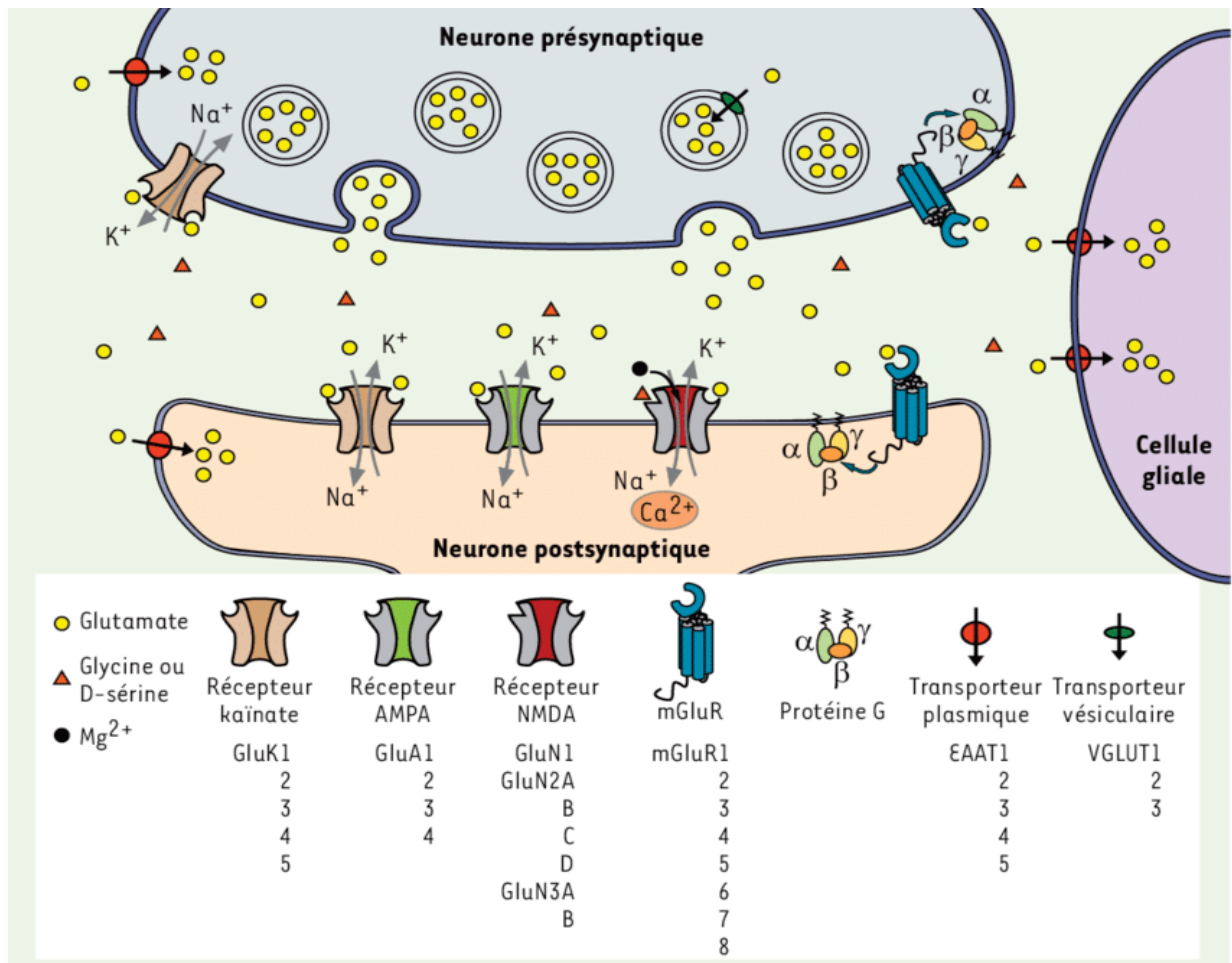


Figure 4 : Représentation schématique d'une synapse glutamatergique du SNC où les familles de récepteurs au glutamate sont représentées.

Le glutamate libéré dans la fente synaptique se lie aux récepteurs ionotropes et métabotropes du glutamate. Une fois dissocié du récepteur, il est recapturé par les EAATs localisés sur les membranes des astrocytes et des neurones. Les récepteurs ionotropes sont perméables aux cations Na⁺, K⁺ et Ca²⁺, la perméabilité au Ca²⁺ étant particulièrement élevée pour les récepteurs NMDA. L'activation des récepteurs ionotropes exprimés à l'élément postsynaptique permet de dépolariser le neurone postsynaptique et d'initier la formation de potentiels d'actions. Ces récepteurs ont des cinétiques d'activation rapide et sont responsables de la transmission excitatrice rapide dans le SNC. Les récepteurs métabotropes du glutamate ont des cinétiques d'activations plus lentes et sont responsables des modulations lentes mais durables des réponses synaptiques. Pour chaque récepteur, les différentes sous-unités existantes sont indiquées. mGluR : Récepteur métabotrope du glutamate ; EAATs : Transporteurs membranaires des acides aminés excitateurs ; vGLUT : Transporteur vésiculaire du glutamate. D'après Gielen 2010.

Transmission synaptique excitatrice

Le glutamate est le neurotransmetteur excitateur le plus répandu dans le système nerveux central des mammifères. Une fois libéré dans la fente synaptique, il peut atteindre des concentrations allant jusqu'à 1mM pendant un bref instant (de l'ordre de la milliseconde) (Clements et al., 1992). Le glutamate va alors pouvoir se lier à deux grandes familles de récepteurs qui sont les récepteurs métabotropes (mGluRs) et ionotropes (iGluRs) du glutamate. Une fois dissocié du récepteur, le glutamate est rapidement recapturé par des transporteurs des acides aminés excitateurs (excitatory amino acid transporter ou EAAT) localisés sur les membranes des astrocytes principalement et des neurones (Figure 4).

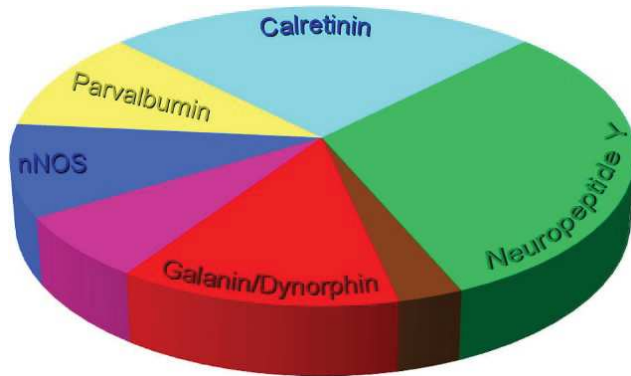
Les récepteurs métabotropes du glutamate

Les mGluRs sont des récepteurs à sept domaines transmembranaires couplés aux protéines G qui activent ou inhibent différentes voies intracellulaires en fonction de la protéine G à laquelle ils sont couplés (Niswender et Conn, 2010). Dans la ME, la majorité des mGluRs sont exprimés à l'exception de mGluR6 et 8 (Valerio et al., 1997). Il existe aussi un motif d'expression en fonction des laminae, ainsi on retrouve mGluR1 dans les laminae I et V, mGluR5 dans les laminae I et II (Alvarez et al., 2000) et mGluR2 et 3 dans la lamina II interne (Aronica et al., 2001). Les mGluRs sont exprimés aux extrémités de la densité postsynaptique ainsi qu'à l'élément présynaptique (Azkue et al., 2000). Les mGluRs ont des cinétiques d'activation relativement lentes de l'ordre de 50 ms (Attwell et Gibb, 2005). Ils ne répondent en général qu'à des expositions prolongées au glutamate et sont responsables des modulations lentes et plus durables des réponses synaptiques notamment via la régulation de canaux potassium et calcium, et des iGluRs (Conn et Pin, 1997).

Les récepteurs ionotropes du glutamate

Les iGluRs sont des récepteurs canaux responsables de la transmission synaptique excitatrice rapide. Ils ont été répartis en quatre sous-groupes de récepteurs en fonction de leur pharmacologie (Watkins et Jane, 2006) : les récepteurs NMDA, AMPA, Kaïnate et Delta (Dingledine et al., 1999). Ces derniers étant très peu caractérisés, ils ne seront pas détaillés par la suite. Le nom des récepteurs du glutamate vient des agonistes qui les activent spécifiquement : Le NMDA (N-méthyl-D-aspartate), l'AMPA (acide α -amino-3-hydroxy-5-méthyl-4-isoxalone-propionique) et l'acide kaïnique. Ces récepteurs sont des tétramères dont les segments transmembranaires forment un canal perméable aux ions sodium (Na^+), potassium (K^+) et calcium (Ca^{2+}). Les récepteurs AMPA et NMDA sont exprimés à la densité postsynaptique. Leur activation induit la dépolarisation de la membrane du neurone et la formation de potentiels d'action. Ces récepteurs peuvent aussi être exprimés sur l'élément présynaptique où ils exercent alors une modulation de la libération de neurotransmetteurs et sur les éléments extrasynaptiques où ils exercent différentes fonctions. Pour revue voir Petralia et al. (2010) et Chapitre III. Les récepteurs Kaïnate ont une localisation pré ou extrasynaptiques et jouent un rôle de modulateur

Neurones inhibiteurs



Neurones excitateurs

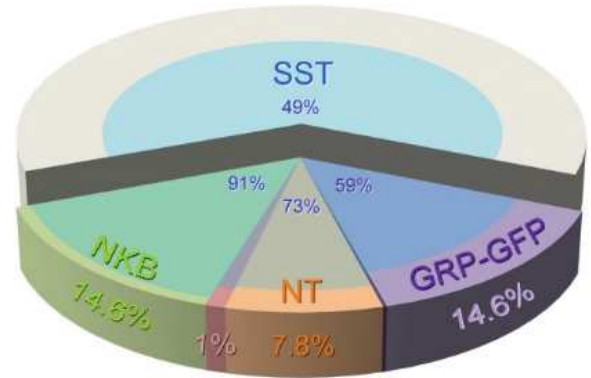


Figure 5 : Proportions des différentes populations d'interneurones en fonction des marqueurs neurochimiques exprimés.

A gauche : Le graphique représente les proportions d'interneurones inhibiteurs dans les laminae I et II en fonction des marqueurs exprimés.

La zone mauve représente les neurones qui co-expriment la Galanine/Dynorphine et l'oxyde nitrique synthase neuronale (nNOS) tandis que la zone marron représente les neurones co-exprimant la Galanine/Dynorphine et le Neuropeptide Y. Il existe aussi une légère co-expression du Neuropeptide Y avec la nNOS et la Parvalbumine (non représenté sur ce graphique). D'après Boyle et al., 2017.

A droite : Le graphique représente les proportions d'interneurones excitateurs dans les laminae I et II en fonction des marqueurs exprimés.

La somatostatine (SST) est exprimée par la plupart des neurones. La proportion de neurone exprimant la SST est par exemple de 91% pour les neurones exprimant la Neurokinine B (NKB), de 73% pour les neurones exprimant la neurotensine (NT) et de 59% pour les neurones exprimant le « gastrin-releasing peptide » (GRP). Il existe aussi une co-expression chez peu de neurones (1%) de la NT, de la NKB et du « gastrin-releasing peptide ». D'après Gutierrez-Mecinas et al., 2016.

de la transmission synaptique similaire à celui des mGluRs (Lerma, 2003). A la différence des mGluRs, les iGluRs ont des cinétiques d'activation rapide de l'ordre de la milliseconde pour les récepteurs AMPA/Kaïnate et de la dizaine de milliseconde pour les récepteurs NMDA. Cette caractéristique leur permet d'initier des réponses synaptiques rapides suite à une brève libération de glutamate.

1.2.2 Neurones inhibiteurs

Quantification des neurones inhibiteurs

Pour identifier les neurones inhibiteurs, il est possible d'utiliser des anticorps dirigés contre les neurotransmetteurs GABA/glycine (Todd et Sullivan, 1990). L'identification spécifique des interneurons GABAergiques peut être réalisée avec des anticorps dirigés contre les glutamate décarboxylases (GAD 65 et GAD 67) (McLaughlin et al., 1975) qui sont les deux enzymes responsables de la synthèse du GABA. L'identification des interneurons glycinergiques peut être réalisée avec des anticorps anti-GlyT2 (Spike et al., 1997) qui est le transporteur membranaire de la glycine exprimé par les neurones glycinergiques de la ME.

Par des approches immunohistochimiques, il a été montré que les interneurons GABAergiques et glycinergiques sont distribués dans toute la substance grise de la CD (Barber et al., 1982; Spike et al., 1997). Les interneurons GABAergiques sont particulièrement nombreux dans les laminae I-III tandis que la distribution des interneurons glycinergiques est faible dans la lamina II (Todd et McKenzie, 1989). Ainsi, les neurones inhibiteurs représentent environ 25% des neurones dans la lamina I, 33% des neurones dans la lamina II et 40% des neurones dans la lamina III (Polgár et al., 2003; Polgár et al., 2013). Il n'y a pas de quantification précise dans les couches plus profondes mais il semble que le nombre de neurones inhibiteurs diminue (Barber et al., 1982).

Marqueurs des neurones inhibiteurs

L'utilisation de marqueurs neurochimiques a aussi permis de classer les interneurons inhibiteurs. Ainsi, cinq populations ont pu être identifiées dans les laminae I et II chez le rat et regroupent plus de la moitié des interneurons inhibiteurs. Les populations identifiées comprennent les neurones exprimant le neuropeptide Y (NPY) (Polgár et al., 2011), la galanine (Simmons et al., 1995), la parvalbumine, la forme neuronale de la synthase du monoxyde d'azote "neuronal Nitric Oxide Synthase" (nNOS) (Sardella et al., 2011) et la calretinine (Boyle et al., 2017) (Figure 5). Les interneurons exprimant la parvalbumine semblent correspondre à certains neurones en îlots de la lamina II. Pour revue : Todd (2017).

Types neuronaux inhibiteurs

Dans la lamina II, une étude électrophysiologique et morphologique a permis de montrer que les neurones en îlots sont exclusivement inhibiteurs et leur stimulation induit dans le neurone cible un courant postsynaptique inhibiteur (CPSI) sensible à la bicuculline, un antagoniste des récepteurs GABA_A (Lu et Perl, 2003; Maxwell et al., 2007). D'autre part les neurones centraux avec un profil de décharge tonique sont eux aussi principalement inhibiteurs (Grudt et Perl, 2002). Comme il a été précisé plus haut, les neurones radiaux et verticaux bien que principalement excitateurs peuvent aussi être inhibiteurs pour certains (Lu et Perl, 2005; Maxwell et al., 2007; Yasaka et al., 2010).

La co-transmission GABA-glycine

La plupart des neurones de la CD reçoivent à la fois des entrées synaptiques GABAergiques et glycinergiques (Chéry et De Koninck, 1999; Cronin et al., 2004; Inquimbert et al., 2007; Rajalu et al., 2009). Dans les laminae I et II, les neurones marqués par un anticorps anti-glycine sont aussi marqués par un anticorps anti-GABA indiquant la présence de GABA et de glycine au sein d'un même neurone. Il existe également dans les couches superficielles pendant le développement une co-transmission GABA/glycine se traduisant par l'apparition de courants postsynaptiques inhibiteurs mixtes GABA/glycine (Chéry et De Koninck, 1999; Keller et al., 2001; Rajalu et al., 2009). Cette co-transmission n'est pas détectée dans les laminae III et IV chez le jeune rat (P10-15) (Inquimbert et al., 2007). Il a été montré que la co-détection disparaît à l'âge adulte mais peut réapparaître suite à une inflammation (Keller et al., 2001; Poisbeau et al., 2005; Inquimbert et al., 2007).

Rôle de la transmission synaptique inhibitrice

La transmission synaptique inhibitrice rapide a un rôle essentiel dans le traitement spinal des informations sensorielles et permet de maintenir un équilibre entre excitation et inhibition. La perte de cet équilibre au profit d'une inhibition plus faible ou d'une excitation plus forte peut mener au développement de symptômes associés aux douleurs chroniques tel que l'hyperalgésie ou l'allodynie. L'hyperalgésie est définie comme l'augmentation de l'efficacité d'un stimulus nociceptif et l'allodynie est définie comme la perception d'une douleur en réponse à un stimulus non nociceptif (Latremoliere et Woolf, 2009). A l'inverse, il est généralement admis qu'un excès d'inhibition ou une perte d'excitation induit des phénomènes d'hypoalgésie. Ces différents points seront abordés dans le chapitre II consacré à la transmission synaptique inhibitrice et son rôle dans le traitement des informations sensorielles.

2. Les fibres afférentes primaires

2.1 Classification et propriétés des fibres afférentes

L'information sensorielle est détectée par les neurones sensoriels primaires qui sont des neurones pseudo-unipolaires dont l'axone, se terminant par deux boutons présynaptiques, fait le lien entre la périphérie et le système nerveux central (SNC) par l'intermédiaire d'une synapse excitatrice glutamatergique. Les neurones sensoriels primaires peuvent être répartis en plusieurs catégories selon leurs propriétés morphologiques, fonctionnelles ou neurochimiques (Djoughri et al., 1998; Millan, 1999). La classification la plus répandue est basée sur les propriétés de vitesse de conduction de l'influx nerveux qui est directement liée au diamètre et à la myélinisation de l'axone. Trois groupes de fibres ont été considérés : les fibres A α/β , A δ , et C. Chez l'homme, les fibres A α/β possèdent de gros axones (diamètre >10 μ m) fortement myélinisés qui conduisent rapidement l'information (35-100 m/s). Les fibres A δ possèdent des axones fins (diamètre de 2 à 6 μ m) qui sont peu myélinisés et conduisent l'information plus lentement (5 à 35 m/s). Enfin les fibres du groupe C possèdent les axones les plus fins (diamètre de 0.4 à 1.2 μ m), sont non myélinisés et conduisent l'information très lentement (<2 m/s) (Millan, 1999). Les fibres C sont classées en fibres C peptidergiques, qui libèrent des neuropeptides comme la substance P et le peptide associé au gène de la calcitonine, et en fibres C non peptidergiques (Snider et McMahon, 1998).

La plupart des fibres A α/β transmettent des informations mécaniques non nociceptives bien qu'il existe aussi des fibres A β nociceptives (Djoughri et Lawson, 2004). Les fibres A δ et C sont décrites comme majoritairement nociceptives (Brown, 1982; Todd, 2010) mais là encore il existe des exceptions et certaines fibres C transmettent des informations mécaniques non nociceptives (Alvarez et Fyffe, 2000; Braz et al., 2014).

Les neurones sensoriels primaires spécialisés dans la détection de stimuli nociceptifs sont appelés des nocicepteurs et sont activés par des stimulations mécaniques, thermiques ou chimiques. Les nocicepteurs activés par une seule modalité de ces stimulations sont en général des fibres A δ et les nocicepteurs pouvant répondre à plusieurs stimulus sont dit polymodaux. La majorité des fibres C et quelques fibres A δ font partie de cette catégorie. Pour revue, voir Millan (1999).

2.2 Projection des fibres afférentes dans la corne dorsale de la moelle épinière

Les fibres A α/β projettent vers la moelle allongée qui est un premier relai avant que les informations soient transmises aux centres supra spinaux, tel que le thalamus et le cortex somatosensoriel. Cependant, les fibres A α/β émettent aussi des collatérales qui font un relai dans les CDME. D'autre part, toutes les fibres A δ et C projettent directement dans la CD et la lamina X de la ME (Millan, 1999). Cela signifie que toutes les informations nociceptives sont d'abord acheminées et traitées dans la ME avant d'être transmises aux centres supra spinaux.

Fibre C non peptidergique (lamina II)

Fibre A δ nociceptive (lamina I-IIo, V et X)

Fibre A β proprioceptive (lamina III-V)

Fibre C peptidergique (lamina I-IIo)

Fibre A δ mécanique (lamina III-III)

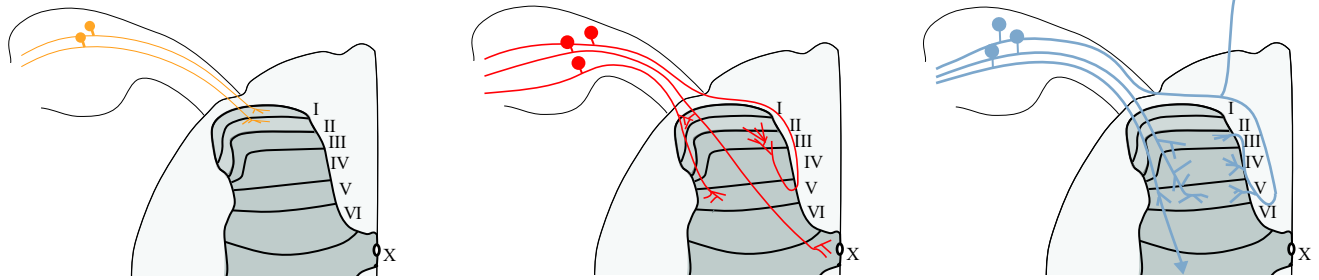


Figure 6 : Projection des fibres afférentes A β , A δ et C dans la corne dorsale de la moelle épinière.

Les fibres C non peptidergiques projettent dans la lamina II tandis que les fibres C non peptidergiques projettent plus dorsalement vers la lamina I et II externe. Les fibres A δ nociceptives contactent les laminae I, II externe, V et X tandis que les fibres A δ mécaniques projettent vers les laminae II interne et III. Enfin les fibres A β proprioceptives contactent les laminae III à V.

Transmission des informations non nociceptives

Les collatérales des fibres A β projettent principalement dans les laminae III et IV et plus rarement dans la lamina II interne. Certaines fibres A δ non nociceptives projettent plus dorsalement dans les laminae II interne et III (Light et Perl, 1979; Brown, 1982) tandis que les fibres C non nociceptives projettent dans la lamina II interne (Seal et al., 2009).

Transmission des informations nociceptives

Les fibres afférentes conduisant l'information nociceptive ont un motif de projection légèrement plus dorsal que les fibres conduisant l'information non nociceptive. On retrouve ainsi les fibres A β qui projettent dans les laminae III à V (Light et Perl, 1979; Djouhri et Lawson, 2004; Duan et al., 2014) tandis que les fibres A δ nociceptives projettent dans les laminae I, II externe et V. Les fibres C nociceptives peptidergiques projettent principalement dans la lamina I et la lamina II externe (Millan, 1999; Basbaum et al., 2009) tandis que les fibres C non peptidergiques terminent dans la lamina II interne (Zylka, 2005) (Figure 6).

Projection sur des types neuronaux spécifiques

Dans les laminae I et II, il existe aussi un motif de connexion des fibres afférentes en fonction des types cellulaires. Dans la lamina I par exemple, les neurones de projection reçoivent des entrées de fibres afférentes de type C (Ikeda et al., 2003; Lu et Perl, 2003) et A δ pour les neurones possédant des récepteurs NK1 des neurokinines (Torsney, 2011; Peirs et al., 2015). Les interneurons de la lamina I sont eux en grande partie contactés par des fibres afférentes de type C peptidergiques (Labrakakis et MacDermott, 2003).

Environ deux tiers des neurones verticaux et radiaux reçoivent des contacts monosynaptiques de fibres A δ (Sandkühler et al., 1997; Yasaka et al., 2007). Les fibres C contactent les quatre principaux types neuronaux (ilôt, central, vertical et radial) (Lu et Perl, 2003; Yasaka et al., 2007) et particulièrement les interneurons en ilôt qui ne reçoivent que des contacts monosynaptiques à partir de fibres C (Yasaka et al., 2007).

Les neurones des laminae I et II reçoivent principalement des entrées synaptiques provenant de fibres C et A δ nociceptives et sont donc essentielles à l'intégration et la modulation de ces informations.

3. Connectivité des neurones des laminae I à III

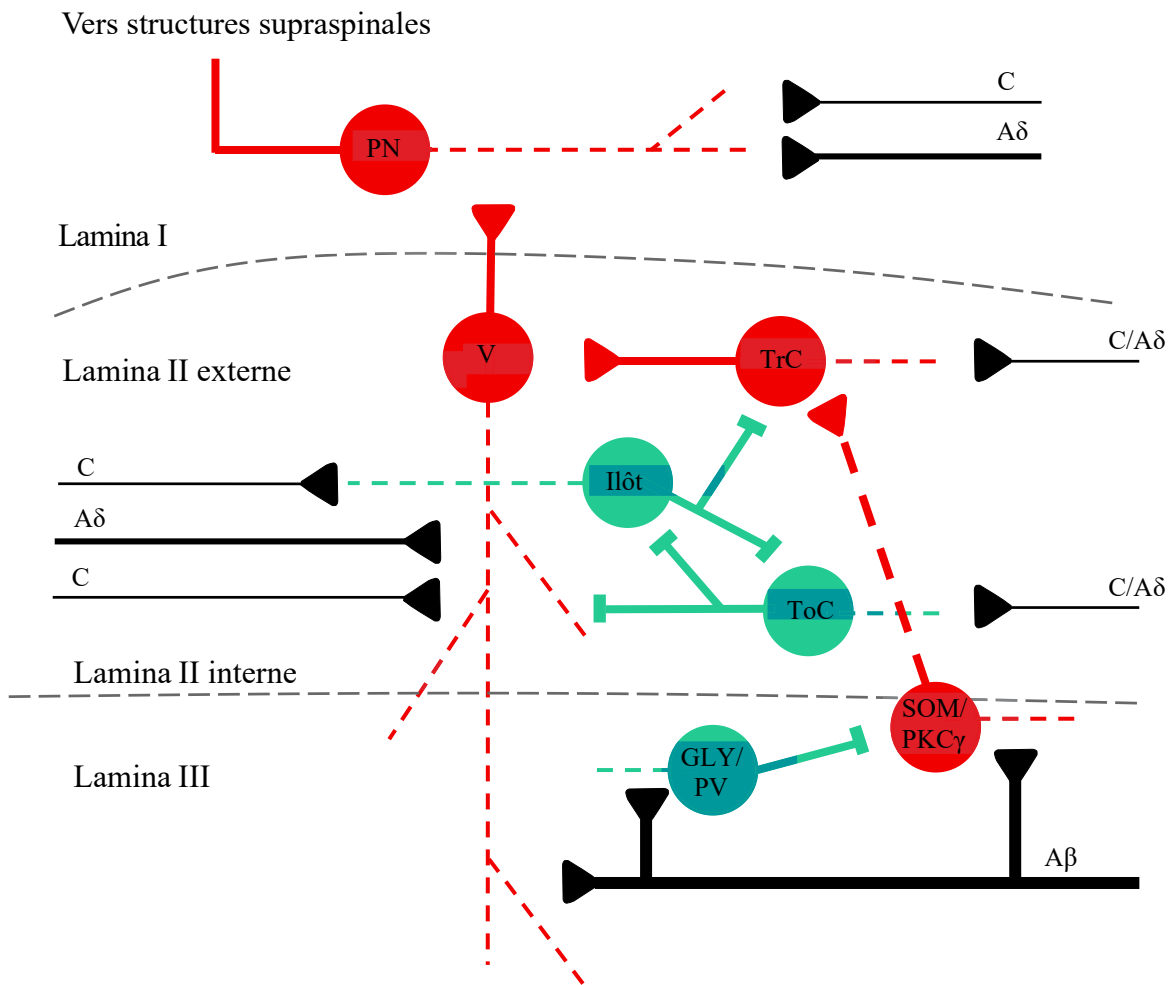


Figure 7 : Représentation schématique simplifiée des principaux réseaux neuronaux identifiés à ce jour au niveau des laminae I à III.

Les neurones en rouge sont excitateurs et utilisent le glutamate comme neurotransmetteur. Les neurones en bleu sont inhibiteurs et utilisent le GABA et/ou la glycine comme neurotransmetteurs. Il est important de noter qu'à l'exception des neurones en ilôts qui sont inhibiteurs, il n'existe pas de corrélation certaine entre la morphologie et la nature neurochimique du neurone. Le motif de projection des fibres afférentes glutamatergiques C, A δ et A β est représenté en noir. PN : Neurone de projection ; V : Neurone vertical ; TrC : Neurone central avec un profil de décharge transitoire ; Ilôt : Neurone en ilôt ; ToC : Neurone central avec un profil de décharge tonique ; SOM : Interneurone positif à la somatostatine ; PKC γ : Interneurone positif à la PKC γ ; Gly : Interneurone glycinergique ; PV : Interneurone positif à la parvalbumine . Modifié de Cordero-Erausquin et al., 2016.

Les enregistrements de neurones en paires dans la CD ont grandement facilité l'étude des réseaux neuronaux. Plusieurs microcircuits ont ainsi pu être identifiés dans les laminae I à III, en grande partie grâce aux travaux de Lu, Perl et Zheng (Figure 7).

Dans la lamina II, Zheng et al. (2010) ont montré une connexion réciproque entre deux types d'interneurones inhibiteurs dans la lamina II qui seraient des neurones en îlots et des neurones centraux avec un profil de décharge tonique. D'autres part, plusieurs connexions ont été mises en évidence dans les laminae I et II. Ainsi il a été montré une connexion entre un neurone en îlot inhibiteur vers un neurone central excitateur (avec un profil de décharge transitoire) (Lu et Perl, 2003). Il a par la suite été montré que les neurones centraux excitateurs contactent les neurones verticaux localisés dans la lamina II externe. Enfin ces neurones verticaux vont contacter un neurone de projection dans la lamina I (Lu et Perl, 2005). A la bordure de la lamina II-III, les neurones PKC γ /SOM⁺ de nature excitatrice sont contactés par des neurones PV⁺/glycine de nature inhibitrice. Il est d'ailleurs montré que la levée de l'inhibition ciblant les neurones PKC γ /SOM⁺ induit la transmission d'information non nociceptive provenant de fibres A β vers les couches superficielles (Miraucourt et al., 2007; Peirs et al., 2015; Petitjean et al., 2015). Enfin les travaux de Santos ont mis en évidence que les neurones excitateurs de la lamina II établissent des contacts synaptiques surtout au sein même de la lamina II (76%) comparé à la lamina I (14%) ou la lamina III (25%) (Santos et al., 2009). Pour plus de détails sur les communications inter-laminaires en conditions physiologique ou pathologique : Cordero-Erausquin et al. (2016); Peirs et Seal (2016).

4. Plasticité des réseaux neuronaux dans les cornes dorsales de la moelle épinière

Des phénomènes de plasticité synaptique et morphologique ont lieu dans les CDME et sont généralement induits par la stimulation répétée et/ou soutenue des afférences primaires, comme par exemple lors d'une inflammation ou d'une lésion nerveuse périphérique. Différentes formes de plasticité sont décrites et sont à l'origine de l'apparition d'états d'hyperalgésie et d'allodynie. On note également l'apparition de douleurs spontanées.

Les mécanismes de plasticité peuvent mener à une diminution de l'inhibition dans la ME et seront décrits dans le chapitre II tandis que les mécanismes de plasticité mettant en jeu les récepteurs NMDA seront abordés dans le chapitre III. Dans les deux cas, ces mécanismes facilitent la mise en place et le maintien de la sensibilisation centrale. La sensibilisation centrale peut être définie comme l'augmentation de la réponse des neurones nociceptifs dans le SNC à leurs stimuli habituels. Elle peut être due à l'augmentation de l'excitabilité membranaire et de l'efficacité de la transmission synaptique.

Une réduction de l'inhibition peut mener à un phénomène de désinhibition dans la ME, aussi impliqué dans la sensibilisation centrale. La sensibilisation centrale est donc une manifestation de la plasticité du système nerveux somatosensoriel en réponse à l'activité électrique (décharge de potentiels d'actions), à une inflammation ou à une lésion nerveuse. Pour une revue détaillée sur la sensibilisation centrale : Latremoliere et Woolf (2009).

5. Les cellules gliales dans le système nociceptif spinal

5.1 Rôle physiologique

Les cellules gliales représentent plus de la moitié des cellules dans le SNC. Elles ont longtemps été considérées comme cellules de soutien et de protection pour les neurones, avec pour fonctions principales de maintenir l'homéostasie ionique, du pH extracellulaire et de fournir aux neurones les substrats métaboliques (glutamine) (Araque et al., 1999; Nedergaard et al., 2003). Au cours des vingt dernières années, il a été montré que ces cellules sont aussi capables de moduler la neurotransmission (Verkhratsky et al., 2011).

Dans les CDME on retrouve des cellules gliales qui sont des astrocytes ou des cellules microgliales dans la substance grise et des oligodendrocytes dans la substance blanche. Les cellules microgliales et les astrocytes ont un rôle dans le développement d'états douloureux bien détaillés par rapport aux oligodendrocytes. Un intérêt particulier sera donc porté à la microglie et aux astrocytes. Ces cellules expriment à leur surface de nombreux récepteurs aux neurotransmetteurs et neuromodulateurs (Watkins et al., 2005; Verkhratsky et Nedergaard, 2018). Parmi les récepteurs exprimés, on retrouve par exemple les récepteurs P2Y, P2X (Watkins et al., 2005), les récepteurs GABA_A (Maldonado et al., 2011) les récepteurs NMDA (chez le rat nouveau-né) (Verkhratsky et Chvátal, 2019). Les astrocytes possèdent des prolongements entourant les éléments pré et postsynaptiques de la synapse et peuvent détecter les neurotransmetteurs dans la fente synaptique grâce à leurs récepteurs. En réponse à l'activité synaptique, les astrocytes peuvent libérer des gliotransmetteurs qui vont alors agir sur des neurones ou des cellules gliales voisines. Dans le SNC, il est par exemple connu que les astrocytes modulent la transmission synaptique glutamatergique et GABAergique notamment par la libération de gliotransmetteurs tels que le GABA en réponse à l'activité synaptique ou le glutamate, l'adénosine triphosphate (ATP) ou la D-sérine (Kang et al., 1998; Panatier et al., 2006; Miraucourt et al., 2011; Bazargani et Attwell, 2016; Verkhratsky et Chvátal, 2019). Leur rôle dans le soutien des neurones et dans la gliotransmission confère un rôle important aux cellules gliales des CMDE dans le système nociceptif (Foley et al., 2011).

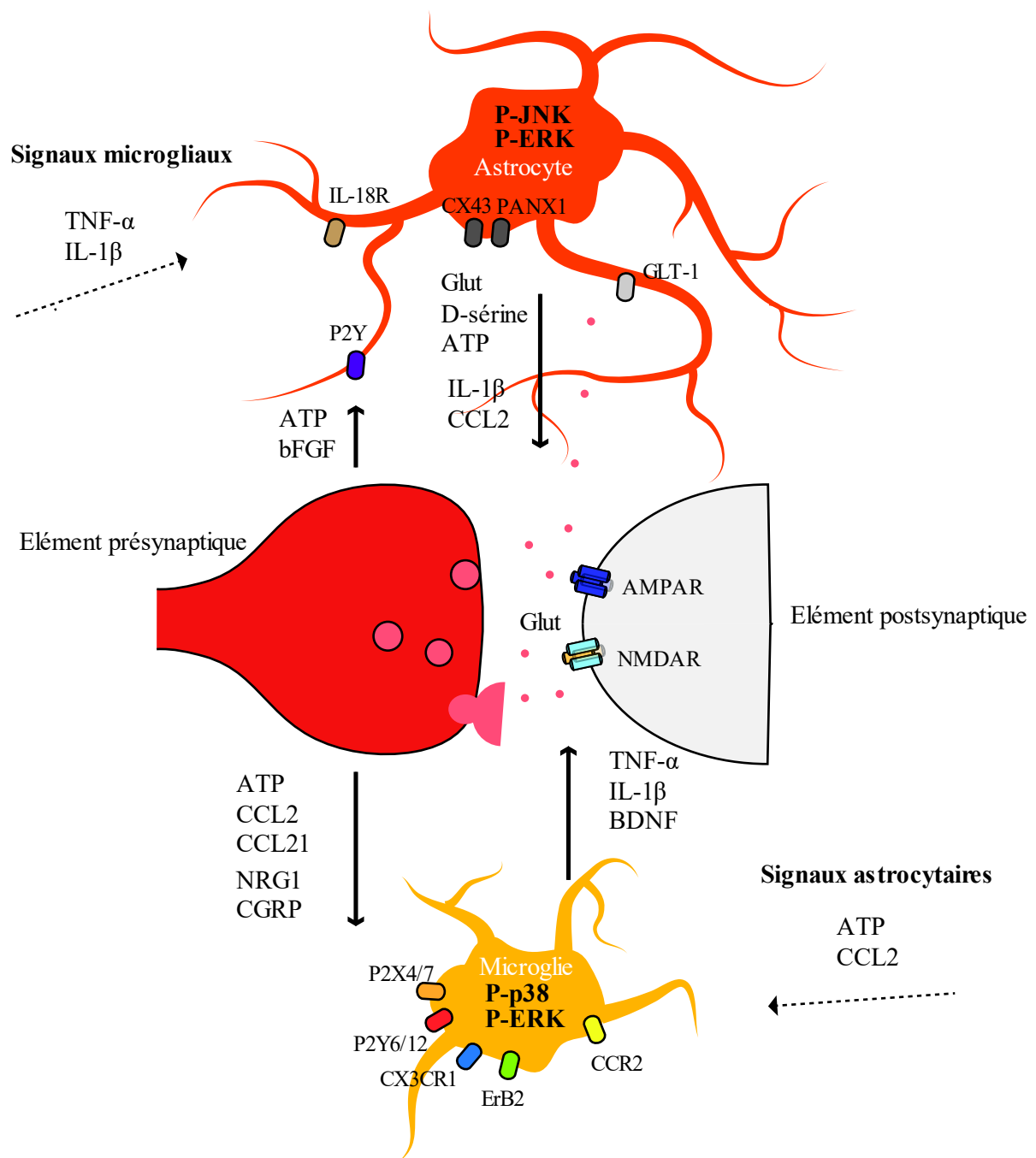


Figure 8 : Représentation des interactions entre neurone et cellules gliales suite à une lésion nerveuse périphérique.

L'augmentation d'activité au sein du réseau spinal suite à une lésion nerveuse induit la libération de facteurs favorisant l'activation des cellules microgliales. Parmi les facteurs libérés par les afférences primaires on retrouve l'ATP, des chémokines (CCL2, CCL21, CX3CL1), la neurogiline 1 (NRG1) et le CRGP qui vont activer respectivement les récepteurs de l'ATP (P2X4, P2X7, P2Y6, P2Y12), les récepteurs des chémokines (CX3CR1 et CCR2), de la neurogiline (Erb2). Cela induit la phosphorylation de p38 et ERK dans la microglie, induisant la production et libération de cytokines pro inflammatoire (TNF- α , IL-1 β , IL-18) et du BDNF qui participe au développement d'un état de sensibilisation dans le réseau spinal.

Les astrocytes peuvent être activés par le TNF- α et l'IL-18 libérés par la microglie ou par le bFGF libérés par d'autres astrocytes. La phosphorylation de JNK et ERK qui en résulte induit la production et libération de chémokines (CCL2), de cytokines (IL-1 β) ainsi que d'ATP et de glutamate (suite à l'activation des connexines Cx43 et PNx1) participant aussi à la sensibilisation centrale.

Enfin, la diminution d'expression astrocytaire du transporteur membranaire du glutamate (GLT-1) conduit à une augmentation de la concentration extracellulaire de glutamate. Cette augmentation de glutamate peut induire le recrutement de récepteurs NMDA normalement non activés. D'après Ji et al., 2013.

5.2 Rôle dans la plasticité du système nociceptif spinal

La microglie

Les microglies ainsi que les astrocytes sont en général sous formes quiescentes, cependant dans certains cas pathologiques tels qu'une lésion nerveuse ou une inflammation, celles-ci vont entrer dans un état dit « activé » qui est accompagné de modifications morphologiques et fonctionnelles (Tsuda et al., 2005; Watkins et al., 2005). En seulement quelques heures après une lésion nerveuse, la microglie activée prolifère et s'accumule au niveau des fibres lésées (Aldskogius et Kozlova, 1998). L'activation microgliale peut être due à l'action de nombreuses molécules qui vont se lier sur les récepteurs exprimés par ces cellules gliales (Figure 8). On retrouve parmi ces molécules, l'ATP qui se lie sur les récepteurs P2X (Tsuda et al., 2003; Chessell et al., 2005; Haynes et al., 2006), le monoxyde d'azote (NO), les prostaglandines, les chimiokines (chemokine ligand 2 ou CCL2, la fractalkine ou CX3CL1) et la neureguline 1 (NRG1). L'activation de ces récepteurs induit la phosphorylation des protéines kinases p38 et ERK induisant une production et libération de cytokines (interleukine 1- β , le facteur de nécrose tumorale ou TNF- α), de prostaglandines (prostaglandine E₂) et du facteur neurotrophique issu du cerveau (BDNF) qui vont participer à la sensibilisation centrale (De Leo et al., 2006). Il a aussi été montré que l'injection intrathécale de microglies activées peut reproduire l'allodynie mécanique observés après une lésion nerveuse (Coull et al., 2005) montrant le rôle important de ces cellules dans la mise en place de la sensibilisation centrale. Un des mécanismes dans lequel ces cellules sont impliquées est le changement du gradient des ions chlorure qui est détaillé dans le chapitre II (Coull et al., 2003; Coull et al., 2005).

Les astrocytes

Les astrocytes sont impliqués dans le maintien de la sensibilisation centrale plutôt que dans son initiation (Scholz et Woolf, 2007; Ji et al., 2014). Leur activation est moins rapide que celle de la microglie mais persiste plusieurs mois. L'activation des astrocytes peut être induite par des molécules libérées par la microglie telles que le facteur de nécrose tumorale TNF- α et l'interleukine 18 ou par d'autres astrocytes via l'action du bFGF par exemple (« basic fibroblast growth factor ») (Ji et al., 2007). L'activation des récepteurs de ces molécules informatives induit la phosphorylation des kinases c-Jun N-terminale (JNK) et ERK, qui stimulent la libération d'ATP, de glutamate, de D-sérine, de chimiokines (CCL2) et d'interleukines (interleukine-1 β , interleukine-6, interleukine-1) (Figure 8) qui vont aussi faciliter la sensibilisation centrale. La localisation accolée aux synapses des astrocytes leur permet de moduler efficacement la transmission synaptique. En condition pathologique, les astrocytes activés recapturent moins efficacement le glutamate au niveau de synapses excitatrices du fait d'une réduction de l'expression des transporteurs du glutamate (GLT-1) à leurs membranes (Rothstein et al., 1996; Sung et al., 2003; Inquimbert et al., 2012). Cela induit une augmentation de la concentration de glutamate

ambiant qui pourrait activer des récepteurs NMDA normalement silencieux et mener à des phénomènes d'excitotoxicité.

Les cellules gliales ont donc un rôle important dans le fonctionnement du système nociceptif spinal et dans le développement et maintien des états douloureux chroniques (Ji et al., 2014; Nam et al., 2016).

6. Communication avec les structures supra-spinales

6.1 Les voies de sortie de l'information

Les neurones de projection permettent la transmission de l'information de la ME vers les centres supra spinaux. Ces neurones (< 10% des neurones de la CD) se trouvent dans les laminae I, III et V principalement et leurs axones se regroupent dans la substance blanche pour former les faisceaux ascendants. Les principaux faisceaux ascendants sont brièvement décrits ci-dessous. Pour une revue détaillée voir : Millan (1999).

Le faisceau spino-cérébelleux permet la transmission vers le cervelet des informations proprioceptives inconscientes provenant des muscles et articulations. Ces informations participent au contrôle de la posture.

La voie des cordons dorsaux permet de véhiculer les informations cutanées tactiles et les informations proprioceptives conscientes provenant des muscles et des articulations. Ces informations sont acheminées indirectement vers plusieurs structures dont le tronc cérébral, le thalamus et le cortex somesthésique primaire.

Les faisceaux spino-thalamique et spino-réticulé véhiculent les informations nociceptives et thermiques à destination du thalamus et de la formation réticulée respectivement. Les fibres de ces faisceaux remontent par la voie antérolatérale.

Le faisceau projetant vers le mésencéphale (voie spino-mésencéphalique) véhicule aussi des informations nociceptives et passe par le faisceau ventrolatéral après avoir croisé la ligne médiane de la commissure grise postérieure. Ces axones projettent aussi dans le tronc cérébral vers la substance grise périaqueducule et l'aire parabrachiale. L'aire parabrachiale permet ensuite la transmission de l'information à l'amygdale et à l'hypothalamus (Keay et al., 1997; Millan, 1999).

Parmi les structures ciblées, certaines sont associées à la composante sensori-discriminative, qui permet de détecter la modalité des stimuli nociceptifs ainsi que leur localisation, leur durée et leur intensité. C'est notamment le cas des cortex somatosensoriels primaire et secondaire. D'autres structures comme le girus cingulaire antérieur ou le cortex insulaire sont impliquées dans la composante cognitive

et affective de la douleur qui concerne le lien entre la douleur et l'humeur, l'attention, la mémorisation de l'expérience ou l'aspect émotionnel.

6.2 Les contrôles descendants

Les centres supra-spinaux peuvent moduler le traitement de l'information dans la ME par l'intermédiaire de projections descendantes. Ces contrôles de natures neurochimiques variées peuvent faciliter ou inhiber la transmission du message nociceptif spinal en agissant sur les terminaisons des fibres afférentes, sur les neurones de projection et sur les interneurons excitateurs ou inhibiteurs et enfin sur d'autres contrôles descendants. Ces contrôles peuvent être directs ou indirects mais empruntent toujours les faisceaux dorsolatéraux ou ventrolatéraux pour rejoindre la ME (Millan, 2002). Il est intéressant de noter que les contrôles descendants peuvent contacter les cellules gliales dans les CD (Tsuda et al., 2017), ces cellules ont donc vraisemblablement aussi un rôle dans la transmission d'informations provenant des structures supra spinales au réseau nociceptif spinal.

Les contrôles monoaminergiques (noradrénaline, dopamine, sérotonine) proviennent du tronc cérébral et de l'hypothalamus et innervent les couches superficielles de la ME. Ils facilitent ou bloquent la transmission du message nociceptif selon le récepteur exprimé au niveau spinal. Les contrôles sérotoninergiques qui arrivent de la formation réticulée ventromédiane et du noyau du raphé Magnus inhibent en général l'activité des neurones dans la ME. Les contrôles noradrénergiques du locus coeruleus inhibent l'activité des neurones dans les laminae I, II, V et X.

D'autres neurotransmetteurs et neuropeptides sont impliqués dans les contrôles descendants tels que l'histamine (noyau tubéromammillaire), la mélanocortine (noyau arqué), la cholécystokinine et la substance P (substance grise periaqueducatale) qui ont une action pro-nociceptive, alors que la vasopressine (noyau paraventriculaire) et la β endorphine (noyau arqué) ont une action anti-nociceptive. Pour une revue détaillée des voies ascendantes et contrôles descendants : Millan (1999, 2002).

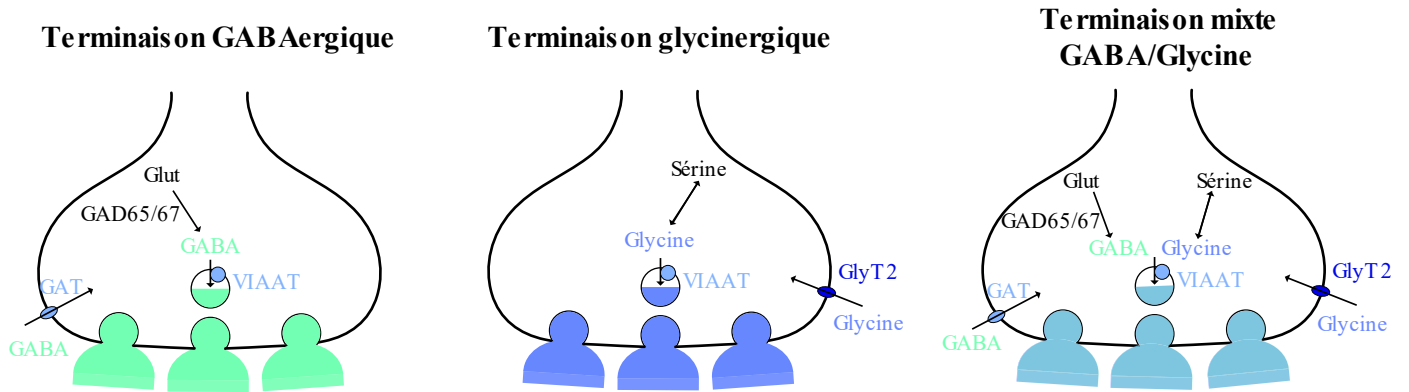


Figure 9 : Représentation schématique des trois types de terminaisons synaptiques inhibitrices

Le transporteur vésiculaire VIAAT est présent dans les trois types de terminaisons inhibitrices et permet le transport de GABA et glycine dans les vésicules. La concentration cytoplasmique de GABA et/ou glycine détermine le contenu des vésicules. Les concentrations sont déterminées par la présence d'une des enzymes de synthèse du GABA (GAD65/GAD67), des transporteurs membranaires du GABA (GAT) et de la glycine (GlyT). La terminaison GABAergique exprime la GAD et le GAT tandis que la terminaison glycinergique exprime GlyT. Les terminaisons mixtes GABA/Glycine coexpriment la GAD, GAT et GlyT. Modifié de Zeilhofer et al., 2012.

Seconde partie :

La transmission synaptique inhibitrice dans la corne dorsale.

L'inhibition synaptique dans la ME met en jeu deux neurotransmetteurs, le GABA et la glycine. Le GABA se fixe sur les récepteurs ionotropes GABA_A / GABA_C et sur les récepteurs métabotropes GABA_B tandis que la glycine se lie au récepteur ionotrope de la glycine. Cependant, la transmission inhibitrice rapide à laquelle nous nous sommes intéressés implique les récepteurs GABA_A et glycine. Par conséquent, nous limiterons notre introduction à ces deux types de récepteurs canaux. Les récepteurs GABA_A et glycine sont perméables aux ions chlorures (Cl⁻) et aux ions bicarbonates (HCO₃⁻), leur activation chez l'adulte induit l'entrée de Cl⁻ et l'hyperpolarisation de la membrane des neurones, réduisant ainsi l'excitabilité des cellules.

1. Caractéristique de la transmission synaptique inhibitrice rapide

1.1 Les trois types de transmission inhibitrice

Trois types de transmission inhibitrice coexistent dans les CDME. La nature de la transmission synaptique inhibitrice est déterminée par la présence ou l'absence au niveau des terminaisons, (1) de la glutamate décarboxylase (GAD) qui permet la synthèse du GABA et (2) des transporteurs membranaires du GABA (GAT) ou de la glycine (GlyT) (Figure 9).

La transmission GABAergique requiert l'expression aux terminaisons nerveuses de la GAD ainsi que l'expression du transporteur membranaire GAT. La présence de transporteurs vésiculaires des acides aminés inhibiteurs (VIAATs) et l'absence de GlyT sont des conditions pour définir une transmission exclusivement GABAergique.

La transmission glycinergique implique l'expression de GlyT et de VIAAT ainsi que l'absence de GAD aux terminaisons synaptiques (Aubrey et al., 2007). Ainsi, les vésicules libérées par ces terminaisons contiennent seulement de la glycine.

La transmission mixte GABA/glycine nécessite l'expression d'une GAD, d'un GlyT et de VIAAT. Les vésicules libérées par ces terminaisons contiennent ainsi du GABA et de la glycine (Jonas et al., 1998).

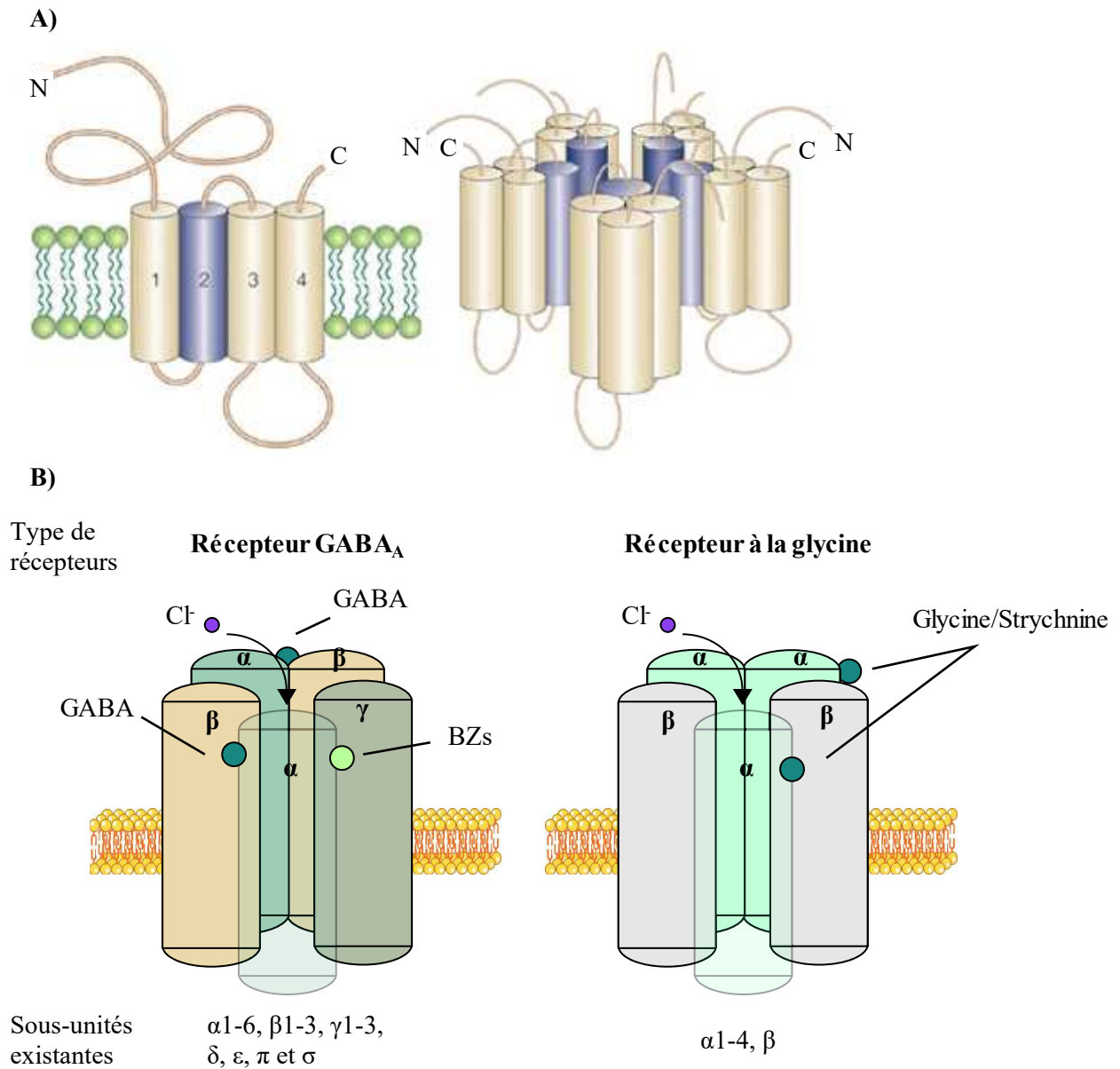


Figure 10 : Structure des récepteurs GABA_A et glycine et diversité des sous-unités.

(A) Les sous unités des récepteurs GABA_A et glycine contiennent quatre domaines transmembranaires hydrophobes, une grande extrémité N-terminale, une extrémité carboxyle et une boucle intracellulaire importante dans les phénomènes de modulation du récepteur. Le récepteur fonctionnel est constitué de cinq sous-unités et possède un pore perméable aux anions Cl⁻ et HCO₃⁻ qui est formé par les domaines transmembranaires 2. D'après Moss et Smart., 2001. (B) La composition en sous-unité la plus fréquemment retrouvée dans le SNC pour le récepteur GABA_A est : 2 α : 2 β : 1 γ . Pour le récepteur à la glycine, la composition la plus fréquente est : 3 α : 2 β . BZs : Benzodiazépines.

1.2 Synthèse, stockage et recapture du GABA et de la glycine

Le GABA est synthétisé dans les neurones à partir du glutamate par l'action de la GAD. Il existe deux isoformes de la GAD qui sont présentes dans la plupart des interneurons inhibiteurs de la ME (Mackie et al., 2003) à partir du 11^{ème} jour de vie embryonnaire (Somogyi et al., 1995). La GAD65 codée par le gène *Gad2* est localisée dans le compartiment axonal tandis que la GAD67 codée par le gène *Gad1* est localisée dans le compartiment somato-dendritique. Le GABA est transporté dans les vésicules de stockage présynaptique par les VIAATs (Sagné et al., 1997). Les VIAATs sont des transporteurs permettant l'entrée de GABA et/ou glycine dans les vésicules contre la sortie d'un proton (eux-mêmes chargés dans les vésicules par l'activité d'une ATPase pompe à protons). Suite à la libération synaptique, le GABA peut être recapturé par quatre transporteurs membranaires à haute affinité (GAT1-4) et un à plus faible affinité (le transporteur betaine/GABA). Pour revue : Borden (1996). Les transporteurs GAT1 et 4 sont principalement localisés sur les terminaisons présynaptiques des neurones tandis que GAT2 et 3 se retrouvent surtout sur les cellules gliales. Ce sont des symports impliquant $2\text{Na}^+/1\text{Cl}^-/1\text{GABA}$ (Gadea et López-Colomé, 2001).

La glycine est un acide aminé ubiquitaire synthétisé à partir de la sérine. Si la glycine est présente dans tous les neurones, elle doit cependant être concentrée dans le cytosol pour être chargée par l'action des VIAATs dans les vésicules. En effet les VIAATs ont une affinité plus faible pour la glycine que pour le GABA (McIntire et al., 1997). Cette accumulation de glycine dans le cytosol est possible grâce aux transporteurs membranaires GlyT1 (a-c) et GlyT2 (a-b) codés par les gènes *GlyT1* et *GlyT2*. La stœchiométrie de GlyT1 et GlyT2 est de $2\text{Na}^+/1\text{Cl}^-/1\text{glycine}$ et $3\text{Na}^+/1\text{Cl}^-/1\text{glycine}$ respectivement (Roux et Supplisson, 2000). Ces deux transporteurs sont retrouvés dans la ME (Zafra et al., 1995) et d'autres régions où la transmission glycinergique est abondante (Luque et al., 1995). D'une manière générale, GlyT2 a principalement une localisation neuronale et est exprimé aux terminaisons glycinergiques tandis que GlyT1 peut aussi être localisé sur la glie (Adams et al., 1995; Zafra et al., 1995). Dans la ME, le GlyT1 neuronal est exprimé aux synapses glutamatergiques (Cubelos et al., 2005) où il pourrait réguler la concentration de glycine et ainsi moduler l'activité des récepteurs NMDA dont un des deux principaux co-agonistes est la glycine. Dans la ME, par des approches pharmacologiques sur la lamina X de rat, le blocage de GlyT1 et GlyT2 montre que les deux transporteurs modulent la phase de désactivation des courants postsynaptiques inhibiteurs évoqués et facilitent l'activation des récepteurs NMDA (Bradaña et al., 2004). Enfin, il est intéressant de noter que si GlyT2 transporte toujours la glycine vers le compartiment intracellulaire, GlyT1 peut en revanche libérer de la glycine dans certaines conditions (Roux et Supplisson, 2000). Il est donc envisageable que GlyT1 puisse libérer de la glycine permettant l'activation des récepteurs NMDA.

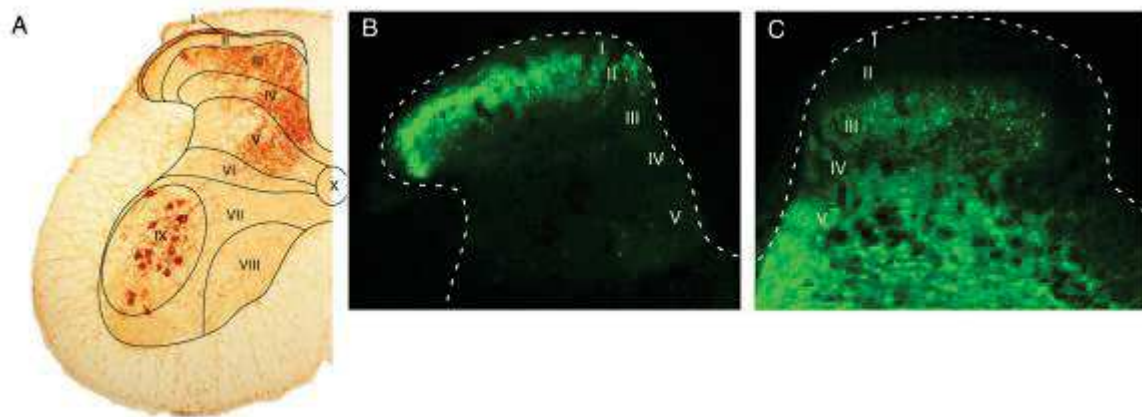


Figure 11 : Distribution des neurones GABAergiques et glycinergiques dans la CDME.

(A) Section transversale d'un segment lombaire de ME de souris. La toxine cholérique a été utilisée pour marquer les terminaisons des fibres myélinisées et les motoneurones. (B) Distribution des neurones GABAergiques visualisée par l'expression de EGFP sous le contrôle du promoteur GAD67. D'après Tamamaki et al., 2003. (C) Distribution des neurones glycinergiques visualisée via l'expression de EGFP sous le contrôle du promoteur GlyT2. D'après Zeilhofer et al., 2005. Ces données, obtenues par immunohistochimie, permettent de noter une distribution des neurones GAD67::EGFP principalement dans les laminae superficielles tandis que les neurones GlyT2::EGFP sont retrouvés dans les laminae plus profondes de la corne dorsale.

1.3 Les récepteurs GABA_A et glycine

Les récepteurs GABA_A et glycine font partie de la famille des canaux « cys loop ». Ces deux types de récepteurs sont des pentamères perméables aux ions Cl⁻ et HCO₃⁻ qui se distinguent par leur composition en sous-unités formées chacune de quatre segments transmembranaires (M1 à M4) et par une large extrémité N-terminale contenant un pont disulfure (Karlin et Akabas, 1995).

1.3.1 Le récepteur GABA_A

Structure et sous-unités

Ce récepteur, purifié en 1987, est composé de 5 sous-unités parmi les 19 existantes : α 1-6 ; β 1-3 ; γ 1-3, δ , ϵ , π , σ et ρ 1-3 (Olsen et Sieghart, 2008). La stœchiométrie la plus fréquemment retrouvée du récepteur GABA_A est de 2 sous-unités α , 2 β et une γ (Moss et Smart, 2001) (Figure 10). Ces récepteurs assemblés en forme de roue sont en général localisés en face des boutons GABAergiques pour permettre leur activation lors de la libération de GABA.

Expression des sous-unités

Il existe un motif d'expression particulier des sous-unités du récepteur GABA_A dans la ME chez le rat adulte (Tamamaki et al., 2003) (Figure 11). Par une approche immunohistochimique, il a été montré que α 3, β 2/3 et γ 2 sont largement distribuées dans la CD. La sous-unité α 2 est abondante dans les laminae superficielles dont la lamina II tandis que les sous-unités α 1 et 5 sont exprimées dans les laminae plus profondes (III-VIII) (Bohlhalter et al., 1996). Le même motif de distribution est retrouvé chez la souris adulte (Knabl et al., 2008) (Figure 12).

Pharmacologie du récepteur

La liaison du GABA a lieu à la jonction des sous-unités α et β , ce qui définit deux sites de liaisons sur un récepteur GABA_A classique. Ce site reconnaît aussi des agonistes spécifiques des récepteurs GABA_A comme le muscimol et l'isoguvacine ainsi que des antagonistes compétitifs comme la bicuculline et la gabazine (SR95531). La bicuculline est l'antagoniste des récepteurs GABA_A le plus utilisé et permet de bloquer tous les récepteurs GABA_A, à l'exception de ceux contenant la sous-unité ρ (Druzin et al., 2004). Les récepteurs GABA_A possèdent aussi des sites de fixation pour des modulateurs allostériques permettant ainsi de modifier l'effet du GABA. Les benzodiazépines, par exemple, ont un site d'action localisé à l'interface des sous-unités α et γ et induisent en général une potentialisation des courants GABA_A en facilitant l'ouverture du canal. Cet effet est dû à une augmentation de l'affinité du GABA pour son récepteur au niveau d'un site de liaison au GABA (Twyman et al., 1989). La fixation

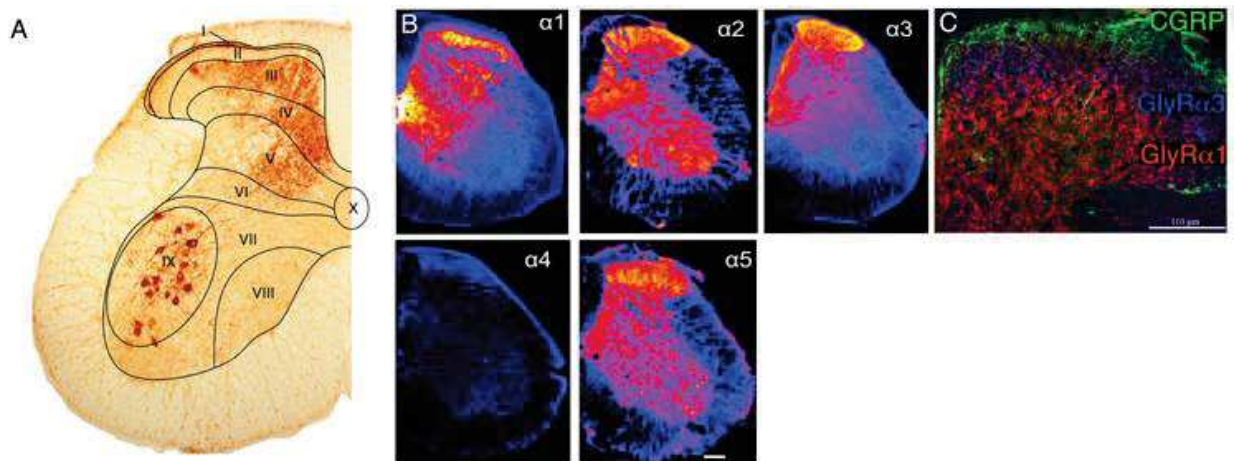


Figure 12 : Distribution laminaire des sous-unités des récepteurs GABA_A et de la glycine.

(A) Section coronale d'un segment lombaire de ME de souris. La toxine cholérique a été utilisée pour marquer les terminaisons des fibres myélinisées et les motoneurones. (B) Distribution des sous-unités α du récepteur GABA_A. Jaune : Forte densité ; Bleue : Faible densité. D'après Zeilhofer et al., 2012. Ces données, obtenues par immunohistochimie, permettent de noter que les sous-unités $\alpha 1$ et $\alpha 5$ sont exprimées plus fortement dans les laminae III-VIII. Les sous-unités $\alpha 2$ et $\alpha 3$ sont principalement exprimées dans les laminae superficielles et la sous-unité $\alpha 4$ n'est pas détecté. (C) Distribution des sous-unités $\alpha 1$ et $\alpha 3$ des récepteurs de la glycine dans la CD. Contre marquage avec la CGRP qui marque la lamina II externe. D'après Harvey et al., 2004. Ces données, obtenues par immunohistochimie, permettent de noter que les sous-unités $\alpha 3$ sont concentrées dans les laminae superficielles de la corne dorsale tandis que les sous-unités $\alpha 1$ se retrouvent dans les laminae plus profondes.

de benzodiazépines aux récepteurs GABA_A est responsable des effets anxiolytiques, antiépileptiques et hypnotiques de ces modulateurs (Macdonald et Olsen, 1994). On trouve d'autres modulateurs allostériques positifs comme les barbituriques ou l'alcool qui ont des effets sédatifs et anesthésiques, leur sites d'action sont distincts de celui des benzodiazépines (MacDonald et al., 1989; Sanna et al., 2004). L'activité des récepteurs GABA_A est aussi modulée par la phosphorylation. La phosphorylation par les protéines kinases A et C induit une diminution de l'amplitudes des réponses des récepteurs GABA_A. Enfin d'autres modulateurs comme les neurostéroïdes se lient comme le GABA à l'interface des sous-unités α et β mais sur des sites différents. Les neurostéroïdes modulent positivement les récepteurs GABA_A dans les couches superficielles de la ME pendant la période post-natale ou suite à une inflammation (Poisbeau et al., 2005; Inquimbert et al., 2007, 2008).

1.3.2 Le récepteur de la glycine

Structure et sous-unités

Ce récepteur a été purifié en 1981 grâce à la liaison de son antagoniste sélectif, la strychnine (Pfeiffer et Betz, 1981; Pfeiffer et al., 1982). Il existe quatre sous-unités α (1-4) et une β actuellement connues. Ces récepteurs sont généralement organisés en hétéromères composés de trois sous-unités α et deux β ou deux α et trois β (Langosch et al., 1988) bien que des récepteurs homomériques α aient aussi été décrits (Grudzinska et al., 2005) (Figure 10). Les sous-unités α et β sont impliquées dans la liaison de la glycine et de la strychnine et la sous-unité β dans l'ancrage à la membrane grâce à l'interaction avec la géphyrine (Pfeiffer et al., 1982; Lynch, 2004).

Expression des sous-unités

Dans les CD de souris adultes, la sous-unité du récepteur de la glycine $\alpha 3$ est concentrée dans les laminae superficielles tandis que $\alpha 1$ et β sont largement distribuées dans les différentes couches de la CD. La sous-unité $\alpha 2$ est peu exprimée (Harvey et al., 2004; Zeilhofer et al., 2005) (Figure 11 et 12).

Pharmacologie du récepteur

La glycine est l'agoniste des récepteurs de la glycine le plus puissant suivi de la β -alanine et de la taurine qui peuvent être libérées par les cellules gliales (Rajendra et al., 1995). L'antagoniste sélectif le plus puissant connu actuellement est la strychnine. Il existe différents modulateurs des récepteurs de la glycine. Pour revue : Legendre (2001). On peut citer le zinc, qui à faible concentration (20nM-10 μ M), augmente les courants évoqués par l'application de glycine et qui, à des concentrations supérieures à 10 μ M, a un effet inhibiteur (Bloomenthal et al., 1994). Enfin, comme pour les récepteurs GABA_A, des phosphorylations sur les sites intracellulaires induites par l'action de la protéine kinase C (PKC) ou A (PKA) peuvent moduler les courants glycinergiques (Legendre, 2001).

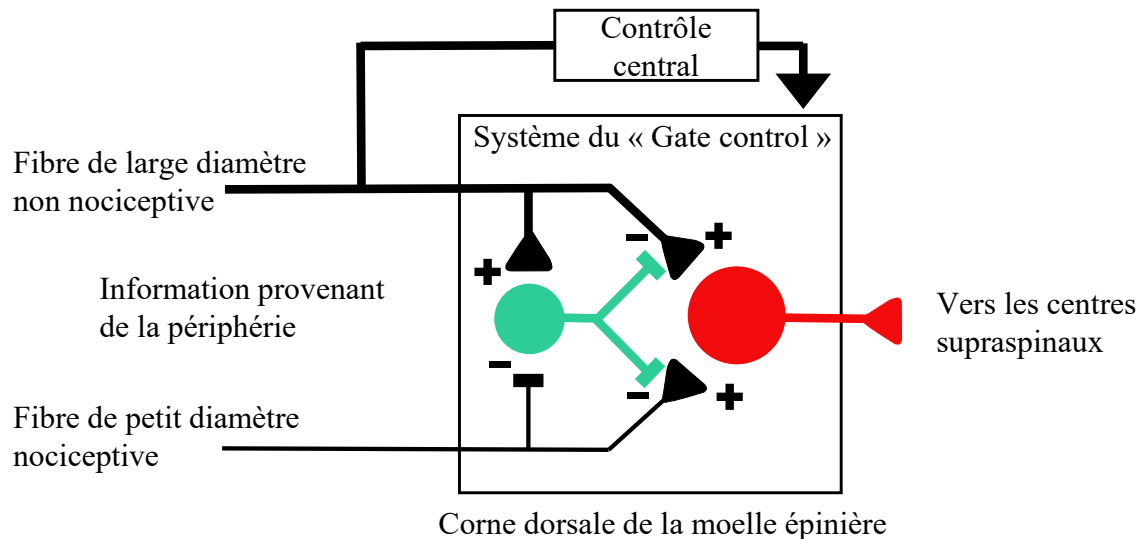


Figure 13 : Schéma du contrôle du portillon (Gate-control theory of pain) de Melzack et Wall.

Dans ce modèle, les auteurs proposaient que les interneurons inhibiteurs (en bleu) situés dans la lamina II contrôlent le relai des informations nociceptives et non nociceptives provenant de la périphérie vers les centres supraspinaux. Selon ce schéma, l'activité des fibres de large diamètre non nociceptives permet d'activer des interneurons inhibiteurs. Cela résulte en une inhibition des fibres sensorielles primaires et bloque la transmission d'informations à destination du neurone de projection (en rouge). A l'inverse si les interneurons inhibiteurs ne sont pas activés par les fibres de large diamètre, l'information nociceptive sera transmise librement par les fibres de petits diamètres aux neurones de projection puis aux centres supraspinaux. Modifié de Melzack et Wall., 1965.

2. Rôle de la transmission synaptique inhibitrice dans le système nociceptif au sein des cornes dorsales

En 1965, Melzack et Wall proposaient une théorie appelée « Gate control theory of pain » dans laquelle l'inhibition synaptique joue un rôle clef dans le traitement de l'information nociceptive (Melzack et Wall, 1965). Dans leur modèle, les auteurs proposent que les informations acheminées par les fibres afférentes nociceptives et non nociceptives modulent différemment l'activité d'interneurones inhibiteurs locaux qui contrôlent par la suite le relais des informations vers les centres supraspinaux (Figure 13). L'importance de la transmission synaptique inhibitrice dans le contrôle de la transmission des informations nociceptives vers les centres supraspinaux fut plus tard confirmée notamment par l'utilisation d'agonistes ou d'antagonistes spécifiques des récepteurs GABA_A et de la glycine.

2.1 Modulation pharmacologique de la transmission synaptique inhibitrice

Plusieurs études basées sur l'injection intrathécale d'antagonistes ou d'agonistes spécifiques des récepteurs GABA_A et glycine ont permis d'évaluer l'importance de la transmission synaptique GABAergique et glycinergique dans la ME, sur le comportement douloureux d'animaux éveillés.

Inhibition de la transmission glycinergique

Ainsi, il a été montré chez le rat que l'injection intrathécale de strychnine induit du prurit, des automutilations et un comportement de toilettage accentué (Beyer et al., 1985). Il a aussi été mis en évidence chez le rat, suite à l'injection intrathécale de strychnine, le développement d'une allodynie mécanique (Beyer et al., 1985; Yaksh, 1989) ainsi qu'une hyperalgésie thermique au chaud (Yamamoto et Yaksh, 1993). Par la suite, l'ablation ou le « silencing » des neurones glycinergiques chez la souris et le rat a permis de confirmer leur rôle dans le développement de ces symptômes et de montrer que leur activation a un effet anti-nociceptif (Lu et al., 2013; Foster et al., 2015; Petitjean et al., 2015). Enfin, au niveau de la racine spinale du trijumeau, la réduction de la transmission glycinergique chez le rat induit l'augmentation de la fréquence de décharge des neurones nociceptifs dans la lamina I, ces derniers devenant de plus sensibles à des stimuli non nociceptifs (Mirauccourt et al., 2007).

Inhibition de la transmission GABAergique

De façon similaire, l'injection intrathécale de bicuculline ou de picrotoxine (un antagoniste des récepteurs GABA_A) induit aussi une hypersensibilité douloureuse avec par exemple des vocalisations en réponse à des stimuli mécaniques non nociceptifs et la diminution des seuils de retrait de la queue

suite à des stimulations électriques de la queue (Yaksh, 1989). Récemment, il a été montré que l'inhibition spécifique de neurones inhibiteurs localisés dans les laminae profondes (III à V) et exprimant le récepteur à la tyrosine kinase induit des douleurs aiguës chez la souris (Cui et al., 2016). Les auteurs montrent de plus que ces neurones inhibiteurs inhibent en condition normale les neurones excitateurs positifs aux marqueurs neurochimiques PKC γ et somatostatine. Le blocage de ces neurones inhibiteurs permettrait donc aux informations non-nociceptives d'entrer dans le réseau de traitement de l'information nociceptive et d'induire le développement d'hyperalgésie et d'allodynie. À l'inverse, la stimulation de ces neurones inhibiteurs exprimant le récepteur à la tyrosine kinase réduit le seuil de détection des stimulations nociceptives normale et atténue les douleurs chroniques (Cui et al., 2016). Enfin, il est intéressant de noter que sur des tranches aiguës de ME de rat neuropathique (SNI), la perfusion de bicuculline n'induit pas autant d'effet que chez un animal sain. Cela laisse penser que la transmission inhibitrice est déjà modulée négativement dans ce modèle (Baba et al., 2003).

Facilitation de la transmission GABAergique et glycinergique

À l'inverse d'un blocage, qui induit l'apparition de symptômes douloureux, la facilitation de l'activation des récepteurs GABA_A et glycine dans la ME par injection de benzodiazépines (diazepam ou midalozam) rétablit une détection des stimulations nociceptives normale chez le rat et la souris (Kontinen et Dickenson, 2000; Knabl et al., 2008). De même, le traitement avec des agonistes des récepteurs GABA_A a des effets anti-hyperalgésiques (Novak et al., 2001).

Données fonctionnelles et d'imagerie

Ces observations comportementales sont cohérentes avec des données d'immunohistochimie obtenue chez le rat. Le marquage de la protéine c-Fos, utilisée comme marqueur d'activation neuronale, a permis de déterminer la distribution des neurones inhibés de façon tonique dans la ME de rat sain (Cronin et al., 2004). Les auteurs ont administré de la strychnine par voie intraveineuse chez des rats anesthésiés et ont observé une augmentation du marquage c-Fos dans les noyaux des neurones des laminae profondes. Cela semble indiquer que les neurones glycinergiques inhibent habituellement de façon tonique les neurones de ces laminae. Quand les auteurs ont administré de la picrotoxine par voie intraveineuse, ils ont observé une augmentation du marquage c-Fos dans les noyaux des neurones distribués à l'ensemble de la CD (lamina I-VI). Cela indique que les neurones GABAergiques exercent un contrôle inhibiteur important dans l'ensemble des CD en conditions physiologiques (Cronin et al., 2004). Ces résultats montrent qu'il existe une augmentation de l'activité du réseau en absence de contrôle inhibiteur.

Enfin, des données fonctionnelles obtenues chez le rat par des enregistrements électrophysiologiques *in vivo* ont montré que l'injection intrathécale de strychnine ou bicuculline, pour inhiber les récepteurs GABA_A et glycine, rend les motoneurones plus facilement activables mais aussi plus sensibles à des stimulations non nociceptives (Sivilotti et Woolf, 1994). Les auteurs ont montré que

Rôle de l'inhibition	Mécanismes d'action	Effet	Conséquences en cas de perte d'inhibition
Atténuer l'information nociceptive	Inhibition des neurones spinaux excitateurs en présence d'un stimulus	Réponse appropriée à une stimulation nociceptive	Hyperalgésie
Empêcher l'activation spontanée	Inhibition des neurones spinaux excitateurs en absence de stimulus	Eviter une activation spontanée des neurones nociceptifs	Douleur spontanée
Séparer les modalités sensorielles	Inhibition des neurones connectés par des fibres A β par exemple	Eviter les communications entre différentes modalités	Allodynie
Limiter la diffusion de l'excitation	Inhibition des neurones traversant des barrières somatotopiques	Garder un traitement spatialement défini	Douleur irradiante, Projetée.

Tableau 1 : Les quatre principales fonctions de l'inhibition dans le système nociceptif.

D'après Sandkühler., 2009

la bicuculline induit, dans la lamina II, l'apparition de longues réponses polysynaptiques suite à l'activation de fibres A β , A δ et C. Ils montrent aussi que ces réponses polysynaptiques sont bloquées par l'acide 2-amino-5-phosphonovalérique (AP5) ou la kétamine et sont donc dépendantes de l'activation des récepteurs NMDA.

La suppression de la transmission inhibitrice GABAergique ou glycinergique mène donc au développement de symptômes associés aux douleurs chroniques tels que l'allodynie mécanique et l'hyperalgésie thermique au chaud. Cela suggère que la modification de la transmission synaptique inhibitrice joue un rôle important dans le développement et maintien des douleurs chroniques.

2.2 Les fonctions de la transmission synaptique inhibitrice dans le système nociceptif au seins des cornes dorsales

Virtuellement tous les neurones de la ME reçoivent des entrées GABAergiques et une partie d'entre eux reçoit aussi des entrées glycinergiques, qui proviennent d'interneurones inhibiteurs locaux principalement et de contrôles descendants. La plupart des axones GABAergiques et glycinergiques forment des synapses axo-dendritiques ou axo-somatiques et permettent ainsi l'inhibition postsynaptique GABAergique. Il existe aussi des axones formant des contacts axo-axoniques sur les terminaisons des afférences primaires, responsables de l'inhibition présynaptique GABAergique. On peut distinguer quatre fonctions principales de la transmission inhibitrice rapide dans le traitement de l'information nociceptive (Sandkühler, 2009) (Tableau 1).

Atténuer l'information nociceptive

Cette fonction inclut l'inhibition glycinergique de l'élément postsynaptique et GABAergique qui peut être au niveau de l'élément pré ou postsynaptique. Dans la ME, l'inhibition synaptique a lieu aux terminaisons des afférences primaires, sur les interneurones excitateurs et sur les neurones de projection. La perte de cette fonction peut mener au développement d'hyperalgésies ou d'allodynies mécaniques et thermiques chez l'animal. Il est par exemple montré *in vivo* que le blocage des récepteurs GABA_A et glycine spinaux induit l'augmentation de la réponse des neurones à des stimuli nociceptifs chez le chat et le rat (Zieglgänsberger et Sutor, 1983; Saadé et al., 1985).

Sur les terminaisons des afférences primaires, l'activation des récepteurs GABA_A mène à un phénomène particulier où l'ouverture de ces canaux induit une dépolarisation plutôt que l'hyperpolarisation observée dans les neurones du SNC chez l'animal adulte. Ce phénomène appelé dépolarisation des afférences primaires (primary afferent depolarization) est dû au fait que les fibres afférentes expriment le transporteur Na⁺/K⁺/Cl⁻ appelé NKCC1 tandis que le co-transporteur potassium-chlorure (KCC2) n'est pas retrouvé (Kanaka et al., 2001). Le NKCC1 charge le milieu intracellulaire en

ions Cl^- et le KCC2 peu présent, ne permet pas de maintenir une concentration d'ions Cl^- intracellulaire faible. L'activation des récepteurs GABA_A induit donc la sortie d'ions Cl^- du neurone et par conséquent une dépolarisation de la membrane des neurones. De façon intéressante, ce mécanisme bloque la libération de neurotransmetteur évoquée par un potentiel d'action et plusieurs théories permettent d'expliquer ce phénomène (Kullmann et al., 2005). La dépolarisation des afférences primaires pourrait mener à une inactivation des canaux calcium voltage-dépendants et réduire ainsi l'influx de Ca^{2+} présynaptique et par conséquent la libération de neurotransmetteur. Cela pourrait aussi bloquer la propagation du potentiel d'action par un effet de shunt de la résistance membranaire.

Inhiber les circuits nociceptifs

En l'absence de stimuli nociceptifs chez le chat, les neurones traitant l'information nociceptive ont une activité spontanée faible (Cervero et al., 1976; Iggo et al., 1988) tandis que les neurones traitants les informations non nociceptives ont une activité plus variable (Handwerker et al., 1975; Cervero et al., 1976). Cela est dû à une inhibition tonique des neurones traitants l'information nociceptive. En effet, lorsque les récepteurs GABA_A et glycine dans la ME sont bloqués, il est observé chez le rat une augmentation de l'activité spontanée des neurones, qui peuvent commencer à émettre des potentiels d'actions de façon synchrone (Ruscheweyh et Sandkühler, 2003). De plus chez le rat vigile, bloquer les récepteurs GABA_A spinaux mène à un comportement indiquant des douleurs spontanées et/ou une dysesthésie avec du prurit et de l'automutilation (Loomis et al., 2001). La conséquence de la perte de ce contrôle inhibiteur des circuits nociceptifs résulte donc en l'apparition de douleurs spontanées.

Séparer les modalités sensorielles

L'inhibition synaptique est essentielle dans la séparation des modalités sensorielles et le blocage de celle-ci mène au développement d'allodynie mécanique chez le rat (Yaksh, 1989; Sivilotti et Woolf, 1994). Cela est dû au moins en partie à une interaction entre les laminae III-IV et les laminae I-II. Les neurones exprimant vGLUT3 de façon transitoire ou $\text{PKC}\gamma/\text{SOM}^+$ au cours du développement dans la lamina III reçoivent des informations principalement non nociceptives provenant des fibres $\text{A}\beta$. Ces neurones sont habituellement inhibés par des neurones PV^+ /glycine de nature inhibitrice. La perte de ce contrôle inhibiteur mène à la transmission d'information non nociceptives vers la lamina II puis éventuellement aux neurones de projection de la lamina I (Baba et al., 2003; Mirauccourt et al., 2007; Peirs et al., 2015). Par une approche d'électrophysiologie sur des tranches de ME de rat jeune (P17-P22), il a notamment été montré que les neurones de projections exprimant les récepteurs aux neurokinines 1, localisés dans la lamina I et III, sont impliqués dans la transmission d'informations non nociceptives. En effet, après la perfusion de bicuculline ou glycine sur les tranches de ME, les neurones de projections exprimant les récepteurs aux neurokinines 1 reçoivent de nouvelles informations provenant de fibres $\text{A}\beta$ non nociceptives. Dans des conditions où la transmission synaptique inhibitrice est bloquée, l'information non nociceptive mécanique est donc interprétée comme douloureuse.

	Méthodes d'induction	Symptômes développés	Phase de développement / De maintien	Références
CCI	Ligature lâche du nerf sciatique	Allodynie mécanique Hyperalgésie thermique (chaud)	2 jours 2 mois	Bennett et Xie. 1988
Cuff model	Compression du nerf sciatique par un manchon en polyéthylène	Allodynie mécanique	1 jour > 2 mois	Yalcin et al. 2014
SNL	Ligature serrée de la branche spinal L5	Allodynie mécanique Hyperalgésie thermique (chaud)	Allodynie : 1j -10 s Hyperalgésie : 3j - 5 s	Kim et Chung. 1992
SNI	Section des branches tibiale et péronéale. La branche surale est laissé intacte	Allodynie mécanique Allodynie thermique (froid) Hyperalgésie mécanique Hyperalgésie thermique (chaud)	<1 jours >6 mois	Decosterd et Woolf. 2000

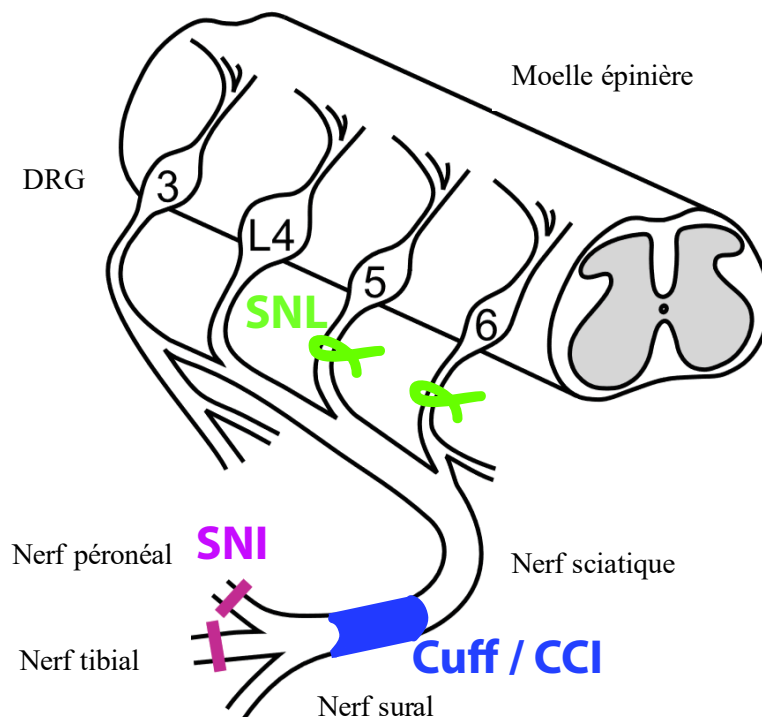


Figure 14 : Modèles animaux fréquemment utilisés dans l'étude des douleurs neuropathiques suite à une lésion du nerf sciatique.

Les modèles de constriction chronique (CCI), du manchon (cuff), de ligature du nerf spinal (SNL) et du nerf épargné (SNI) sont présentés et illustrés dans le schéma du bas. Les méthodes d'induction, les symptômes développés et la durée du développement et du maintien des symptômes sont présentés dans le tableau.

Limiter la diffusion de l'excitation

Comme indiqué dans la partie I, les CDME présentent une organisation précise avec un motif de projection des fibres afférentes, une localisation d'interneurones et de neurones de projection bien spécifique. Cela indique un traitement de l'information nociceptive spatialement organisé. Cependant, le blocage de l'inhibition par perfusion de bicuculline ou strychnine entraîne une propagation de vagues calciques dans virtuellement tous les neurones de la CD sur des tranches de ME de jeunes rat. L'augmentation de l'excitation qui en résulte pourrait induire l'apparition d'hyperalgésie secondaire chez le rat (Ruscheweyh et Sandkühler, 2005).

3. Plasticité de la transmission synaptique inhibitrice en condition pathologique

La diminution de l'inhibition observée dans certaines conditions pathologiques, comme suite à une lésion nerveuse, peut affecter chacune des fonctions décrites plus haut et peut conduire au développement d'allodynie et d'hyperalgésie.

3.1 Les modèles animaux de douleur neuropathique suite à une lésion du nerf sciatique

La mise au point des modèles animaux de neuropathie par lésion nerveuse partielle du nerf sciatique (Figure 14) a permis d'étudier les mécanismes responsables du développement et du maintien de douleurs neuropathiques. Parmi les modèles les plus utilisés on retrouve :

Le modèle de constriction chronique (chronic constriction injury ou CCI) consiste en la ligature lâche du nerf sciatique afin de réaliser une compression de la branche principale du nerf sciatique. Les animaux ayant subi une CCI développent une allodynie mécanique et une hyperalgésie thermique au chaud. La phase de développement de ces symptômes est d'environ deux jours et ils persistent pendant deux mois (Bennett et Xie, 1988; Attal et al., 1990).

Un modèle similaire appelé « **Cuff model** » peut être réalisé avec la pose d'un manchon en polyéthylène autour de la branche principale du nerf sciatique afin de réaliser une compression plus facilement reproductible d'un animal à l'autre (Pitcher et al., 1999; Yalcin et al., 2014). Les auteurs rapportent le développement d'une allodynie mécanique un jour après l'opération qui persiste pendant plus de deux mois.

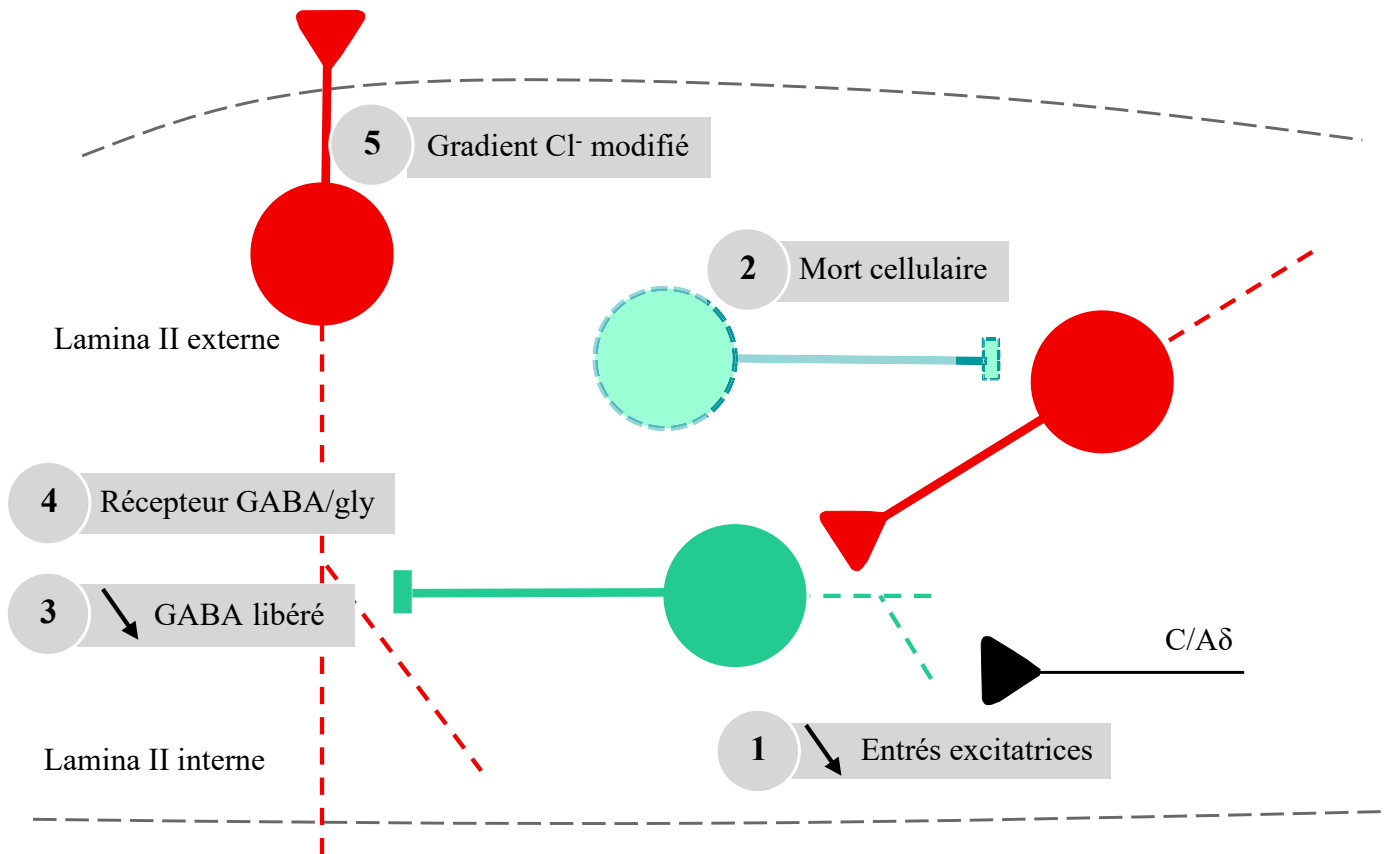


Figure 15 : Schéma des modulations potentielles de la transmission synaptique inhibitrice suite à une lésion nerveuse.

L'inhibition peut être altérée à plusieurs niveaux. **1)** Les entrées excitatrices qui proviennent des fibres afférentes ou d'interneurones excitateurs locaux sur les neurones inhibiteurs sont diminuées. **2)** Perte irréversible d'interneurones inhibiteurs par des mécanismes d'apoptose. **3)** Diminution de la libération de neurotransmetteur GABA due à une réduction de la synthèse et/ou de la recapture. **4)** Modification de l'activité des récepteurs GABA et glycine. **5)** Réduction du gradient chlorure qui rend l'ouverture des récepteurs GABA et glycine moins hyperpolarisante. Les neurones en rouge sont excitateurs et utilisent le glutamate comme neurotransmetteur. Les neurones en bleu sont inhibiteurs et utilisent le GABA et/ou la glycine comme neurotransmetteurs. Modifié de Sandkuhler., 2009.

Le modèle de ligature du nerf spinal (spinal nerve ligation ou SNL) consiste à réaliser une ligature serrée du nerf spinal L5 (et parfois L6). Ce modèle induit le développement d'une allodynie mécanique à partir d'un jour et persistant jusqu'à dix semaines après l'opération. Les auteurs rapportent aussi le développement d'une hyperalgésie thermique au chaud détectée à partir de trois jours et persistant jusqu'à cinq semaines suivant l'opération (Ho Kim et Mo Chung, 1992).

Le modèle de la lésion nerveuse épargnée (spared nerve injury ou SNI) est réalisé en ligaturant et sectionnant deux des trois branches du nerf sciatique (les branches tibiale et péronéale) et en laissant la branche surale intact. Ce modèle permet le développement de l'allodynie mécanique et thermique au froid ainsi qu'une hyperalgésie mécanique et thermique au chaud dans le territoire restant innervé. Les symptômes apparaissent moins de 24h et persistent plus de six mois (Decosterd et Woolf, 2000).

3.2 Modification de l'inhibition spinale suite à une lésion nerveuse

Suite à une lésion nerveuse, des mécanismes menant à une diminution de l'inhibition ont été observés dans la ME et sont décrits ci-dessous (Figure 15).

3.2.1 La réduction de l'excitation des interneurons inhibiteurs.

L'utilisation de souris exprimant la « green fluorescent protein » (GFP) sous le contrôle du promoteur GAD67 a permis d'observer que 10 jours après la réalisation d'une CCI sur des souris, les interneurons GABAergiques dans les laminae superficielles de la CD reçoivent significativement moins d'entrée excitatrices : à la fois l'amplitude et la fréquence des courants postsynaptiques excitateurs miniatures (mCPSEs) sont réduites (Leitner et al., 2013). Cependant en condition de lésion nerveuse périphérique les fibres afférentes développent une activité exacerbée et libèrent plus de glutamate dans la CDME (Wall et al., 1974; Liu et al., 2000; Wu et al., 2001), on pourrait donc s'attendre à observer dans un premier temps une augmentation des entrées excitatrices reçues par les interneurons inhibiteurs. Il est cependant envisageable que certaines connexions se dégradent suite à un phénomène d'excitotoxicité glutamatergique.

3.2.2 La perte d'interneurons inhibiteurs

Perte neuronale par apoptose

Il est connu qu'une exposition prolongée au glutamate peut induire des phénomènes d'excitotoxicités menant à la mort neuronale (Choi, 1994). Plusieurs équipes ont donc étudié si une perte de neurones et plus particulièrement de neurones inhibiteurs avait lieu dans la ME suite à une lésion nerveuse. Les résultats obtenus ont été sujet à controverse. En utilisant la méthode TUNEL (Terminal Transferase dUTP Nick End Labeling) pour détecter les cellules en apoptose, plusieurs études ont rapporté une apoptose dans les CDME de rat et de souris qui apparaît dès une heure après la lésion nerveuse et devient maximale à sept jours (Moore et al., 2002; Polgár et al., 2005; Scholz et al., 2005; Inquimbert et al., 2018). La détection de la forme activée de la caspase 3 a aussi été utilisée comme marqueur d'apoptose (Scholz et al., 2005). Moore et al. (2002) rapportent une apoptose neuronale via l'utilisation du marqueur NeuN tout comme Scholz et al. (2005) qui observent une colocalisation entre NeuN et la forme active de la caspase 3 après une SNI. A l'inverse Polgár et al. (2005) trouvent que les cellules positives au test TUNEL sont marquées par le marqueur microglial Iba-1 suite à une SNI et concluent que la mort cellulaire observée correspond à une perte de cellules gliales. Par des méthodes stéréologiques, Scholz et al. (2005) estiment à 20% la perte neuronale dans les laminae I à III quatre semaines après la SNI tandis que Polgár et al. (2004, 2005) n'observent aucune perte de neurones dans ces régions deux et quatre semaines après une SNI ou CCI. Ces résultats contradictoires peuvent être en partie expliqués par les approches et les techniques d'analyse utilisées, qui diffèrent entre les études. Par la suite, plusieurs études ont toutefois conforté les résultats en faveur d'une perte neuronale en conditions neuropathiques et plus spécifiquement la perte d'interneurones inhibiteurs (Scholz et al., 2005; Yowtak et al., 2013; Inquimbert et al., 2018).

Perte spécifique des interneurones inhibiteurs

Concernant les interneurones inhibiteurs, deux études dans les années 1990 rapportent une perte quasi totale du marquage dirigé contre le neurotransmetteur GABA entre 3 jours et 2 semaines après une CCI chez le rat (Ibuki et al., 1996; Eaton et al., 1998). Des études plus récentes rapportent une perte plus modérée : une perte de 25% d'ARN messager (ARNm) pour la GAD67 4 semaines après SNI chez le rat (Scholz et al., 2005) et une perte d'environ 10% des neurones GABAergiques dans la lamina II une et deux semaines après une SNL ou SNI chez la souris (Yowtak et al., 2013; Inquimbert et al., 2018). Récemment il a été mis en évidence suite à une SNI une perte de neurones inhibiteurs irréversible par un mécanisme d'excitotoxicité glutamatergique qui participe au maintien de douleurs neuropathiques (Inquimbert et al., 2018). Les auteurs montrent également que le récepteur NMDA joue un rôle essentiel dans ce phénomène d'excitotoxicité. En effet, la délétion conditionnelle du gène *Grin1* codant pour la sous-unité GluN1 (essentielle pour avoir des récepteurs NMDA fonctionnels) avant la SNI empêche la perte de neurones inhibiteurs. De manière intéressante, la délétion du gène *Grin1* n'a pas empêché le développement de l'allodynie mécanique mais prévient la chronicisation des douleurs neuropathiques indiquant le rôle spécifique des récepteurs NMDA dans le maintien de ces douleurs.

Transplantation de cellules souches GABAergiques

Enfin, il a été montré chez la souris qu'une transplantation de cellules souches GABAergiques provenant de cortex d'embryons dans la ME de souris adultes avait des effets bénéfiques (Bráz et al., 2012; Bráz et al., 2015; Etlín et al., 2016; Llewellyn-Smith et al., 2018). Par des approches électrophysiologiques, immunohistochimiques et de microscopie électronique, les auteurs ont montré que deux semaines après la transplantation, les cellules souches GABAergiques s'intègrent aux réseaux de la ME et deviennent des neurones GABAergiques fonctionnels à la fois en condition normale ou en condition SNI. De plus, l'injection de cellules souches GABAergiques une semaine après la réalisation de la SNI empêche la chronicisation de l'allodynie mécanique avec une récupération des seuils de sensibilité similaires aux souris pseudo-opérés SHAM. Cette transplantation permet par ailleurs de restaurer les taux d'ARNm de la GAD65 et GAD67 qui sont significativement réduits en condition SNI (Moore et al., 2002). L'ensemble de ces données indique un rétablissement de l'équilibre inhibition/excitation médié par une augmentation du nombre de neurones GABAergiques.

3.2.3 Modification de la synthèse, de la recapture et de la libération de GABA

Par des approches d'immunohistochimie sur la ME de rat, il a été observé deux et quatre semaines après une transection du nerf sciatique, une diminution de la détection du GABA (Castro-Lopes et al., 1993). De façon similaire, par des approches d'immunohistochimie et d'hybridation in situ sur la ME de rat, il a été montré une diminution de la détection de GABA et de GAD65 deux à quatre semaines après une CCI et SNI (Moore et al., 2002). On retrouve aussi une diminution de la GAD65 et de la GAD67 dans les CDME de rats à partir de trois jours après la CCI (Eaton et al., 1998). Ces résultats semblent suggérer que le contenu en GABA des terminaisons est diminué. Cela est cependant contredit par deux études menées chez le rat. La première, conduite par HPLC (High Performance Liquid Chromatography), montre une augmentation du contenu en GABA entre 1 et 30 jours après une CCI. Dans cette étude, un traitement quotidien avec un bloquant du pore des récepteurs NMDA, la Dizocilpine (MK-801), injectée par voie intrathécale empêche cette augmentation de GABA et de glycine et bloque le développement de l'hyperalgésie indiquant un rôle des récepteurs NMDA dans ce mécanisme d'hyperalgésie (Sato et Omote, 1996). La seconde, réalisée par microscopie électronique sur des ME de rats quatre semaines après une SNI, n'a pas détecté de changement de la densité de marquage des boutons GABAergiques (Polgár et Todd, 2008).

D'autres études rapportent que sept jours après une CCI chez le rat, il y a une diminution de l'expression du transporteur GAT-1 d'environ 40% (Miletic et al., 2003; Shih et al., 2008). Chez des rats SNL, il a aussi été montré une diminution de la libération de GABA suite à une stimulation par application de K⁺ à haute concentration (50mM) sur la corne dorsale ipsilatérale (Lever et al., 2003).

Enfin une étude sur le rat montre la diminution de l'expression des sous-unités $\gamma 2$ des récepteurs GABA_A exprimés dans les ganglions dorso-rachidiens après une CCI ce qui pourrait refléter la diminution d'expression de ces récepteurs ou un changement de la composition en sous-unités des récepteurs GABA_A (Obata et al., 2003).

3.2.4 Changement du gradient chlorure

Diminution de l'expression de KCC2 en condition pathologique

En 2003, il a été montré que suite à une CCI chez le rat, l'expression du co-transporteur potassium-chlorure (KCC2) dont la fonction est de maintenir une concentration en Cl⁻ intracellulaire faible est diminué dans les neurones de la lamina I (Coull et al., 2003). Cela mène à une augmentation de la concentration intracellulaire en ions Cl⁻ induisant un changement du potentiel d'équilibre des ions chlorure dans les CDME. La conséquence de ce changement de gradient est que l'ouverture des récepteurs GABA_A et glycine induit une hyperpolarisation plus faible qu'en condition physiologique voire même une dépolarisation (van den Pol et al., 1996). D'autres auteurs ont ensuite mis en évidence chez le rat que les microglies activées par la cytokine CCL2 libèrent du BDNF et de l'ATP qui en se liant aux récepteurs trkB et P2X4 sont responsables de la diminution d'expression de KCC2 (Rivera et al., 2004; Coull et al., 2005; Thacker et al., 2009) et de l'augmentation de l'activité des neurones de la lamina I ce qui peut jouer un rôle dans le développement de symptômes douloureux (Keller et al., 2007). Il a aussi été montré dans la ME de rat que trois et quatre semaines après une SNL, l'activité de la calpaïne calcium-dépendante est augmentée et induit le clivage du co-transporteur KCC2 (Zhou et al., 2012). Enfin le co-transporteur KCC2 peut aussi être modulé négativement suite à sa phosphorylation par la protéine kinase déficiente en lysine (WNK) (Kahle et al., 2013).

Augmentation de l'expression de KCC2 pour restaurer le gradient d'ion chlorure

De façon intéressante, l'augmentation d'expression du co-transporteur KCC2 induite par l'injection intrathécale d'un vecteur lentiviral contenant le gène codant pour le KCC2 permet de restaurer la fonction du co-transporteur suite à une SNL et de rétablir un gradient chlorure physiologique (E_{anions} environ -73mV comparé à -49mV après une CCI). De plus, ce transfert viral de KCC2 permet de rétablir l'activité physiologique des récepteurs NMDA aux éléments pré et postsynaptiques dont l'activité est augmentée suite à une lésion nerveuse (Li et al., 2016). De manière similaire, le blocage pharmacologique des récepteurs NMDA après une SNL permet de rétablir un gradient chlorure physiologique et l'inhibition synaptique (Lee et al., 2011; Zhou et al., 2012). Ces données indiquent que les récepteurs NMDA jouent un rôle important dans la régulation du transporteur KCC2. Bien que le gradient chlorure soit modifié en condition de douleur chronique, l'activation des récepteurs GABA ou glycine conservent probablement un effet inhibiteur sur la nociception étant donné que l'injection

d'agonistes GABA/glycine a un effet anti-nociceptif dans plusieurs modèles de douleurs neuropathiques.

4. Plasticité activité-dépendante de la transmission inhibitrice dans le système nerveux central

Les différentes modifications de la transmission synaptique inhibitrice dans la ME montrent que le réseau inhibiteur n'est pas figé mais au contraire très plastique. Cela signifie que la transmission de l'information peut être modifiée en fonction des activités antérieures. Ces modifications peuvent être de courte durée (millisecondes) et on parle alors de plasticité synaptique à court terme ou perdurer dans le temps (30 min à plusieurs jours) pour la plasticité à long terme. De plus, les modifications peuvent être dans le sens d'une augmentation de la transmission d'information (potentialisation) ou d'une diminution (dépression).

Après une lésion nerveuse périphérique, les fibres afférentes développent une activité exacerbée (Wall et al., 1974; Liu et al., 2000; Wu et al., 2001). Cela induit au niveau du réseau neuronal spinal une activité synaptique anormale responsable de la mise en place de mécanismes de plasticité au niveau des synapses excitatrices et inhibitrices. Concernant les mécanismes de plasticité de la synapse excitatrice dans la ME, ceux-ci sont étudiés depuis plus longtemps et sont mieux connus que les mécanismes de plasticité de la synapse inhibitrice (Cook et al., 1987; Dougherty et Willis, 1992). Plusieurs études rapportent notamment des mécanismes de potentialisation à long terme (LTP) au niveau des synapses entre fibres afférentes de type C et neurones de la lamina I dont l'origine peut être postsynaptique ou présynaptique (Liu et Sandkühler, 1995; Sandkühler et Liu, 1998; Ikeda et al., 2003; Ikeda et al., 2006). Ces mécanismes de plasticité sont aussi connus pour jouer un rôle important dans le développement et le maintien de douleurs chroniques (Pockett, 1995; Lynskey et al., 2008). Généralement, ces mécanismes impliquent l'activation de divers récepteurs tels que les récepteurs NMDA, AMPA, mGluR du glutamate ou TrkB qui vont induire l'activation de voies intracellulaires responsables des mécanismes de plasticité. Parmi les éléments activés on retrouve la PKC, la protéine kinase 2 dépendante du complexe Ca^{2+} /calmoduline (CaMKII), ERK et la PKA. Pour plus d'informations concernant les mécanismes de plasticité de la transmission synaptique excitatrice dans la ME, voir Latremoliere et Woolf (2009); Kuner (2015).

A l'inverse, la plasticité de la transmission inhibitrice spinale a été très peu étudiée à ce jour dans la ME. Dans cette partie de l'introduction, les rares cas de plasticité synaptique de la synapse inhibitrice connus dans la ME seront décrits. Ceux-ci sont peu nombreux, mais des mécanismes de

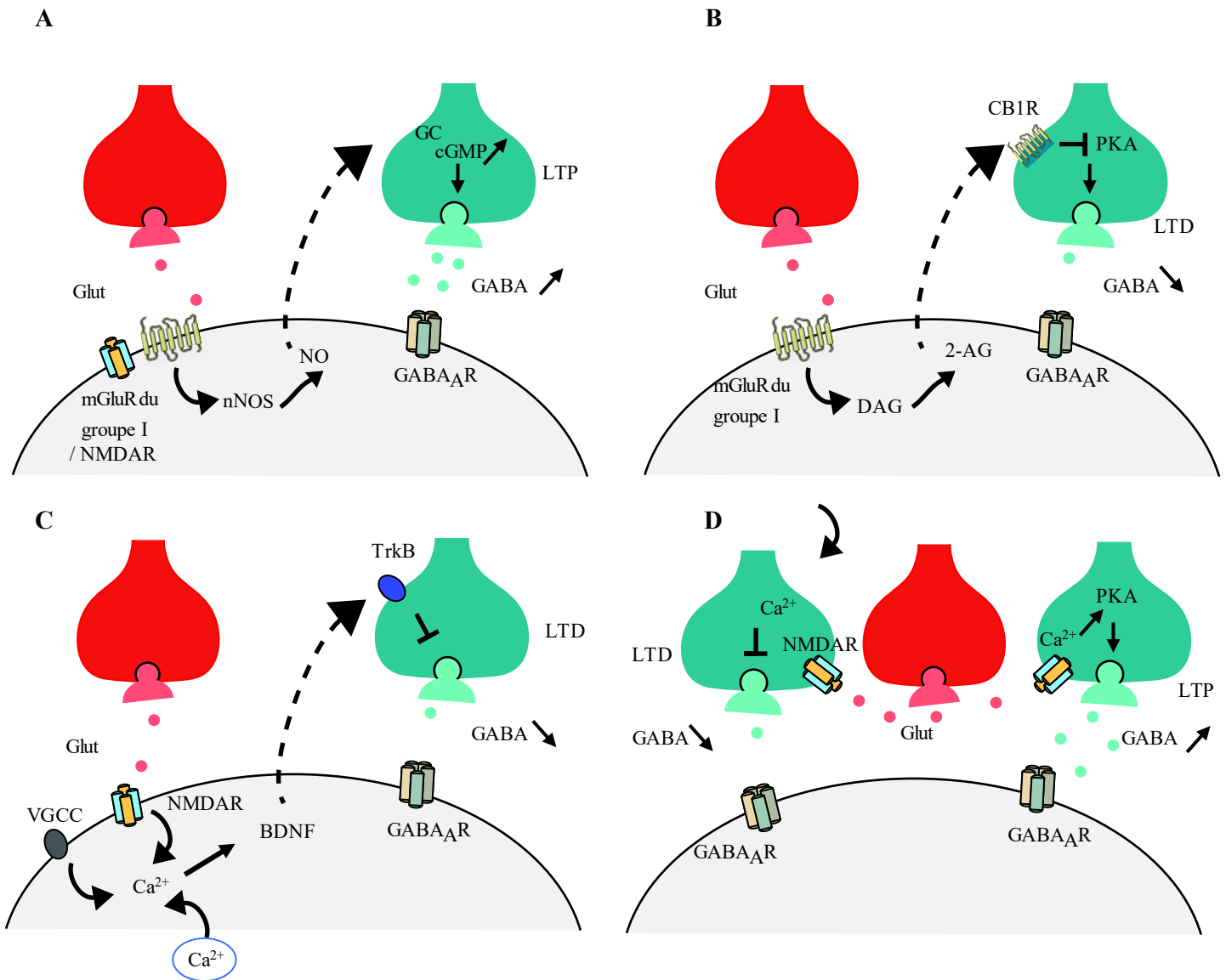


Figure 16 : Représentation des différentes formes de plasticités de la synapse GABAergique exprimées à l'élément présynaptique. D'après Castillo et al., 2011.

A. La LTP médié par le NO implique l'activation de mGluR du groupe I dans la lamina I (Fenselau et al., 2011) et de récepteurs NMDA dans l'aire tegmentale ventrale (Nugent et al., 2007). Cela permet l'activation de la NOS et la production de NO qui va agir au niveau présynaptique et activer la guanylate cyclase, augmentant ainsi le taux de cGMP et la libération de GABA.

B. A l'élément postsynaptique, l'activation des récepteurs mGlu du groupe I peut induire la production de diacylglycérol (DAG) via la phospholipase C. le DAG est ensuite transformé par la diacylglycérol lipase en 2-AG qui va traverser la synapse et se lier aux récepteurs CB1R localisé sur l'élément présynaptique. L'activation de ces récepteurs réduit l'activité de la PKA et mène à une LTD de la synapse GABAergique. (Duguid et Smart., 2004 ; Kano et al., 2009).

C. A l'élément postsynaptique, le BDNF est produit suite à une augmentation de calcium intracellulaire provenant de l'ouverture des récepteurs NMDA, des canaux calciques voltage-dépendants (VGCC) ou de stock intracellulaire de calcium. Le BDNF va ensuite agir sur les récepteurs TrkB localisé à l'élément présynaptique ce qui induit une LTD de la synapse GABAergique. (Inagaki et al., 2008).

D. Le glutamate provenant de synapses excitatrices voisines peut directement agir sur des récepteurs NMDA localisés à l'élément présynaptique de synapses inhibitrices et induire des mécanismes de LTD ou LTP. (Lien et al., 2006 ; Liu et al., 2007 ; Lachamp et al., 2009).

plasticité similaires à ceux décrits dans d'autres région du SNC sont envisageables dans le réseau de la ME. Un aperçu des mécanismes de plasticité de la transmission inhibitrice ayant lieu dans d'autres région du SNC sera donc donné. Les mécanismes de plasticité structurale, impliqués dans la transition des douleurs aiguës aux douleurs chroniques, ne seront pas abordés dans cette partie mais le lecteur intéressé peut se référer à la revue de : Kuner et Flor (2017).

4.1 Plasticité présynaptique de la transmission GABAergique induite par un messager rétrograde

Ces formes de plasticité sont généralement induites par un messager rétrograde produit au niveau de l'élément postsynaptique qui va ensuite traverser la synapse pour agir à l'élément présynaptique mais peuvent aussi être due à une action directe du glutamate libéré par des synapses excitatrices voisines.

Messenger rétrograde : Monoxyde d'azote

Dans la lamina I des CDME, Fenselau et al. (2011) rapportent l'existence d'une plasticité hétérosynaptique à long terme de la synapse GABAergique. Les auteurs ont montré que la stimulation des fibres afférentes de type C avec un protocole de stimulation à haute fréquence (3 x 1sec à 100Hz) induit une LTP des synapses glutamatergiques entre l'afférence primaire stimulée et un neurone de la lamina I mais aussi une LTP des synapses GABAergiques contactant le neurone enregistré. Celle-ci est induite par l'activation de mGluR1, par le glutamate libéré par les fibres afférentes, ce qui permet la production et la libération de monoxyde d'azote. Le monoxyde d'azote libéré agit ensuite comme un messager rétrograde sur la terminaison inhibitrice GABAergique induisant l'activation de la guanylate cyclase (GC) et par conséquent l'augmentation de la concentration intracellulaire de guanosine monophosphate cyclique (cGMP). L'effet final sera une potentialisation à long terme de la libération synaptique de GABA (Figure 16). Ce mécanisme renforce probablement les quatre grandes fonctions de l'inhibition décrites plus haut. Il est aussi envisageable que cette plasticité ait un rôle supplémentaire et puisse empêcher la mise en place de LTP aux synapses excitatrices dans la lamina I. En effet il a été montré *in vivo* que la potentialisation de la transmission GABAergique dans la CD peut bloquer la LTP au niveau des fibres C (Hu et al., 2006).

Cette forme de plasticité présynaptique partage plusieurs caractéristiques avec celle décrite dans l'aire tegmentale ventrale. En effet, dans cette structure, la stimulation à haute fréquence d'afférences glutamatergiques innervant des neurones dopaminergiques induit la production de monoxyde d'azote qui mène aussi à une LTP hétérosynaptique de la transmission GABAergique. La différence

fondamentale étant que dans cette forme de plasticité, l'activation des récepteurs NMDA est essentielle pour initier la production et la libération de monoxyde d'azote (Nugent et al., 2007) (Figure 16).

Messenger rétrograde : Endocanabinoïdes et glutamate

Aucun mécanisme de plasticité de la transmission synaptique inhibitrice impliquant des endocanabinoïdes n'a été décrit dans la ME. Cependant, dans d'autres structures du SNC, l'existence de formes de plasticité de la transmission inhibitrice impliquant un messenger rétrograde endocanabinoïdes ont été montrées. Dans le cervelet et l'hippocampe, la dépolarisation des cellules de Purkinje ou des neurones pyramidaux induit une dépression transitoire (<5min) de la libération de GABA par les interneurons inhibiteurs. Cette forme de plasticité a été appelée « suppression de l'inhibition par la dépolarisation » (Llano et al., 1991; Pitler et Alger, 1992). La suppression de l'inhibition par la dépolarisation implique généralement la synthèse et la libération de 2-arachidonoylglycérol (2-AG) qui va agir de façon rétrograde sur les récepteurs des endocanabinoïdes de type 1 (CB1R) menant à une diminution temporaire de la libération de GABA spontanée et évoquée (Kano et al., 2009). Cette forme de plasticité implique principalement les récepteurs NMDA ou les récepteurs mGluR1 dont l'activation induit la production de 2-AG. Toujours dans le cervelet, une stimulation plus intense des cellules de Purkinje peut mener à la libération à la fois d'endocanabinoïdes et de glutamate. Le glutamate agit sur des récepteurs NMDA présynaptiques localisés sur les terminaisons des interneurons inhibiteurs et permet l'augmentation de calcium intracellulaire à la fois par l'ouverture des récepteurs NMDA et par la libération de calcium provenant des stocks intracellulaires. L'action du glutamate mènera finalement à une LTP de la synapse GABAergique. Ces deux mécanismes permettent aux cellules de Purkinje de diminuer leur libération de GABA ou au contraire de l'augmenter en cas d'activité plus importante au sein du réseau (Duguid et Smart, 2004) (Figure 16).

Dans la ME, les récepteurs des endocanabinoïdes de type 1 sont exprimés, notamment dans les laminae superficielles (I-III) (Farquhar-Smith et al., 2000). Les endocanabinoïdes sont aussi retrouvés dans la ME, de plus, il est montré chez le rat que les niveaux d'endocanabinoïdes varient en condition neuropathique. Il est par exemple observé à 3 jours post CCI, une augmentation des taux de 2-AG et d'anandamide (Petrosino et al., 2007). Il est envisageable dans la ME que des mécanismes de plasticité de la transmission synaptique inhibitrice impliquant les endocanabinoïdes aient lieu.

Messenger rétrograde : BDNF

Par des approches électrophysiologiques, il a été montré une potentialisation de la transmission synaptique inhibitrice par l'action rétrograde du BDNF dans l'hippocampe, le cortex visuel et le tectum optique (Gubellini et al., 2005; Inagaki et al., 2008; Sivakumaran et al., 2009). Ces mécanismes de LTP sont bloqués par l'application d'un antagoniste des récepteurs TrkB (K252a) indiquant un mode d'action du BDNF par l'intermédiaire de son récepteur TrkB. La production et la libération de BDNF dans les différentes régions du SNC semble nécessiter l'augmentation de calcium intracellulaire dans l'élément

présynaptique, le calcium pouvant provenir d'un influx à travers les récepteurs NMDA (Liu et al., 2007a), les canaux calcium de type L (Sivakumaran et al., 2009) ou d'une libération à partir des stocks internes de calcium (Inagaki et al., 2008) (Figure 16).

Dans la ME, le BDNF et son récepteur TrkB sont retrouvés. Il est aussi montré en condition neuropathique que l'expression du récepteur TrkB et le taux de BDNF sont augmentés (Weishaupt et al., 2012). Il est donc aussi possible d'imaginer des mécanismes similaires à ceux présentés ci-dessus dans la ME.

Des mécanismes de plasticité présynaptique de la synapses GABAergiques peuvent aussi être induits par du glutamate provenant directement de synapses excitatrices voisines et agissant sur des récepteurs NMDA présynaptiques. Selon les structures, l'activation des récepteurs NMDA présynaptiques pourra mener à une LTD, comme dans le nerf optique de xénope (Lien et al., 2006; Liu et al., 2007a) ou à une LTP de la transmission GABAergique, comme décrit dans le cervelet (Liu et Lachamp, 2006; Lachamp et al., 2009).

4.2 Plasticité exprimée sur l'élément postsynaptique

Plasticité de la transmission glycinergique

Outre la plasticité à long terme de la transmission GABAergique dans la lamina I mise en évidence par Fenselau (Figure 16), il existe d'autres formes de plasticité de la transmission inhibitrice dans la ME. Il a été montré récemment chez la souris jeune que l'activation des récepteurs NMDA potentialise la transmission synaptique glycinergique sur les interneurons GABAergiques de la lamina II (Kloc et al., 2019). Cette forme de plasticité requiert l'entrée de calcium suite à l'activation des récepteurs NMDA dans le neurone postsynaptique et est exprimée à l'élément postsynaptique. En effet, les auteurs ne rapportent aucun changement du paired-pulse ratio (PPR), qui est un indicateur de la modification de la probabilité de libération de neurotransmetteur par l'élément présynaptique ce qui va dans le sens d'une plasticité postsynaptique. Il a aussi été montré que dans les couches superficielles de la ME, l'exposition à l'interleukine-1 β pro-inflammatoire induit une LTP de la transmission glycinergique sur des neurones GABAergiques (Chirila et al., 2014). Dans le circuit de la ME, une LTP de la transmission glycinergique sur des neurones GABAergiques peut mener à un mécanisme de désinhibition et promouvoir l'excitabilité au sein du réseau spinal, en général associé avec le développement de symptôme de douleur (Miraucourt et al., 2007; Petitjean et al., 2015). Enfin, l'activité des récepteurs de la glycine dans la lamina II peut être modifiée via des phosphorylations. En condition inflammatoire, les récepteurs à la glycine contenant la sous-unité $\alpha 3$ peuvent être phosphorylés par la PKA, suite à l'activation des récepteurs de la prostaglandine E₂ (PGE₂), induisant l'inhibition du

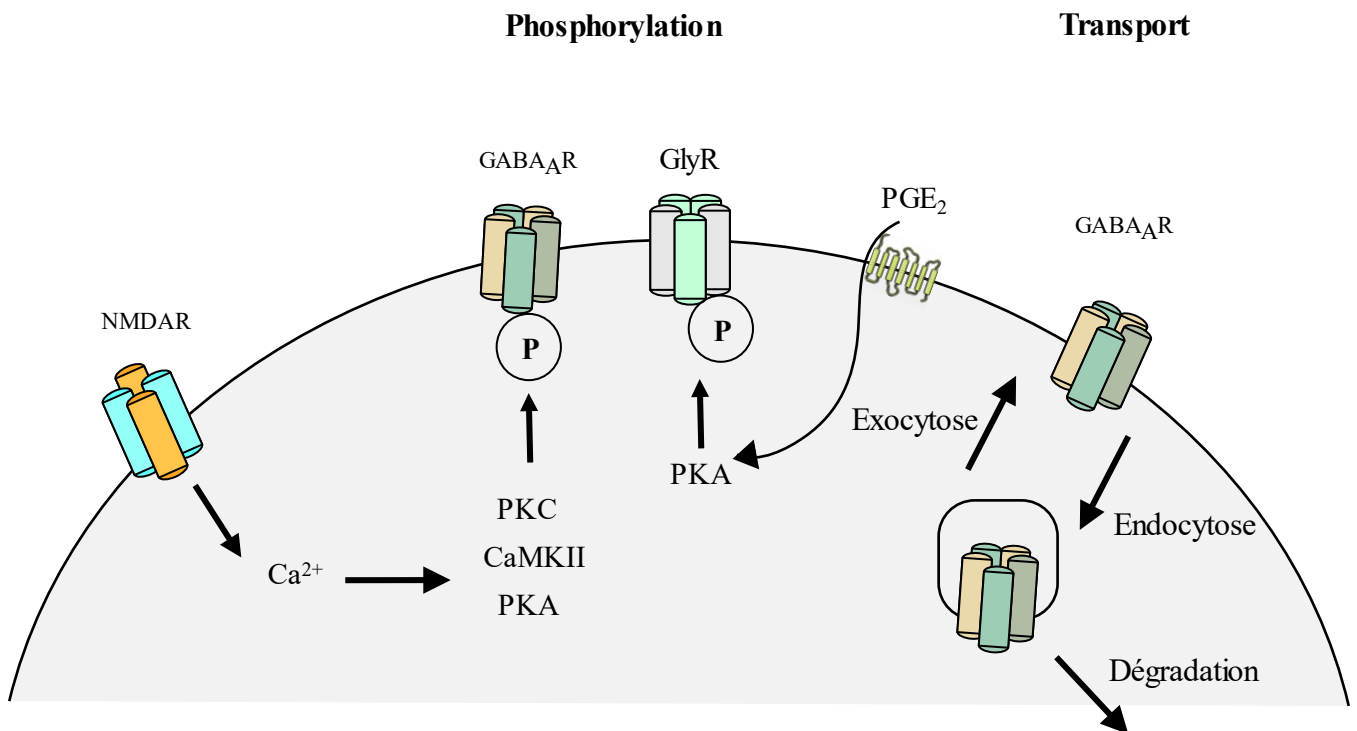


Figure 17 : Représentation de certaines formes de plasticité de la synapse GABAergique et glycinergique exprimées à l'élément postsynaptique.

Des modifications du fonctionnement des récepteurs GABA_A et de la glycine peuvent avoir lieu suite à des phosphorylations par des protéines kinases. La PGE₂ active les récepteurs des prostaglandines E ce qui induit l'activation de la PKA et mène à la phosphorylation et inhibition des récepteurs à la glycine dans les CDME. La PKC, la CaMKII, et la PKA peuvent phosphoryler les récepteurs GABA_A ce qui peut mener à la modulation positive de ces récepteurs dans les cellules de Purkinje par exemple (Kano et al., 1992) ou leur modulation négative comme dans l'hippocampe (Wanaverbecq et al., 2007). La régulation du transport, de l'endocytose et de l'insertion dans la membrane plasmique des récepteurs permet aussi de modifier la transmission inhibitrice. Ainsi la transmission inhibitrice peut être réduite par une augmentation de l'endocytose et à l'inverse augmentée si l'insertion dans la membrane plasmique est dominante (Arancibia-Carcamo et Kittler., 2009).

récepteur sous-tendant le développement d'hyperalgésie thermique et mécanique (Harvey et al., 2004) (Figure 17).

Plasticité de la transmission GABAergique

Dans la ME, aucune étude ne rapporte de plasticité de la transmission GABAergique à l'élément postsynaptique. Il est possible que des mécanismes similaires de plasticités de la transmission GABAergique retrouvés dans d'autres régions du SNC (Figure 17) aient lieu dans la ME. En culture sur des neurones de l'hippocampe par exemple, les récepteurs NMDA modulent les récepteurs GABA_A par l'intermédiaire d'une augmentation de calcium intracellulaire. L'augmentation de la concentration intracellulaire de calcium entraîne l'activation de plusieurs cascades de signalisation dont la protéine kinase 2 dépendante du complexe Ca²⁺/calmoduline (CaMKII), la PKA et la PKC qui peuvent moduler l'état de phosphorylation, la mobilité, la composition en sous-unité des récepteurs GABA_A ainsi que leur insertion à la membrane (Marsden et al., 2007; Vithlani et al., 2011). Ces cascades de phosphorylation peuvent mener à une potentialisation de l'activité des récepteurs GABA_A comme par exemple dans les cellules de Purkinje (Kano et al., 1992) ou à l'inverse à leur inhibition transitoire dans l'hippocampe (Wanaverbecq et al., 2007). En culture sur des neurones de l'hippocampe, l'activation des récepteurs NMDA affecte l'expression des récepteurs GABA_A et peut, en fonction du degré d'activation de la calcineurine, augmenter ou diminuer cette expression (Marsden et al., 2007; Bannai et al., 2009; Marsden et al., 2010).

Dans l'hippocampe, au niveau des synapses entre des colatérales de Schaffer et des interneurons du stratum radiatum ou des neurones pyramidaux, la LTP ou la LTD de la transmission GABAergique peut avoir lieu et dépend d'une augmentation de calcium intracellulaire. La LTP est dépendante des récepteurs NMDA et requiert la dépolarisation des éléments pré et postsynaptiques (Wang et Kelly, 2001; Lamsa et al., 2005). La LTD dépend de l'activation des mGluR1 et des récepteurs AMPA perméables aux calcium (McMahon et Kauer, 1997; Cowan et al., 1998).

Plasticité dépendante du « timing » de décharge

Une autre forme de plasticité appelée plasticité dépendante du timing de décharge mise en évidence sur des tranches d'hippocampe nécessite l'activité simultanée d'un interneurone et d'une cellule excitatrice. Dans ce cas, une entrée postsynaptique de calcium par les canaux calcium de type L ou par les récepteurs NMDA peut changer l'équilibre du gradient chlorure et réduire l'efficacité de l'inhibition (Ormond et Woodin, 2009).

D'autres formes de plasticité nécessitant une activité excitatrice et inhibitrice synchronisées ont aussi été démontrées. Ainsi une forme de LTD a été montrée dans le système visuel de la grenouille (Lien et al., 2006) et une forme de LTP dans le cortex cérébelleux de rongeur (Liu et Lachamp, 2006), ces deux formes de plasticités impliquant des récepteurs NMDA présynaptiques. D'autres formes de LTD

dépendantes de la décharge présynaptique de potentiels d'actions dans l'hippocampe ne sont pas dépendantes des récepteurs NMDA (Heifets et al., 2008) mais des mGluR1.

4.3 Plasticité de la transmission inhibitrice impliquant un maillon glial

Astrocytes

Comme l'ont montré Kang et al. (1998), les astrocytes sont des partenaires importants dans la modulation activité-dépendante des synapses inhibitrices dans l'hippocampe et peuvent faciliter la transmission inhibitrice. Par des approches d'imagerie du calcium intracellulaire et d'électrophysiologie sur des tranches de jeunes rats, les auteurs ont montré que la stimulation électrique répétée d'un interneurone GABAergique ciblant un neurone pyramidal glutamatergique dans l'hippocampe induit une facilitation de la transmission GABAergique qui requiert les astrocytes environnants. En effet, les auteurs ont montré que la stimulation répétée d'un interneurone induit l'activation des récepteurs GABA_B astrocytaire. L'activation de ces récepteurs entraîne une élévation de calcium dans les astrocytes environnants. Cela induit la libération de glutamate par les astrocytes qui agit sur des récepteurs ionotropes du glutamate présynaptique. L'activation de ces récepteurs, potentiellement des récepteurs NMDA, induit la facilitation de la transmission inhibitrice (Kang et al., 1998). D'autres études pionnières menées sur des cultures de neurones d'hippocampe ont révélé que l'entrée de calcium dans les astrocytes potentialise les courants GABAergiques induit par l'activation des récepteurs GABA_A (Liu et al., 1996; Liu et al., 1997). D'autres études récentes mettent en avant le rôle important des astrocytes dans les processus de plasticité de la transmission inhibitrice. En effet, la transmission inhibitrice et le nombre de synapses est plus important dans les cultures de neurones renfermant des astrocytes qu'en absence d'astrocytes (Kaczor et Mozrzymas, 2017). Enfin les astrocytes en culture provenant du cervelet, du bulbe olfactif et de l'hippocampe peuvent aussi libérer du GABA (Kozlov et al., 2006; Lee et al., 2010) qui pourrait directement moduler l'activité des synapses GABAergiques environnantes.

Microglie

Les cellules microgliales ont aussi un rôle dans la plasticité de la transmission inhibitrice dans le SNC. Ces cellules peuvent par exemple libérer l'interleukine-10 qui facilite le développement des synapses inhibitrices sur des neurones d'hippocampe en culture (Lim et al., 2013). L'activation microgliale induite par des injections de lipopolysaccharide peut avoir un effet neuroprotecteur et réduire l'apoptose neuronale suivant une lésion cryogénique du cortex notamment via l'activation des récepteurs TLR4 (Chen et al., 2012). La microglie activée peut aussi réguler le développement de la synapse glycinergique dans la ME (Cantaut-Belarif et al., 2017). Pour revue : Um (2017).

En conclusion, la transmission inhibitrice a un rôle central dans le développement et le maintien de douleurs neuropathiques. Dans de nombreux cas de lésion de nerfs périphérique il est en effet observé une diminution de l'efficacité de l'inhibition ce qui induit la désinhibition du réseau spinal. Si les modifications de la transmission inhibitrice commencent à être connues, les mécanismes responsables restent dans de nombreux cas à élucider, en particulier dans la ME.

Suite à une lésion nerveuse périphérique, les fibres afférentes primaires développent une activité augmentée et la libération de glutamate est augmentée (Latremoliere et Woolf, 2009; Kuner, 2015). Le glutamate va alors se lier aux divers récepteurs du glutamate dont le récepteur NMDA, bien connus pour son implication dans les phénomènes de plasticités et de sensibilisation du système nociceptif spinal.

Dans le chapitre suivant, les caractéristiques générales des récepteurs NMDA et leur localisation spinale seront décrites. Le rôle des récepteurs NMDA dans la mise en place et le maintien des douleurs neuropathiques sera ensuite développé.

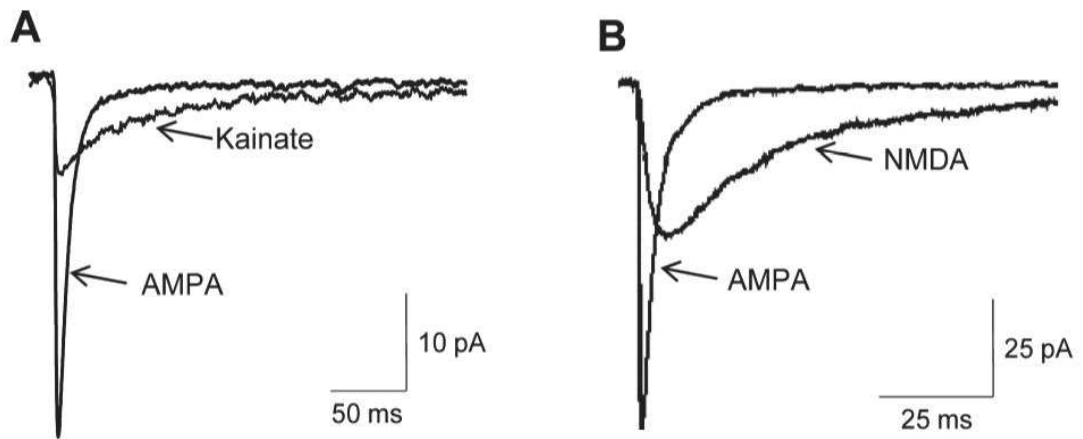


Figure 18 : Contribution des récepteurs ionotropiques du glutamate à la transmission synaptique.

(A) Contribution des récepteurs AMPA et Kainate aux CPSE miniatures mesurés dans l'hippocampe entre une fibre moussue et une cellule pyramidale de l'aire CA3. Les effets des antagonistes des récepteurs du glutamate montrent que l'activation des récepteurs AMPA produit des CPSE plus grands et plus rapides que ceux induits par l'activation des récepteurs kainate. D'après Mott et al., 2008. (B) Contributions des récepteurs AMPA et NMDA aux CPSE mesurés à une synapse dans le cortex visuel entre une cellule pyramidale et un interneurone. Le blocage des récepteurs AMPA met en évidence la composante plus lente des CPSE induits par les récepteurs NMDA. D'après Watanabe et al., 2005.

Troisième partie :

Le récepteur NMDA.

Les récepteurs NMDA sont des récepteurs ionotropes du glutamate composés de quatre sous-unités arrangées autour d'un pore central perméable aux cations Na^+ , K^+ et Ca^{2+} . Ces récepteurs ont des propriétés fonctionnelles qui les distinguent des autres récepteurs du glutamate. Les plus importantes étant sans doute que leur perméabilité au Ca^{2+} est une des plus élevées parmi les récepteurs ionotropes (Rogers et Dani, 1995) et que ces récepteurs sont bloqués par le magnésium (Mg^{2+}) au potentiel de repos des neurones. L'augmentation de la concentration de Ca^{2+} intracellulaire libre provoquée par l'ouverture des récepteurs NMDA jouent un rôle majeur dans les phénomènes de plasticité synaptique. Des modifications d'expression ou de fonction de ce récepteur peuvent être délétères et être à l'origine du développement de maladies neurologiques (Wang et Shuaib, 2005) et psychiatriques (Heresco-Levy et Javitt, 1998; Iii et Chafee, 2006). Ce récepteur a donc fait l'objet de nombreuses études depuis sa découverte visant à mieux comprendre son fonctionnement dans le but de développer de nouvelles thérapies.

1. Découverte des récepteurs NMDA

La première mise en évidence de l'existence des récepteurs NMDA provient de données pharmacologiques montrant que le NMDA active spécifiquement une famille d'iGluRs (Watkins et Evans, 1981). Plus tard il sera observé que ces récepteurs, nommés récepteurs NMDA, sont spécifiquement bloqués par l'AP5 mais sont insensibles au 6-cyano-7-nitroquinoxaline-2,3-dione (CNQX) et au 2,3-dihydroxy-6-nitro-7-sulfamoyl-benzo[f]quinoxaline (NBQX). Les réponses synaptiques médiées par l'activation des différents types de récepteurs ionotropes du glutamate peuvent être identifiées grâce à des antagonistes spécifiques, tels que le CNQX et NBQX qui bloquent les récepteurs AMPA/Kaïnate et l'AP5 qui bloque les récepteurs NMDA (Figure 18) (Mott et al., 2008; Watanabe et al., 2005). Cela permet aussi de remarquer que les courants induits par l'activation du récepteur NMDA ont des cinétiques d'activation de l'ordre de la dizaine de milliseconde et s'inactivent sur des dizaines ou des centaines de millisecondes selon la composition en sous-unités. Ce récepteur est donc responsable de la composante plus lente des réponses synaptiques induites par l'activation des iGluRs étant donné que les récepteurs AMPA et Kaïnate ont des cinétiques d'activation et d'inactivation rapides (<1ms) leur permettant de répondre à des variations très rapides de glutamate dans la fente synaptique (Erreger et al., 2004).

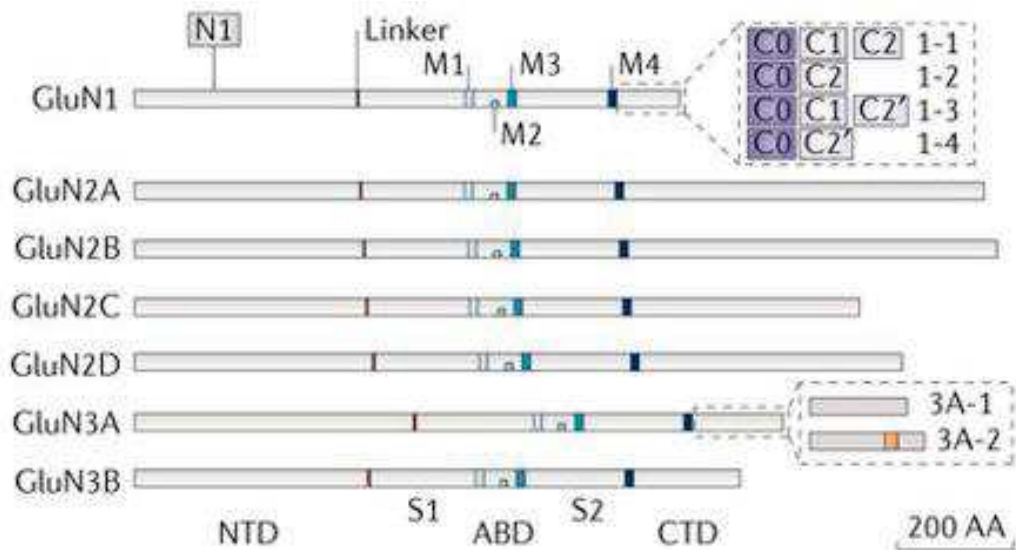


Figure 19 : Structure et comparaison des sept sous-unités des récepteurs NMDA.

Les sept différentes sous-unités des récepteurs NMDA et les longueurs des différents domaines (en acide aminé) sont représentées. Les sous-unités GluN1 et GluN3A peuvent faire l'objet d'épissages alternatifs, augmentant ainsi les possibilités de combinaisons. On remarque que les domaines NTD (domaine N-terminale), transmembranaires (de M1 à M4) et ABD (domaine de liaison du ligand) sont relativement bien conservés entre les différentes sous-unités contrairement au domaine CTD (domaine C-terminale) dont la longueur diffère fortement entre sous-unité. D'après Paoletti et al., 2013.

Sept gènes caractérisés par clonage codent pour les sept sous-unités du récepteur NMDA et sont divisés en trois familles en fonction de leur homologie de séquence. Le gène *Grin1* a été caractérisé par clonage dans les ovocytes de Xénope en 1991 et code pour la sous-unité GluN1 (Moriyoshi et al., 1991). Quatre gènes codent pour les sous-unités GluN2, *Grin2A-D* pour les sous-unités GluN2A-D. Enfin deux gènes codent pour les sous-unités GluN3, ce sont les gènes *Grin3A* et *B* (Figure 19). Il peut donc en théorie exister un très grand nombre de combinaisons de sous-unités pour former des récepteurs NMDA dans le SNC. Cependant, la présence de deux sous-unités GluN1 est nécessaire pour former un récepteur canal fonctionnel et le complexe le plus fréquemment retrouvé dans la ME est un assemblage de deux sous-unités GluN1 et deux sous-unités GluN2A/B (Petrulia et al., 1994; Mi et al., 2004).

2. Propriétés des récepteurs NMDA

2.1 Structure des récepteurs NMDA

La structure globale des sous-unités du récepteur NMDA est similaire à celle des autres sous-unités des récepteurs ionotropes du glutamate. Chaque sous-unité est ainsi constituée de quatre domaines, le domaine N-terminal et le domaine de liaison de l'agoniste (« agonist binding domain ») au niveau extracellulaire, le domaine transmembranaire et le domaine C-terminal dans le compartiment intracellulaire (Figure 20).

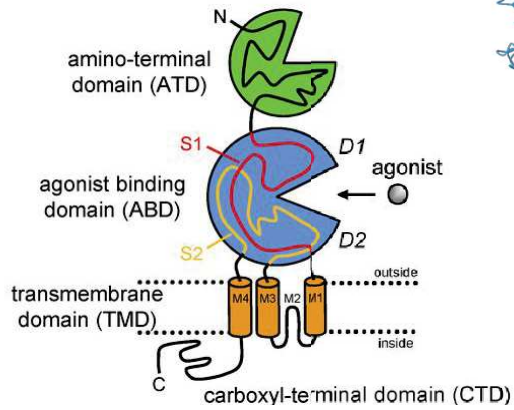
Le **domaine N-terminal** a la forme de deux globes bilobés en forme de pince (« clamshell-like »). Cette partie est impliquée dans l'assemblage des sous-unités et dans les régulations par des modulateurs allostériques.

Le **domaine de liaison de l'agoniste** situé sous le domaine N-terminal est formé par les segments S1 et S2 qui vont constituer le site de liaison de l'agoniste pour les sous-unités GluN2 et le site de liaison du co-agoniste pour les sous-unités GluN1 et GluN3.

On retrouve ensuite le **domaine transmembranaire** constitué de trois hélices transmembranaires (M1, M3 et M4) et d'une boucle intramembranaire (M2). Ce domaine est responsable de la formation du pore, de la sélectivité ionique et de la perméabilité du canal.

Enfin le **domaine C terminal** intracellulaire complète la structure du récepteur NMDA. Ce domaine est le moins conservé entre les différentes sous-unités et peut être de longueur très variable. Il est impliqué dans le couplage à d'autres protéines intracellulaires (Ryan et al., 2008) et donc fortement impliqué dans la diversité des effets de l'activation des récepteurs NMDA. Ce domaine est également important pour l'ancrage et le déplacement du récepteur à la membrane.

(A)



(B)

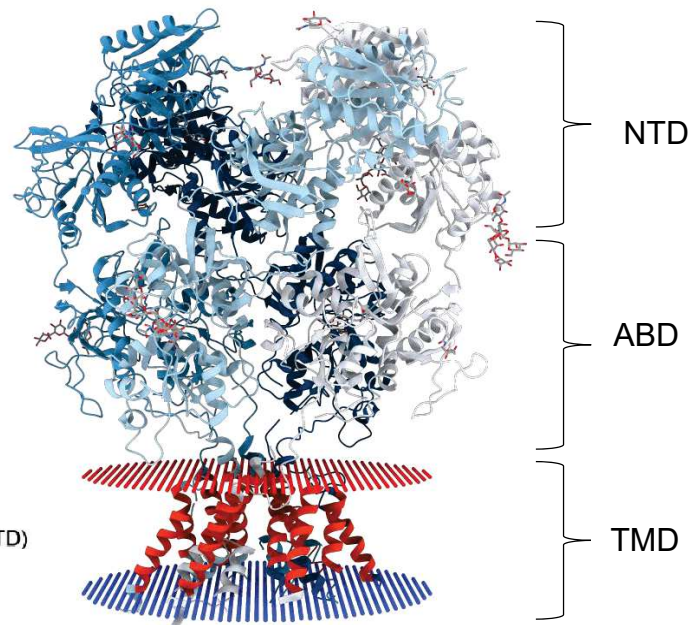


Figure 20 : Structure du récepteur NMDA.

(A) Représentation schématique d'une sous-unité du récepteur NMDA. La sous-unité est formée de quatre domaines. Le domaine N terminal (NTD) et le domaine de liaison de l'agoniste (ABD) forment la partie extracellulaire de la sous-unité. Le domaine transmembranaire (TMD) permet la formation du pore et le domaine C terminale (CTD) se trouvant dans la partie intracellulaire permet le couplage à d'autres protéines intracellulaires. D'après Paoletti et al., 2013.

(B) Structure cristallographique d'un récepteur GluN1a/GluN2B (le domaine CTD n'est pas présent).

2.2 Activation des récepteurs NMDA

Les récepteurs NMDA possèdent un mode d'activation très particulier. Trois conditions doivent habituellement être remplies pour permettre leur activation (Figure 21) (Mayer et al., 1984). La première condition est la liaison de deux molécules d'agoniste, en général le glutamate, sur le domaine de liaison du ligand des sous-unités GluN2. Il faut ajouter à cela la liaison de deux molécules de co-agoniste, la glycine (Johnson et Ascher, 1987; Kleckner et Dingledine, 1988) ou la D-sérine (Hashimoto et al., 1992) sur les domaines de liaison du ligand des sous-unités GluN1 ou GluN3. Enfin les récepteurs NMDA ont la particularité d'avoir leur pore ionique bloqué par des ions Mg^{2+} extracellulaires (1-2mM) au potentiel de repos des neurones (environ -60mV). Ce blocage est levé lors d'une dépolarisation de la membrane qui libère ainsi le pore et permet l'entrée de Ca^{2+} . Ce blocage ainsi que la cinétique d'activation lente des récepteurs NMDA est à l'origine de la qualification de détecteur de coïncidence donnée à ce récepteur. En effet, pour permettre l'ouverture du pore des récepteurs NMDA, il faut simultanément une stimulation de l'élément présynaptique et une dépolarisation postsynaptique.

Il est cependant intéressant de noter que ces trois conditions ne sont pas toujours requises pour observer une activation du récepteur NMDA et un influx de Ca^{2+} à travers le pore. Dans une étude réalisée sur des neurones isolés de la CDME de rat, l'activation des récepteurs NMDA sans dépolarisation et en présence d'une concentration physiologique en ions Mg^{2+} (1mM ou 100 μ M) peut entraîner une augmentation de calcium intracellulaire libre (Reichling et MacDermott, 1996). De plus, il est maintenant connu que les récepteurs NMDA contenant les sous-unités GluN2C/D et GluN3 sont moins sensibles au blocage par le Mg^{2+} (Dingledine et al., 1999; Paoletti et al., 2013). Des récepteurs NMDA contenant ces sous-unités pourraient donc être activés sans qu'il n'y ait de dépolarisation. Toutefois, ces données ont été obtenues *in-vitro* en culture et il serait nécessaire de vérifier ces résultats *in-vivo*.

2.3 Propriétés biophysique du récepteur NMDA

Chaque sous-unité possède une structure unique qui donne au récepteur final des propriétés pharmacologiques et fonctionnelles spécifiques (Traynelis et al., 2010). La composition en sous-unité confère au récepteur final son affinité pour le ligand, ses cinétiques d'activation, d'inactivation, ses propriétés de perméabilité aux cations et sa probabilité d'ouverture (Tableau 2 et Figure 22).

2.3.1 Activité pharmacologique des ligands

L'hyperpolarisation permet le bloc Magnésium

La dépolarisation lève le bloc Magnésium

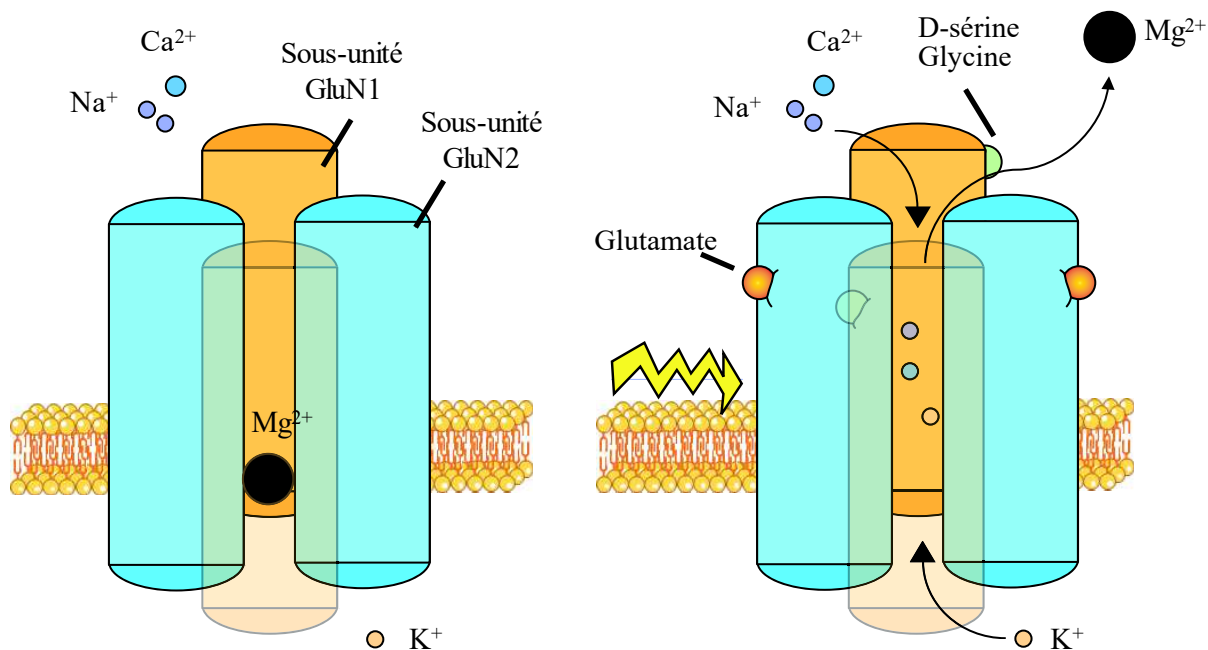


Figure 21 : Mode d'activation classique du récepteur NMDA.

Pour être activé, ce récepteur nécessite la liaison de deux molécules d'agonistes, deux molécules de co-agoniste ainsi que l'absence de magnésium au niveau du pore. L'absence du bloc magnésium est généralement permis par la dépolarisation de la membrane représenté ici par la flèche jaune. L'ouverture du canal permet le passage des cations calciums, sodiums et potassiums. Modifié de Purves et al., Neurosciences 5^{ème} édition.

Les agonistes

L'affinité pour le glutamate est forte pour la sous-unité GluN2D ($EC_{50} = 0.51\mu M$) et diminue progressivement jusqu'à la sous-unité GluN2A ($EC_{50} = 3.3\mu M$) (Erreger et al., 2007). Celle-ci reste cependant bien plus élevée que pour les récepteurs AMPA et kaïnate ($EC_{50} > 100\mu M$) (Attwell et Gibb, 2005). L'affinité pour le NMDA est plus forte pour la sous-unité GluN2D ($EC_{50} = 7.30\mu M$) et diminue jusqu'à la sous-unité GluN2A ($EC_{50} = 94.1\mu M$) (Erreger et al., 2007). Il existe d'autres agonistes des récepteurs NMDA tels que le D-aspartate ($EC_{50} = 10\mu M$), le L-aspartate ($EC_{50} = 14\mu M$), le N-méthyl-L-aspartate ($EC_{50} = 127\mu M$) (Erreger et al., 2007).

Les co-agonistes

La glycine, premier co-agoniste du récepteur NMDA découvert (Johnson et Ascher, 1987) et la D-sérine décrite en 1992 (Hashimoto et al., 1992) ont une forte affinité pour la sous-unité GluN2D ($EC_{50} = 0.13\mu M$) qui diminue jusqu'à la sous-unité GluN2A ($EC_{50} = 1.31\mu M$) (Chen et al., 2008; Dravid et al., 2010). Il faut noter que dans la ME, la glycine est l'un des deux principaux neurotransmetteurs inhibiteurs rapides avec le GABA. Ainsi par microdialyse chez le rat anesthésié à l'halothane on retrouve des concentrations de glycine extracellulaires aux alentours de $2.6\mu M$ dans les CDME (Whitehead et al., 2001a). Ces résultats peuvent laisser penser que le site du co-agoniste est toujours saturé, à condition que la glycine puisse accéder aux récepteurs NMDA synaptique ce qui n'est peut-être pas le cas selon l'empaquetage des synapses par les cellules gliales. Il existe une diminution de l'affinité du glutamate pour la sous-unité GluN2 quand le site de liaison de la glycine est occupé et inversement (Regalado et al., 2001), ce qui pourrait être le cas dans la ME si le co-agoniste est suffisamment concentré. Enfin, il existe d'autres co-agonistes que la glycine et la D-sérine tel que la L-sérine ($EC_{50} = 77\mu M$), la D-alanine ($EC_{50} = 0.89\mu M$) et la L-alanine ($EC_{50} = 36\mu M$) (Chen et al., 2008).

Les antagonistes et modulateurs allostériques

Les antagonistes des récepteurs NMDA peuvent être classés en fonction de leurs sites d'actions. Les antagonistes qui se lient sur le même site de liaison que l'agoniste sont dit compétitifs tandis que ceux se liant sur des sites différents sont non-compétitifs. Enfin les antagonistes qui bloquent le passage des cations au niveau du pore sont appelés bloquants du pore. Seul quelques exemples d'antagonistes sont donnés ici. Pour une liste plus exhaustive voir : Paoletti et Neyton (2007).

Antagonistes compétitifs

Parmi les premiers antagonistes compétitifs découverts, on trouve l'**AP5** qui inhibe les récepteurs NMDA contenant les sous-unités GluN2A ($K_i = 0.28\mu M$) et dont l'efficacité diminue jusqu'à la sous-unité GluN2D ($K_i = 3.7\mu M$). Le 3-(2-Carboxypiperazin-4-yl)propyl-1-phosphonic acid (**D-CPP**) inhibe les récepteurs NMDA contenant les sous-unités GluN2A ($K_i = 0.04\mu M$) et son efficacité diminue jusqu'à la sous-unité GluN2D ($K_i = 2\mu M$) (Feng et al., 2005). L'acide (2R,3S)-1-

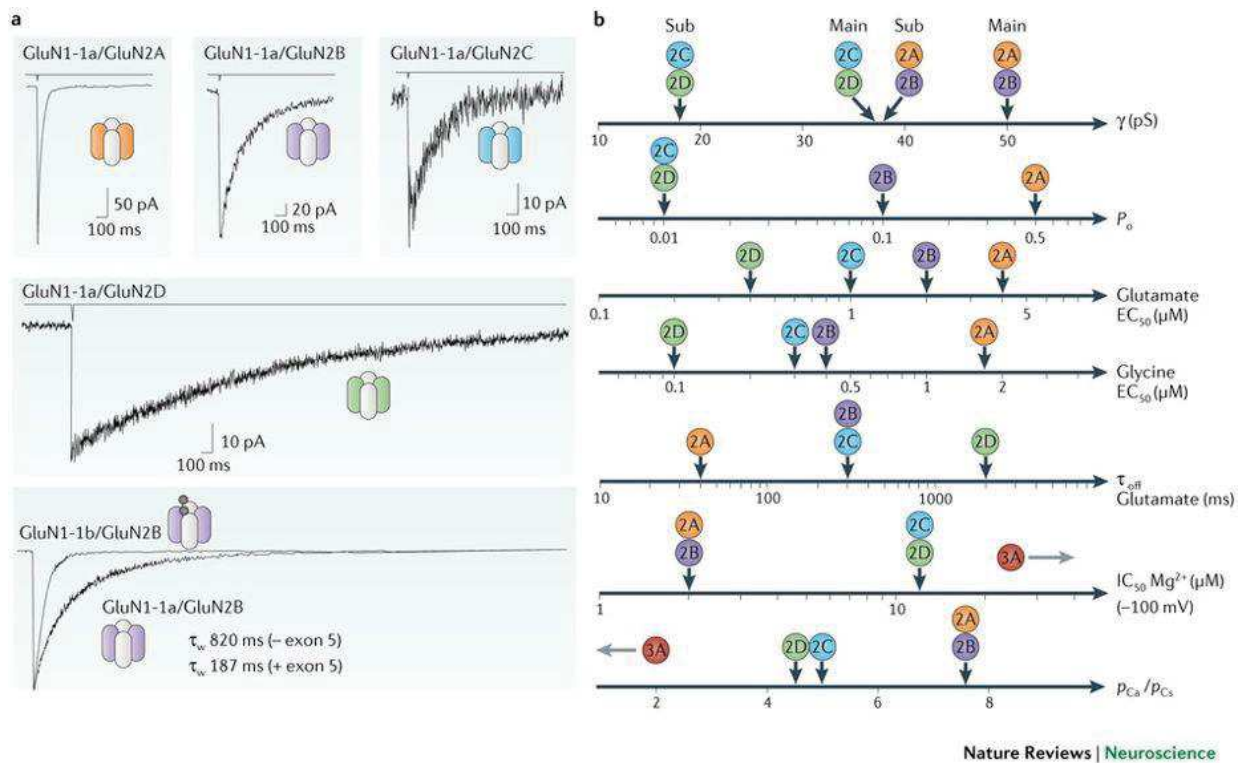


Figure 22 : Propriétés biophysiques des récepteurs NMDA en fonction de la composition en sous-unités.

(a) Cinétique de désactivation (en ms) des récepteurs NMDA, enregistrée sur des cellules embryonnaires humaines du rein 293, après une application brève de glutamate (1ms) à 1mM. Les récepteurs NMDA contenant les sous-unités GluN2A ont le temps de désactivation le plus rapide tandis que les récepteurs contenant les sous-unités GluN2D ont le temps de désactivation le plus lent.

(b) Effet de la composition en sous-unités sur les propriétés biophysiques du récepteur dont la conductance unitaire en pS (γ), la probabilité d'ouverture du canal (P_o), l'affinité au glutamate et à la glycine (indiqué par l' EC_{50}), la constante de désactivation (t_{off} en ms), la sensibilité au Mg^{2+} (indiqué par l' IC_{50} calculé à -100mV) et la perméabilité calcique (p_{Ca}/p_{Cs}). Les valeurs sont obtenues sur des récepteurs GluN1a/GluN2. D'après Paoletti et al., 2013.

[(phenanthren-3-yl)carbonyl]piperazine-2,3-dicarboxylic) (**UBP141**) bloque préférentiellement les récepteurs NMDA contenant les sous-unités GluN2C/D ($K_i = 3-4 \mu\text{M}$) par rapport aux récepteurs NMDA contenant les sous-unités GluN2A/B ($K_i = 17-22\mu\text{M}$) (Traynelis et al., 2010).

Antagonistes non-compétitifs

Le (4-((1H-Indol-7yl)carbamoyl)phenyl diethylcarbamate) (**NAB14**) est un antagoniste non-compétitif spécifique des récepteurs NMDA contenant les sous-unités GluN2C/D dont l'affinité est 800 fois plus élevée pour les sous-unités GluN2C/D que pour les sous-unités GluN2A/B (IC_{50} pour les sous-unités GluN2C/D environ égale à $0.5\mu\text{M}$ contre environ 2.5mM pour les sous-unité GluN2A/B) (Swanger et al., 2018). **L'ifenprodil** est un antagoniste non-compétitif des récepteurs NMDA (Williams, 1993) qui inhibe spécifiquement les sous-unités GluN2B ($IC_{50} = 0.15\mu\text{M}$ contre $30-70\mu\text{M}$ pour les sous-unités GluN2A/C/D) (Hess et al., 1998).

Bloquants du pore

Outre les antagonistes disponibles qui empêchent l'activation des récepteurs NMDA, il existe des bloquants du pore qui permettent d'empêcher le passage de cations. Il faut cependant noter que le récepteur NMDA doit être activé au préalable pour que le bloquant pénètre et bloque le pore. Parmi ces molécules qui bloquent le pore du récepteur NMDA on retrouve **le MK-801, la kétamine, la mémantine et le Mg^{2+}** (IC_{50} de l'ordre du nM pour le MK-801 et la mémantine et du μM pour la kétamine et le Mg^{2+}) (Bresink et al., 1996; Kuner et Schoepfer, 1996; Dravid et al., 2007; Kotermanski et Johnson, 2009). Il est intéressant de noter que les récepteurs NMDA contenant les sous-unités GluN2C/D et GluN3 sont moins sensibles voire insensibles à ces bloqueurs (Henson et al., 2010).

Modulateurs allostériques

Il existe aussi des modulateurs allostériques des récepteurs NMDA. Ces modulateurs ont des sites de liaisons différents des agonistes et co-agonistes, ils sont donc particulièrement utiles pour réguler positivement ou négativement l'activation des récepteurs NMDA. Parmi ces modulateurs on retrouve le **zinc (Zn^{2+})** qui est un cation divalent co-libéré avec le glutamate dans certaines structures du SNC et qui peut atteindre des concentrations de l'ordre du μM dans la fente synaptique (Vogt et al., 2000; Paoletti et al., 2009). Il est intéressant de noter que le Zn^{2+} est co-défecté avec le GABA aux terminaisons GABAergiques dans les laminae superficielles de souris (Wang et al., 2001). Le zinc libéré pourrait donc réguler l'activité de récepteurs NMDA localisés sur les synapses inhibitrices. Le Zn^{2+} , qui se lie sur le domaine N-terminal des sous-unités GluN2A, module négativement de manière spécifique les récepteurs NMDA contenant la sous-unité GluN2A (IC_{50} de l'ordre du nM) contrairement à la sous-unité GluN2B (IC_{50} de l'ordre du μM) (Paoletti et al., 1997). Il est cependant à noter que le Zn^{2+} peut avoir un effet de modulateur allostérique positif ou négatif selon sa concentration. Ainsi une concentration faible de Zn^{2+} peut potentialiser les réponses des récepteurs NMDA contenant les sous-

Tableau 2 : Pharmacologie des récepteurs NMDA

Les valeurs des EC₅₀, IC₅₀ et K_i sont exprimées en µM et ont été obtenues sur des récepteurs NMDA recombinants exprimés dans la plupart des cas dans des ovocytes de Xénope et moins fréquemment dans des cellules HEK.

Abréviations : NMLA (N-Méthyl-L-Aspartate) ; D-CPP (4-(3-phosphonopropyl) piperazine-2-carboxylic acid) ; UBP141 (2R,3S)-1-[(phenanthren-3-yl)carbonyl]piperazine-2,3-dicarboxylic acid) ; NAB14 (4-((1H-Indol-7-yl)carbamoyl)phenyl diethylcarbamate) ; MK801 (Dizocilpine) ; CIQ (3-chlorophenyl)(6,7-dimethoxy-1-((4-methoxyphenoxy)methyl)-3,4-dihydroisoquinolin-2(1 H)yl)methanone) ; Prégnenolone S (Prégnenolone sulfate).

Type d'effet	Substances	Site de liaison	GluN1/GluN2A	GluN1/GluN2B	GluN1/GluN2C	GluN1/GluN2D
Agonistes	Glutamate	GluN2 ABD	3.3	2.86	1.68	0.51
	NMDA	GluN2 ABD	94.1	29.5	21.7	7.3
	D-aspartate	GluN2 ABD	1.18	1.18	1.44	2.11
	L-aspartate	GluN2 ABD	1.15	1.34	1.21	1.77
	NMLA	GluN2 ABD	1.21	1.41	1.28	1.6
EC ₅₀ obtenues sur des récepteurs recombinants GluN1-1a/GluN2 exprimés dans des ovocytes de xénope. D'après Erreger et al., 2007						
Co-agonistes	Glycine	GluN1 ABD	1.31	0.72	0.34	0.13
	D-sérine	GluN1 ABD	1.27	0.65	0.32	0.16
	L-sérine	GluN1 ABD	212	76.8	27.4	14.7
	D-alanine	GluN1 ABD	3.13	0.89	0.56	0.22
	L-alanine	GluN1 ABD	96.2	35.6	27.5	12.5
EC ₅₀ obtenues sur des récepteurs recombinants GluN1-1a/GluN2 exprimés dans des ovocytes de xénope. D'après Chen et al., 2008						
Antagonistes compétitifs	AP5	GluN2 ABD	0.3	0.5	1.6	3.7
	D-CPP	GluN2 ABD	0.04	0.3	0.6	2
	UBP-141	GluN2 ABD	14	19	4.2	2.8
K _i obtenues sur des récepteurs recombinants GluN1-1a/GluN2 exprimés dans des ovocytes de xénope. D'après Paoletti et Neyton., 2007						
Antagonistes non compétitifs	NAB14	GluN2C/D TMD	5170	3010	3.7	2.2
	Ifenprodil	GluN2B NTD	>30	0.15	>30	>30
IC ₅₀ obtenues sur des récepteurs recombinants GluN1-1a/GluN2 exprimés dans des ovocytes de xénope. D'après Hess et al., 1998 ; Swanger et al., 2018						
Bloqueur du pore	Magnésium	TMD	20	20	80	80
	MK-801	TMD	0.01	0.01	0.1	0.1
	Kétamine	TMD	5.4	5.1	1.2	2.9
	Mémantine	TMD	13	10	1.6	1.8
IC ₅₀ obtenues sur des récepteurs recombinants GluN1-1a/GluN2 exprimés dans des ovocytes de xénope ou cellules HEK. D'après Kuner et Schoepfer., 1996 ; Yakakura et al., 1993 ; Bresink et al., 1996 et Kotermanski et al., 2009.						
Modulateurs allostériques positifs	CIQ	GluN2C/D TMD	/	/	2.8	3
	Prégnenolone S	GluN2 TMD	21	33	/	/
Données obtenues sur des récepteurs recombinants GluN1-1a/GluN2 exprimés dans des ovocytes de xénope. D'après Mullasseril et al., 2010 ; Malayev et al., 2009						
Modulateurs allostériques négatifs	Zinc	GluN2A NTD	0.02	2	20	10
	Protons	GluN1 ABD-TMD	pH IC ₅₀ = 6.92	/	/	/
	Pregnanolone S	GluN2 TMD	50	44	26	30
Données obtenues sur des récepteurs recombinants GluN1-1a/GluN2 exprimés dans des ovocytes de xénope. D'après Petrovic et al., 2005 ; Rachline et al., 2005 ; Traynelis et al., 1998 ; Paoletti et al., 1997.						

unités GluN1 du groupe « a » ($EC_{50} = 0.50\mu M$) tandis qu'à des concentrations plus élevées le Zn^{2+} modulera négativement à la fois les sous-unités GluN1a et b (Hollmann et al., 1993). D'autres exemples de modulateurs allostériques positifs et négatifs sont donnés dans le Tableau 2 (Paoletti et al., 1997; Traynelis et al., 1998; Malayev et al., 2002; Petrovic et al., 2005; Rachline et al., 2005; Mullasseril et al., 2010).

2.3.2 Cinétiques d'activation, de désactivation, perméabilité et sensibilité au magnésium et probabilité d'ouverture

Cinétique d'activation et de désactivation

Les cinétiques d'activation du récepteur NMDA sont très rapides cependant le temps d'apparition d'un courant est de l'ordre de la dizaine de milliseconde ce qui est relativement lent par rapport aux autres iGluRs.

Les cinétiques de désactivation des courants macroscopiques sont relativement rapides pour les récepteurs NMDA contenant la sous-unité GluN2A (40ms) et augmentent progressivement jusqu'au récepteurs NMDA contenant la sous-unité GluN2D (2s) (Monyer et al., 1994) (Figure 22). La cinétique de désactivation lente des courants conditionne la composante lente des courants postsynaptiques excitateurs (CPSE) dépendants des récepteurs NMDA (Lester et al., 1990).

Perméabilité et sensibilité au magnésium

Les sous-unités vont aussi déterminer la perméabilité du récepteur, c'est-à-dire la capacité des ions à traverser le pore. Les récepteurs NMDA contenant les sous-unités GluN2A/B ont les conductances les plus élevées avec une conductance principale de 50pS et une conductance moins fréquente de 38pS. Ce sont aussi les sous-unités qui rendent le récepteur le plus sensible au blocage par le Mg^{2+} extracellulaire ($IC_{50} = 15\mu M$ à $-70mV$). Les récepteurs NMDA contenant les sous-unités GluN2C/D ont des conductances plus faibles (37 et 18 pS) et sont moins sensibles au blocage par le Mg^{2+} ($IC_{50} = 80\mu M$ à $-70mV$) (Dingledine et al., 1999; Paoletti et al., 2013). La perméabilité au Ca^{2+} est la plus forte pour GluN2A et B (pCa/pCs de 7.5) et diminue jusqu'à GluN2D (pCa/pCs de 4.5) (Burnashev et al., 1995). Enfin les récepteurs NMDA contenant exclusivement des sous-unités GluN3 et GluN1 ont une conductance similaire à celle des récepteurs NMDA contenant les sous-unités GluN2C/D (environ 37 et 12 pS) et sont décrits comme très peu sensibles au blocage par le Mg^{2+} (Henson et al., 2010).

Probabilité d'ouverture

La composition en sous-unité affecte aussi la probabilité d'ouverture des récepteurs NMDA. Ainsi les probabilités d'ouverture sont fortes pour les récepteurs NMDA composés de GluN2A (0.5),

diminuent à 0.1 pour GluN2B et sont très faibles pour GluN2C et D (0.01) (Wyllie et al., 1998; Erreger et al., 2005).

2.3.3 Désensibilisation, endocytose et déphosphorylation des récepteurs NMDA

L'activation des récepteurs NMDA entraîne des phénomènes en général réversibles. Cela est dû en partie à plusieurs mécanismes induisant la désensibilisation, l'endocytose ou la déphosphorylation. Pour revue : Carroll et Zukin (2002). Dans la ME, ces mécanismes sont peu décrits.

La désensibilisation est généralement définie comme la diminution d'une réponse en présence de stimulus continu ou d'applications répétées à intervalle court. Les récepteurs NMDA peuvent être désensibilisés suite à une exposition prolongée à la glycine et au glutamate (Hansen et al., 2018). Il a aussi été montré une désensibilisation des récepteurs NMDA en présence de glycine et de zinc à des concentrations non-saturantes. La désensibilisation à la glycine a été montrée sur des récepteurs NMDA recombinants exprimés par des cellules HEK293 et sur des neurones d'hippocampe de souris en culture (Mayer et Vyklicky Jr, 1989; Zhu et al., 2016). La désensibilisation au zinc a été montrée sur des récepteurs NMDA exprimés par des neurones de la rétine de rat (Chen et al., 1997). Ces types de désensibilisation impliquent des modifications structurales des récepteurs NMDA mais les mécanismes restent peu connus. Enfin, une augmentation de calcium intracellulaire libre sur une période de plusieurs secondes peut aussi induire la désensibilisation des récepteurs NMDA dans les neurones d'hippocampe de rat (Clark et al., 1990; Legendre et al., 1993). Les récepteurs NMDA contenant les sous-unités GluN2A sont plus sensibles à ce type de désensibilisation que ceux contenant les sous-unités GluN2B/C (Medina et al., 1995).

Le domaine C-terminal contient différents sites, en fonction des sous-unités du récepteur, qui peuvent permettre **l'endocytose** des récepteurs NMDA. Le site nommé YEKL est par exemple reconnu par la protéine AP2 (endocytic adaptor protein 2) impliquée dans l'endocytose des récepteurs (Roche et al., 2001). Il faut souligner que ces récepteurs sont relativement stables à la membrane comparés aux récepteurs AMPA (Lissin et al., 1998; Carroll et al., 1999), en partie à cause de l'interaction avec la protéine de la densité postsynaptique 95 (PSD95) (Carroll et Zukin, 2002). La phosphorylation du récepteur par la PKC peut empêcher cette interaction et favoriser le transport du récepteur hors de la synapse et l'endocytose du récepteur (Tingley et al., 1997).

Enfin, l'activité des récepteurs NMDA peut aussi être réduite par des mécanismes de **déphosphorylation**. Cette régulation a été mise en évidence sur des récepteurs NMDA recombinants exprimés par des cellules HEK293 (Vissel et al., 2001) et sur des neurones en culture provenant de la CDME de rat (Wang et al., 1996).

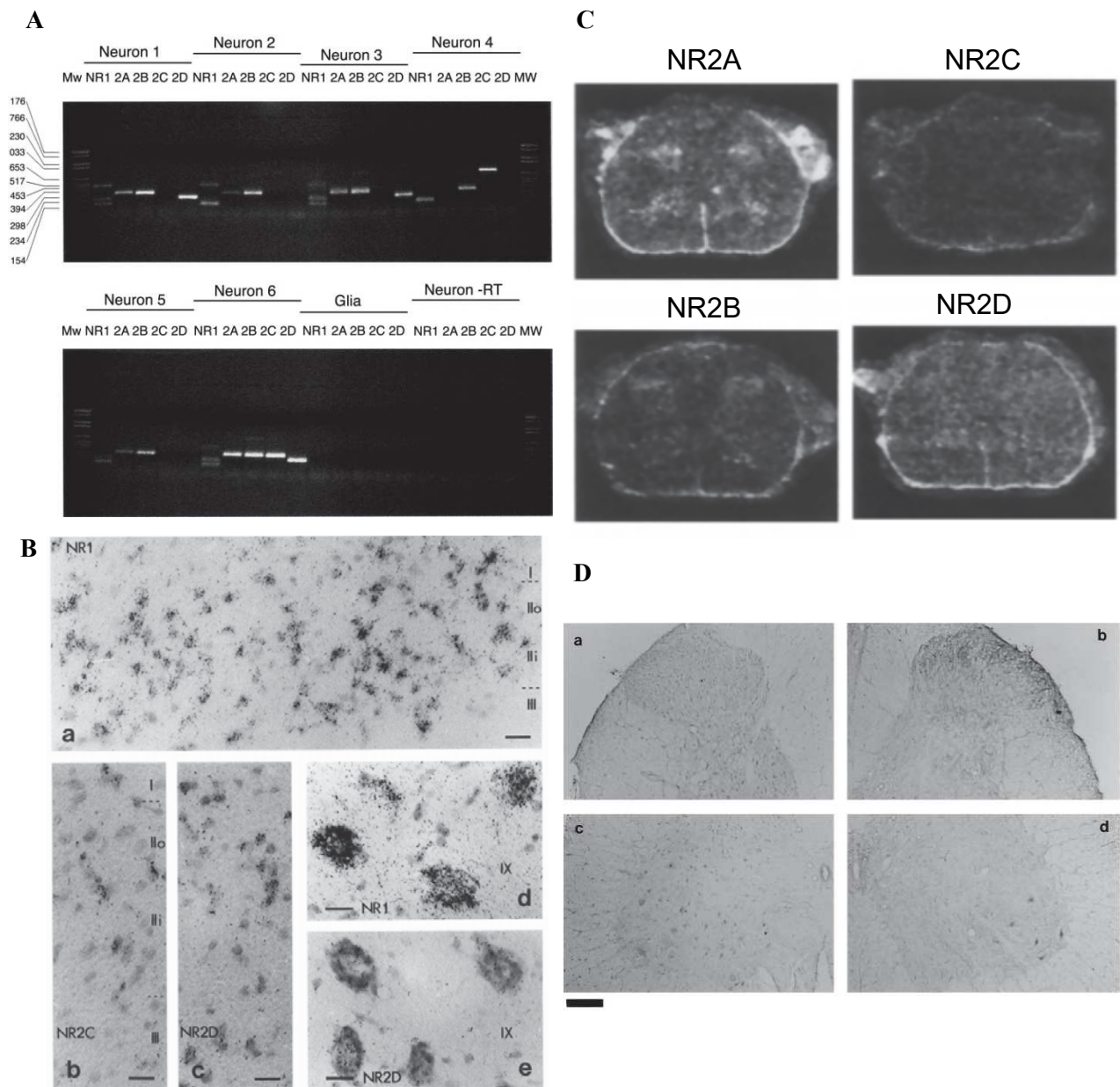


Figure 23 : Expression des sous-unités des récepteurs NMDA dans la moelle épinière.

(A) Détection des ARNm codant pour les sous-unités du récepteur NMDA par RT-PCR sur 6 neurones, 1 cellule gliale et un neurone contrôle sans transcriptase reverse. D'après Karlsson et al., 2002.

(B) Détection des ARNm codants pour les sous-unités du récepteur NMDA par radiographie sur un segment lombaire de la ME. (a) GluN1 (b) GluN2C dans la lamina II (c) GluN2D dans la lamina II. (d) GluN1 dans un motoneurone. (e) GluN2D dans un motoneurone localisé dans la lamina IX. Barres d'échelles : 30 μ m (a) et 20 μ m (b-e). D'après Tolle et al., 1993.

(C) Détection de l'ARNm codant pour les sous-unités GluN2 sur des sections transversales de ME. D'après Cumberbatch et al., 2002.

(D) Sections transversales de ME lombaire de rat (laminae III-V) marquées avec des anticorps anti GluN2A (a, dorsal et c, ventral) et GluN2B (b, dorsal et d, ventral). Barre d'échelle : 10 μ m. D'après Boyce et al., 1999.

3. Distribution des récepteurs NMDA

3.1 : Expression des sous-unités du récepteur NMDA

La localisation des récepteurs NMDA dans le SNC varie en fonction de la composition en sous-unité et du stade de développement. Dans la ME, si les récepteurs NMDA sont exprimés de façon ubiquitaire, on retrouve cependant des motifs d'expression en sous-unités différents.

GluN1

La présence de deux sous-unités GluN1 est indispensable à la formation d'un récepteur NMDA fonctionnel. Celle-ci se retrouve donc assez logiquement exprimée de façon ubiquitaire peu importe le stade de développement dans le SNC (Akazawa et al., 1994).

Dans la ME, il est notamment montré que l'ARNm codant pour GluN1 est distribué de façon ubiquitaire chez le rat adulte (Tolle et al., 1993; Luque et al., 1994; Monyer et al., 1994; Häring et al., 2018) et des données immunohistochimiques indiquent que cette sous-unité est largement exprimée (Yung, 1998; Boyce et al., 1999; Nagy et al., 2004) (Figure 23).

GluN2

Les sous-unités GluN2 comprennent quatre membres qui influencent fortement les caractéristiques du récepteur NMDA. Selon le stade de développement et la structure nerveuse concernée, l'expression de ces sous-unités varie fortement (Figure 23) (Cumberbatch et al., 2002).

GluN2 A

Dans le SNC, la sous-unité GluN2A est très peu exprimée pendant la période embryonnaire. C'est au cours des 2 premières semaines post natales qu'elle commence à être exprimée et devient prépondérante à l'âge adulte.

On retrouve une grande quantité d'ARNm codant pour la sous-unité GluN2A dans toute la matière grise spinale (Luque et al., 1994; Karlsson et al., 2002), bien que dans une étude, les auteurs n'aient pas détecté de ARNm codant pour GluN2A par hybridation in situ (Tolle et al., 1993). Des données immunohistochimiques confirment la forte expression de cette sous-unité dans la ME (Yung, 1998; Boyce et al., 1999) qui semble enrichie dans les laminae III et IV d'après des données obtenues par microscopie électronique (Nagy et al., 2004).

GluN2 B

Dans les structures supraspinales, la sous-unité GluN2B est exprimée pendant la période embryonnaire et se trouve surtout dans le cortex et le thalamus. A l'âge adulte, cette sous-unité est principalement localisée dans le cervelet et le bulbe olfactif (Watanabe et al., 1993).

Dans la ME, des ARNm codant pour la sous-unité GluN2B sont retrouvés en faible quantité à E14 mais leur expression augmente fortement à E17 (Monyer et al., 1994). Ces ARNm sont présents dans la lamina II et IX à l'âge adulte dans la moelle épinière cervicale de rat et plus généralement dans toute la CD (Luque et al., 1994; Karlsson et al., 2002). Une étude récente a permis par une approche de séquençage de cellules uniques dans les CDME de montrer la présence du gène *Grin2B* dans la totalité des neurones analysés (Häring et al., 2018). Tout comme pour la sous-unité GluN2A, Tolle et al. (1993) n'ont pas détecté d'ARNm codant cette sous-unité probablement à cause d'un problème technique. Par immunohistochimie et microscopie électronique chez le rat adulte il a ensuite été montré que la sous-unité GluN2B se retrouve principalement dans les laminae I et II (Yung, 1998; Boyce et al., 1999).

GluN2 C

La sous-unité GluN2C comme la sous-unité GluN2A est peu exprimée pendant la période embryonnaire dans le SNC et apparait au cours des 2 premières semaines post natales. A l'âge adulte l'expression de la sous-unité GluN2C se retrouve principalement dans le cervelet et le bulbe olfactif (Watanabe et al., 1993).

Concernant la ME, la présence d'ARNm pour la sous-unité GluN2C a été détectée dans une faible proportion de neurones de la lamina II (Tolle et al., 1993) et dans une faible proportion de neurones dans la CD plus généralement (Karlsson et al., 2002). L'étude de Häring et al. (2018) semble indiquer une présence faible du gène *Grin2C* dans les interneurones excitateurs et légèrement plus importante dans les interneurones inhibiteurs. Ces résultats sont cependant en désaccord avec une étude où les ARNm codants pour cette sous-unité n'ont pas été détectés (Luque et al., 1994). De plus, des données immunohistochimiques n'ont pas permis de mettre en évidence l'expression de cette sous-unité dans la ME (Yung, 1998). Ces résultats en apparence contradictoires peuvent s'expliquer par la difficulté de trouver des anticorps spécifiques pour les sous-unités GluN2C et par la faible proportion de neurones qui expriment le gène *Grin2C* (Häring et al., 2018), voir <http://linnarssonlab.org/dorsalhorn/>.

GluN2 D

Dans le SNC, la sous-unité GluN2D est exprimée pendant la période embryonnaire dans les régions caudales. A l'âge adulte, l'expression de la sous-unité GluN2D diminue fortement mais reste présente dans le diencephale et mésencéphale.

Dans la ME, des ARNm codant pour la sous-unité GluN2D ont été retrouvés en faibles quantités à E14 mais augmentent fortement à E17 (Monyer et al., 1994). Les ARNm pour cette sous-unité sont retrouvés de façon diffuse mais avec un signal faible (Tolle et al., 1993; Karlsson et al., 2002). Dans la

CD, il semble que le gène *Grin2D* soit exprimé faiblement dans les interneurons excitateurs et plus fortement dans les interneurons inhibiteurs (Häring et al., 2018). Deux études n'ont pas permis de retrouver d'ARNm ou d'expression de la sous-unité GluN2D dans la ME (Yung, 1998). Comme pour la sous-unité GluN2C, une faible expression de la sous-unité GluN2D et le manque d'anticorps efficace peuvent être à l'origine de ces résultats.

Des études fonctionnelles tendent à confirmer la présence des sous-unités GluN2C/D dans la ME de rat jeune et adulte (Momiya, 2000; Green et Gibb, 2001; Hildebrand et al., 2014). Dans ces études, des approches d'électrophysiologie sur canal unique permettent d'observer des conductances correspondant à l'activation des récepteurs NMDA contenant les sous-unités GluN2C/D. De plus en utilisant à profit les différentes sensibilités au Mg^{2+} des récepteurs NMDA selon leurs compositions en sous-unité, il a été montré dans la CD de souris la présence de sous-unités GluN2C/D fonctionnelles et principalement exprimées par les interneurons inhibiteurs (Shiokawa et al., 2010). Il faut cependant noter que cette étude a été réalisée sur des souris jeunes (P14), un stade de développement auquel la composition en sous-unités du récepteur NMDA est encore susceptible d'évoluer.

GluN3

Il existe deux sous-unités GluN3 (GluN3A et B) qui modifient aussi les propriétés des récepteurs NMDA (Henson et al., 2010). Un récepteur composé de deux sous-unités GluN1 et deux sous-unités GluN3 est un récepteur excitateur activé par la glycine étant donné que le site de liaison du glutamate se trouve sur les sous-unités GluN2. Ce type de récepteur existe dans un système recombinant (Chatterton et al., 2002) et a été observé dans une étude sur des nerfs optiques ex-vivo (Piña-Crespo et al., 2010). Des données combinant une approche électrophysiologique et un nouveau modulateur allostérique positif des récepteurs NMDA contenant les sous-unités GluN3A (le CGP-78608) indiquent que ce type de récepteur est exprimé et fonctionnel dans l'hippocampe de souris jeune (P8-P12) (Grand et al., 2018). Récemment, il a aussi été montré que ces récepteurs peuvent être exprimés et fonctionnels dans l'habenula chez la souris adulte (Otsu et al., 2019).

GluN3 A

Par des analyses d'hybridation *in situ* et d'immunocytochimie, il a été montré que la sous-unité GluN3A est assez fortement exprimée les premiers jours après la naissance notamment dans le thalamus. A l'âge adulte, cette sous-unité est principalement détectée dans le bulbe olfactif (Sucher et al., 1995). Dans les CDME, le gène *Grin3A* est retrouvé dans tous les neurones (Häring et al., 2018).

GluN3 B

A l'inverse de la sous-unité GluN3A, la sous-unité GluN3B est faiblement exprimée dans le SNC à la naissance et son expression augmente au cours du développement. Dans la ME, l'ARNm

codant pour la sous-unité GluN3B se retrouve essentiellement dans la corne ventrale (Chatterton et al., 2002) et le gène Grin3B n'est pas détecté dans la CD (Häring et al., 2018).

En résumé, chez le rongeur, même si les données d'hybridation *in situ* et d'immunocytochimie sont parfois en contradiction, il apparaît que dans la ME, les récepteurs NMDA sont exprimés de façon ubiquitaire. Les récepteurs composés des sous-unités GluN1, GluN2A, GluN2B et GluN3A sont les plus fréquemment retrouvés. La sous-unité GluN2C est la moins exprimée mais le gène Grin2C est retrouvé dans certains interneurons inhibiteurs. La sous-unité GluN2D est assez largement exprimée mais avec des niveaux d'expression faibles et comme pour le gène Grin2C, le gène Grin2D est préférentiellement exprimé par les interneurons inhibiteurs.

3.2. Localisation cellulaire et subcellulaire des récepteurs NMDA et rôle physiologique

3.2.1 Sur les neurones excitateurs

Dans la ME, les récepteurs NMDA sont exprimés à la membrane de la quasi-totalité des neurones excitateurs (Nagy et al., 2004) et sont composés des sous-unités GluN2A/B essentiellement.

A l'élément postsynaptique

D'un point de vue subcellulaire, les récepteurs NMDA sont localisés en majorité à la densité postsynaptique et jouent un rôle clef dans de nombreux mécanismes de plasticité dépendants de l'entrée de calcium suite à l'ouverture du canal des récepteurs NMDA (Malenka et Nicoll, 1993). Il est montré dans l'hippocampe de rat que les récepteurs NMDA postsynaptiques et extrasynaptiques présentent des caractéristiques distinctes. Les récepteurs NMDA postsynaptiques sont majoritairement constitués de la sous-unité GluN2A et leur co-agoniste préférentiel serait la D-sérine (Papouin et al., 2012).

En extra-synaptique

Les récepteurs NMDA ont aussi une localisation extra-synaptique à une distance supérieure à 100nm de la densité postsynaptique dans la lamina II des CDME (Momiya, 2000) ainsi que dans d'autres régions du SNC tel que le cortex somatosensoriel (Valtschanoff et al., 1999), le cervelet (Petralia et al., 2002) et l'hippocampe (Papouin et al., 2012) où ils exercent des rôles différents des récepteurs NMDA synaptiques (Petralia et al., 2010).

Très peu d'études ont été réalisées pour déterminer le rôle de ces récepteurs NMDA extra-synaptique dans la ME. Il a toutefois été montré qu'une diffusion latérale de glycine dans la ME peut faciliter l'activation de récepteurs NMDA extrasynaptiques ce qui pourrait éventuellement contribuer

au développement de symptômes douloureux (Ahmadi et al., 2003). Le rôle de ces récepteurs NMDA extra-synaptique est mieux connu dans d'autres régions du SNC. Quelques uns de ces rôles sont décrits et pourraient éventuellement être retrouvés dans la ME.

Par exemple, sur des cultures de neurones d'hippocampe de rat, l'activation des récepteurs NMDA extrasynaptiques (contenant la sous-unité GluN2B) va avoir un effet inverse à l'activation des récepteurs NMDA synaptiques (contenant la sous-unité GluN2A) en inhibant l'activation de la voie ERK. Cela aura pour effet d'empêcher l'adressage de récepteurs AMPA à la membrane (Kim et al., 2005). Il est généralement considéré que l'on retrouve plus de récepteurs NMDA extra-synaptiques contenant la sous-unité GluN2B que la sous-unité GluN2A (Fellin et al., 2004; Papouin et al., 2012) et leur co-agoniste de préférence serait la glycine (Papouin et al., 2012).

Les récepteurs NMDA extrasynaptiques contenant les sous-unités GluN2C et GluN2D participent aussi à la transmission synaptique et aux phénomènes de plasticité. Dans le noyau sous-thalamique, les récepteurs NMDA contenant les sous-unités GluN2D régulent la transmission synaptique excitatrice *in vivo* (Swanger et al., 2015) tandis que des données obtenues *in vitro* dans le cervelet indiquent que les récepteurs NMDA contenant la sous-unité GluN2C sont impliqués dans l'intégration et la transmission des informations (Schwartz et al., 2012). Par des approches d'électrophysiologie sur tranches d'hippocampe, il a été montré que les récepteurs NMDA contenant les sous-unités GluN2D localisés en extrasynaptique sont recrutés à la synapse et participent aux mécanismes de plasticité suite à un protocole de stimulation à haute fréquence (Harney et al., 2008).

Parmi les rôles des récepteurs NMDA extrasynaptiques, il a aussi été montré sur des neurones d'hippocampe en culture que leur activation serait responsable de l'apoptose des neurones tandis que les récepteurs NMDA synaptiques favoriseraient la survie (Hardingham et al., 2002). Entre temps, ces résultats ont été remis en questions et des études montrent que l'activation des récepteurs NMDA postsynaptique (Papouin et al., 2012) ou la co-activation des récepteurs NMDA synaptiques et extrasynaptiques est responsable de l'initiation de l'apoptose (Zhou et al., 2015).

A l'élément présynaptique

Si l'expression de récepteur NMDA sur l'élément présynaptique semblait rare à sa découverte dans les années 1990 (Fink et al., 1990; Pittaluga et Raiteri, 1992), elle est maintenant retrouvée dans de nombreuses structures dans le SNC telles que l'amygdale (Humeau et al., 2003), le cervelet (Casado et al., 2000; Casado et al., 2002), le striatum (Park et al., 2014), l'hippocampe (McGuinness et al., 2010) et la ME. Pour revue voir Bouvier et al. (2015). Ainsi, par microscopie électronique, il a été mis en évidence la présence de récepteurs NMDA présynaptiques dans la corne dorsale et ventrale principalement sur les terminaisons des fibres afférentes (Liu et al., 1994). La présence de ces récepteurs a par la suite été confirmée par des données fonctionnelles montrant que des récepteurs NMDA présynaptiques dans la CD de la ME participent à la régulation de la transmission synaptique excitatrice

en facilitant notamment la libération de glutamate et de SP par les fibres afférentes véhiculant des informations nociceptives (Bardoni et al., 2004; Zeng et al., 2006).

Les récepteurs NMDA présynaptiques sont idéalement localisés pour contrôler la libération de neurotransmetteur et moduler l'élément présynaptique. Dans la majorité des cas, les récepteurs NMDA présynaptiques facilitent la libération de neurotransmetteur par l'augmentation de calcium dans les terminaisons axonales, ce qui déclenche l'exocytose des vésicules synaptiques (Glitsch, 2008; McGuinness et al., 2010). Cependant leur action peut aussi être due à l'entrée de sodium qui est suffisante pour augmenter la libération de glutamate dans le cortex visuel ou au couplage à des voies intracellulaires telles que celle de la PKC (Kunz et al., 2013). Récemment, il a été montré dans la couche 5 du cortex visuel de souris jeunes que les libérations spontanées ou évoquées sont régulées par les récepteurs NMDA présynaptiques de manière différentes. Les auteurs montrent que ces récepteurs NMDA régulent les vésicules prêtes à être libérées pour permettre une libération rapide en condition évoquée qui dépend de RIM1 $\alpha\beta$ tandis que la régulation de la libération spontanée dépend de kinases c-Jun N-terminale 2 (Abrahamsson et al., 2017).

Dans la ME, les récepteurs NMDA présynaptiques localisés sur les terminaisons de neurones excitateurs semblent agir comme des autorécepteurs et participent à la modulation de la transmission synaptique excitatrice.

3.2.2 Sur les interneurones inhibiteurs

A l'élément postsynaptique

Dans les structures supraspinales, les récepteurs NMDA présent à l'élément postsynaptique de neurones inhibiteurs sont responsables de mécanismes de plasticité (chapitre II) (Vithlani et al., 2011).

Dans la ME, très peu d'études relatent l'expression de récepteurs NMDA par des neurones inhibiteurs. Il est toutefois intéressant de noter que chez le rat adulte, des données de microscopie électronique suggèrent une expression de la sous-unité GluN1 sur les neurones inhibiteurs de la CD (Lu et al., 2005). Ces récepteurs sont notamment importants dans l'induction de la LTP de la transmission glycinergique ciblant les neurones GABAergiques dans la lamina II (Kloc et al., 2019) (Chapitre II). Cette LTP pourrait mener à une inhibition accrue des neurones GABAergiques et à la désinhibition du réseau.

A l'élément présynaptique

Dans l'étude de Lu et al. (2005), les auteurs ont montré qu'en plus des éléments postsynaptiques, les éléments présynaptiques sont aussi positifs pour le marquage de la sous-unité GluN1. Dans les

laminae I à III, en moyenne : 37% des terminaisons synaptiques GABAergiques exprimant la GAD65 sont positifs pour la sous-unité GluN1. Ces neurones inhibiteurs sont des interneurons inhibiteurs locaux tel que les neurones centraux ou en îlots, localisés dans la lamina II.

Dans la ME, les récepteurs NMDA localisés sur les terminaisons inhibitrices pourraient agir comme des hétérorécepteurs activés par le glutamate provenant de cellules gliales, de synapses excitatrices voisines ou encore d'un neurone postsynaptique excitateur. L'activation de ces récepteurs pourrait ensuite moduler la synthèse et/ou la libération de GABA. Ce type de récepteur est observé dans certaines structures tel que le cervelet où il est à l'origine d'une forme de plasticité de la synapse inhibitrice nommée potentialisation de l'inhibition induite par la dépolarisation (depolarization-induced potentiation of inhibition). L'induction de cette plasticité est permise par l'entrée rapide de calcium dans une cellule de Purkinje postsynaptique qui induit la libération de glutamate. Le glutamate agit alors comme un messenger rétrograde et active les récepteurs NMDA présynaptiques des terminaisons GABAergiques. L'activation de ces récepteurs induit la libération de calcium par les stocks présynaptiques ce qui a pour effet de faciliter la transmission GABAergique (Duguid et Smart, 2004). De façon similaire, sur les cellules en étoile du cervelet, il est montré que des récepteurs NMDA présynaptique hétérotrimérique (contenant deux sous-unités GluN1 et deux autres sous-unités différentes l'une de l'autre) composés des sous-unités GluN2B et D jouent un rôle clef dans la régulation de la transmission GABAergique. Ces récepteurs sont activés par du glutamate provenant de synapses excitatrices voisines et induisent une potentialisation à long terme de la libération de GABA (Liu et Lachamp, 2006). Enfin, une modulation négative de la libération de GABA peut aussi avoir lieu après l'activation des récepteurs NMDA présynaptiques comme il est observé sur le nerf optique de Xénope après une stimulation en burst thêta (Lien et al., 2006).

Dans le SNC, ces récepteurs NMDA exprimés aux terminaisons axonales d'interneurones inhibiteurs peuvent servir de senseur de glutamate et ainsi détecter l'activité environnante. En cas d'une activité excitatrice trop importante par exemple, les récepteurs NMDA localisés à ces terminaisons faciliteraient la libération de GABA pour contrôler le niveau d'excitation au sein du réseau. Ces récepteurs sont idéalement placés pour permettre une communication croisée entre synapse excitatrice et inhibitrice. Dans la ME, le rôle de ces récepteurs présynaptiques reste cependant inconnu. Il est donc envisageable qu'ils agissent aussi comme des détecteurs de l'activité du réseau et qu'ils puissent moduler la transmission synaptique GABAergique et sans doute modifier l'intégration spinale des informations nociceptives.

3.2.3 Sur les cellules gliales

Pendant longtemps, il fut considéré que les récepteurs NMDA n'étaient exprimés que par les neurones dans le SNC. Cependant depuis une vingtaine d'année environ, des études combinant des approches d'électrophysiologie et d'immunohistochimie ont permis de montrer l'existence de récepteurs NMDA gliaux fonctionnels.

Présence du gène

Les données prouvant la présence d'ARNm des différentes sous-unités du récepteur NMDA dans les cellules gliales ont principalement été obtenues sur des cellules gliales provenant du cortex de souris et d'humain. Les résultats indiquent la détection des sept sous-unités du récepteurs NMDA (Rusnakova et al., 2013; Orre et al., 2014). Moins d'études ont été réalisées dans la ME et les résultats obtenus par PCR sur cellule unique montrent soit l'absence de ARNm codant pour les sous-unités du récepteur NMDA dans les cellules gliales de la ME de rat (Karlsson et al., 2002) soit la présence des ARNm codant pour la sous-unité GluN1 sur des cultures d'une semaine (Zhou et al., 2010).

Preuve fonctionnelle de l'expression de récepteurs NMDA gliaux

Des données électrophysiologiques obtenues sur des tranches transversales lombaires de ME de jeunes rats (P5-P13) indiquent la présence de récepteurs NMDA sur les astrocytes, les oligodendrocytes et les cellules précurseurs d'astrocytes et d'oligodendrocytes. En effet l'application de NMDA induit l'apparition d'un courant non affecté par les antagonistes des récepteurs AMPA et Kainate sur 96% de ces cellules (Ziak et al., 1998). Ces données fonctionnelles indiquant l'existence de récepteurs NMDA astrocytaires sont soutenues par des données obtenues par une approche immunohistochimique montrant l'expression des sous-unités GluN1 sur les prolongements astrocytaires dans le cortex de rat adulte (Conti et al., 1996).

Particularité des récepteurs NMDA gliaux

Les données montrent que les récepteurs NMDA astrocytaires spinaux sont fonctionnels et non bloqués par le Mg^{2+} (Ziak et al., 1998; Lalo et al., 2006). Leur activation induit une augmentation transitoire de la concentration de Ca^{2+} libre intracellulaire qui est bloquée partiellement par l'AP5 et l'UBP141. De plus, leurs perméabilités au Ca^{2+} sont assez faibles, ce qui correspond à des récepteurs contenant les sous-unité GluN2C/D ou GluN3, compatible avec la faible sensibilité au bloc Mg^{2+} des récepteurs NMDA des astrocytes corticaux (Palygin et al., 2010).

En résumé, quelques études indiquent l'expression de récepteurs NMDA fonctionnels dans les cellules gliales de la ME. Ces récepteurs pourraient être des hétérotétramères composés de deux sous-unités GluN1 et deux sous-unités GluN2C/D et/ou GluN3A. Ces récepteurs pourraient induire une entrée de calcium dans les cellules gliales suite à leur activation directement par l'ouverture du pore ou par un mode d'action de type métabotropique comme montré sur des cultures d'astrocytes corticaux de rat où l'activation des récepteurs NMDA induit la libération de calcium stocké dans le réticulum

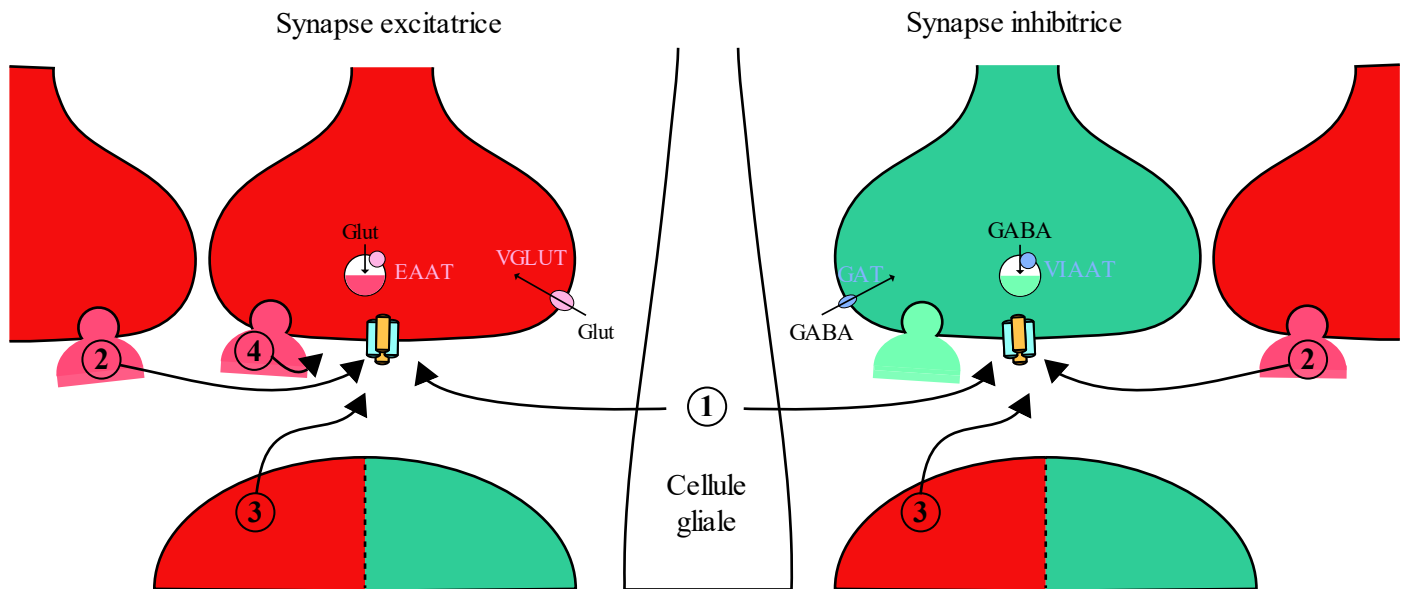


Figure 24 : Sources de glutamate et des co-agonistes glycine et D-sérine dans la moelle épinière de souris adulte.

Selon la synapse considérée, le glutamate peut provenir des cellules gliales voisines (1), des synapses excitatrices environnantes par diffusion latérale (2), de la cellule postsynaptique par diffusion rétrograde (3) ou de la cellule pré-synaptique par une action autocrine (4). La D-sérine peut provenir des cellules gliales (1) et potentiellement des neurones présynaptiques (4) tandis que la glycine provient essentiellement des synapses glycinergiques environnantes par diffusion (non représenté).
 Modifier de Bouvier et al., 2015.

endoplasmique (Gérard et Hansson, 2012). Dans la ME, l'augmentation de calcium intracellulaire libre dans les cellules gliales pourrait induire la libération de gliotransmetteurs (D-sérine, ATP, glutamate) et participer à la régulation de la transmission synaptique.

4. Sources des ligands endogènes dans la ME

Sources du glutamate

Dans la ME, les ligands endogènes du récepteur NMDA peuvent provenir de multiples sources. Toutes les fibres afférentes de la ME sont excitatrices et libèrent du glutamate ce qui représente une première source d'agoniste. De plus, dans la lamina II, le réseau d'interneurones est constitué environ à 70% d'interneurones excitateurs glutamatergiques (Todd, 2010), ce qui représente une deuxième source de glutamate. On sait que dans certains cas pathologiques, tel qu'une lésion nerveuse (SNI), les fibres afférentes développent une activité exacerbée et libèrent plus de glutamate (Wall et al., 1974; Liu et al., 2000; Wu et al., 2001). Cette libération accrue de glutamate n'est pas compensée par une augmentation de la recapture par les transporteurs membranaires, ce qui se traduit par l'augmentation de la concentration extracellulaire de glutamate (Inquimbert et al., 2012). Un blocage pharmacologique des transporteurs du glutamate induit aussi l'augmentation de glutamate extracellulaire (Thomson et al., 2006). Dans ces deux cas de figure, il peut se produire une diffusion latérale (« spill-over ») de glutamate qui pourrait activer des récepteurs NMDA localisés à distance de la densité postsynaptique ou sur des synapses inhibitrices. Une troisième source de glutamate pourrait provenir de cellules gliales environnantes. Ces cellules et notamment les astrocytes sont connues dans le SNC pour moduler la transmission synaptique et pour être impliquées dans la régulation de l'activité neuronale (Araque et al., 2014; Um, 2017). Il est également établi que les astrocytes peuvent libérer des gliotransmetteurs parmi lesquelles le glutamate (Jourdain et al., 2007; Navarrete et Araque, 2008) ainsi que de la D-sérine (Schell et al., 1995; Panatier et al., 2006). Un tel mécanisme est également envisageable dans la ME. Des récepteurs NMDA présynaptiques pourraient être activés par du glutamate libéré par un neurone postsynaptique excitateur suite à une dépolarisation. Le glutamate pourrait agir comme un messenger rétrograde comme c'est le cas dans le cervelet (Duguid et Smart, 2004; Lien et al., 2006; Liu et Lachamp, 2006). Enfin, des récepteurs NMDA présynaptiques pourraient être activés par des synapses glutamatergiques axo-axoniques comme c'est le cas dans la ME de lamproie (Cochilla et Alford, 1997). Cependant, ce genre de contact axo-axonique excitateur n'a jamais été décrit dans la CDME de mammifères. Les différentes sources de glutamate qui pourraient activer des récepteurs NMDA présynaptiques exprimés à la terminaison de neurones excitateurs et inhibiteurs dans la ME sont schématisés dans la Figure 24.

Source de la glycine et D-sérine

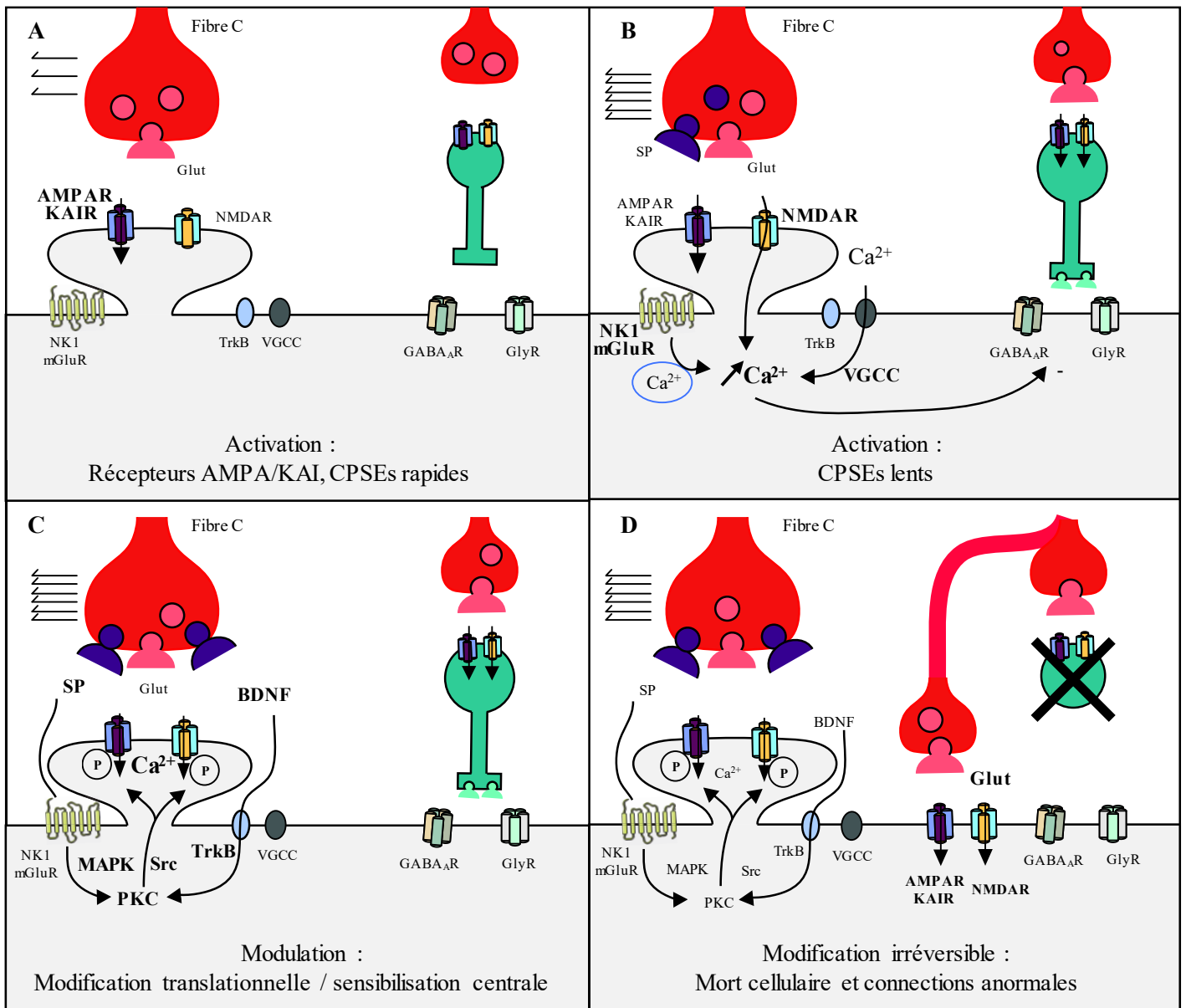


Figure 25 : Rôle physiopathologique des récepteurs NMDA dans les neurones de la CDME et mécanismes de plasticité.

A) Les récepteurs NMDA sont dans un état quiescent dans un état physiologique de base. **B)** Les neurones sont activés par les CPSEs rapides et potentialisés par les CPSEs lents **C)** La modulation par les kinases/phosphatases intracellulaires induit la sensibilisation centrale en facilitant l'expression et la fonction des récepteurs AMPA, kaïnate et NMDA. **D)** Cette plasticité est sous-tendue par l'insertion à la membrane de récepteurs AMPA et NMDA, par la perte d'interneurones inhibiteurs et la mise en place de connexions anormales. D'après Woolf et Salter., 2000.

Concernant les co-agonistes, la glycine libérée par les interneurons glycinergiques spinaux constitue une première source de co-agoniste potentielle (Whitehead et al., 2001b; Ahmadi et al., 2003).

Par des approches immunohistochimiques, il a été montré dans les CDME que la sérine racémase, l'enzyme responsable de la formation de D-sérine, est principalement exprimée dans les astrocytes (Lefèvre et al., 2015). En effet il est montré dans cette étude une forte co-localisation (70%) entre l'anticorps anti sérine racémase et l'anticorps anti GFAP. La D-sérine provient donc principalement des astrocytes (Schell et al., 1995; Panatier et al., 2006). Il n'est cependant pas exclu que la D-sérine puisse provenir en partie des neurones comme cela a été montré dans le cervelet (Miya et al., 2008), dans des cultures de neurones corticaux (Kartvelishvily et al., 2006; Rosenberg et al., 2010) et sur des tranches de cortex (Rosenberg et al., 2010).

5. Rôle physiopathologique des récepteurs NMDA dans la ME

5.1 Rôle physiologique

L'application de NMDA par iontophorèse sur des neurones de la CD de rats sains permet d'augmenter la réponse des neurones spinaux (dont 60% de neurones de projection) à des stimulations nociceptives et non nociceptives (Aanonsen et al., 1990) et l'injection de NMDA par voie intrathécale induit une réponse pro nociceptive (Aanonsen et Wilcox, 1987). On pourrait donc penser que les récepteurs NMDA jouent un rôle important dans le traitement des informations nociceptives aiguës. Plus récemment, des études ont cependant montré que l'utilisation d'antagonistes des récepteurs NMDA ne modifie pas la transmission synaptique et le comportement chez des animaux sains, suggérant ainsi que les récepteurs NMDA de la CD seraient majoritairement dans un état silencieux et ne participeraient pas ou peu au traitement des informations nociceptives (Figure 25A). Les récepteurs NMDA sont cependant importants dans le mécanisme de « gate control » (Figure 13). En effet, l'activation lente de ces récepteurs (10-20ms) aux synapses entre fibres afférentes et neurones de la CD laisse suffisamment de temps aux entrées inhibitrices pour empêcher l'initiation de potentiels d'actions (Zhang et al., 2018).

Une composante clef du traitement de l'information synaptique dans la ME est que le réseau spinal est très plastique et peut faire l'objet de différentes modifications structurelles et fonctionnelles réversibles (Woolf, 1983; Dubner et Ruda, 1992). Ce phénomène appelé plasticité reflète entre autres des changements dans l'efficacité de la transmission synaptique. Dans la ME, les récepteurs NMDA sont en conditions physiologiques dans un état silencieux. Cependant en cas de stimulation répétée ou intense des fibres afférentes primaires, l'augmentation de glutamate libéré dans les CDME va induire le recrutement des récepteurs NMDA. Il est maintenant bien établi que dans la ME, les récepteurs NMDA jouent un rôle primordial dans les phénomènes de plasticité du fait de leur forte perméabilité aux ions

Ca²⁺. Parmi les phénomènes de plasticité spinale dans lesquels les récepteurs NMDA sont impliqués (Figure 25) on peut citer :

La potentialisation à long terme NMDA-dépendante de la synapse excitatrice

Il s'agit d'une des formes de plasticité les plus fréquemment décrites dans le SNC. Brièvement, elle induit de façon activité-dépendante une augmentation de la transmission synaptique à long terme entre deux neurones. Ce type de LTP a été montré dans la CDME entre fibres de type C ou Aδ. Un moyen couramment utilisé pour induire cette LTP est d'utiliser un protocole de stimulation à haute fréquence (3x1sec à 100Hz) (Randić et al., 1993; Ikeda et al., 2003). Dans les CDME, ce type de plasticité est exprimé au niveau postsynaptique et dépend du calcium. L'augmentation de calcium intracellulaire libre peut impliquer l'ouverture des récepteurs NMDA suite à la dépolarisation de la membrane (Ikeda et al., 2006), l'ouverture de canaux calcium voltage-dépendants et l'activation de récepteurs métabotropes du glutamate du groupe I (Azkue et al., 2003). Cela induit l'activation de différentes voies de signalisation dans les neurones de la ME tel que la voie CaMKII, PKA, PLC, IP3 et ERK. L'activation de ces voies induit ensuite la synthèse de nouvelles protéines, l'augmentation de l'expression des récepteurs AMPA à la membrane, la phosphorylation de protéines synaptiques tels que les récepteurs AMPA/NMDA responsables de la LTP. Pour les fibres C, la LTP est bloquée par un antagoniste des récepteurs NMDA (Liu et Sandkühler, 1995).

La dépression à long terme NMDA dépendante de la synapse excitatrice

C'est une forme de plasticité qui à l'inverse de la LTP, aboutit à une diminution à long terme de la transmission synaptique. Comme pour la LTP, des mécanismes de LTD de la synapse inhibitrice impliquant l'activation des récepteurs NMDA ont été étudiées notamment sur le nerf optique de Xénope et sont aussi décrites dans la partie 2.2. Dans la CD, un mécanisme de LTD consiste en l'internalisation des récepteurs AMPA par les interneurones suite à l'activation à basse fréquence des fibres afférentes primaire (Song et Huganir, 2002). Le lecteur voulant plus de détails sur les mécanismes liés à la LTP et LTD dépendantes des récepteurs NMDA peut se référer à la revue de Lüscher et Malenka (2012).

D'un point de vue évolutif, ces mécanismes de plasticité réversibles sont utiles pour la survie. En effet le développement d'une allodynie ou d'une hyperalgésie temporaire permettra d'éviter de stimuler une zone lésée et de permettre ainsi la guérison. Cependant dans certains cas pathologiques telle qu'une lésion nerveuse, ces symptômes douloureux vont persister même après la récupération et vont devenir handicapants.

5.2 Rôle dans le développement et le maintien de douleurs neuropathiques

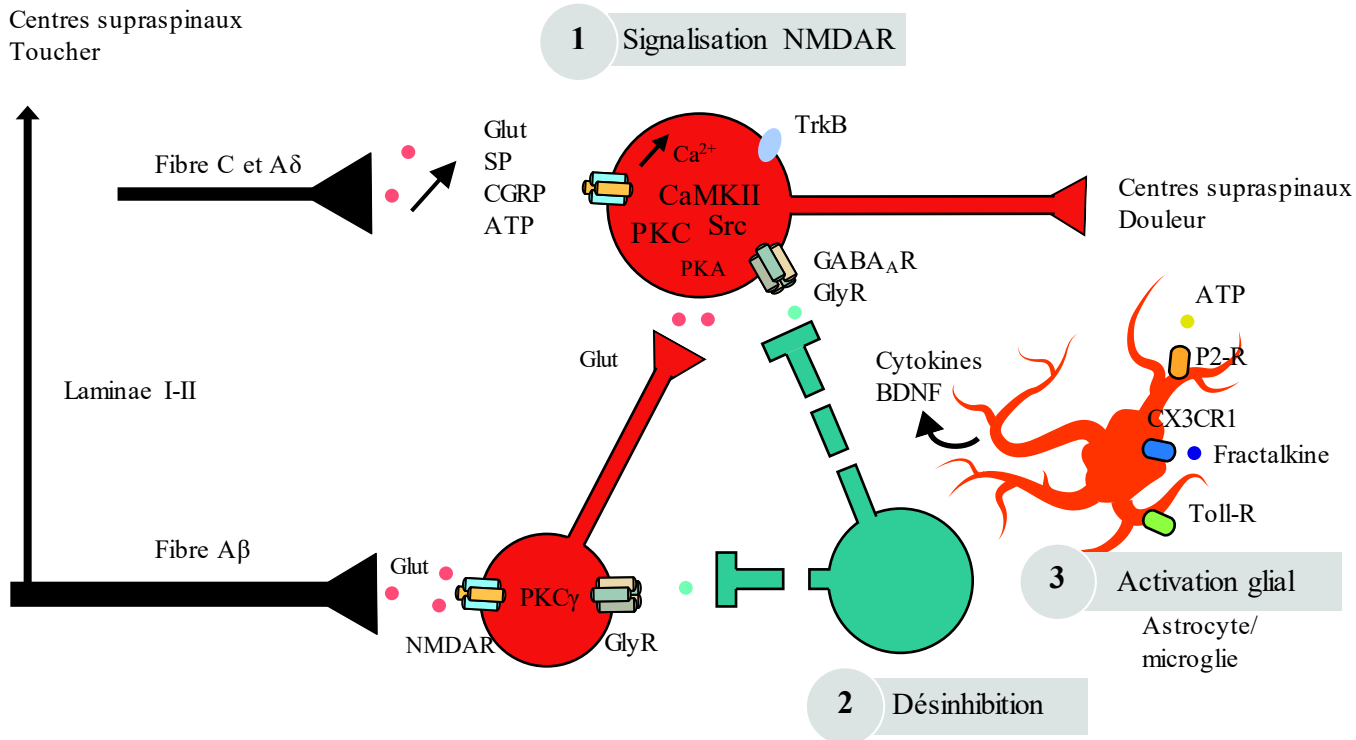


Figure 26 : La sensibilisation centrale.

(1) **La sensibilisation glutamate/récepteur NMDA dépendante.** Suite à une stimulation intense ou à une lésion nerveuse, les fibres afférentes C et A δ ont une activité augmentée et libèrent plus de neurotransmetteurs dont le glutamate, la SP, le CGRP et l'ATP au niveau de la corne dorsale. Cela permet le recrutement de récepteur NMDA normalement dans un état quiescent et l'augmentation de calcium intracellulaire ce qui active plusieurs voies intracellulaires tel que celle de la MAPK, la PKC, la PKA, la PI3K et la Src. Cela aura pour conséquence d'augmenter l'excitabilité des neurones et la transmission d'informations nociceptives au cerveau.

(2) **La désinhibition.** En condition physiologique, les interneurons inhibiteurs en bleu modulent continuellement l'information nociceptive par la libération de GABA et/ou glycine. Dans certains cas pathologiques, cette inhibition est perdue ce qui entraine le développement de symptômes associés aux douleurs neuropathiques. La désinhibition peut aussi permettre au fibres A β d'avoir accès au circuit de la transmission nociceptive, ce qui peut aboutir au fait que des stimuli normalement non nociceptifs soient perçus comme nociceptifs (allodynie). Cela est dû en partie à la perte du contrôle inhibiteur sur les neurones exprimant la PKC γ au niveau de la LIII (Peirs et al 2015).

(3) **L'activation gliale.** Une lésion nerveuse périphérique induit la libération d'ATP et de cytokines qui permettent d'activer les cellules microgliales. Ces microglies activées libèrent du BDNF qui peut activer les récepteurs TrkB exprimés par des neurones de la LI, ceci augmente l'excitabilité des neurones et induit le développement d'états d'hyperalgesie et d'allodynie. La microglie activée libère d'autres cytokines tel que le TNF α , les interleukines-1 β et 6 et d'autres facteurs contribuant à la sensibilisation centrale. D'après Basbaum et al., 2009.

Cette partie sera centrée sur le rôle des récepteurs NMDA dans l'initiation et le maintien des états de douleurs neuropathiques (Wu et Zhuo, 2009). Le rôle des récepteurs NMDA dans les processus inflammatoires ne sera pas abordé bien qu'il soit bien établi (Ren et Dubner, 1993; South et al., 2003; Cheng et al., 2008; Weyerbacher et al., 2010).

5.2.1 La sensibilisation centrale

De nombreuses études ont visé à essayer de mieux comprendre le rôle des récepteurs NMDA dans le développement et le maintien des douleurs neuropathiques. Il est apparu que l'injection intrathécale de NMDA ou l'application par iontophorèse dans la corne dorsale de rats naïfs est suffisante pour induire une sensibilisation centrale (Aanonsen et Wilcox, 1987; Aanonsen et al., 1990). La sensibilisation centrale peut être définie comme l'augmentation de la réponse des neurones nociceptifs dans le SNC à leurs stimuli habituels. Ce processus réversible semblable à la LTP NMDA dépendante nécessite une augmentation de Ca^{2+} intracellulaire libre, celle-ci provient principalement des récepteurs NMDA mais peut aussi avoir lieu par les récepteurs AMPA (Larsson et Broman, 2008), les canaux calcium voltage dépendants et les stocks intracellulaires de Ca^{2+} (Woolf et Salter, 2000). L'augmentation de Ca^{2+} intracellulaire va permettre d'activer la CaMKII (Lisman et al., 2002) ainsi que la PKC qui sont deux effecteurs majeurs de la sensibilisation centrale. L'activation subséquente de la PKA et de ERK vont permettre avec la PKC et la CaMKII de phosphoryler les récepteurs AMPA et NMDA, modifiant leurs propriétés. En parallèle, l'insertion de nouveaux récepteurs AMPA à la membrane et des modifications transcriptionnelles vont avoir lieu.

Ces processus cellulaires très brièvement résumés ici mais revus de façon exhaustive ailleurs (Latremoliere et Woolf, 2009) peuvent mener à une sensibilisation centrale et au développement de symptômes tels que l'allodynie ou l'hyperalgésie.

Suite à une lésion nerveuse, les fibres afférentes développent une activité spontanée exacerbée induisant une augmentation de la libération de glutamate dans la CD et le recrutement de récepteurs NMDA (Wall et al., 1974; Liu et al., 2000; Wu et al., 2001; Latremoliere et Woolf, 2009). Cela peut éventuellement conduire à un phénomène de sensibilisation centrale impliqué dans le développement et le maintien de douleurs chroniques. Plusieurs mécanismes participent à cette sensibilisation centrale. Certains sont réversibles tel que l'altération de la transmission excitatrice, le changement du gradient chlorure et les nouvelles interactions entre neurones et cellules gliales. D'autres sont irréversibles, comme c'est le cas pour la perte des interneurons inhibiteurs qui mène à la désinhibition du réseau spinal (Figure 26).

La perte d'interneurones inhibiteurs par apoptose

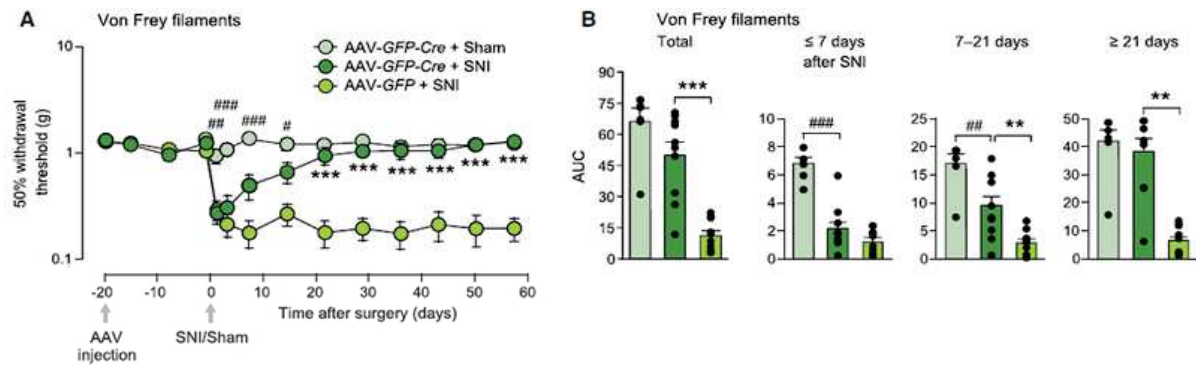


Figure 27 : La délétion conditionnelle de la sous-unité GluN1 des récepteurs NMDA dans la corne dorsale empêche la transition de l'allodynie aiguë à chronique.

(A) Seuil du retrait de la patte en réponse à des stimulations mécaniques avec des filaments de von Frey. (B) Aire sous la courbe des résultats sept jours post-SNI ; entre 7 et 21 jours post-SNI et à plus de 21 jours post-SNI.

On observe que les souris ayant subi une SNI développent une allodynie mécanique en moins d'une journée. De façon très intéressante, la délétion conditionnelle des sous-unités GluN1 dans les CDME de souris ayant subi une SNI permet une récupération, commençant environ une semaine après la SNI, des seuils nociceptifs mécaniques similaires aux souris contrôle. D'après Inquimbert et al., 2018.

Dans la ME, suite à une lésion nerveuse, il a été observé une mort neuronale par apoptose (Moore et al., 2002) (Détailé dans le chapitre II). Cela peut être dû à des phénomènes d'excitotoxicité induits par une concentration élevée de glutamate dans la fente synaptique et/ou une entrée massive de Ca^{2+} dans la cellule. De façon intéressante, la délétion de la sous-unité GluN1 du récepteur NMDA dans la CD bloque ce phénomène chez la souris dans un modèle de douleur neuropathique SNI (Inquimbert et al., 2018) (Figure 27). Cela met en évidence le rôle essentiel du récepteur NMDA dans la perte des interneurons inhibiteurs dans la CD.

Le changement du gradient transmembranaire des ions chlorure

Suite à une CCI chez le rat, l'expression du KCC2 est diminuée dans les neurones de la lamina I (Coull et al., 2003) (Détailé dans le chapitre II). L'augmentation d'expression du co-transporteur KCC2 induite par l'injection intrathécale d'un vecteur lentiviral contenant le gène codant pour le KCC2 permet de restaurer la fonction du co-transporteur suite à une SNL et de rétablir un gradient chlorure physiologique (environ -73mV comparé à -49mV après une CCI). De plus, ce transfert viral de KCC2 permet de rétablir l'activité physiologique des récepteurs NMDA aux éléments pré et postsynaptique dont l'activité est augmentée suite à une lésion nerveuse (Li et al., 2016). De manière similaire, le blocage pharmacologique des récepteurs NMDA après une SNL permet de rétablir un gradient chlorure physiologique et l'inhibition synaptique (Lee et al., 2011; Zhou et al., 2012). Ces données indiquent que les récepteurs NMDA jouent un rôle important dans la régulation du transporteur KCC2.

5.2.2 Effet d'un blocage ou d'une délétion spécifique des récepteurs NMDA

Etant donné le rôle important des récepteurs NMDA dans la sensibilisation centrale, plusieurs études ont été réalisées dans le but de diminuer ou bloquer l'activation des récepteurs NMDA sur des modèles animaux de douleurs neuropathiques et d'observer les conséquences sur la transmission synaptique et sur le comportement.

Injection intrathécale d'antagonistes des récepteurs NMDA

Les antagonistes des récepteurs NMDA sont efficaces pour réduire les symptômes douloureux dans plusieurs modèles de douleurs neuropathiques. Par exemple, l'injection intrathécale de mémantine, un bloquant du canal ionique des récepteurs NMDA, permet de réduire l'allodynie mécanique chez les souris sept jours après une SNL (Carlton et Hargett, 1995). De façon similaire l'injection intrathécale de MK-801, un autre bloquant du canal, ou de l'antagoniste AP5, diminue l'hyperalgésie thermique et réduit l'hyperesthésie suite à une CCI chez le rat sans affecter la sensibilité de la patte controlatérale (Seltzer et al., 1991; Yamamoto et Yaksh, 1992; Tal et Bennett, 1994). Enfin, sur un modèle de CCI chez le rat, l'injection intrathécale d'AP5 réduit l'allodynie mécanique sans changer l'allodynie

thermique au froid (Bennett et al., 2000). Dans toutes les études citées ci-dessus exceptée celle de Seltzer et al. (1991), les injections intrathécales ont été réalisées entre 7 et 24 jours suivant la lésion ou la constriction du nerf sciatique, une période où les douleurs neuropathiques sont déjà bien développées. L'efficacité de ces injections d'antagonistes pour réduire les symptômes douloureux semble indiquer que les récepteurs NMDA jouent un rôle important dans le maintien des douleurs neuropathiques sur le long terme. Il faut cependant noter que l'injection intrathécale de mémantine et d'AP5 juste avant la réalisation de la CCI diminue significativement l'automutilation chez le rat (Seltzer et al., 1991). De même, l'injection d'ifénprodil avant la réalisation d'une SNL empêche le développement de l'allodynie mécanique (Qu et al., 2009). Il semble donc que l'activation des récepteurs NMDA ait aussi un rôle important dans la mise en place des douleurs neuropathiques.

Par la suite, des équipes ont tenté d'identifier le type de récepteurs NMDA impliqués dans les douleurs neuropathiques. Le but étant de réduire les effets secondaires associés à l'utilisation d'antagonistes généraux des récepteurs NMDA en clinique ou phase préclinique en ciblant des sous-types particuliers de récepteurs NMDA (Lipton, 2004). Karlsson et al. (2002) ont observé, 7 et 14 jours après une lésion nerveuse chez le rat, une réduction de l'expression des ARNm codants pour la sous-unité GluN2A. De plus, leurs résultats obtenus par électrophysiologie sur tranche de ME indiquent que l'expression des sous-unités GluN2B/D augmente (Karlsson et al., 2002). Par injection intrathécale, il a aussi été montré que les antagonistes des récepteurs NMDA contenant la sous-unité GluN2B réduisent les symptômes douloureux dans plusieurs modèles de douleur chronique. Par exemple, le traxoprodil, un antagoniste des récepteurs NMDA contenant la sous-unité GluN2B, réduit l'allodynie mécanique 7 jours après une SNL chez le rat (Boyce et al., 1999). Enfin, sur un modèle de SNL chez le rat, l'injection d'ifénprodil et d'un autre antagoniste spécifique des récepteurs NMDA contenant les sous-unités GluN2B (le Ro25-6981) avant la lésion nerveuse permet aussi d'empêcher le développement de l'allodynie mécanique (Qu et al., 2009). Cibler sélectivement les récepteurs contenant la sous-unité GluN2B a donc potentiellement un intérêt thérapeutique dans le traitement de la douleur chronique. A l'heure actuelle, aucun antagoniste des récepteurs NMDA contenant les sous-unités GluN2C/D n'a été testé sur les symptômes douloureux associés aux douleurs neuropathiques. L'injection intrathécale d'antagoniste présente quelques limites. Elle ne permet pas par exemple de cibler des populations neuronales spécifiques. De plus, il n'est possible de réaliser ces injections d'antagonistes des récepteurs NMDA qu'à certains points temporels.

Délétion conditionnelle des récepteurs NMDA

La délétion conditionnelle des sous-unités GluN1 permet de dépasser les limites de l'injection intrathécale d'antagonistes. En effet, avec cette technique, il est possible de restreindre spatialement la délétion à certaine population de neurone. Il est aussi possible de supprimer l'expression de récepteur NMDA sur une longue durée, ce qui est intéressant pour évaluer le rôle de ces récepteurs dans le

développement et la mise en place de douleurs neuropathiques. Dans la ME, la délétion conditionnelle de ces sous-unités est vérifiée par une forte diminution (environ 80%) du taux d'ARNm codant pour la sous-unité GluN1 ainsi que des courants dû à l'activation de récepteurs NMDA (South et al., 2003; Inquimbert et al., 2018). La délétion des sous-unités GluN1 n'altère pas les seuils de sensibilité thermique ou mécanique mais permet de diminuer les processus de plasticité résultant d'une d'inflammation dépendant de l'activation des récepteurs NMDA (South et al., 2003; Weyerbacher et al., 2010).

Les souris ayant subi une SNI développent une allodynie mécanique et thermique au froid irréversibles. De façon très intéressante, la délétion conditionnelle dans la CDME de souris des sous-unités GluN1 ipsilatéral à la SNI permet un retour aux seuils nociceptifs mécaniques et thermiques similaires aux souris contrôle (Inquimbert et al., 2018). A l'inverse les souris sans délétion du récepteur NMDA conservent une allodynie mécanique pendant toute la durée testé (2 mois) (Figure 27) ainsi qu'une hyperalgésie thermique transitoire. Dans cette même étude, les auteurs ont mis en évidence que la délétion des sous-unités GluN1 protège les interneurons inhibiteurs de mort cellulaire par apoptose et permet ainsi de préserver l'inhibition synaptique GABAergique. Cette élimination des récepteurs NMDA restreinte à la CD a permis de clarifier le rôle de ces récepteurs dans l'excitotoxicité glutamatergique et la perte irréversible des interneurons inhibiteurs. Cela a permis de montrer le lien entre les récepteurs NMDA spinaux et l'inhibition GABAergique spinale dans la chronicisation des douleurs neuropathiques.

Objectif de la thèse

Nous avons vu que la lamina II joue un rôle crucial dans le traitement des informations nociceptives grâce à des réseaux d'interneurones locaux excitateurs, inhibiteurs et par les cellules gliales. Dans certains cas pathologiques, tel qu'une lésion nerveuse, la transmission synaptique inhibitrice spinale peut présenter des changements plastiques menant à une diminution de l'inhibition synaptique spinale. Cette plasticité fonctionnelle de l'inhibition spinale est l'un des mécanismes à l'origine du développement et du maintien des douleurs neuropathiques. Les récepteurs NMDA recrutés suite à une lésion nerveuse jouent un rôle dans les phénomènes de plasticité de la synapse excitatrice, cependant leur implication dans la plasticité de l'inhibition spinale reste très peu connue dans la ME.

L'objectif principal de cette étude a donc été d'étudier l'effet de l'activation des récepteurs NMDA sur la transmission synaptique inhibitrice spinale.

Mon travail de thèse a donc consisté dans un premier temps à caractériser l'effet de l'activation des récepteurs NMDA sur la transmission synaptique inhibitrice GABAergique dans la lamina II chez la souris saine. Nous avons ensuite utilisé le modèle du "spared nerve injury" (SNI) afin d'étudier les mécanismes de plasticité de la transmission synaptique inhibitrice chez des animaux présentant une douleur neuropathique induite par une lésion partielle du nerf sciatique.

D'autres part, les cellules gliales de la CD expriment les récepteurs NMDA et dans le SNC, il est montré que ces cellules peuvent moduler la transmission synaptique par la libération de gliotransmetteurs tels que le glutamate, la D-sérine ou l'ATP. Nous avons en parallèle au projet principal, étudié le rôle des cellules gliales des CDME dans l'effet induit par une application de NMDA sur la transmission synaptique inhibitrice.

Matériels et méthodes

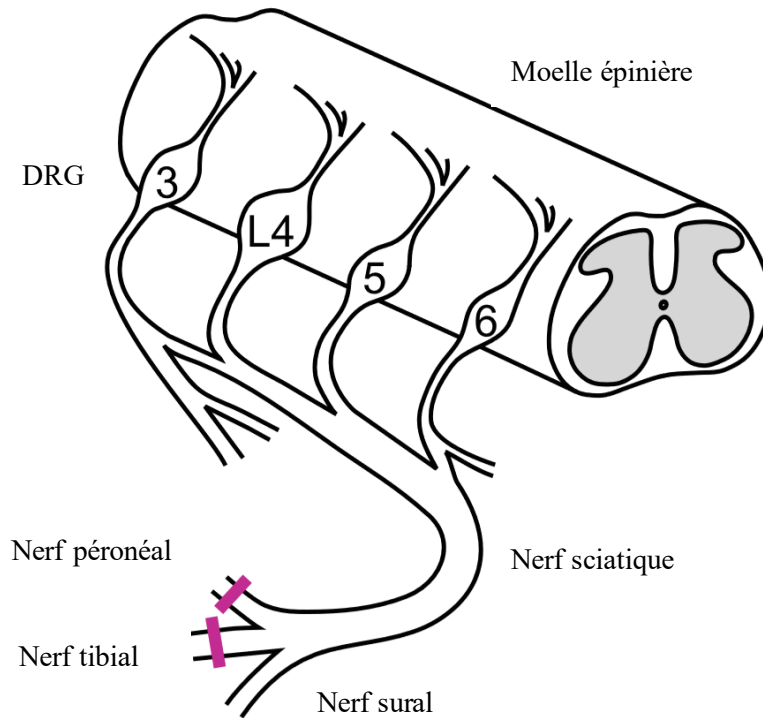


Figure 28 : Le modèle du spared nerve injury (SNI).

Les branches tibiale et péronéale sont ligaturées puis sectionnées tandis que la branche surale est laissée intacte. Ce modèle, mis au point par Decorsterd et Woolf en 2000, induit le développement de l'allodynie mécanique, thermique au froid ainsi qu'une hyperalgésie mécanique et thermique au chaud.

I. Animaux et traitements

1. Animaux utilisés

L'ensemble de notre étude a été réalisé sur des souris mâles adultes C57bl/6J et GAD65::EGFP (Cui et al., 2010) hétérozygotes âgées de 4 à 10 semaines. Ces animaux sont nés et élevés dans l'animalerie « Chronobiotron » (UMS3415), disposent de nourriture et d'eau à volonté et sont soumis à une photopériode jour/nuit de 12heures/12heures.

Les expériences ont été menées en conformité avec la législation européenne et avec l'autorisation du ministère français de l'agriculture (n° d'autorisation 2015030911301894).

2. Induction de la neuropathie

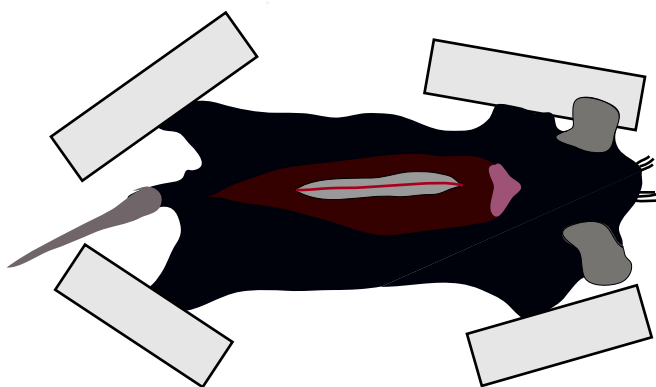
Pour induire la neuropathie, nous avons utilisé le modèle de douleur neuropathique appelé spared nerve injury (SNI) (Decosterd et Woolf, 2000). Nous avons choisi ce modèle car il permet d'obtenir une douleur neuropathique persistante et reproductible avec un développement rapide de l'allodynie mécanique et thermique au froid ainsi qu'une hyperalgésie thermique au chaud.

Sous anesthésie à l'isoflurane (3% induction, 2% maintien), la patte arrière gauche est rasée et désinfectée. Une incision de 1cm est réalisée sur la cuisse dans l'axe dorso-ventral. Les muscles sont écartés afin d'exposer le nerf sciatique et la trifurcation des trois branches terminales : la branche surale, péronéale commune et tibiale. Les branches tibiale et péronéale sont ligaturées (5.0 silk) puis sectionnées distalement tandis que la branche surale est laissée intacte (Figure 28). Une suture superficielle est réalisée sur les muscles et deux agrafes sont utilisées pour fermer l'incision cutanée. Dans certaines expériences, des animaux pseudo-opérés (SHAM) ont été utilisés comme contrôle. L'état de santé des souris est ensuite surveillé jusqu'à leur utilisation à 1 et 2 semaines (\pm 1jour) après la chirurgie.

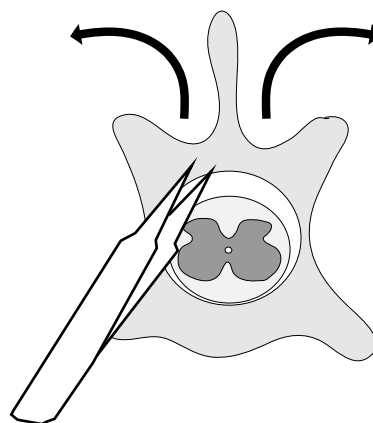
II. Préparation des tranches transversales de moelle épinière

L'ensemble des étapes de préparations des tranches est réalisé avec une solution cérébro-spinale artificielle (ACSF) enrichie en sucrose (sACSF) dont la composition est indiquée dans le tableau 3. Dans la solution de sACSF, le NaCl est remplacé par du sucrose afin de limiter la genèse de potentiels d'action, de réduire la libération synaptique de glutamate lors de la section du tissu et par conséquent de minimiser les phénomènes d'excitotoxicité glutamatergique. Toujours dans le but de réduire

1. Prélèvement de la moelle épinière par laminectomie

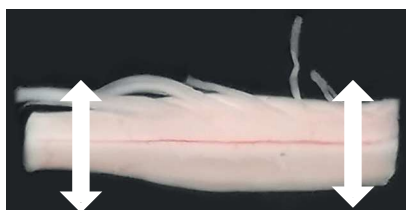


La peau et les muscles para-vertébraux sont écartés afin de dévoiler la colonne vertébrale

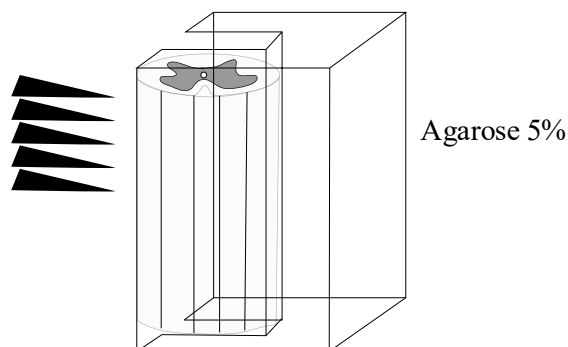


Les vertèbres dorsales sont précautionneusement cassées et retirées pour exposer la moelle épinière

2. Sélection du segment lombaire

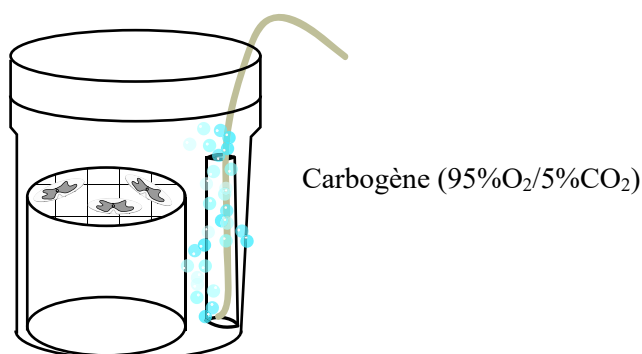


3. Inclusion dans l'agarose et coupe au vibratome



Coupe de 300 μm d'épaisseur
Sucrose-ACSF à 0-4°C

4. Stockage des tranches



ACSF à température ambiante (20-22°C)

Figure 29 : Prélèvement de la moelle épinière de souris par laminectomie et réalisation des tranches transversales de 300 μm d'épaisseur.

Les tranches sont obtenues à partir d'animaux adultes de 4 à 10 semaines, anesthésiés à l'uréthane (1.9g/kg). (1) La laminectomie est réalisée et l'animal est ensuite euthanasié par décapitation. (2) Le segment lombaire est isolé puis inclut dans un bloc d'agarose 5%. (3) Des tranches transversales de 300 μm sont réalisées au vibratome dans un milieu de sACSF. (4) Ces tranches sont ensuite placées dans une chambre de stockage rempli d'ACSF pendant une heure.

l'excitotoxicité glutamatergique pendant la réalisation des tranches, un antagoniste des récepteurs ionotropes du glutamate, l'acide kynurénique (2mM), est ajouté au sACSF. Enfin, le sACSF est toujours utilisé réfrigéré à 0-4°C et équilibré avec du carbogène (95% O₂ ; 5% CO₂) ce qui permet d'oxygéner les tissus et de tamponner le pH à environ 7,3.

1. Prélèvement de la moelle épinière par laminectomie

Les souris sont anesthésiées par injection intra-péritonéale d'uréthane (1,9g/kg). Cet anesthésique induit une anesthésie stable et profonde vérifiée par l'absence de réflexes nociceptifs et oculo-palpébraux. Le dos de la souris est rasé et la peau est incisée le long de la colonne vertébrale. Les muscles para-vertébraux sont écartés afin d'exposer les vertèbres. A l'aide de pinces à laminectomie (FST by Dumont n°11223-20), la partie dorsale des vertèbres est alors délicatement cassée et retirée, de la partie sacrée vers la partie cervicale. Les méninges sont ouvertes et enlevées sur la partie dorsale de la ME à l'aide de pinces fines et de micro-ciseaux (FST by Dumont n°15018-10). La ME est alors immédiatement extraite et placée dans une boîte de pétri remplie de sACSF froid et oxygéné tandis que l'animal est mis à mort par décapitation (Figure 29).

Les méninges restantes sont enlevées délicatement de la moelle épinière tout comme les racines dorsales du côté droit et les racines ventrales. Les racines du côté gauche sont préservées de façon à identifier le côté ipsilatéral à la lésion nerveuse.

2. Réalisation des coupes transversales

Le renflement lombaire est isolé et placé dans une gouttière taillée sur mesure dans un bloc d'agarose à 5% (préalablement polymérisé) pour garantir un bon maintien lors de la réalisation des tranches. L'ensemble est collé sur la platine métallique du vibratome (Leica VT1200S) puis rapidement placé dans la chambre de coupe remplie de sACSF froid et saturé en carbogène. Des tranches transversales d'une épaisseur de 300 µm sont réalisées au vibratome à une vitesse de coupe de 0.1mm/seconde avec une amplitude de vibration de la lame de rasoir de 3mm. Les tranches sont conservées à température ambiante sur un filet de nylon dans une chambre de stockage remplie avec une solution d'ACSF (tableau 3) bullé avec du carbogène (Figure 29).

III. Enregistrements électrophysiologiques

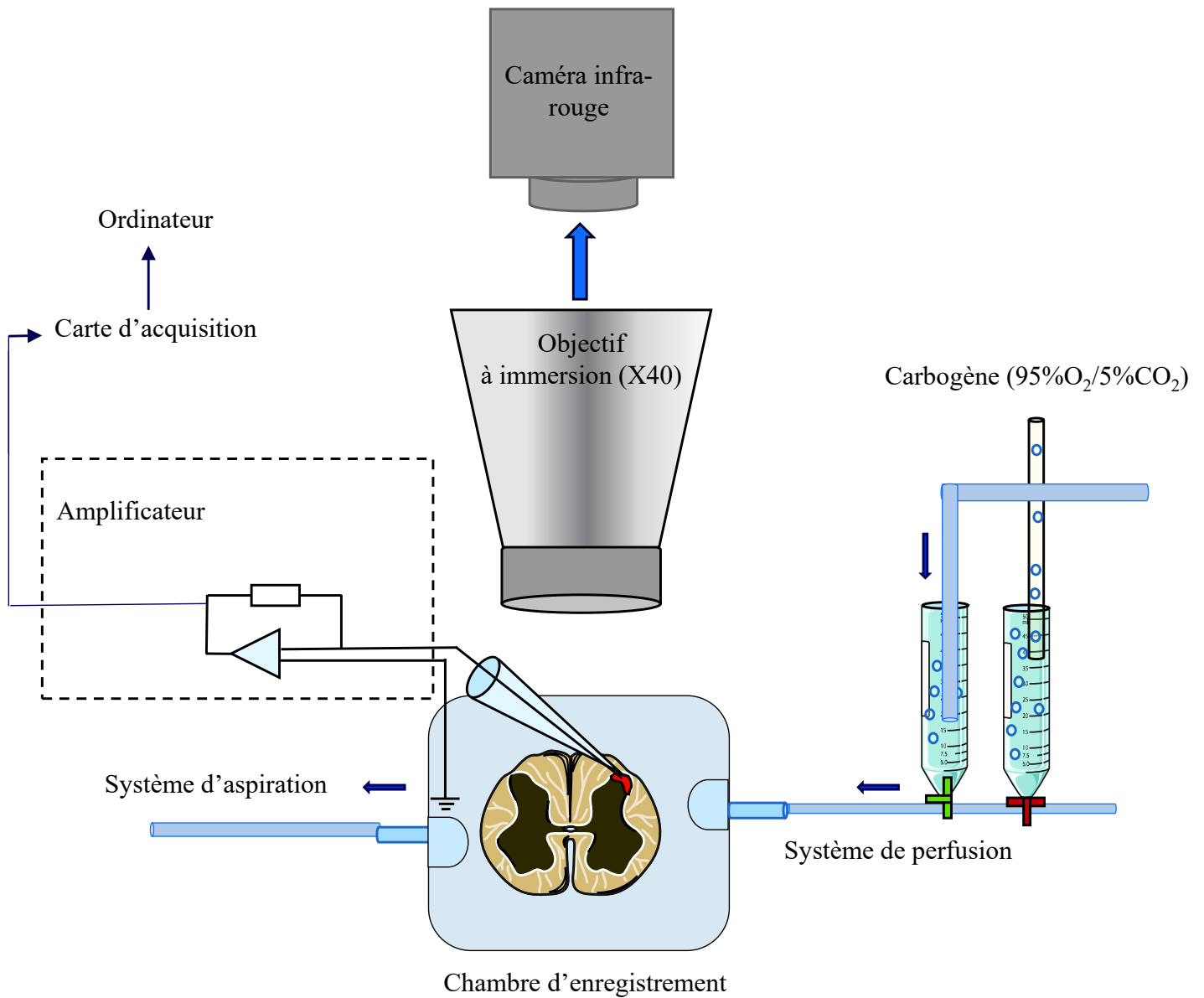


Figure 30 : Schéma du montage expérimental

La tranche est placée dans la chambre d'enregistrement, où circule la solution extracellulaire (ACSF). Les substances pharmacologiques testées sont diluées dans l'ACSF et placées dans le système de perfusion. Un amplificateur Axopatch 200A (Molecular Devices) est utilisé pour réaliser les enregistrements. Après avoir été digitalisées, les informations sont visualisées en direct et stockées sur l'ordinateur grâce au logiciel Clampex.

1. Dispositif expérimental

Pour les enregistrements électrophysiologiques, une tranche de ME est transférée de la chambre de stockage à la chambre d'enregistrement placée sur la platine du microscope où elle est maintenue immobile par une harpe de platine en forme de U. Les tranches sont en permanence perfusées par de l'ACSF bullé avec du carbogène et l'ensemble des expériences sont réalisées à température ambiante (20-22°C). La perfusion de l'ACSF dans la chambre se fait par gravité (débit de 1mL/min) et une pompe péristaltique (Minipuls 2, Gilson) permet d'aspirer le milieu et de maintenir un niveau d'ACSF stable dans la chambre (environ 2mL). L'électrode de référence constituée d'un fil d'argent chloruré est placée dans la chambre d'enregistrement remplie de milieu extracellulaire (Figure 30).

Les tranches sont visualisées avec un microscope droit (Axioscop 2, Zeiss) monté sur une table Gibraltar X-Y. La lamina II est visualisée avec l'objectif à faible grossissement (x10) (figure 31) tandis que les neurones sont ciblés avec l'objectif x40 à immersion (Zeiss) et la caméra infrarouge (IR-DIC, Till Photonics GmbH, Germany) (figure 32). Ce système optique facilite l'observation des neurones des couches superficielles. Les neurones enregistrés dans notre étude sont tous localisés dans la lamina II et ont été choisis en fonction de l'aspect du corps cellulaire ou de la présence de la protéine fluorescente verte « augmentée » (EGFP) pour les expériences réalisées avec des coupes de ME de souris transgéniques GAD65::EGFP.

2. Types d'enregistrements réalisés

Nous avons isolé pharmacologiquement la transmission synaptique inhibitrice en complétant le milieu extracellulaire avec différents antagonistes. Les antagonistes 6-cyano-7-nitroquinoxaline-2,3-dione (CNQX, 10 μ M, Sigma) ou 6,7-dinitroquinoxaline-2,3-dione (DNQX, 10 μ M, Sigma) ont été utilisés pour bloquer la transmission excitatrice mettant en jeu les récepteurs AMPA/Kainate. Les transmissions GABAergique et glycinergique ont été isolées pharmacologiquement en utilisant de la strychnine (1 μ M, Sigma) ou de la bicuculline (10 μ M, Sigma) qui bloquent respectivement les récepteurs à la glycine et les récepteurs GABA_A.

Transmission spontanée

Nous avons étudié la modulation de la transmission synaptique inhibitrice dans la lamina II de la corne dorsale de la moelle épinière par l'activation des récepteurs NMDA. Dans ce but, nous avons enregistré les courants postsynaptiques inhibiteurs (CPSI) en utilisant la technique du patch-clamp en configuration « cellule entière » et en imposant un potentiel de maintien de -60mV. Le potentiel

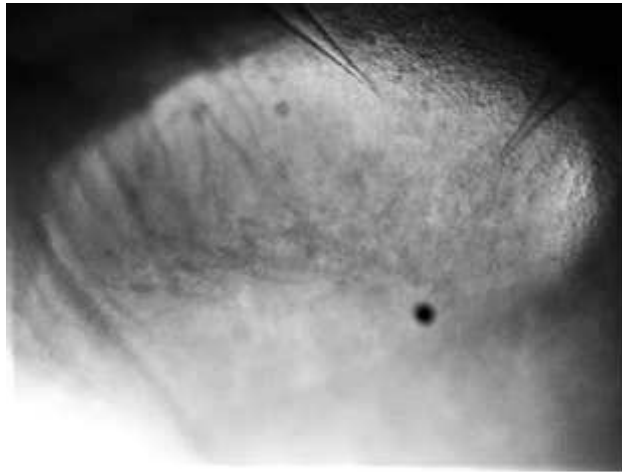


Figure 31 : Observation d'une tranche transversale de moelle épinière lombaire visualisée en lumière transmise.

Observation de la tranche de ME à un grossissement x10. Dû à la faible présence d'axones myélinisés dans la lamina II, celle-ci apparaît translucide en lumière transmise.

d'inversion des ions chlorure dans nos conditions est de 0 mV. Nous avons étudié la transmission synaptique en condition spontanée et miniature.

L'analyse de la transmission synaptique spontanée apporte des informations sur l'état de la transmission synaptique inhibitrice au sein du réseau spinal, notamment suite à l'application de substances pharmacologiques qui peuvent induire des effets de réseaux.

Transmission spontanée miniature

L'étude de la transmission synaptique miniature est réalisée en présence de tétródotoxine (TTX, 0,5 μ M, Latoxan) dans le milieu extracellulaire ce qui permet de bloquer les canaux sodium voltage dépendants et empêche la genèse de potentiel d'action. Dans ces conditions, la probabilité de synchronisation à plusieurs sites de libérations de neurotransmetteurs est très faible. La libération d'une seule vésicule de neurotransmetteur est donc privilégiée. Les courants postsynaptiques (CPS) miniatures (mCPS) sont donc dus à la libération de neurotransmetteur au niveau de sites synaptiques unitaires. L'étude des mCPS apporte des informations, indépendamment de l'activité du réseau, sur la probabilité de libération des vésicules et le contenu de celles-ci ainsi que sur l'état des récepteurs postsynaptiques. Par exemple, un changement de la fréquence d'apparition des mCPS indique en général un effet modulateur présynaptique tandis qu'une modification des cinétiques et/ou de l'amplitude des mCPS indique un effet postsynaptique.

Ces deux approches permettent d'obtenir des informations concernant l'effet du NMDA sur la transmission synaptique inhibitrice dans le réseau et sur la synapse inhibitrice de manière plus spécifique.

Paired-pulse ratio (PPR)

Dans le but de préciser le mécanisme d'action du NMDA, des expériences de PPR ont été réalisées en condition spontanée. Dans ces expériences, le neurone présynaptique est stimulé électriquement deux fois dans un intervalle de temps court (25, 50 et 100ms) toute les trois secondes par une électrode de stimulation à une intensité de 0.25mA en moyenne. Les réponses évoquées dans le neurone postsynaptique sont enregistrées en configuration cellule entière grâce à l'électrode d'enregistrement. Le ratio entre le pic de l'amplitude de la deuxième réponse sur la première réponse évoquée par la stimulation permet de mettre en évidence un changement ou non du PPR. Un changement du PPR en faveur d'une diminution (paire pulse depression) indique une augmentation de la probabilité de libération de neurotransmetteur et à l'inverse, un changement de PPR en faveur d'une augmentation (paire pulse facilitation) indique une diminution de la probabilité de libération. Dans les deux cas un changement de PPR suite à l'application d'une substance pharmacologique suggère un effet présynaptique.

(A)



(B)

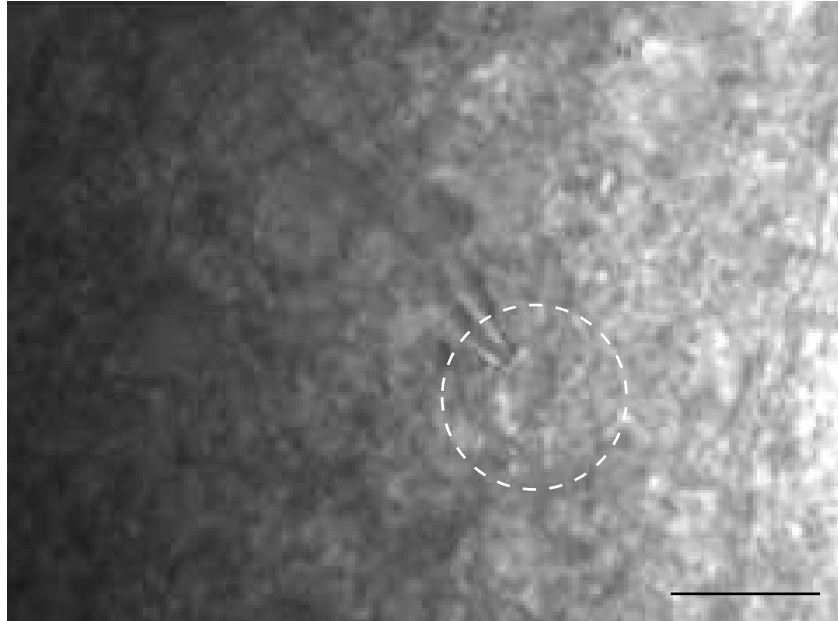


Figure 32 : Obtention de la configuration appelée « cellule entière ».

Les neurones sont visualisés par le biais d'une caméra infrarouge à fort grossissement (x40). (A) La pipette d'enregistrement est approchée près de la membrane du neurone d'intérêt à l'aide du micromanipulateur. La pression exercée à la pointe de la pipette est relâchée et une légère succion est réalisée permettant de passer en configuration « cellule attachée » validée par l'obtention d'un gigaseal. (B) Le morceau de membrane dans la pipette est alors rompu par une brève succion permettant le passage en configuration « cellule entière ». Barre d'échelle : 40 μm .

3. Pipettes et milieux intracellulaire

Les pipettes d'enregistrements sont réalisées à partir de capillaires de verre de borosilicate (modèle CC120F-10 ; diamètre externe = 1,2mm ; diamètre interne = 0.69mm ; Warner Instruments, Harvard Apparatus) étirés avec une étireuse horizontale à filament (P1000 ; Sutter instruments Co, Novato, California, USA). Les micropipettes obtenues sont remplies avec le milieu intrapipette suivant (en mM) : CsCl 130 ; HEPES 10 ; MgCl₂ 2 (Tableau 4). Les résistances électriques des pipettes remplies avec ce milieu intracellulaire et mesurées dans l'ACSF sont comprises entre 3 et 6 MΩ. Le pH et l'osmolarité ont été ajustés respectivement à $7,3 \pm 0.1$ avec du Césium hydroxide (CsOH) et à 300 ± 10 mosml avec du sucrose. Le milieu utilisé permet d'obtenir un potentiel d'inversion des cations et des ions chlorure de 0 mV. En imposant un potentiel de membrane à -60mV, on observe les courants postsynaptiques excitateurs et inhibiteurs sous forme de déflexion négative du signal électrique (courants entrants).

La pipette contenant le milieu intracellulaire est montée sur le porte-électrode du préamplificateur en contact avec une électrode d'argent chloruré (AgCl) qui est reliée à l'étage central de l'amplificateur (Axopatch 200B, Axon Instruments). Ce porte électrode est contrôlé à l'aide d'un micromanipulateur (MPC-200, Sutter instrument) permettant de placer la pipette au-dessus du neurone d'intérêt visualisé au préalable avec l'objectif 40x du microscope. La suite des opérations est réalisée en suivant l'évolution des courants électriques grâce au logiciel Axopatch qui permet de visualiser les CPS et de les enregistrer.

4. Déroulement des enregistrements

La pipette d'enregistrement, placée au-dessus du neurone ciblé, est descendue dans le bain avec une pression positive appliquée à l'intérieur. Cela permet d'éviter son obturation et de nettoyer la zone autour du neurone. Simultanément, un créneau de potentiel ΔV de 5 mV (20 ms) est appliqué à la pipette à une fréquence de 50 Hz. Le courant $I = \Delta V / R$ qui en résulte permet de mesurer la résistance de la pipette. Si la résistance convient, l'extrémité est approchée de la surface du neurone d'intérêt à l'aide du micromanipulateur sous contrôle visuel. La proximité de la membrane entraîne une augmentation de la résistance et une diminution du courant nécessaire pour réaliser le saut de potentiel. La pression est alors relâchée et la membrane adhère à la pipette. L'application d'une légère succion permet alors d'obtenir une jonction de haute résistance. Si la valeur de la résistance est supérieure à 1 GΩ, la jonction est appelée « gigaseal » et la configuration obtenue est dite « cellule attachée ». Les courants capacitifs de la pipette sont alors compensés à l'aide d'un dispositif interne de l'amplificateur. Pour passer en configuration « cellule entière », le potentiel de membrane est fixé à -60 mV et le morceau de membrane dans la pipette est rompu par une brève succion (Figure 32). La résistance en série et la capacitance en série sont ensuite compensées manuellement. La résistance en série est égale à la résistance de la pipette + la

Tableau 3 : Composition en mM du sucrose-ACSF et de l'ACSF (2 et 0mM de Mg²⁺).

Substances	Sucrose - ACSF	ACSF	ACSF Ø Mg²⁺
Sucrose	252	0	0
NaCl	0	126	126
KCl	2,5	2,5	2,5
NaCl ₂	2	2	2
MgCl ₂	2	2	0
Glucose	10	10	10
NaHCO ₃	26	26	26
NaH ₂ PO ₄	1,25	1,25	1,25

Tableau 4 : Composition en mM du milieu intracellulaire.

Substances	milieu intracellulaire
CsCl	130
HEPES	10
MgCl ₂	2
Biocytine	10

résistance d'accès. La résistance d'accès reflète la qualité de la jonction entre la pipette et le neurone, plus celle-ci est faible, plus l'accès est bon. Si la résistance en série est \leq à 25 M Ω , les enregistrements peuvent commencer. A la fin de l'enregistrement, la résistance en série est de nouveau évaluée. Si celle-ci a augmenté ou diminué de plus de 20%, l'enregistrement n'est pas gardé pour l'analyse.

5. Acquisition et stockage de données

Les enregistrements ont été réalisés avec un amplificateur Axopatch 200B (Axon Instruments, USA) en imposant un potentiel de membrane de -60mV. Le signal électrique est filtré avec un filtre passe-bas à 5kHz et digitalisé avec une interface analogique/digitale (digidata 1322A) à une fréquence d'échantillonnage de 10 kHz avant d'être stocké sur le disque dur de l'ordinateur. Les enregistrements sont observés en temps réel grâce au logiciel Clampex 10.2.

IV. Substances pharmacologiques et utilisation du fluorocitrate

1. Préparation des substances pharmacologiques

Les substances pharmacologiques sont préparées à l'avance sous forme de solutions stocks 1000 à 10000 fois concentrées et stockées à -20°C jusqu'au jour de leur utilisation où elles sont alors diluées à leur concentration finale dans l'ACSF. Les solutions stocks sont préparées dans l'eau, du diméthylsulfoxyde (DMSO) ou de l'éthanol 98% et la TTX est préparée dans un tampon acétate (pH 4-5). La liste des substances utilisées, leurs effets pharmacologiques et leurs conditions de préparation sont présentés dans le tableau 5.

Ces substances ont été appliquées par perfusion générale en bain à un débit de 1ml/min. Une période de 10min de perfusion d'un agent pharmacologique est suffisante pour atteindre les concentrations désirées dans la chambre d'enregistrement.

2. Préparation et utilisation du fluorocitrate

Afin d'étudier le rôle de la glie, nous avons utilisé le fluorocitrate (FC) (DL-Fluorocitric acid barium salt, Sigma), qui est une gliotoxine, pour bloquer le métabolisme des cellules gliales. Le FC est disponible sous forme d'un sel de barium connu pour activer les canaux potassiques sensible au barium (Ribera et Spitzer, 1987). Pour éviter cet effet, le barium doit être extrait le jour même pour pouvoir

Tableau 5 : Substances pharmacologiques utilisées en perfusion en bain et en incubation pour le fluorocitrate.

Substances	Concentration	Propriété pharmacologique	Fournisseur	Solvant	Stockage
Acide kynurénique	2 mM	Antagoniste des récepteurs au glutamate	Sigma	sACSF	4
CNQX	10 µM	Antagoniste des récepteurs AMPA/Kaïnate	Tocris	DMSO	-20
NBQX	10µM	Antagoniste des récepteurs AMPA/Kaïnate	Tocris	DMSO	-20
Strychnine	1 µM	Antagoniste des récepteurs de la glycine	Sigma	DMSO	-20
PMBA	10 µM	Antagoniste des récepteurs de la glycine	Sigma	H ₂ O	-20
Bicuculline methiodide	10 µM	Antagoniste des récepteurs GABA _A	Sigma	H ₂ O	-20
TTX	0,5 µM	Antagoniste des canaux Na ⁺ voltage dépendants	Latoxan	H ₂ O	-20
Fluorocitrate	100 µM	Inhibiteur de l'aconitase, bloque le cycle de KREBS	Sigma	ACSF	RT
D-sérine	100 µM	Co-agoniste des récepteurs NMDA	Sigma	H ₂ O	-20
DAAO	50 µM	Dégrade les acides aminés en "D"	Sigma	H ₂ O	-20
PPADS	10 µM	Antagoniste des récepteurs P2X	Abcam	H ₂ O	-20
TBOA	50 µM	Antagoniste des transporteurs EAATs	Tocris	DMSO	-20
NMDA	50 / 100 µM	Agoniste des récepteurs NMDA	Tocris	H ₂ O	-20
APV	50 µM	Antagoniste des récepteurs NMDA (sous unité GluN2)	Abcam	H ₂ O	-20
UBP141	10 / 25 µM	Antagoniste des récepteurs NMDA (sous unité GluN2C/D)	Abcam	NaOH	-20
Ifenprodil	3 / 10 µM	Antagoniste des récepteurs NMDA (sous unité GluN2B)	Sigma	éthanol	-20
NAB14	10 µM	Antagoniste des récepteurs NMDA (sous unité GluN2C/D)	Aobious	DMSO	-20
MK-801	2 mM	Bloqueur du pore des récepteurs NMDA	Tocris	H ₂ O	-20
Zinc	100nM / 1µM	Antagoniste des récepteurs NMDA (sous unité GluN2A)	Sigma	H ₂ O	-20

utiliser le FC. La procédure consiste à faire précipiter le barium sous la forme d'un sel non hydrosoluble par l'ajout d'acide chlorhydrique 0.1M (HCl), de sulfate de sodium 0.1M (Na₂SO₄) et d'hydrogénophosphate de sodium 0.1M (Na₂HPO₄). L'ensemble est ensuite centrifugé et le surnageant contenant le fluorocitrate purifié en surface est récupéré puis dilué dans l'ACSF (Paulsen et al., 1987).

Les tranches sont incubées dans l'ACSF complété avec 100µM de FC pendant 30 minutes puis sont transférées dans la chambre d'enregistrement où les expériences commencent immédiatement. Le temps d'incubation et la concentration ont été choisis afin de bloquer préférentiellement le métabolisme des cellules gliales (Swanson et Graham, 1994).

V. Analyse des données

L'analyse des données a été réalisée sur les neurones dont la résistance en série est restée stable tout au long de l'enregistrement. Une variation de plus ou moins 20% de la résistance en série entre le début et la fin de l'enregistrement est un critère d'exclusion. L'offset est aussi vérifié à la fin de l'enregistrement et le neurone est exclu si l'offset varie de plus ou moins 3 mV.

1. Détection des courants postsynaptiques

Les événements synaptiques sont détectés par une méthode de détection de seuil avec le logiciel Electrophysiology Data Recorder (WinEDR V3.8.6, Strathclyde Electrophysiology Software, Jonh Dempster, University of Strathclyde, Glasgow, UK). Pour cela nous avons utilisé une méthode de ligne de base mobile recherchant des variations d'amplitudes supérieures à un seuil donné dans un temps donné. Les critères de détections ont été fixés à une variation d'amplitude du courant supérieur à 3 pA par rapport à la ligne de base sur une période de 1ms. Tous les événements détectés par le logiciel ont été inspectés visuellement et seuls les événements possédant les caractéristiques d'un courant synaptique ont été gardés. Ces caractéristiques sont : un temps d'activation rapide et une désactivation plus lente sous forme d'exponentielle.

2. Analyse de la fréquence d'apparition des CPS

Pour chaque neurone analysé, le nombre cumulé N des événements synaptiques a été exprimé en fonction du temps grâce au logiciel KyPlot (2.0, Koichi Yoshioka). Cette distribution est ajustée par deux droites selon les équations suivantes :

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

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

Où la pente f_o représente la fréquence en conditions contrôle et f_c la fréquence moyenne après l'application d'un agent pharmacologique. t_c est la valeur de temps correspondant au point d'intersection des deux droites et indique le moment où a lieu le changement de fréquence. "a" est une constante. Nous considérons que les substances appliquées ont un effet sur la fréquence quand t_c se situe environ 100 secondes après le début de l'application. Ce délai a été déterminé par le temps nécessaire à une application de solution enrichie en K^+ (50mM) pour induire une modulation de l'activité synaptique dans la tranche et correspond au volume mort du système de perfusion. De plus, nous considérons qu'une substance a un effet seulement si le changement de pente observé à l'intersection des deux droites est supérieur à 20% avec un retour à la normale suite au rinçage de la substance. Le changement de la fréquence des courants postsynaptiques en % est calculé de la manière suivante :

$$\text{Changement de fréquence (\%)} = ((f_c - f_o) / f_o) * 100$$

La fréquence des événements synaptiques au cours des 200 secondes d'enregistrement qui précèdent l'application d'une substance est définie comme la période témoin et est comparée avec la fréquence des événements synaptiques au cours des 200 secondes d'enregistrements qui suivent le changement de la pente. La drogue est ensuite rincée par perfusion générale d'ACSF, la fréquence des événements synaptiques au cours des 200 secondes d'enregistrements qui suivent le rinçage est comparée aux autres périodes.

3. Analyse de l'amplitude des CPS

L'amplitude des CPS a été déterminée avec le logiciel WinWCP (version 5.4.5) en utilisant le mode « waveform measurements » qui permet de calculer la valeur exacte du pic de l'amplitude de chaque événement synaptique par rapport à la ligne de base. L'amplitude des événements synaptiques au cours des 200 secondes d'enregistrements qui précèdent l'application d'une substance est définie comme la période témoin et est comparée avec l'amplitude des événements synaptiques qui suit l'application ainsi que la période de rinçage.

4. Ajustement des courants postsynaptiques inhibiteurs miniatures

L'ajustement des cinétiques des courants postsynaptiques inhibiteurs miniatures a été réalisé avec le logiciel WinWCP V5.4.5 (Strathclyde Electrophysiology Software, John Dempster). Dans nos expériences, nous avons détectés des mCPSI GABAergiques et glycinergiques isolés

pharmacologiquement ou non. Les CPSI GABAergiques présentent un temps de désactivation plus lent (>15ms) que les CPSI glycinergiques (<13 ms). Ces deux types de courants ont une phase d'activation et de désactivation monoexponentielles qui ont été ajustées en utilisant la fonction endplate current selon la formule :

$$y(t) = 0,5 * A * (1 + \text{erf}((x - \tau_{\text{activation}})) * \exp(-x / \tau_{\text{désactivation}}))$$

Cette formule est définie par 3 paramètres : l'amplitude A (en pA), la constante de temps d'activation ($\tau_{\text{activation}}$ en ms) et la constante de temps de désactivation ($\tau_{\text{désactivation}}$ en ms).

5. Statistiques et représentation des données

Les analyses statistiques ont été réalisées avec le logiciel GraphPad Prism (version 6.07). Pour comparer les paramètres analysés ayant une distribution normale, nous avons utilisé le test de Student pour données appariées et non appariées pour comparer les paramètres des périodes contrôles et test sur un même neurone ou différents neurones respectivement. Le test de Mann whitney a été utilisé pour comparer les effets de substances pharmacologiques sur différents neurones. Enfin le test exact de Fisher a été utilisé pour les comparaisons de réponses des neurones dans différentes conditions.

Les données présentées sont exprimées en tant que moyenne \pm l'erreur type à la moyenne (Standard Error of the Mean ou SEM). Le seuil de significativité (p) est fixé à 0.05. Les symboles utilisés dans les figures pour indiquer les valeurs de p sont les suivantes : ***<0.001 ; ** <0.01 ; * < 0.05 ; n.s (non significatif).

Résultats

Résultat partie I

Manuscrit en préparation

Modulation de la transmission synaptique GABAergique par l'activation des récepteurs NMDA dans la corne dorsale de la moelle épinière

Situation du sujet :

Dans un premier temps, nous avons cherché à caractériser l'effet de l'activation des récepteurs NMDA sur la transmission synaptique inhibitrice chez des souris saines en enregistrant les neurones de la lamina II.

Dans la lamina II, l'activation des récepteurs NMDA dans nos conditions module spécifiquement la transmission GABAergique et pas la transmission glycinergique. Nous avons décrit une facilitation de la transmission synaptique GABAergique spontanée par l'application de NMDA. Cet effet implique l'activation des récepteurs NMDA contenant les sous-unités GluN2C/D.

De manière intéressante, cette facilitation de la transmission synaptique GABAergique cible principalement les interneurons GABAergiques dans la lamina II. En effet, 91% des neurones GABAergiques enregistrés reçoivent une transmission GABAergique augmentée dû à l'activation des récepteurs NMDA. En revanche, seulement 22% des neurones non-GABAergiques enregistrés présentent cette facilitation. Ce ciblage spécifique de la facilitation de la transmission GABAergique aux synapses entre deux neurones GABAergiques pourrait mener à la désinhibition du réseau et donc jouer un rôle important dans le traitement des informations nociceptives. Nous avons de plus montré qu'une augmentation extracellulaire de glutamate au sein du réseau de la lamina II, induite par le blocage de la recapture du glutamate, est suffisante pour induire la facilitation de la libération de GABA observée et dépend de l'activation des récepteurs NMDA. Enfin, il apparaît que l'activation des récepteurs NMDA induit une dépression de la transmission synaptique évoquée.

Nos résultats suggèrent donc une modulation différentielle de la transmission GABAergique spontanée et évoquée dans la lamina II et pourraient être à l'origine d'une régulation complexe de l'équilibre entre l'excitation et l'inhibition au sein du réseau.

1 **Modulation of GABAergic synaptic transmission by NMDA receptors in the**
2 **dorsal horn of the spinal cord**

3

4 Léonardon Benjamin^{1,2}, Cathenaut Lou^{1,2}, Vial-Markiewicz Louise^{1,2}, Hugel Sylvain¹,
5 Schlichter Rémy^{1,2}, Inquimbert Perrine ^{1,2*}.

6

7 ¹ Centre National de la Recherche Scientifique, UPR 3212 Institute of Cellular and Integrative
8 Neurosciences, 67084 Strasbourg, France.

9 ² Université de Strasbourg, 67084 Strasbourg, France

10 * Corresponding author: Perrine Inquimbert ;

11 E-mail: inquimbert@unistra.fr

12

13 **Conflicts of interest:** The authors declare no conflict of interest.

14 **Acknowledgments:**

15 We would like to thank Mrs. Catherine Moreau and Mrs. Chantal Fitterer for excellent technical
16 assistance. We thank Chronobiotron UMS 3512 for assistance in animal cares and
17 experimentation. We thank Ferenc Erdelyi and Gabor Szabo for providing GAD65::EGFP
18 mice. This work was supported by the Centre National de la Recherche Scientifique, Université
19 de Strasbourg, the **French National Research Agency (ANR) through the Programme**
20 **d'Investissement d'Avenir under the contract ANR-17-EURE-0022** and Neurex. B.L. was
21 funded by a fellowship from Région Grand Est and by a fellowship from the Fonds Paul Mandel
22 pour les Recherches en Neurosciences. L.C and L.V-M were funded by a fellowship from the
23 Ministère de la Recherche.

24 INTRODUCTION

25 The dorsal horn (DH) of the spinal cord is an important structure involved in the integration
26 and transmission of nociceptive messages from the inner and outer environment conveyed by
27 peripheral primary afferent nociceptors. Spinal integration of this information relies on the
28 interplay between different DH neurons forming complex and plastic neuronal network.
29 (Cordero-Erausquin et al., 2016).

30 The DH neuronal network is composed of inhibitory and excitatory interneurons. A fine-tuning
31 of the excitatory/inhibitory balance is crucial in the control of the transmission of nociceptive
32 messages from the DH to the supraspinal structures where it may lead to pain perception.
33 Imbalance between excitation and inhibition in DH networks is known to be one of the
34 mechanisms leading to enhanced pain sensation and underlying the development and
35 maintenance of pathological pain, such as neuropathic pain. Impairment in DH inhibition plays
36 a pivotal role in this disruption of the excitation/inhibition balance (Sivilotti and Woolf, 1994;
37 Coull et al., 2003; Harvey et al., 2004; Torsney and MacDermott, 2006). Indeed,
38 pharmacological blockade of ionotropic GABA_A and glycine receptors induces thermal
39 hyperalgesia and mechanical allodynia (Beyer et al., 1985; Roberts et al., 1986).

40 The major excitatory transmitter released by primary afferent fibers is glutamate. Under
41 physiological conditions, fast glutamatergic transmission in the DH is mediated by postsynaptic
42 AMPA receptors (AMPA_r). Sustained or repeated afferent fiber stimulation leads to an
43 increased release of glutamate in the DH and consequently to the recruitment of NMDA
44 receptors (NMDA_r) (Woolf and Thompson, 1991). In the DH, NMDA_r activation is critically
45 involved in long-term potentiation of excitatory synapses (Woolf and Salter, 2000; Sandkuhler,
46 2007; Latremoliere and Woolf, 2009). Moreover activation of presynaptic NMDA_r expressed
47 on afferent fiber terminals facilitates glutamate release in the DH (Liu et al., 1994; Liu et al.,
48 1997; Bardoni, 2013) and modulates transmission of nociceptive messages in the spinal cord

49 (Bardoni, 2013). Interestingly, one study has demonstrated that 37% of GABAergic synaptic
50 terminals expressed NMDAR in the DH of rat spinal cord (Lu et al., 2005), but the subunit
51 composition as well as the role of these presynaptic receptors has not been investigated so far.
52 Plastic changes in the strength of inhibitory synaptic transmissions play a crucial role in
53 information processing and balancing of neural activity. In several regions of the CNS, activity-
54 dependent long-term plasticities (LTP and LTD) of inhibitory synapses have been described
55 (Kullmann et al., 2012). In the DH, one study has described a heterosynaptic plasticity of
56 GABAergic synapses in lamina I neurons, implicating metabotropic glutamate receptors
57 (Fenselau et al., 2011) and one recent study described an NMDAR-dependent potentiation of
58 glycinergic synapses (Kloc et al., 2019). In other structures, postsynaptic and presynaptic
59 NMDAR have been shown to be key players in the modulation of GABA release (Glitsch and
60 Marty, 1999; Duguid and Smart, 2004; Crabtree et al., 2013) and in the plasticity of inhibitory
61 synapses (Nugent et al., 2007; Mapelli et al., 2016). It is known that plastic changes in spinal
62 inhibition are crucial in the processing of nociceptive information and that NMDAR are
63 activated by an increased activity in the DH network. However, nothing is known on the
64 possibility that activity-dependent plasticity of inhibitory synapses engaging NMDAR could
65 take place in the DH.

66 In the present work, we addressed the role of NMDA receptors in the modulation of GABAergic
67 synaptic transmission in the DH network. Using patch-clamp recordings on adult mice DH
68 neurons, we characterized the effect of NMDAR activation on inhibitory synaptic transmission
69 and more especially on the GABAergic one. Our results indicate that NMDAR activation
70 modulate differentially evoked and spontaneous GABA release and that this effect target
71 preferentially GABAergic synapse on GABAergic interneurons.

72

73 **MATERIALS and METHODS**

74 *Animals*

75 All procedures were performed in accordance with European directives and were approved by
76 the regional ethics committee and the French Ministry of Agriculture (license No.
77 2015030911301894). Experiments were performed with male adult mice (4-10 weeks old).
78 C57BL/6 and GAD65::EGFP (Cui et al., 2011) mice were born in the animal house of the
79 laboratory.

80

81 *Slice Preparation*

82 Mice were anesthetized by intraperitoneal injection of urethane (1.9g/kg body weight) prior to
83 realizing a laminectomy. The lumbar spinal cord was removed and immediately immersed in
84 ice-cold sucrose-based artificial cerebrospinal fluid (sACSF) containing in mM : sucrose (252),
85 KCl (2.5), NaCl₂ (2), MgCl₂ (2), glucose (10), NaHCO₃ (26) and NaH₂PO₄ (1.25)
86 continuously gassed with carbogen (5% CO₂ and 95% O₂). The spinal cord was embedded in
87 agarose (5%) and 300 µm-thick transverse slices were cut through lumbar 3 to 5 segments using
88 a Leica VT1200S vibratome (Leica Microsystems Inc.). Slices were stored at room temperature
89 (22-24°C) in a chamber filled with ACSF containing (in mM): NaCl (126), NaHCO₃ (26),
90 NaCl₂ (2), KCl (2.5), NaH₂PO₄ (1.25), MgCl₂ (2), glucose (10), and continuously gassed with
91 carbogen.

92

93 *Electrophysiology*

94 Slices were transferred to the recording chamber and continuously perfused with oxygenated
95 ACSF. Recordings were performed from lamina II neurons.

96 Patch pipettes were pulled from borosilicate glass capillaries (1.2 mm o.d.0.69 mm i.d.; Harvard
97 Apparatus) using a P-1000 puller (Sutter Instruments, Novato, CA, USA) and had final tip

98 resistances between 3 and 6 M Ω . Pipettes were filled with an intracellular solution containing
99 (in mM): CsCl (130), HEPES (10) and MgCl₂ (2). The intracellular solution had a pH of 7.3
100 adjusted with CsOH and an osmolarity of 300 mOsm adjusted with sucrose. In these conditions,
101 the theoretical equilibrium potential for Cl⁻ anions was 0mV.

102 Voltage-clamp recordings were performed with an Axopatch 200B amplifier (Axon
103 Instruments) at a holding potential fixed at -60 mV allowing visualization of excitatory
104 postsynaptic currents and inhibitory postsynaptic currents (EPSCs ; IPSCs) as inward currents.
105 Recordings were low-pass filtered (5 kHz) and acquired with Clampex software (Strathclyde
106 Electrophysiology Software, John Dempster, University of Strathclyde, Glasgow, UK). Current
107 traces were digitized (10 kHz) and stored on the hard drive of a personal computer. All
108 experiments were performed at room temperature (22–24 °C).

109 Paired-pulse ratio experiments were performed by stimulation of a presynaptic neuron with a
110 0.25mA current injection. Three different interstimulus intervals of stimulation were realized:
111 20, 50 and 100ms and were repeated every 3 seconds. Paired-pulse ratio is determined as the
112 amplitude ratio of second to first IPSCs evoked in the postsynaptic neuron.

113

114 *Pharmacological substances*

115 Different drugs were used in order to study NMDA effect on inhibitory synaptic transmission.
116 We recorded spontaneous IPSCs in the presence of one of the two following antagonists of
117 AMPA and Kainate receptors, the 6-cyano-7-nitroquinoxaline-2,3-dione (CNQX, 10 μ M,
118 Tocris) and the 2,3-Dioxo-6-nitro-1,2,3,4-tetrahydrobenzo[f]quinoxaline-7-sulfonamide
119 (NBQX, 10 μ M, Tocris). To isolate GABAergic or glycinergic currents, we used strychnine
120 (1 μ M, Sigma) or bicuculline methiodine (10 μ M, Sigma), respectively. Miniature IPSCs were
121 recorded in the presence of tetrodotoxin (TTX) (0.5 μ M, Latoxan) to block sodium channels.

122 DL-threo- β -Benzyloxyaspartic acid (TBOA, 50 μ M, Tocris) was used to block excitatory
123 amino-acid transporters (EAATs).
124 To assess the role of NMDA receptors, we used the specific agonist N-Methyl-D-aspartic acid
125 (NMDA, 100 μ M, Tocris). The specific antagonist of NMDA receptors, D-2-amino-5-
126 phosphonovalerate (APV 50 μ M; Abcam), was used to block all NMDA receptors. Two specific
127 antagonist of NMDA receptors containing GluN2C/D subunits were used, the (2R,3S)-1-
128 [(phenanthren-3-yl)carbonyl]piperazine-2,3-dicarboxylic acid) (UBP141) and the (4-((1H-
129 Indol-7yl)carbamoyl)phenyl diethylcarbamate) NAB14 (10 μ M, from Abcam and Aobious
130 respectively). Ifenprodil (10 μ M, Sigma) was used to block NMDA receptors containing
131 GluN2B subunits. Zinc (100nM, Sigma) was used to inhibit NMDA receptors containing
132 GluN2A subunits. Finally, we also used a channel blocker of NMDA receptors, dizocilpine
133 (MK-801) (2mM in the intracellular solution, Tocris). Drugs were prepared as 1000x or 10000x
134 concentrated stock solutions in dimethylsulphoxide (DMSO), water or ethanol in accordance
135 with indications. The stocks were stored at -20 °C. All substances were diluted to their final
136 concentration in ACSF at the beginning of each experiment and applied by general perfusion
137 (flow rate: 1.0 mL/min; total chamber volume: 2 mL).

138

139 *Data analysis*

140 Synaptic events were detected using WinEDR with an amplitude threshold detection algorithm
141 and visually inspected for validity. For each neuron analyzed, the cumulative number, N, of
142 synaptic events was plotted as a function of time. A two-linear-segment curve was fitted by
143 non-linear regression (KyPlot 2.15; KyensLab, Tokyo, Japan) using the following equation:

144

$$145 \quad N = f_0 \times t \times a \quad \text{for } t < t_c \quad \text{and}$$

$$146 \quad N = f_c \times t + (f_0 - f_c) \times t_c + a \quad \text{for } t > t_c$$

147

148 Where the slope “fo” represents an estimation of the average frequency under control conditions
149 and “fc” provides an estimation of the mean frequency following the application of the drug.
150 “tc” is the time at which the change in frequency occurs. Drugs were considered to have an
151 effect when “tc” occurred around 100 seconds following the beginning of the application of the
152 substance and when the change in frequency exceeded 20% of the recorded basal frequency.

153 The percentage of increase in frequency was calculated as follows:

154

155 $\text{Change in frequency (\%)} = ((f_c - f_o) / f_o) \times 100$

156

157 Peak amplitude was determined by using WinWCP (waveform measurements) to determine the
158 exact value of the peak. Tau rise and Tau decay were determined by fitting the trace with an
159 exponential decay (EPC endplate current-fitting function of WinWCP) using this equation:

160

161 $y(t) = 0,5 * A * (1 + \text{erf}((x - \tau_{\text{rise}})) * \exp(-x / \tau_{\text{decay}})$

162 Where A is the amplitude (in pA), τ_{rise} (in ms) and τ_{decay} (in ms). Following these analyses,
163 each neuron was classified either as displaying a change in EPSCs or IPSCs frequency,
164 amplitude or kinetics in response to the application of the substance or as being non-responsive
165 to this substance.

166

167 *Statistics*

168 Data are represented as mean \pm Standard Error of the Mean (SEM). Statistical analysis were
169 performed with GraphPad Prism (GraphPad Software 6.07, La Jolla, CA, USA). To compare
170 proportions of neurons, Fisher exact t test was used. For the effect of drug application, we used
171 the paired t-Test or the Wilcoxon test, and the unpaired t-Test or the Mann-Whitney test were

172 used for unpaired comparisons, depending of the data distribution previously tested with the
173 D'Agostino & Pearson normality test.

174

175 **RESULTS**

176

177 **NMDA receptor activation lead to an increase in spontaneous GABAergic synaptic** 178 **transmission.**

179 Bath application of NMDA (100 μ M, 60 s) caused a significant increase of spontaneous
180 inhibitory postsynaptic currents (sIPSCs) frequency in 75% of the recorded neurons (N=18/24).
181 This potentiation was always followed by a full recovery (fig 1A-B). In neurons displaying a
182 significant increase in sIPSCs frequency, the increase was of 415% (control: 0.19 ± 0.06 Hz,
183 NMDA: 0.79 ± 0.17 Hz; N=18; $t=4.147$, $p=0.0007$, paired t-test). In these neurons, increase in
184 sIPSCs frequency occurred without changes in currents amplitude (control: -32.5 ± 4.0 pA,
185 NMDA: -32.5 ± 4.7 pA; N=18; $t=0.003$, $p=0.9975$, paired t-test) (Fig1B).

186 Fast synaptic inhibition in the dorsal horn of the spinal cord is mediated by GABA and glycine.
187 To test the effect of NMDA on each of these synaptic transmission, we recorded GABAergic
188 sIPSCs in presence of 1 μ M strychnine, a glycine receptor antagonist. NMDA application
189 induced a reversible increase of GABAergic sIPSCs in 80.7 % of the recorded neurons
190 (N=67/83). In neurons with displaying a significant effect, NMDA increased GABAergic
191 sIPSCs by 736% (control: 0.11 ± 0.01 Hz, NMDA: 0.81 ± 0.08 Hz; N=67; $t=4.147$, $p=0.0007$,
192 paired t-test) without changes in their amplitude (control: -24.2 ± 1.6 pA, during NMDA: -23.5
193 ± 1.2 pA; N=67; $t=0.9188$, paired t-test) (Fig 1C). Glycinergic spontaneous IPSCs were
194 recorded in presence of 10 μ M bicuculline, a GABA_A receptor antagonist. NMDA application
195 had no significant effect on glycinergic sIPSCs (N= 9) indicating that NMDA modulates
196 specifically GABAergic synaptic transmission (Fig 1D).

197 In neurons were NMDA facilitated GABAergic sIPSCs, a second application yielded a similar
198 effect (relative increase in frequency: NMDA = 0.93 ± 0.29 , N=6,) (Fig 2A). Taking advantage
199 of NMDA effect reproducibility we examined the effect of NMDAr antagonists in NMDA-
200 responsive neurons. To this end, a second application of NMDA was performed in presence of
201 NMDAr antagonists or modulators and effects of both applications were compared.

202 In the presence of 50 μ M APV, a selective NMDAr antagonist, NMDA-induced increase in
203 GABAergic sIPSCs was reduced by 72% (relative increase in frequency: NMDA = 0.93 ± 0.29 ,
204 NMDA+APV = 0.28 ± 0.07 , N=8, $p = 0.02$, Mann-Whitney test)(Fig 2B).

205 These results indicate that activation of NMDAr increase the frequency of GABAergic and not
206 glycinergic spontaneous IPSCs.

207 NMDAr is a tetrameric ionotropic glutamate receptors with a frequent-most configuration
208 consisting of two mandatory GluN1 and two GluN2 subunits (GluN2 A-D). To assess the
209 composition of NMDAr contributing to the increase in GABAergic sIPSCs frequency, we
210 tested the effect of NMDAr selective antagonists.

211 Zinc (100 nM), blocking specifically NMDAr containing GluN2A subunit, had no effect on
212 NMDA-induced effect (relative increase in frequency: Zinc = 1.40 ± 0.30 , N= 4), neither did
213 ifenprodil (10 μ M), a selective antagonist of GluN2B-containing NMDAr (relative increase in
214 frequency: ifenprodil = 0.94 ± 0.25 , N= 8). However, NMDA-induced increase in GABAergic
215 sIPSCs frequency was reduced by 79% in presence of UBP 141 (UBP 10 μ M: relative increase
216 in frequency = 0.21 ± 0.08 , N=4, $p=0.019$, Mann-Whitney test; UBP 25 μ M: relative increase
217 in frequency = 0.20 ± 0.04 , N=9, $p = 0.0048$, Mann-Whitney test) a specific antagonist of
218 GluN2C/D-containing NMDAr (Fig. 2C).

219

220 **NMDA receptor activation selectively increases GABA release.**

221 We next examined whether NMDA-induced facilitation of spontaneous GABAergic
222 transmission involved a direct effect on GABAergic presynapse or whether it required action
223 potential firing of presynaptic interneurons. To this end, we recorded miniature IPSCs (mIPSC)
224 in the presence of 0.5 μ M TTX. In 58% of recorded-neurons (N=14/24), application of NMDA
225 induced a significant increase in mIPSCs frequency (control: 0.04 ± 0.01 Hz, NMDA: 0.21
226 ± 0.05 Hz; N=14; $t = 3.664$, $p = 0.0029$, paired t-test), without change in currents amplitudes.
227 Then, we recorded GABAergic mIPSCs in the presence of the channel blocker TTX and the
228 glycine receptor antagonist Strychnine (STR). In 54% of recorded neurons (N=35/65), NMDA
229 induced a significant increase in GABAergic mIPSCs frequency (control: 0.07 ± 0.01 Hz,
230 NMDA: 0.26 ± 0.04 Hz; N=36; $t = 5.364$, $p < 0.0001$, paired t-test) (Fig 3A-B). NMDA neither
231 induced significant changes in amplitude, nor in mIPSCs activation or deactivation kinetics,
232 suggesting a presynaptic effect on release probability.

233 To examine the specificity of the NMDA effect on GABAergic synapse, we test NMDA
234 application effect on mEPSCs or glycinergic mIPSCs. NMDA application did not lead to any
235 change in mEPSC (recorded without CNQX and in presence of bicuculline and strychnine), or
236 glycinergic mIPSCs (recorded in absence of Strychnine and in presence of CNQX and
237 Bicuculline) (data not shown).

238 As previously performed for spontaneous GABAergic transmission, we test effect of NMDAR
239 antagonists on the NMDA effect on NMDA-induced increase in mIPSc frequency.

240 APV (50 μ M) reduced by 72% the NMDA-induced increase in GABAergic mIPSCs frequency
241 (relative response: NMDA = 0.59 ± 0.11 , APV = 0.17 ± 0.04 , N=6, $p = 0.0087$, Mann-Whitney
242 test) (Fig 2B). These results indicate that activation of NMDAR results in an increase in the
243 frequency of GABAergic miniature IPSCs.

244 NMDA-induced increase in GABAergic mIPSCs frequency was reduced by 77% in presence
245 of NAB14 (10 μ M), a highly selective antagonist of GluN2C/D-containing NMDAR (relative

246 response: $NAB14 = 0.23 \pm 0.05$, $N=5$, $p = 0.0173$, Mann-Whitney test) confirming the
247 involvement of GluN2C/D-containing NMDAr in NMDA-induced potentiation of GABAergic
248 synaptic transmission (Fig3C).

249 The voltage-dependent block of NMDAr by Mg^{2+} is stronger for NMDAr containing GluN2A
250 or GluN2B subunits than for those containing NR2C/D subunit. The experiments described so
251 far were performed in the presence of 2 mM Mg^{2+} . To assess whether the contribution of NR2A-
252 or NR2B-containing NMDAr was masked by voltage-dependent Mg^{2+} block, we evaluated the
253 effect of NMDA on GABAergic mIPSCs in absence of extracellular Mg^{2+} . These recordings
254 were realized in presence of MK801 (2 mM) in the recording pipette in order to avoid activation
255 of NMDArs from the recorded neuron. The stimulatory effect of NMDA on GABAergic
256 mIPSCs was unchanged in these condition. In 50% of recorded cells ($N=5/10$), NMDA
257 application induced an increased in GABA mIPSC frequency (control: 0.10 ± 0.07 Hz, during
258 NMDA: 0.34 ± 0.08 Hz; $N=5$; $p=0.0625$, Wilcoxon test) without change in amplitudes of the
259 currents (Fig 3D).

260

261 **Inhibition of glutamate transporters induces NMDAr-dependent increase in the**
262 **frequency of GABAergic mIPSCs.**

263 We next assessed whether NMDA-induced facilitation of GABAergic synaptic transmission
264 could be engaged by endogenous release of glutamate. To this end, we blocked glutamate
265 transporter with bath applications of 50 μ M TBOA.

266 In 50% of the recorded cells ($N=7/14$) TBOA significantly increased GABAergic mIPSCs
267 frequency (control: 0.17 ± 0.03 Hz, TBOA: 0.80 ± 0.36 Hz; $N=7$; $p=0.0156$, Wilcoxon test)
268 without changes in mIPSC amplitude (control: -21.2 ± 2.3 pA, TBOA: -20.9 ± 3.0 pA; $N=7$;
269 ns, Wilcoxon test) (Fig4). The effect of TBOA was reversed by the application of APV (50 μ M)

270 in presence of TBOA (TBOA+APV: 0.17 ± 0.05 Hz, N=7, $p= 0.0156$, Wilcoxon test)
271 suggesting that TBOA-induced increase in mIPSCs frequency involved NMDAr activation.

272

273 **NMDAr-dependent modulation of GABAergic transmission depends on the nature of the**
274 **recorded neuron.**

275 The NMDA-induced modulation was not observed in a significant proportion of neurons.
276 We examined whether NMDA-induced facilitation of GABAergic transmission was specific to
277 connections onto excitatory or onto inhibitory interneurons. To this end, we recorded from
278 slices prepared with GAD65-eGFP mice.

279 NMDA facilitated spontaneous GABAergic IPSCs recorded from both GAD+ and GAD-
280 neurons, in similar proportions (GAD positive: 100%, N=10/10; GAD negative: 85 % N=6/7).
281 These results were similar to those obtained from C57Bl6 mice (Fig 5A).

282 Almost every GAD+ neuron displayed a facilitatory effect of NMDA on GABAergic
283 mIPSCs (91%, N= 20/22). However, a significantly lower proportion of GAD negative neurons
284 (22%, N=2/9, $p= 0.00042$, Fischer's exact test) show an effect of NMDA on GABAergic
285 mIPSCs (Fig5B). As previously observed in unidentified neurons, NMDA application
286 increased GABAergic mIPSCs frequency (control: 0.07 ± 0.02 Hz, during NMDA: 0.25 ± 0.05
287 Hz; N=20; $t = 4.880$, $p = 0.0001$, paired t-test) with neither changes in amplitude (control: -17.5
288 ± 1.3 pA, during NMDA: -16.8 ± 1.4 pA; N=20; $t = 0.5017$, paired t-test) nor in kinetics (data
289 not shown) (Fig 5C-D). In GAD negative neurons showing an effect, NMDA application also
290 increased GABAergic mIPSCs frequency (control: 0.10 ± 0.04 Hz, during NMDA: 0.21 ± 0.07
291 Hz; N=2) (Fig 5C). These results indicate that the facilitation of GABAergic synaptic
292 transmission by presynaptic NMDAr depended on the postsynaptic target: it preferentially
293 occurs in GABAergic connections onto GAD+ neurons.

294

295 **NMDA modifies the paired-pulse ratio and inhibits evoked GABAergic IPSCs.**

296 An increased frequency of mIPSCs without changes in amplitude suggests a presynaptic
297 facilitation of GABA release. We further assessed this by measuring the effect of NMDA on
298 the paired-pulse ratio (PPR) of evoked IPSCs (eIPSCs) (Fig6A). The relative change in absolute
299 PPR was consistently different from 0 independently of the interpulse interval : 20 ms interpulse
300 ($\Delta\text{PPR} = 0.19 \pm 0.07$, N = 8 , t= 2.751 , p= 0.0285 , one sample t-test), 50 ms interpulse (ΔPPR
301 = 0.19 ± 0.06 , N = 9, t= 3 , p= 0.0112 , one sample t-test) or 100 ms interpulse ($\Delta\text{PPR} = 0.19$
302 ± 0.07 , N = 9, t= 0.1944 , p= 0.0205 , one sample t-test) (Fig6B).

303 We therefore investigated effects of NMDA application on evoked currents in GABAergic
304 neurons onto GABAergic neurons synapses. The mean amplitude of the evoked IPSC was
305 reduced (control: -37.5 ± 3.9 pA, during NMDA: -24.7 ± 2.6 pA; N = 17; t = 6.029, p<0.0001,
306 paired t-test). This inhibition was maintained even after a complete wash out of NMDA (Wash
307 -24.4 ± 2.6 pA, N=17, compared to control t = 2.440, p = 0.0267, paired t-test) (Fig6C-D).

308

309

310

311 **DISCUSSION**

312 We showed that NMDA increased the frequency of GABA mIPSCs but depressed GABA
313 eIPSCs recorded in lamina II neurons. Inhibition of glutamate transporter induced NMDAr
314 activation and regulation of spontaneous GABA release. Furthermore, we showed that
315 facilitation of GABAergic synaptic transmission by NMDAr depended on the postsynaptic
316 target: it preferentially occurs in GABAergic connections onto GAD⁺ neurons.

317

318 **NMDAr subunit composition and Mg sensitivity.**

319 NMDAr are abundant in the dorsal horn with GluN1 and GluN2A/B receptors subunits
320 expressed virtually in all lamina I and II neurons (Nagy et al., 2004). Concerning GluN2C/D
321 subunits, their level of expression is lower in the dorsal horn compared to others GluN2
322 subunits. But it has been shown that GABAergic interneurons also express NMDAr containing
323 NR2C/D subunits. These receptors may play a role for these receptors in modulating the activity
324 of inhibitory interneurons (Shiokawa et al., 2010).

325 Using a pharmacological approach, we identify GluN2C/D containing NMDAr as responsible
326 for the NMDA-induced increase of spontaneous GABA release. The increase in mIPSC
327 frequency was comparable in presence of 2mM Mg²⁺ or in absence of Mg²⁺ showing low
328 sensitivity of this NMDAr to Mg²⁺ block. This is in agreement with the fact that presence of
329 GluN2C/D subunits reduces the voltage-sensitive Mg²⁺ block of NMDAr and therefore allows
330 an activation by endogenous glutamate even without depolarization to relieve the Mg²⁺ block
331 (Paoletti, 2011). These properties of NMDAr are well suited for a presynaptic NMDA function
332 because it may allow receptors to sense levels of ambient glutamate and to be activated in
333 absence of depolarization, and so under resting conditions. Inhibition may be thus finely

334 regulated according to the overall level of glutamate and so to the excitatory activity in the
335 network. (Bouvier et al., 2015).

336

337 **NMDA receptors localization.**

338 In the superficial laminae of the dorsal horn, NMDAr are present in virtually every excitatory
339 synapse and so expressed by every interneurons (Nagy et al., 2004). NMDAr have also been
340 immunocytochemically detected on presynaptic terminals of primary afferents (Liu et al., 1994;
341 Lu et al., 2003) where they regulate neurotransmitter release from the afferent terminals
342 (Bardoni, 2013). Presynaptic localization of NMDAr on GABAergic terminals is less
343 documented. Only one immunohistochemical study has reported that, NMDAr are present on
344 a subset of GABAergic terminals (37 %) in rat superficial dorsal horn (Lu et al., 2005) but the
345 role of these receptors has not been investigated so far.

346 In other regions of the CNS, such as Cerebellum, Neocortex, Prefrontal cortex and visual cortex
347 immunocytochemicals and functional studies have documented presynaptic NMDAr
348 expression involved in modulation of GABA release (Glitsch and Marty, 1999; Mathew and
349 Hablitz, 2011; Abrahamsson et al., 2017; Pafundo et al., 2018). Some of these studies reported
350 a differential regulation of evoked and spontaneous release by presynaptic NMDAr (Glitsch
351 and Marty, 1999; Abrahamsson et al., 2017) comparable with our results. Indeed, we showed
352 that NMDA increased the frequency of GABA mIPSCs but depressed evoked GABA IPSCs
353 recorded in lamina II neurons. Considering a presynaptic localization of NMDAr, NMDAr
354 activation could induce a calcium influx through the NMDAr channel, facilitate synaptic vesicle
355 exocytosis and spontaneous GABA release. The same presynaptic NMDAr could depress
356 evoked GABA release by decreasing the input resistance, shunting the propagation of incoming
357 action potential. Presynaptic NMDAr could also, by depolarizing the synaptic bouton,
358 inactivate Na⁺ channels and elevate the threshold for action potential firing. Both mechanisms

359 would result in an increased transmission failure and reduced the probability of evoked GABA
360 release. Finally, presynaptic NMDAr could act via distinct and independent pathways to
361 control evoked and spontaneous release separately, as recently shown in visual cortex
362 (Abrahamsson et al., 2017).

363 However, our results are indirect evidence of a presynaptic localization of NMDAr with
364 important limitations. We cannot exclude that NMDAr are expressed near the GABAergic
365 synapse and that NMDA act by an indirect effect implicating a second messenger. Indeed,
366 postsynaptic NMDAr activation could be the source of calcium needed to trigger and/or release
367 of a retrograde message such as NO. NO for example would act retrogradely on the presynaptic
368 site and facilitate GABA release. Such a mechanism has been reported in the dorsal horn where
369 NO release is triggered by metabotropic glutamate receptors mGluR1 and induces a
370 heterosynaptic LTP of GABAergic synapses (Fenselau et al., 2011). Interestingly, in the dorsal
371 horn, NO synthase is expressed in 17% of GABAergic interneurons (Boyle et al., 2017) and we
372 found that NMDAr-dependent modulation of GABAergic transmission preferentially targets
373 inputs to GABAergic neurons. However this mechanism could only explain the facilitatory
374 effect observed on spontaneous transmission but not the depression of evoked IPSCs.

375 Finally, recent investigations have shown that functional NMDAr are present on astrocytes
376 (Ziak et al., 1998; Lalo et al., 2006; Palygin et al., 2011), and activation of these astroglial
377 NMDAr is involved in neuron-to-glia communication, and in the modulation of synaptic
378 inhibition (Lalo et al., 2006; Lalo et al., 2014)

379 Such receptors could be involved in our results but once again could not completely explain
380 the differential modulation of spontaneous and evoked GABA release.

381 However implication of different NMDAr with different localization can drive bidirectional
382 plasticities of GABAergic synapse (Mapelli et al., 2016) and so could explain the differential
383 regulation of GABAergic transmission that we observed.

384 In our experiments, the frequency of glycinergic mIPSCs was unaffected, indicating that
385 presynaptic NMDAr were exclusively located at GABAergic nerve terminals and specifically
386 control spontaneous synaptic transmission at GABAergic inputs. These results are in
387 accordance with recent study by Kloc and collaborator who showed that NMDAr activation
388 induce LTP of glycinergic synapse that depends upon an increase in number and/or function of
389 GlyRs but is independent of glycine release. (Kloc et al., 2019).

390 Physiologically, glutamate required to activate NMDAr responsible of GABAergic synapse
391 modulation may originate from neighboring excitatory synapses. Then, NMDAr activation
392 depends on glutamate diffusing from neighboring synapses as previously described in
393 cerebellum (Huang and Bordey, 2004; Duguid and Smart, 2009). In dorsal horn networks
394 ambient levels of glutamate are tightly regulated by glutamate transporters. These transporters,
395 (mainly expressed by glial cells) have a crucial role in limiting glutamate diffusion and crosstalk
396 between neighboring synapses. Our results showed that even in absence of action potentials in
397 the network, blocking glutamate transporters is sufficient to increase extracellular glutamate
398 levels and induce NMDAr-dependent modulation of GABA release. In pathological states such
399 as neuropathic pain induced by a nerve injury, disruption of glutamate homeostasis in the DH
400 lead to an increase in extracellular levels of glutamate and subsequent spillover (Inquimbert et
401 al., 2012). The modulation of GABAergic synaptic transmission by NMDAr we described in
402 this study could be one new spinal mechanism involved in neuropathic pain.

403

404 Altogether our results strongly suggest that glutamate directly activates NR2C/D containing
405 NMDAr which differentially regulate GABA release. This crosstalk between excitation and
406 inhibition could control the excitatory/inhibitory balance in the spinal neuronal network. It will
407 be critical in future work to clarify the localization of NMDAr involved in the regulation of

408 GABAergic transmission targeting GABAergic neurons and understand the role in spinal
409 network processing of nociceptive information.

410

411 REFERENCES

- 412 Abrahamsson T, Chou CYC, Li SY, Mancino A, Costa RP, Brock JA, Nuro E, Buchanan KA,
413 Elgar D, Blackman AV, Tudor-Jones A, Oyrer J, Farmer WT, Murai KK, Sjostrom PJ
414 (2017) Differential Regulation of Evoked and Spontaneous Release by Presynaptic
415 NMDA Receptors. *Neuron* 96:839-855 e835.
- 416 Bardoni R (2013) Role of presynaptic glutamate receptors in pain transmission at the spinal
417 cord level. *Curr Neuropharmacol* 11:477-483.
- 418 Beyer C, Roberts LA, Komisaruk BR (1985) Hyperalgesia induced by altered glycinergic
419 activity at the spinal cord. *Life Sci* 37:875-882.
- 420 Bouvier G, Bidoret C, Casado M, Paoletti P (2015) Presynaptic NMDA receptors: Roles and
421 rules. *Neuroscience* 311:322-340.
- 422 Boyle KA, Gutierrez-Mecinas M, Polgar E, Mooney N, O'Connor E, Furuta T, Watanabe M,
423 Todd AJ (2017) A quantitative study of neurochemically defined populations of
424 inhibitory interneurons in the superficial dorsal horn of the mouse spinal cord.
425 *Neuroscience* 363:120-133.
- 426 Cordero-Erausquin M, Inquimbert P, Schlichter R, Hugel S (2016) Neuronal networks and
427 nociceptive processing in the dorsal horn of the spinal cord. *Neuroscience* 338:230-247.
- 428 Coull JA, Boudreau D, Bachand K, Prescott SA, Nault F, Sik A, De Koninck P, De Koninck Y
429 (2003) Trans-synaptic shift in anion gradient in spinal lamina I neurons as a mechanism
430 of neuropathic pain. *Nature* 424:938-942.

431 Crabtree JW, Lodge D, Bashir ZI, Isaac JT (2013) GABAA , NMDA and mGlu2 receptors
432 tonically regulate inhibition and excitation in the thalamic reticular nucleus. *Eur J*
433 *Neurosci* 37:850-859.

434 Cui L, Kim YR, Kim HY, Lee SC, Shin HS, Szabo G, Erdelyi F, Kim J, Kim SJ (2011)
435 Modulation of synaptic transmission from primary afferents to spinal substantia
436 gelatinosa neurons by group III mGluRs in GAD65-EGFP transgenic mice. *J*
437 *Neurophysiol* 105:1102-1111.

438 Duguid IC, Smart TG (2004) Retrograde activation of presynaptic NMDA receptors enhances
439 GABA release at cerebellar interneuron-Purkinje cell synapses. *Nat Neurosci* 7:525-
440 533.

441 Duguid IC, Smart TG (2009) Presynaptic NMDA Receptors. In: *Biology of the NMDA*
442 *Receptor* (Van Dongen AM, ed). Boca Raton (FL).

443 Fenselau H, Heinke B, Sandkuhler J (2011) Heterosynaptic long-term potentiation at
444 GABAergic synapses of spinal lamina I neurons. *J Neurosci* 31:17383-17391.

445 Glitsch M, Marty A (1999) Presynaptic effects of NMDA in cerebellar Purkinje cells and
446 interneurons. *J Neurosci* 19:511-519.

447 Harvey RJ, Depner UB, Wassle H, Ahmadi S, Heindl C, Reinold H, Smart TG, Harvey K,
448 Schutz B, Abo-Salem OM, Zimmer A, Poisbeau P, Welzl H, Wolfer DP, Betz H,
449 Zeilhofer HU, Muller U (2004) GlyR alpha3: an essential target for spinal PGE2-
450 mediated inflammatory pain sensitization. *Science* 304:884-887.

451 Huang H, Bordey A (2004) Glial glutamate transporters limit spillover activation of presynaptic
452 NMDA receptors and influence synaptic inhibition of Purkinje neurons. *J Neurosci*
453 24:5659-5669.

454 Inquimbert P, Bartels K, Babaniyi OB, Barrett LB, Tegeder I, Scholz J (2012) Peripheral nerve
455 injury produces a sustained shift in the balance between glutamate release and uptake
456 in the dorsal horn of the spinal cord. *Pain* 153:2422-2431.

457 Kloc ML, Pradier B, Chirila AM, Kauer JA (2019) NMDA receptor activation induces long-
458 term potentiation of glycine synapses. *PLoS One* 14:e0222066.

459 Kullmann DM, Moreau AW, Bakiri Y, Nicholson E (2012) Plasticity of inhibition. *Neuron*
460 75:951-962.

461 Lalo U, Rasooli-Nejad S, Pankratov Y (2014) Exocytosis of gliotransmitters from cortical
462 astrocytes: implications for synaptic plasticity and aging. *Biochem Soc Trans* 42:1275-
463 1281.

464 Lalo U, Pankratov Y, Kirchhoff F, North RA, Verkhratsky A (2006) NMDA receptors mediate
465 neuron-to-glia signaling in mouse cortical astrocytes. *J Neurosci* 26:2673-2683.

466 Latremoliere A, Woolf CJ (2009) Central sensitization: a generator of pain hypersensitivity by
467 central neural plasticity. *J Pain* 10:895-926.

468 Liu H, Mantyh PW, Basbaum AI (1997) NMDA-receptor regulation of substance P release
469 from primary afferent nociceptors. *Nature* 386:721-724.

470 Liu H, Wang H, Sheng M, Jan LY, Jan YN, Basbaum AI (1994) Evidence for presynaptic N-
471 methyl-D-aspartate autoreceptors in the spinal cord dorsal horn. *Proc Natl Acad Sci U*
472 *S A* 91:8383-8387.

473 Lu CR, Hwang SJ, Phend KD, Rustioni A, Valtschanoff JG (2003) Primary afferent terminals
474 that express presynaptic NR1 in rats are mainly from myelinated, mechanosensitive
475 fibers. *J Comp Neurol* 460:191-202.

476 Lu CR, Willcockson HH, Phend KD, Lucifora S, Darstein M, Valtschanoff JG, Rustioni A
477 (2005) Ionotropic glutamate receptors are expressed in GABAergic terminals in the rat
478 superficial dorsal horn. *J Comp Neurol* 486:169-178.

479 Mapelli J, Gandolfi D, Vilella A, Zoli M, Bigiani A (2016) Heterosynaptic GABAergic
480 plasticity bidirectionally driven by the activity of pre- and postsynaptic NMDA
481 receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 113:9898-9903.

482 Mathew SS, Hablitz JJ (2011) Presynaptic NMDA receptors mediate IPSC potentiation at
483 GABAergic synapses in developing rat neocortex. *PLoS One* 6:e17311.

484 Nagy GG, Watanabe M, Fukaya M, Todd AJ (2004) Synaptic distribution of the NR1, NR2A
485 and NR2B subunits of the N-methyl-d-aspartate receptor in the rat lumbar spinal cord
486 revealed with an antigen-unmasking technique. *Eur J Neurosci* 20:3301-3312.

487 Nugent FS, Penick EC, Kauer JA (2007) Opioids block long-term potentiation of inhibitory
488 synapses. *Nature* 446:1086-1090.

489 Pafundo DE, Miyamae T, Lewis DA, Gonzalez-Burgos G (2018) Presynaptic Effects of N-
490 Methyl-D-Aspartate Receptors Enhance Parvalbumin Cell-Mediated Inhibition of
491 Pyramidal Cells in Mouse Prefrontal Cortex. *Biol Psychiatry* 84:460-470.

492 Palygin O, Lalo U, Pankratov Y (2011) Distinct pharmacological and functional properties of
493 NMDA receptors in mouse cortical astrocytes. *Br J Pharmacol* 163:1755-1766.

494 Paoletti P (2011) Molecular basis of NMDA receptor functional diversity. *Eur J Neurosci*
495 33:1351-1365.

496 Roberts LA, Beyer C, Komisaruk BR (1986) Nociceptive responses to altered GABAergic
497 activity at the spinal cord. *Life Sci* 39:1667-1674.

498 Sandkuhler J (2007) Understanding LTP in pain pathways. *Mol Pain* 3:9.

499 Shiokawa H, Kaftan EJ, MacDermott AB, Tong CK (2010) NR2 subunits and NMDA receptors
500 on lamina II inhibitory and excitatory interneurons of the mouse dorsal horn. *Mol Pain*
501 6:26.

502 Sivilotti L, Woolf CJ (1994) The contribution of GABAA and glycine receptors to central
503 sensitization: disinhibition and touch-evoked allodynia in the spinal cord. *J*
504 *Neurophysiol* 72:169-179.

505 Torsney C, MacDermott AB (2006) Disinhibition opens the gate to pathological pain signaling
506 in superficial neurokinin 1 receptor-expressing neurons in rat spinal cord. *J Neurosci*
507 26:1833-1843.

508 Woolf CJ, Thompson SW (1991) The induction and maintenance of central sensitization is
509 dependent on N-methyl-D-aspartic acid receptor activation; implications for the
510 treatment of post-injury pain hypersensitivity states. *Pain* 44:293-299.

511 Woolf CJ, Salter MW (2000) Neuronal plasticity: increasing the gain in pain. *Science*
512 288:1765-1769.

513 Ziak D, Chvatal A, Sykova E (1998) Glutamate-, kainate- and NMDA-evoked membrane
514 currents in identified glial cells in rat spinal cord slice. *Physiol Res* 47:365-375.

515

516

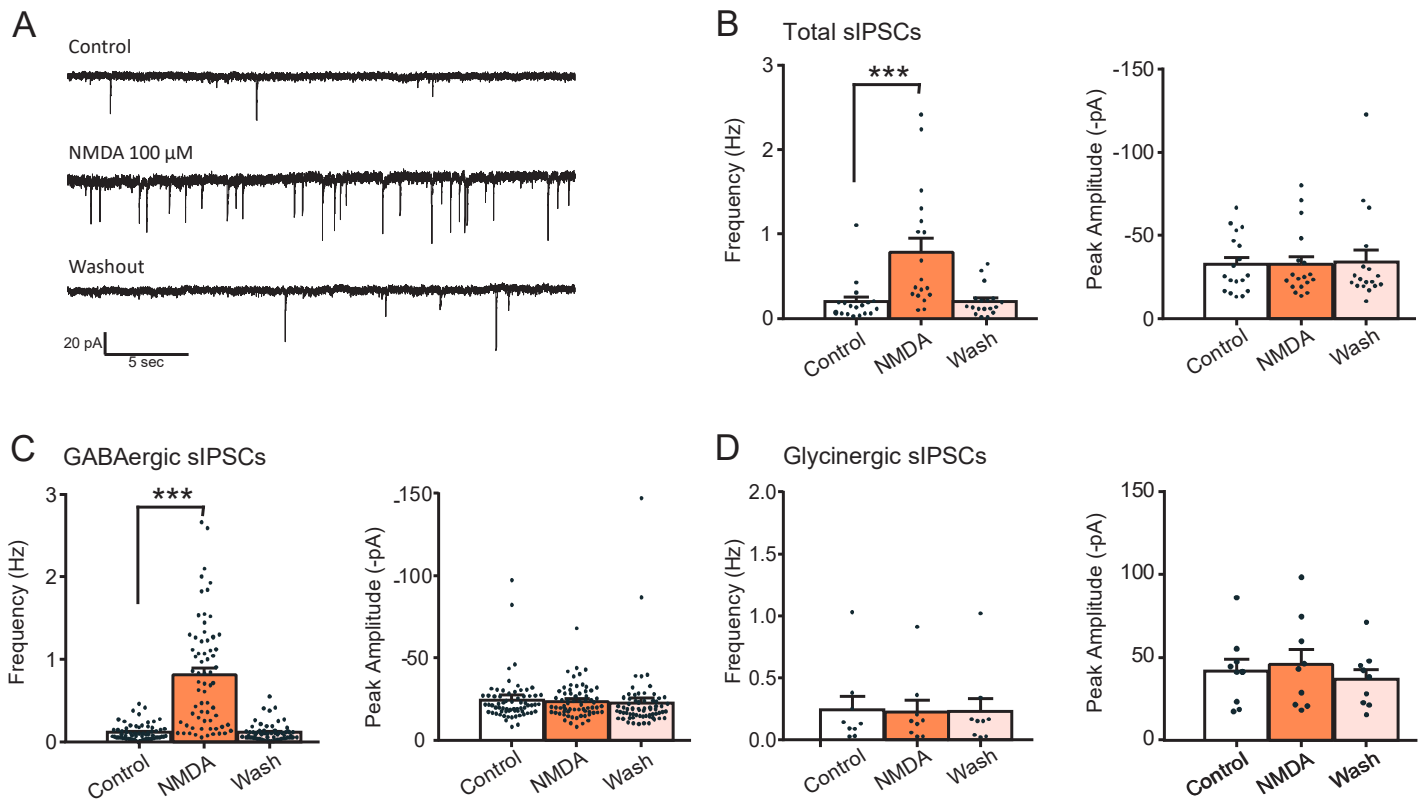


Figure 1. NMDA increases GABA sIPSC frequency in lamina II neurons.

A. Representative traces of total sIPSCs recorded from lamina II neuron in spinal cord slice from C57Bl6 mouse before (Control) and during NMDA application (NMDA) and after a washout (wash).

B. Bar graph showing total sIPSC frequency and peak amplitude before (Control) and during NMDA application (NMDA) and after a washout (wash) (N=18). NMDA application resulted in a reversible increase in sIPSC frequency without change in sIPSC amplitude.

C-D. Frequency and peak amplitude of GABAergic sIPSCs (C) and glycinergic sIPSCs (D) isolated pharmacologically. NMDA application enhances GABAergic sIPSC (recorded in presence of strychnine) frequency (N=67) but did not affect glycinergic sIPSCs, recorded in presence of bicuculline (D) (N=9).

*** p<0.001. Paired t-test was used. Error bars indicate SEM.

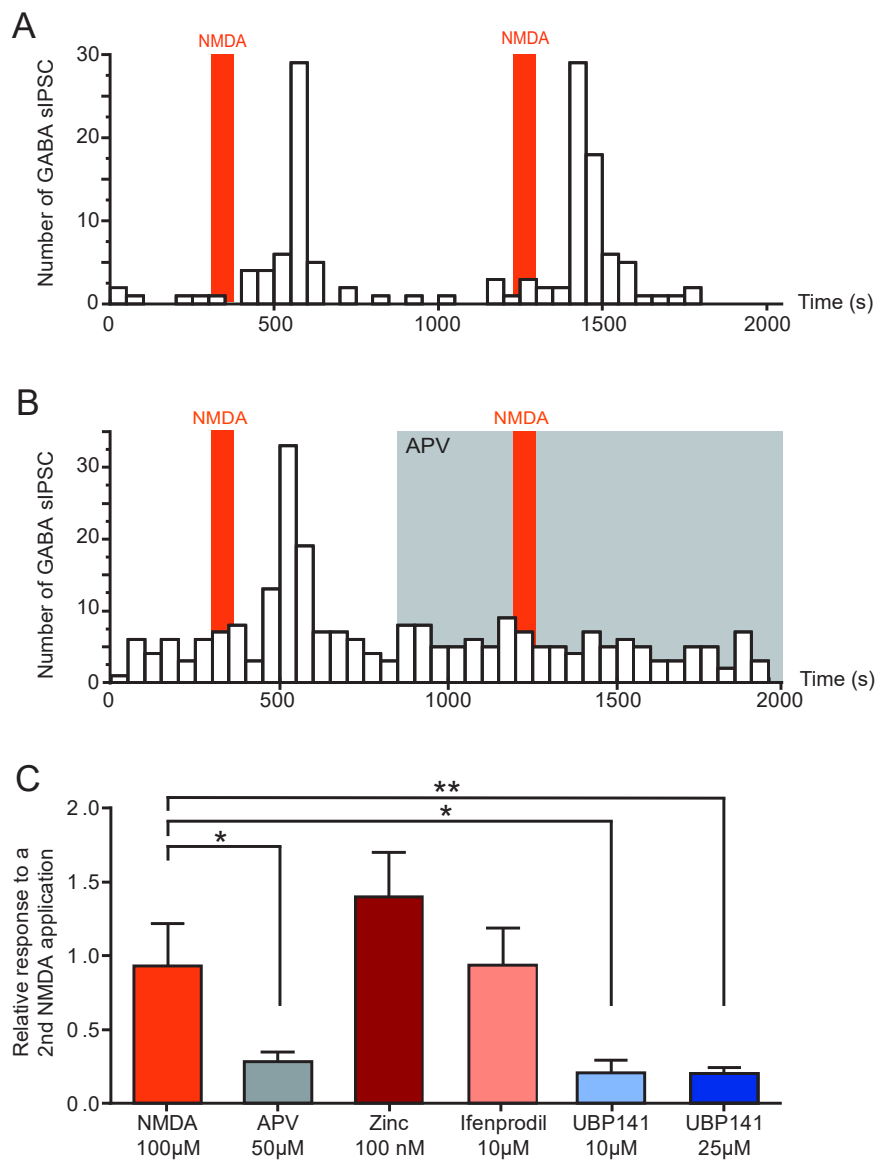


Figure 2. Activation of GluN 2C/D containing NMDA receptors induces increase of spontaneous GABAergic transmission.

A-B. Example of the effect of 2 successive NMDA applications on the number of GABAergic sIPSCs (50sec bin). NMDA effect is reproducible (A) and completely blocked in presence of APV (50 μM) (B).

C. Effect of a second application of NMDA in presence of different NMDAR selective antagonists. Histogram showing the effect of a second NMDA application normalized to a first application performed in absence of antagonists. NMDA-induced increase in GABA sIPSC frequency was inhibited in presence of APV (50 μM, N=8) and UBP 141 (10 μM, N = 4; 25 μM, N = 9). Presence of Zinc (100nM, N = 4) or Ifenprodil (10 μM, N = 8) did not affect NMDA effect.

* $p < 0.05$ and ** $p < 0.01$. Mann-Whitney test was used. Error bars indicate SEM.

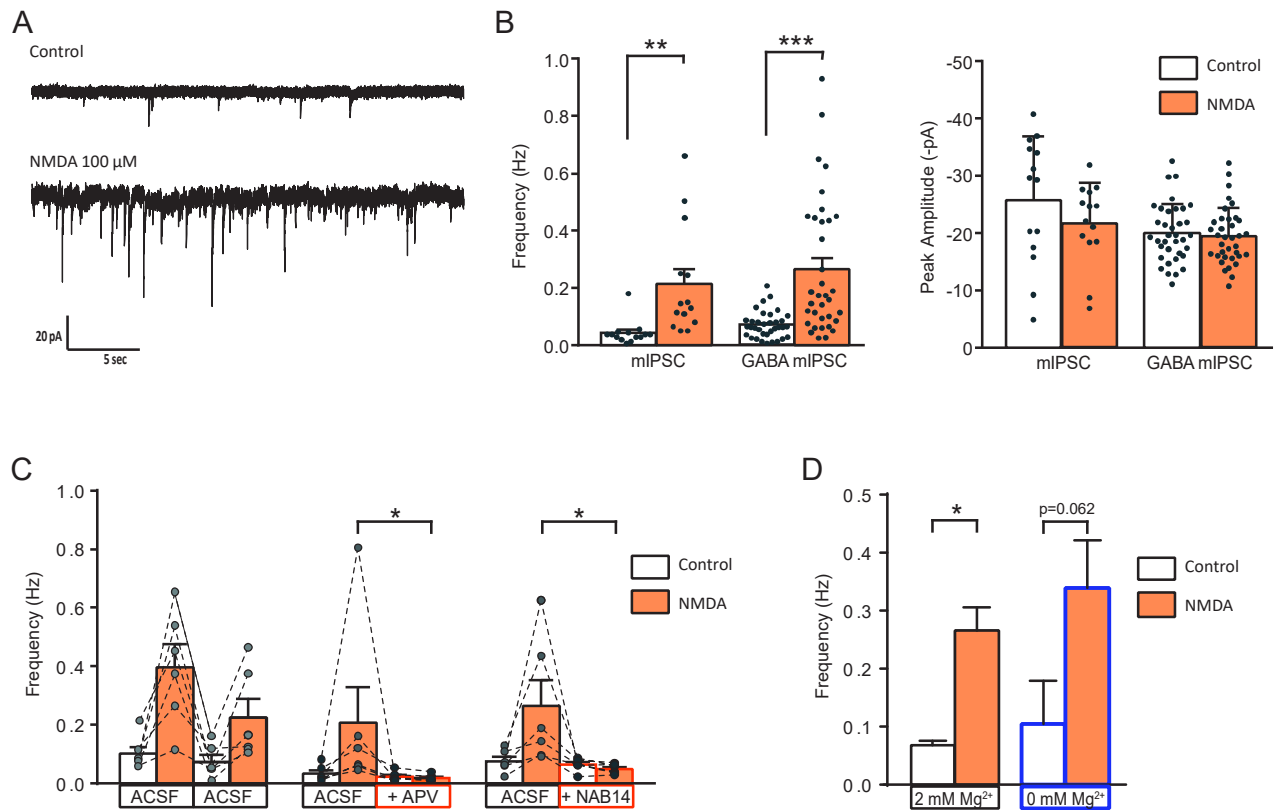


Figure 3. Activation of GluN2C/D containing NMDA receptor increase miniature GABAergic mIPSCs.

A. Representative traces of mIPSCs recorded from a lamina II neuron in spinal cord slice from C57B16 mouse before (Control) and during NMDA application (NMDA).

B. Bar graph showing total mIPSC (N = 14) and GABA mIPSC (N = 36) frequency and peak amplitude before (Control) and during NMDA application (NMDA).

C. Effect of APV (50 μ M, N = 6) and NAB 14 (10 μ M, N = 5) on NMDA-induced increase in GABA mIPSC frequency. Both antagonists blocked effect of NMDA application.

D. NMDA-induced increase in GABA mIPSC frequency in presence (2mM Mg^{2+} , N= 36) or in absence of external Mg^{2+} (0 mM Mg^{2+} , N = 5) is comparable.

* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$. Paired t-test (A), Mann-Whitney test (B) and Wilcoxon test (C) were used. Error bars indicate SEM.

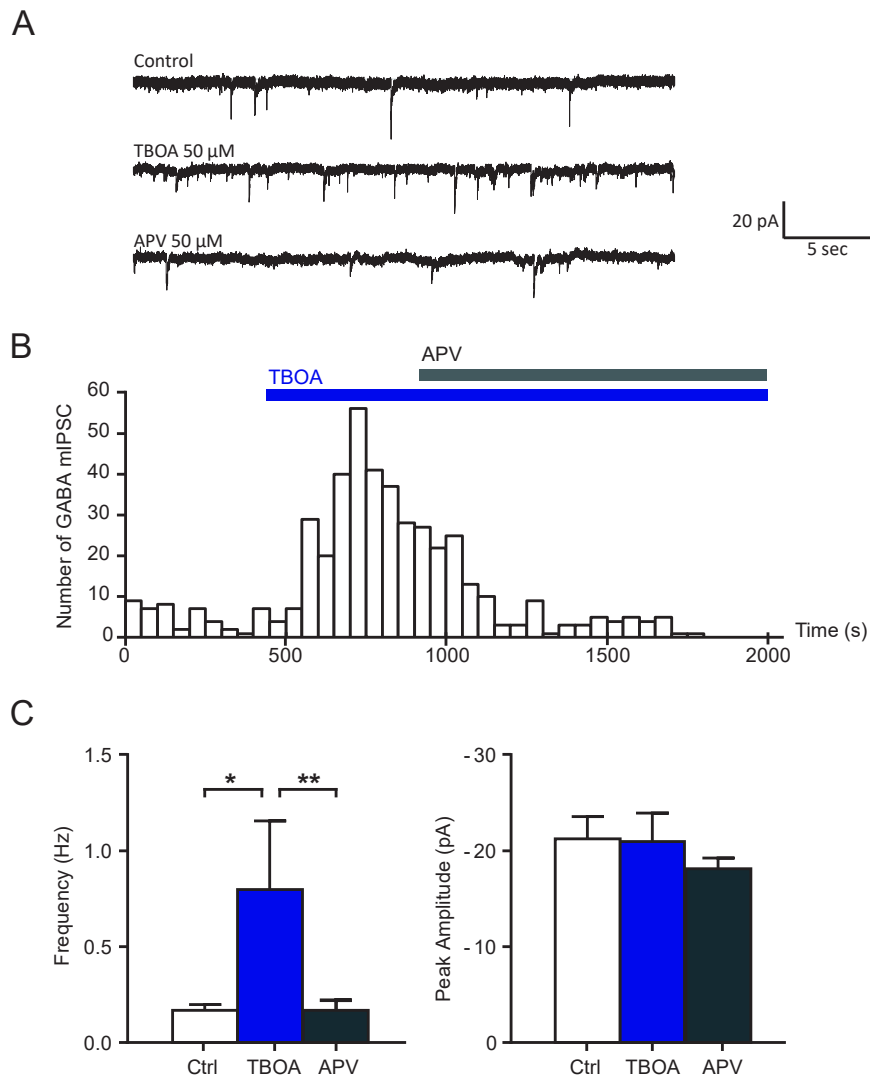


Figure 4. Inhibition of glutamate transporter increase GABA mIPSC frequency.

A. Representative traces of GABA mIPSC before (Control) and during TBOA (50 μ M) application (NMDA), and in presence of TBOA plus APV (50 μ M).

B. Histogram showing number of GABA mIPSC as a function of the recording time in a representative recorded neuron.

C. Frequency and peak amplitude of GABAergic mIPSCs (N = 7). TBOA increased GABA mIPSC frequency but did not alter their amplitude. TBOA effect is blocked by APV application.

* $p < 0.05$ and ** $p < 0.01$. Paired t-test was used. Error bars indicate SEM.

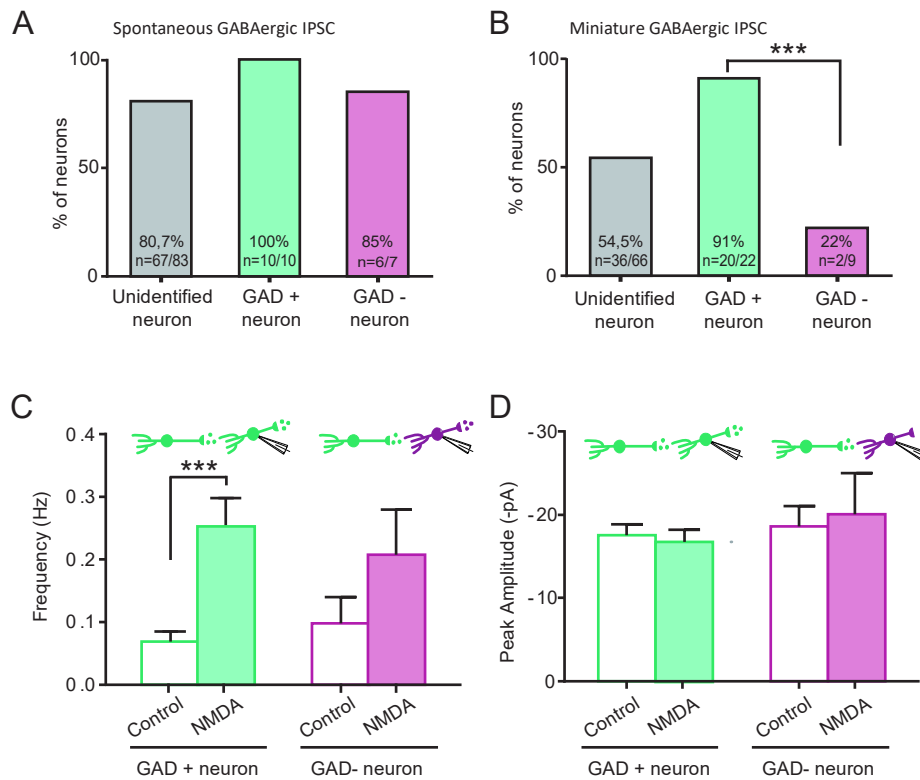


Figure 5. NMDA enhancement of mIPSC frequency target specifically GABAergic interneurons

A. proportion of recorded neurons showing an increase of GABA sIPCS frequency by NMDA application, in unidentified neurons from C57bl6 mice and GAD positive (GAD+) or GAD negative (GAD-) neurons from GAD65-eGFP mice.

B proportion of recorded neurons recorded showing an increase of GABA mIPCS frequency by NMDA application is significantly higher in GAD positive (GAD+) neurons than for GAD negative (GAD-).

C-D Frequency (C) and peak amplitude (D) of GABAergic mIPSCs recorded in GAD+ and GAD- neurons from GAD65-eGFP mice. Effect of NMDA on mIPSC frequency is independent of the neuron type.

*** $p < 0.001$. Fischer's exact test (B) and Paired t-test (C) were used. Error bars indicate SEM.

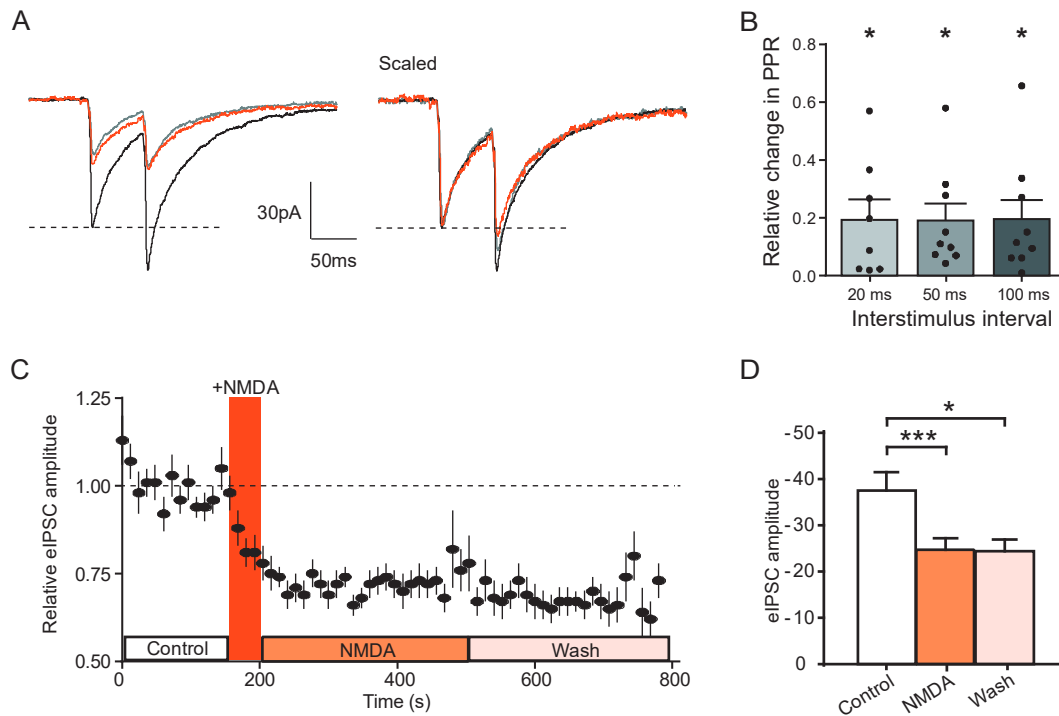


Figure 6. NMDA inhibits evoked IPSCs in GAD positive neurons.

A. Average of 10 traces representing the response to two successive stimulations separated by 50 ms before (black, control) and during NMDA application (orange, NMDA) and after a washout (grey, wash).

B. histograms showing the relative change in PPR measured in GAD positive cells, for 3 different paired stimulation interval: 20 ms (N = 8), 50 ms (N =9) and 100 ms (N=9).

C Time course of normalized GABAergic eIPSC amplitude before and after NMDA application (N = 17).

D. Histogram showing average eIPSC amplitude before (control) NMDA application, after NMDA application (NMDA) and after a washout (wash) (N = 17)

* $p < 0.05$ and *** $p < 0.001$. One sample t-test (B) and paired t-test (D) were used. Error bars indicate SEM.

Résultat partie II

Rôle des cellules gliales dans la transmission GABAergique basale et dans la facilitation de la transmission GABAergique induite par l'activation des récepteurs NMDA

Contexte de l'étude :

Dans le SNC, les cellules gliales expriment une grande diversité de récepteurs pour des neurotransmetteurs et des neuromodulateurs (Watkins et al., 2005; Verkhratsky et Nedergaard, 2018). Cela leur permet de recevoir des informations des synapses environnantes et de moduler en retour la transmission synaptique glutamatergique et GABAergique. Cela est possible en partie par la libération de gliotransmetteurs tels que le glutamate, la D-sérine, l'ATP ou le GABA (Kang et al., 1998; Panatier et al., 2006; Bazargani et Attwell, 2016; Verkhratsky et Chvátal, 2019).

Dans le SNC, l'expression des récepteurs NMDA est montrée sur des astrocytes corticaux en culture où il est retrouvé des ARNm codant pour la sous-unité GluN1 (Zhou et al., 2010). Il est de plus montré que ces récepteurs NMDA sont fonctionnels et sont moins sensibles au blocage par le Mg^{2+} (Lalo et al., 2006; Verkhratsky et Chvátal, 2019).

Dans la ME, assez peu d'études indiquent l'existence de récepteurs NMDA ayant une localisation gliale. Des données électrophysiologiques indiquent cependant l'expression de récepteurs NMDA par les astrocytes, oligodendrocytes et cellules précurseurs de ces cellules chez le jeune rat (P5-P13). En effet, l'application de NMDA sur ces cellules induit un courant entrant de charges positives non affecté par les antagonistes des récepteurs AMPA et Kainate (Ziak et al., 1998). Ces récepteurs sont peu sensibles au Mg^{2+} , ce qui est cohérent avec les données obtenues sur des astrocytes corticaux en culture montrant une expression des sous unités GluN2C/D ou GluN3 (Palygin et al., 2010).

Des résultats préliminaires obtenus au sein de l'équipe, par la technique du patch clamp en condition outside-out sur des cultures de cellules gliales de la CD, tendent à montrer la présence de récepteurs NMDA fonctionnels. En effet, ces données préliminaires indiquent que l'application de NMDA induit l'ouverture d'un canal avec des conductances similaires à celle des récepteurs NMDA contenant des sous-unités GluN2C/D ou GluN3. De plus l'ouverture de ces canaux est bloquée par l'application d'AP5 (50 μ M) (n=2).

Ces raisons nous ont amené à étudier l'implication des cellules gliales dans l'effet facilitateur du NMDA sur la transmission synaptique GABAergique au sein de la lamina II. Pour cela nous avons

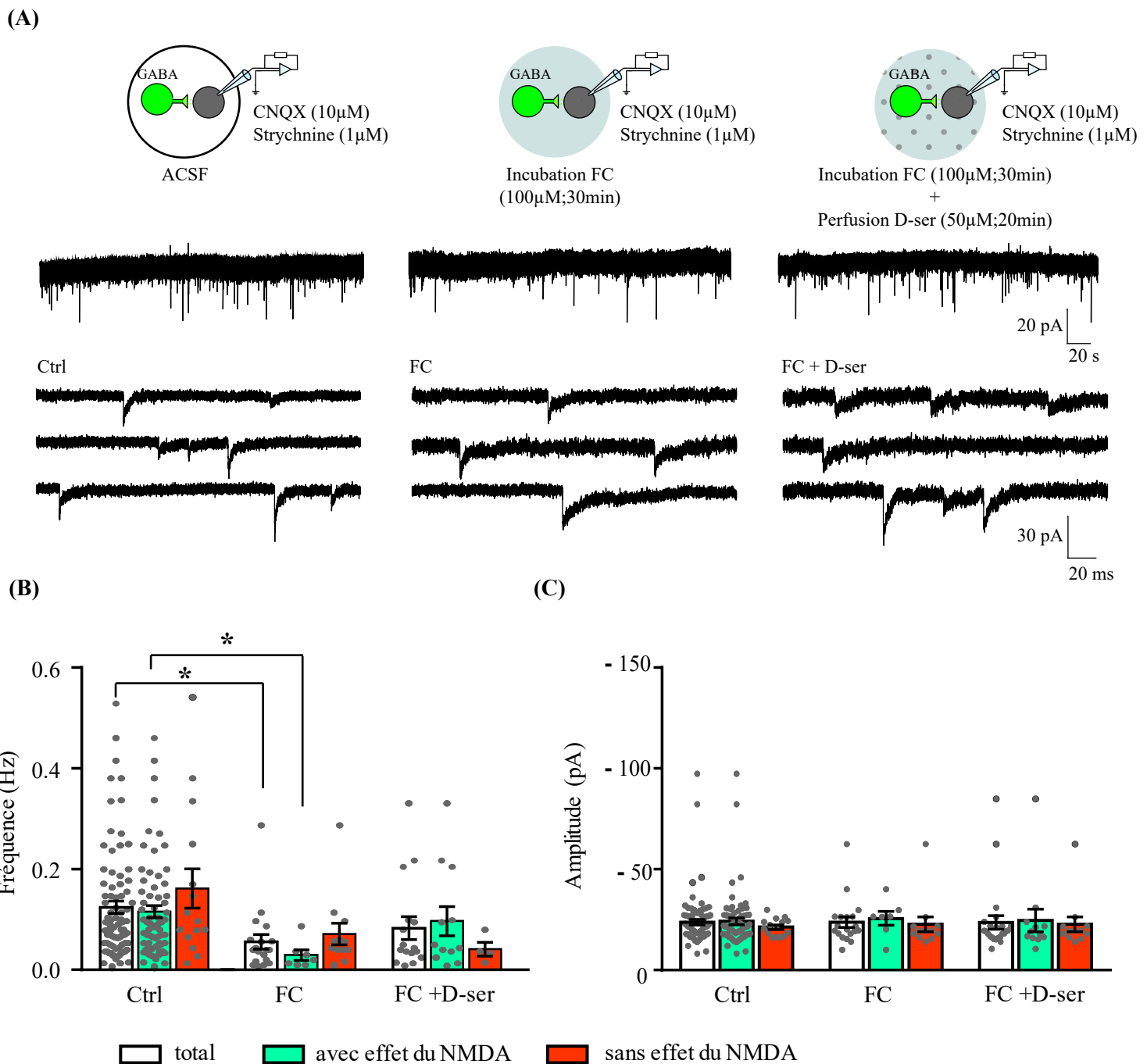


Figure 33 : Effet du fluorocitrate et de la D-sérine sur la transmission GABAergique spontanée de base.

(A) Haut : Des neurones non identifiés sont enregistrés en condition cellule-entière en présence de CNQX (10µM) et strychnine (1µM). Les tranches de ME du groupe contrôle n'ont pas reçu de traitement tandis que les tranches du groupe FC et FC+D-ser ont été incubées pendant 30minutes avec du FC à 100µM. Les tranches du groupe FC+D-ser ont de plus été perfusées avec de la D-sérine (50µM) pendant 20 minutes durant l'enregistrement. Bas : Exemple de traces représentatives des sCPSIs GABAergiques dans les différentes conditions. **(B-C)** Fréquence **(B)** et amplitude **(C)** des sCPSIs GABAergiques en condition contrôle (Ctrl), après incubation avec du fluorocitrate (FC) et suite à la perfusion de D-sérine (D-ser) sur la totalité des neurones et sur les neurones avec ou sans effet du NMDA sur la transmission synaptique GABAergique. Test de Student pour données appariées * $p < 0.05$.

bloqué la communication neurone-glie grâce à une gliotoxine, le fluorocitrate (FC). Nous avons choisi d'incuber les tranches de ME dans l'ACSF contenant du FC (100 μ M) pendant 30 minutes avant de commencer les enregistrements. Cette condition est notée FC. Des expériences complémentaires avec une perfusion en bain de D-sérine (100 μ M pendant 20 minutes) sur des tranches préalablement traitées au FC ont aussi été réalisées afin de déterminer si la D-sérine astrocytaire joue un rôle dans la modulation de la transmission GABAergique. Cette condition est notée FC+D-ser.

1) Effet du FC et de la D-sérine sur la transmission synaptique inhibitrice

GABAergique basal

Les expériences ont été réalisées en présence de CNQX (10 μ M) et strychnine (1 μ M) afin d'étudier l'effet du FC et de la D-sérine sur la transmission spontanée GABAergique. De la TTX (0.5 μ M) a été ajoutée au milieu extracellulaire dans certaines expériences pour étudier la transmission miniature. Les enregistrements ont été réalisés dans les mêmes conditions que précédemment (voir chapitre matériels et méthodes). Les résultats obtenus ont été comparés avec un groupe contrôle dans lequel les neurones n'ont pas subi de traitement pharmacologique. L'étude de l'effet du FC sur la transmission GABAergique basale a été réalisée sur une période de 5 minutes après 30 minutes d'incubation au FC pour la condition FC. L'effet de la perfusion de la D-sérine est évalué après 20 minutes de perfusion de D-sérine sur des tranches pré-incubées avec du FC pendant 30 minutes (Figure 33A).

1.1 Etude sur la transmission spontanée

Afin de déterminer l'effet du FC sur la transmission synaptique GABAergique, nous avons comparé les fréquences des sCPSIs GABAergiques des neurones non traités à ceux traités au FC (contrôle : 0.124 \pm 0.009 Hz, n=82 ; FC : 0.056 \pm 0.009 Hz, n=19 ; test de Student pour données non appariées, p=0.0102) (Figure 33B). Nous avons ainsi observé que l'incubation des tranches avec le FC diminue significativement la fréquence d'apparition des sCPSIs GABAergiques.

Nous avons ensuite analysé l'effet du FC sur le sous-groupe de neurones où un effet du NMDA est observé et sur le sous-groupe où aucun effet du NMDA n'est observé. Ces analyses ont été réalisées dans le but de mettre en évidence une éventuelle régulation spécifique de la transmission synaptique GABAergique par les cellules gliales. Dans le sous-groupe de neurones où le NMDA induit un effet, les résultats obtenus indiquent que le FC diminue significativement la fréquence d'apparition des sCPSIs GABAergiques (contrôle : 0.116 \pm 0.009 Hz, n=67 ; FC : 0.029 \pm 0.007, n=7 ; test de Student pour données non appariées, p=0.024) (Figure 33B). Dans le sous-groupe de neurones où aucun effet du NMDA n'est observé, les résultats indiquent une tendance à la diminution, non significative, de la

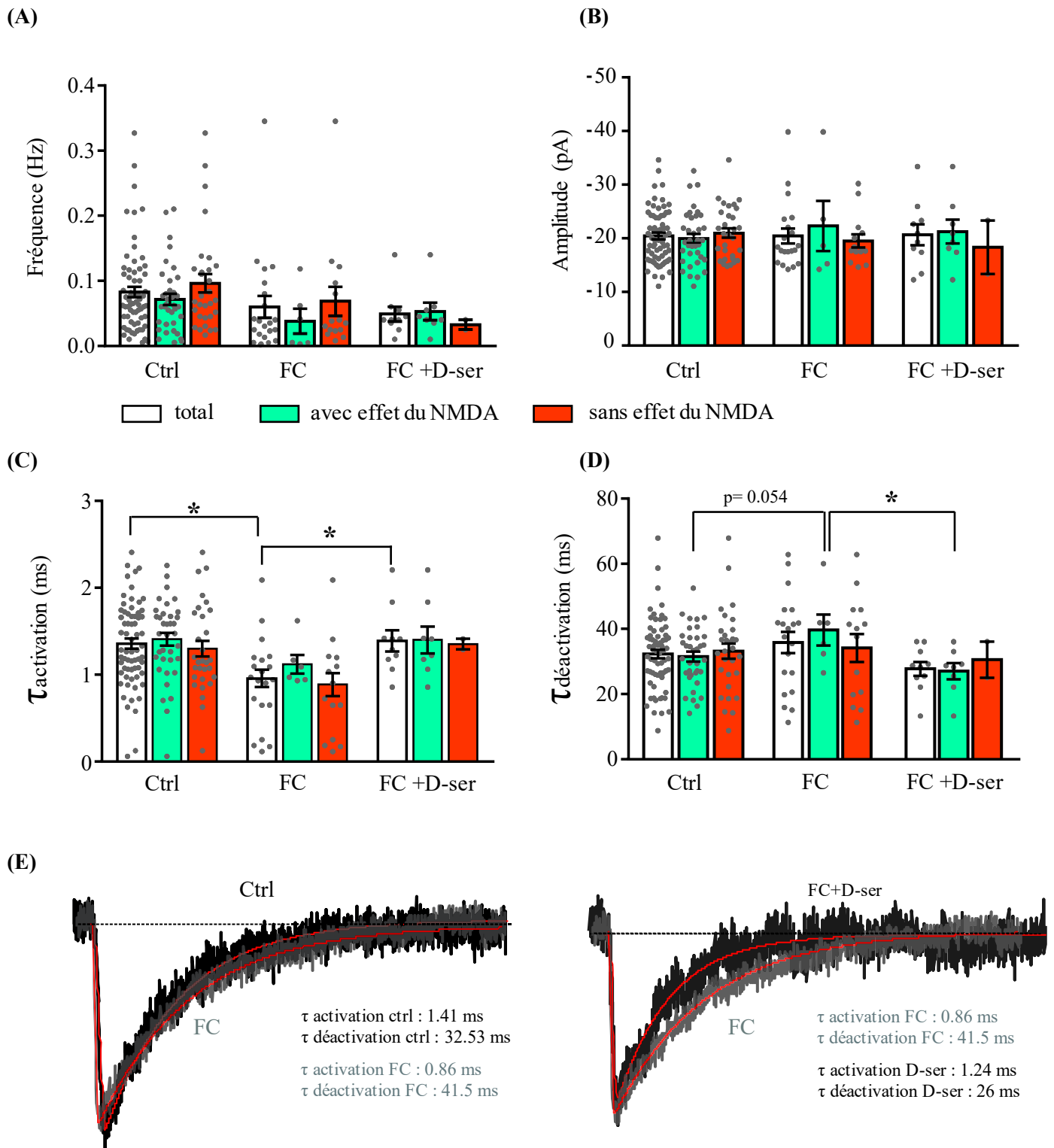


Figure 34 : Effet du fluorocitrate et de la D-sérine sur la transmission GABAergique miniature de base.

Effet du FC et de la D-sérine sur la fréquence (A), l'amplitude (B), le τ activation (C) et le τ désactivation (D) des mCPSIs GABAergiques de la totalité des neurones et sur les neurones avec ou sans effet du NMDA. On note que le traitement au FC et à la D-sérine modifie les cinétiques des événements GABAergiques miniatures. Test de Student pour données appariées * $p < 0.05$.

(E) Gauche : traces moyennes obtenues à partir de 10 traces individuelles d'événements GABAergiques miniatures en condition contrôle (noir) et FC (gris). Droite : traces moyennes obtenues à partir de 10 traces individuelles d'événements GABAergiques miniature en condition FC (gris) et FC+D-sér (gris foncé). Test de Student pour données appariées * $p < 0.05$.

fréquence d'apparition des sCPSIs GABAergiques après l'incubation des tranches avec le FC (contrôle : 0.161 ± 0.03 Hz, $n=15$; FC : 0.071 ± 0.01 , $n=12$; test de Student pour données non appariées, $p=0.071$) (Figure 33B). Enfin, l'effet du FC sur l'amplitude des sCPSIs GABAergiques a été évalué et aucun changement n'a été observé (Figure 33C) (Tableau 6). Ces résultats suggèrent que le traitement au FC, qui bloque le métabolisme des cellules gliales, diminue la libération de GABA au sein du réseau de la lamina II.

Pour déterminer le rôle de la D-sérine dans la modulation de la transmission synaptique GABAergique, nous avons perfusé de la D-sérine ($50\mu\text{M}$; 20min) sur des tranches prétraitées au FC. Nous avons noté que la perfusion de D-sérine ne change pas la fréquence de base des sCPSIs GABAergiques (Tableau 6) (Figure 33B). Il est intéressant de remarquer qu'il n'y a pas de différence significative de la fréquence des sCPSIs GABAergiques entre le groupe contrôle et le groupe FC+D-ser (contrôle sur l'ensemble des neurones : 0.124 ± 0.009 Hz, $n=82$; FC+D-ser sur l'ensemble des neurones : 0.083 ± 0.017 , $n=16$; test de Student pour données non appariées, $p=0.16$) (Figure 33B). Ce résultat peut signifier une récupération de la fréquence de base des sCPSIs GABAergiques lorsque la D-sérine est perfusée. Enfin l'effet de la D-sérine sur l'amplitude des sCPSIs GABAergiques a été évalué et aucun changement n'a été observé (Figure 33C) (Tableau 6).

1.2 Etude sur la transmission miniature

Nous avons réalisé les mêmes expériences en présence de TTX ($0.5\mu\text{M}$) afin de s'affranchir de l'activité de décharge de potentiels d'actions dans le réseau neuronal et d'évaluer l'effet du FC et de la D-sérine sur la synapse GABAergique. Aucun changement significatif de la fréquence d'apparition et de l'amplitude des mCPSIs GABAergiques n'a été observé (Tableau 6) (Figure 34A et B). On note toutefois une tendance à la diminution de la fréquence d'apparition des mCPSIs GABAergiques sur le sous-groupe de neurone où le NMDA induit un effet (contrôle : 0.072 ± 0.006 Hz, $n=36$; FC : 0.053 ± 0.019 $n=8$; test de Student pour données non appariées $p=0.14$) (Figure 34A).

Effet du FC et de la D-ser sur les cinétiques des mCPSIs GABAergiques

Nous avons analysé l'effet du FC sur les cinétiques d'activation (τ activation) des mCPSIs GABAergiques (contrôle : 1.36 ± 0.048 ms, $n=66$; FC : 0.958 ± 0.074 ms, $n=20$; test de Student pour données non appariées, $p=0.011$). Les résultats montrent que l'incubation au FC diminue le τ activation des mCPSIs GABAergiques. L'effet de la D-sérine a ensuite été évalué sur les tranches pré-incubées avec du FC et comparé à la condition contrôle (contrôle : 1.36 ± 0.048 ms, $n=66$; FC+D-ser : 1.39 ± 0.08 , $n=10$; test de Student pour données non appariées, $p=0.84$) (Figure 34C et E). On constate que la perfusion de D-sérine restaure un τ activation des mCPSIs GABAergiques similaire à celui obtenu en condition contrôle.

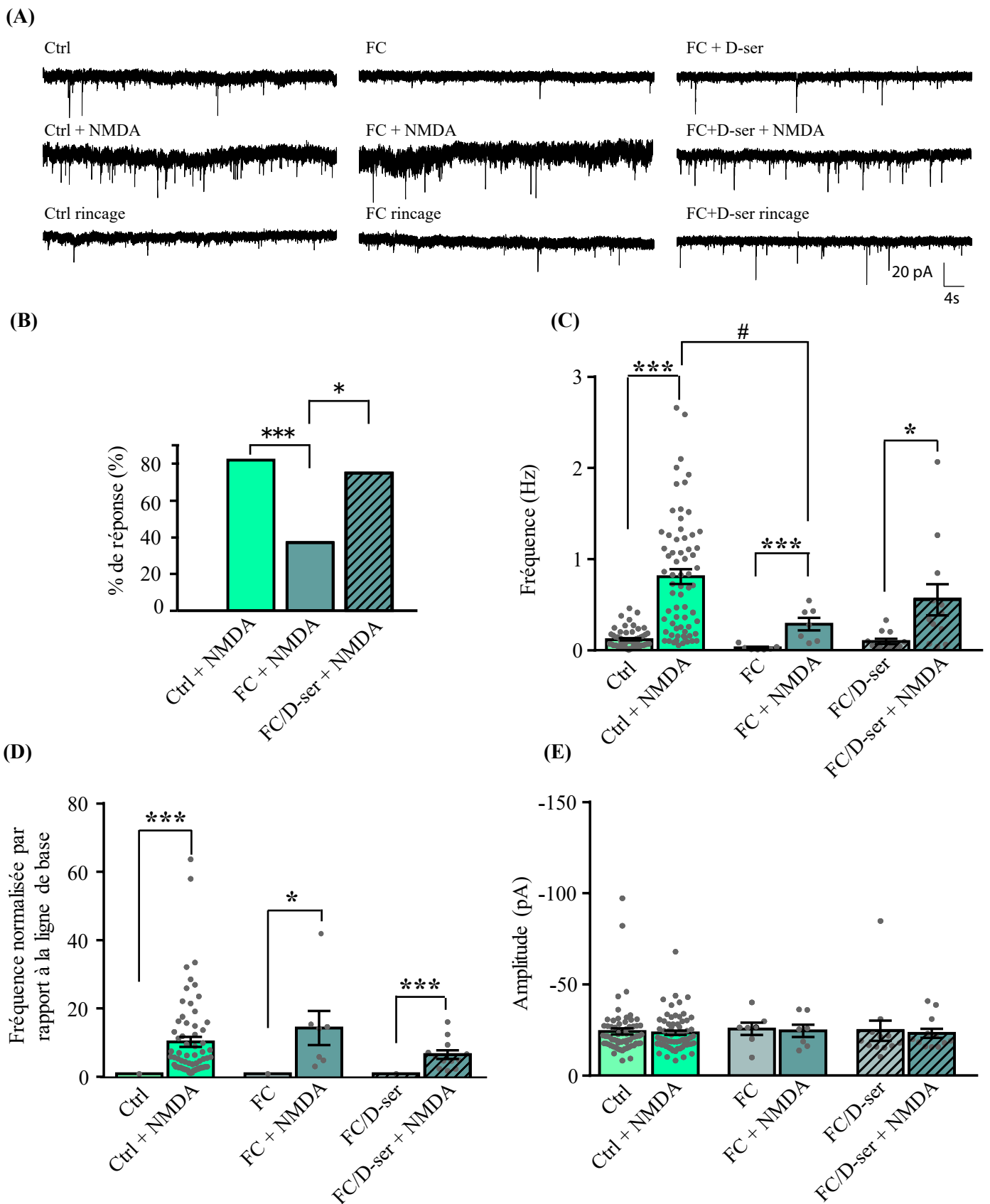


Figure 35 : Effet de l'application de NMDA sur la transmission GABAergique spontanée après incubation des tranches avec du FC (100 μ M ; 30min) et perfusion avec la D-sérine (50 μ M ; 20min).

(A) Exemples de traces représentatives des sCPSIs GABAergiques d'un neurone de la lamina II en condition contrôle, FC et FC+D-ser avant, pendant et après application de NMDA (100 μ M). **(B)** Fraction de neurones répondant à l'application de NMDA en condition contrôle, FC et FC+D-ser. Test exact de Fischer *** $p < 0.001$; * $p < 0.05$. **(C-D-E)** Effet du NMDA sur la fréquence **(C)**, la fréquence normalisée par rapport à la ligne de base **(D)** et l'amplitude **(E)** des sCPSIs GABAergiques en condition contrôle, FC et FC+D-ser. Test de Student pour données appariées * $p < 0.05$; *** $p < 0.001$. Test de Student pour données non appariées # $p < 0.05$.

Nous avons ensuite analysé l'effet du FC sur les cinétiques de désactivation (τ désactivation) des mCPSIs GABAergiques (contrôle cellules avec réponses : 31.52 ± 1.22 ms, $n=36$; FC cellules avec réponses : 39.7 ± 3.36 ms, $n=6$; test de Student pour données non appariées $p=0.054$). Les résultats indiquent une tendance à l'augmentation du τ désactivation des mCPSIs GABAergiques en condition FC sur les neurones où le NMDA induit un effet. Sur ces mêmes neurones, la D-sérine a été perfusée (FC cellules avec réponses : 39.7 ± 3.36 ms, $n=6$; FC+D-ser cellules avec réponses : 27.03 ± 1.78 ms, $n=8$; test de Student pour données non appariées $p=0.025$) (Figure 34D et E). Nous avons constaté que la perfusion de D-sérine sur des tranches pré-traitées au FC diminue le τ désactivation des mCPSIs GABAergiques. Le nombre de neurones enregistré n'est pas suffisant pour tirer des conclusions de ces résultats. On observe tout de même que l'incubation au FC diminue le τ activation et tend à augmenter le τ désactivation des mCPSIs GABAergiques. De plus, la perfusion de D-sérine rétablit des cinétiques similaires à celles observées en condition contrôle.

2) Effet du FC et de la D-sérine sur la facilitation de la transmission GABAergique observée après l'application de NMDA

Sur les neurones analysés précédemment, une application de NMDA ($100\mu\text{M}$; 1min) a été réalisée dans les conditions contrôle, FC et FC+D-ser. Seuls les résultats concernant les neurones présentant un changement de la fréquence d'apparition des CPSIs GABAergiques suite à l'application de NMDA seront présentés ci-dessous. Pour les neurones dans lesquels le NMDA n'a pas eu d'effet sur la fréquence, nous n'avons pas observé d'effet sur l'amplitude, le τ activation et le τ désactivation des sCPSIs et mCPSIs GABAergiques (tableau 6).

2.1 Etude sur la transmission spontanée

Proportion de réponses suite à l'application de NMDA

En condition contrôle, 81.7% des neurones ($n=67$ sur 82 neurones) présentent une augmentation de la fréquence d'apparition des sCPSIs suite à l'application de NMDA (Figure 35A et B). Cette forte proportion de réponses est réduite à 36.8% ($n=7$ sur 19 neurones) lorsque les neurones sont préalablement incubés avec du FC (test exact de Fisher entre condition contrôle et FC, $p=0.0002$). La perfusion des tranches avec de la D-sérine ($50\mu\text{M}$; 20minutes) permet de restaurer une proportion de réponses à 75% ($n=12$ sur 16 neurones), similaire à celle observée en condition contrôle (test exact de Fisher entre condition FC et FC+D-ser, $p=0.041$) (Figure 35B). Ces résultats indiquent que dans le réseau de la lamina II, le maillon glial est important pour obtenir l'effet du NMDA sur une sous-population de neurones. On peut spéculer qu'en condition FC, les astrocytes sont en incapacités de

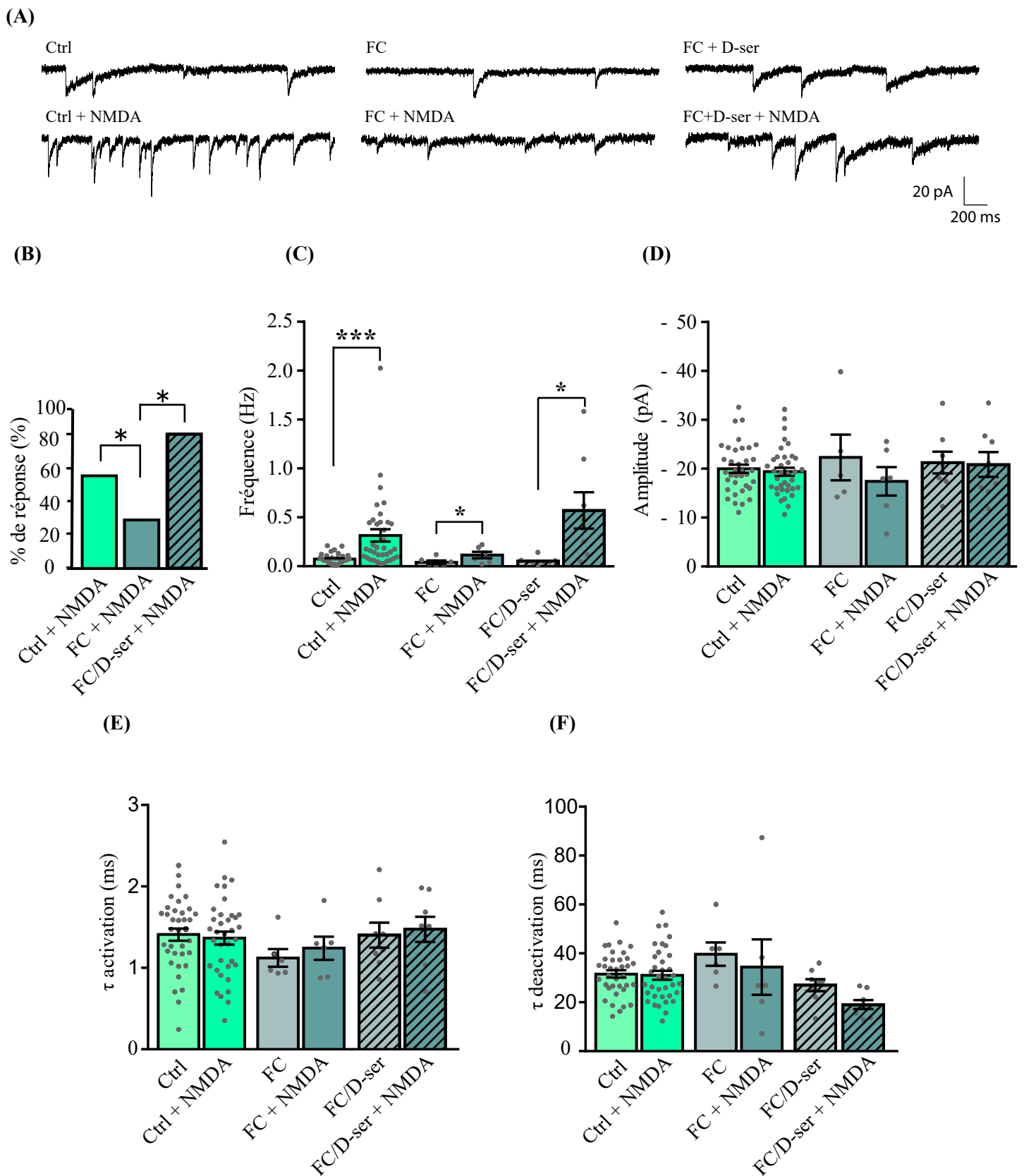


Figure 36 : Effet de l'application de NMDA sur la transmission GABAergique miniature après incubation des tranches dans le FC et perfusion avec la D-sérine.

(A) Exemples de traces représentatives des mCPSIs GABAergiques de neurones de la lamina II en condition contrôle, FC et FC+D-ser avant et après application de NMDA (100 μ M). **(B)** Fraction de neurones répondant à l'application de NMDA en condition contrôle, FC et FC+D-ser. Test exact de Fischer * $p < 0.05$. **(C-D-E-F)** Effet du NMDA sur la fréquence **(C)**, l'amplitude **(D)**, le τ activation **(E)** et le τ déactivation **(F)** des mCPSIs GABAergiques en condition contrôle, FC et FC+D-ser. Test de Student pour données appariées * $p < 0.05$; *** $p < 0.001$

libérer de la D-sérine. L'absence de ce gliotransmetteur serait alors responsable de la diminution du taux de réponse observée suite à l'application de NMDA.

Effet du NMDA en condition FC

L'application de NMDA en condition contrôle augmente fortement la fréquence des sCPSIs GABAergiques dans 81.7% de neurones (contrôle : 0.116 ± 0.01 Hz ; contrôle+NMDA : 0.809 ± 0.079 Hz, n=67 ; test de Student pour données appariées, $p < 0.0001$). Nous avons évalué l'effet du NMDA sur la fréquence des sCPSIs GABAergiques en condition FC (FC : 0.029 ± 0.01 Hz ; FC+NMDA : 0.287 ± 0.069 Hz, n=7 ; test de Student pour données appariées, $p = 0.008$). On constate que la perfusion de NMDA augmente significativement la fréquence des sCPSIs GABAergiques en condition FC (Figure 35C). On note toutefois que l'amplitude de l'effet du NMDA est plus faible en condition FC par rapport à la condition contrôle (contrôle+NMDA : 0.809 ± 0.0790 Hz, n=67 ; FC+NMDA : 0.287 ± 0.069 Hz, n=7 ; test de Student pour données non appariées, $p = 0.038$) (Figure 35C). Cette comparaison de l'effet du NMDA est observé alors que la fréquence de base des sCPSIs GABAergiques est déjà diminuée en condition FC (Figure 33B). Afin de ne prendre en compte que l'effet relatif du NMDA, nous avons normalisé les fréquences par rapport à la fréquence de base pour chaque condition (fréquence de base normalisée à 1 ; Contrôle+NMDA : 10.4 ± 1.5 , n=67 ; FC+NMDA : 14.4 ± 5 , n=7 ; FC+D-ser+NMDA : 6.7 ± 1.23) (Figure 35D). Il apparaît ainsi que l'effet du NMDA augmente la fréquence des sCPSIs GABAergiques relative de façon similaire en condition contrôle et FC.

Effet du NMDA en condition FC+D-ser

L'effet du NMDA sur la fréquence des sCPSIs GABAergiques a été évalué sur des tranches pré-traitées au FC et perfusées avec la D-sérine (FC+D-ser : 0.0968 ± 0.029 Hz ; FC+D-ser+NMDA : 0.556 ± 0.17 Hz, n=12 ; test de Student pour données appariées, $p = 0.011$) (Figure 35C). On note que le NMDA augmente significativement la fréquence des sCPSIs GABAergiques. Nous avons ensuite comparé l'effet du NMDA entre la condition contrôle et FC+D-ser (contrôle+NMDA : 0.809 ± 0.079 Hz, n=67 ; FC+D-ser+NMDA : 0.556 ± 0.17 Hz, n=12 ; test de Student pour données non appariées, $p = 0.21$) (Figure 35C). Les résultats n'indiquent pas de différence significative entre l'effet du NMDA sur le groupe contrôle et l'effet du NMDA sur le groupe FC+D-ser. Cela indique que la perfusion de D-sérine tend à rétablir l'effet du NMDA à des niveaux comparables à ceux observés en condition contrôle. L'amplitude des sCPSIs GABAergiques suivant une application de NMDA ne change pas dans les différentes conditions (figure 35E) (tableau 6).

L'effet du NMDA est donc similaire entre les différentes conditions et induit une facilitation de la transmission synaptique GABAergique. Cependant, le fluorocitrate induit une diminution de la proportion de neurones dans lesquels le NMDA induit cette facilitation. Cet effet du FC est réversé par la perfusion de D-sérine.

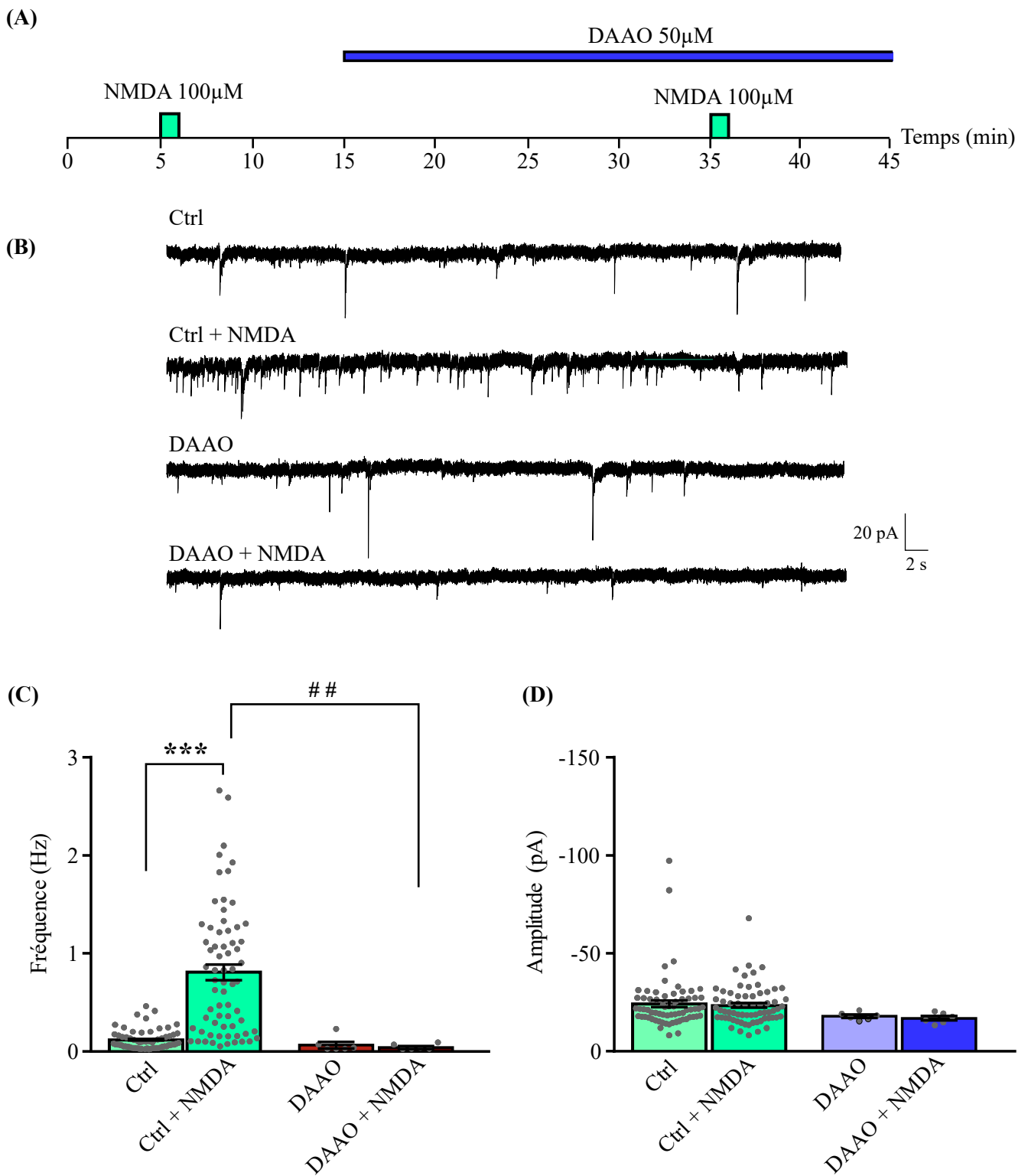


Figure 37 : Effet de la perfusion de DAAO sur la transmission GABAergique spontanée dans des tranches de ME non traitées.

(A) Les neurones enregistrés répondant à une première application de NMDA sont perfusés avec la DAAO (50µM) pendant 20 minutes avant la seconde application de NMDA et jusqu'à la fin de l'enregistrement. (B) Les traces présentées illustrent l'effet du DAAO obtenue sur 6 neurones. (C-D) Effet du NMDA sur la fréquence (B) et l'amplitude (C) des sCPSIs GABAergique avant et après perfusion de la DAAO. Test de Student pour données appariées *** $p < 0.001$. Test de Student pour données non appariées # $p < 0.05$

2.2 Etude sur la transmission miniature

Proportions de réponse suite à l'application de NMDA

54.5% des neurones (n=36 sur 66 neurones) présentent une augmentation de la fréquence d'apparition des mCPSIs GABAergiques suite à une application de NMDA en condition contrôle. Cette proportion diminue fortement en condition FC jusqu'à 28.6% (n= 6 sur 21 neurones) (test exact de Fisher entre condition contrôle et FC, p=0.047). Cependant, suite à la perfusion de D-sérine, la proportion de neurones qui répondent au NMDA est rétablie à 80% (n=8 sur 10 neurones) (test exact de Fisher entre condition FC et FC+D-ser, p=0.018) (Figure 36B). Comme en condition spontanée, la glie et la D-sérine jouent un rôle important dans l'effet modulateur du NMDA sur la transmission synaptique GABAergique miniature.

Effet du NMDA

L'application de NMDA induit une augmentation de la fréquence des mCPSIs GABAergiques en condition contrôle (contrôle : 0.072 ± 0.009 Hz ; contrôle+NMDA : 0.314 ± 0.06 Hz, n=36 ; test de Student pour données appariées, p=0.0001). Nous avons évalué l'effet du NMDA en condition FC sur la fréquence des mCPSIs GABAergiques (FC : 0.038 ± 0.019 Hz ; FC+NMDA : 0.113 ± 0.033 Hz, n=6 ; test de Student pour données appariées, p=0.012). De même, nous avons déterminé l'effet du NMDA en condition FC+D-ser (FC+D-ser : 0.0531 ± 0.013 Hz ; FC+D-ser+NMDA : 0.57 ± 0.19 Hz, n=8 ; test de Student pour données appariées, p=0.028) (Figure 36A et C). Pour chaque condition, l'application de NMDA augmente la fréquence d'apparition des mCPSIs GABAergiques. Aucun effet n'a été observé sur les cinétiques des mCPSIs GABAergiques (tableau 6) (Figure 36D, E et F).

2.3 Effet de la D-Aminoacide oxydase (DAAO) sur la transmission synaptique inhibitrice GABAergique spontanée

Afin de déterminer le rôle de la D-sérine dans l'effet facilitateur du NMDA, des tranches non traitées au FC ont été perfusées avec de la DAAO (50µM, 20min) afin de dégrader la D-sérine extracellulaire avant l'application de NMDA. Six neurones montrant une réponse à une première application de NMDA ont été perfusés avec de la DAAO (contrôle : 0.0119 ± 0.047 Hz ; contrôle+NMDA : 0.814 ± 0.26 Hz ; test de Student pour données appariées p=0.029) (Figure 37A et B). La perfusion de DAAO pendant 20 minutes, suite à la première application de NMDA, a induit un blocage complet de l'effet de la seconde application de NMDA (DAAO : 0.065 ± 0.035 Hz ; DAAO+NMDA : 0.04 ± 0.014 Hz, n=6 ; test de Student pour données appariées p=0.34) (figure 37C). Aucun changement significatif de l'amplitude des sCPSIs GABAergiques n'a été observé après application de la DAAO (tableau 6) (Figure 37D). Ces

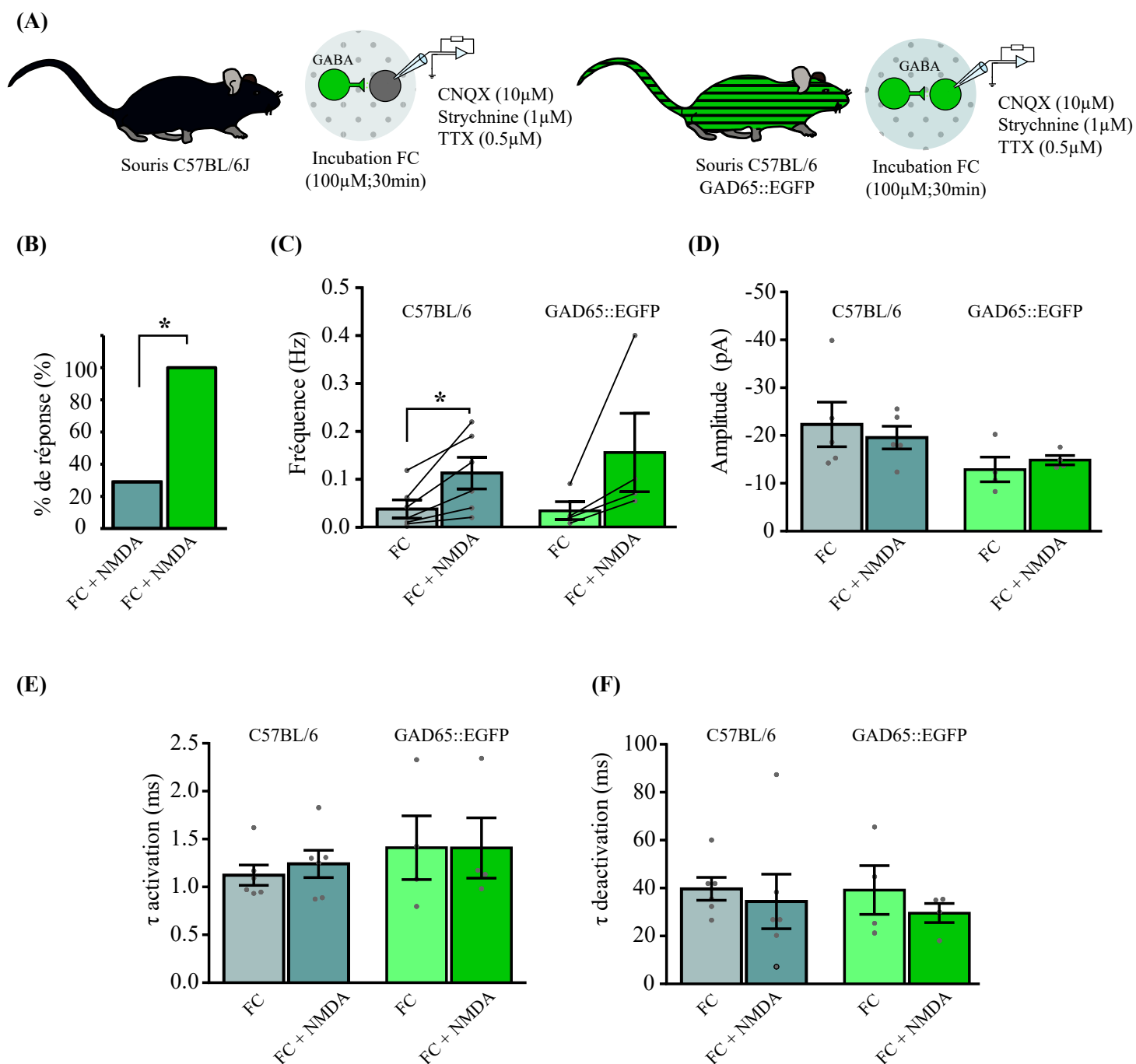


Figure 38 : Etude de l'effet du FC et d'une application de NMDA au niveau de la population des neurones GABAergiques.

(A) Les neurones non identifiés, enregistrés sur des tranches de ME de souris C57BL/6, répondant à une première application de NMDA après une incubation dans le fluorocitrate représente la condition contrôle. Elle est représenté sur les graphiques en bleu. Les neurones GABAergiques, enregistrés sur des tranches de ME de souris transgéniques GAD65::EGFP, après une incubation dans le fluorocitrate représente la condition GAD65::EGFP. Ces deux conditions ont été comparé afin de déterminer s'il existe une régulation différente de la communication neurone-glie selon la nature neurochimique du neurone enregistré.

La fraction de neurones répondant à l'application de NMDA **(B)** ainsi que la fréquence **(C)**, l'amplitude **(D)**, le τ activation **(E)** et le τ désactivation **(F)** des mCPSIs GABAergiques sont représentés. Test de Student pour données appariées * $p < 0.05$.

résultats indiquent que la D-sérine joue un rôle majeur dans l'activation des récepteurs NMDA responsables de la facilitation de la transmission synaptique GABAergique.

3) Régulation différentielle de la communication neurone-glie selon la nature neurochimique du neurone enregistré

Nous avons vu qu'un traitement au FC diminue significativement la proportion de neurones répondant au NMDA, passant de 54.5 à 28.6% en condition miniature. Dans la lamina II, les interneurons inhibiteurs représentent environ 30-35% des neurones (Polgár et al., 2003). Il est intéressant de remarquer que la proportion de neurones répondant toujours à l'application de NMDA après l'incubation avec le FC (28.6%) est similaire à celle des interneurons inhibiteurs dans la lamina II. Afin de déterminer si le FC a un effet spécifique selon la nature du neurone postsynaptique enregistré, nous avons utilisé des souris GAD65::EGFP. Cela nous a permis d'étudier l'effet du FC sur les synapses GABAergiques contactant un neurone GABAergique (Figure 38A).

Proportion de réponses suite à l'application de NMDA

Ces expériences préliminaires sur la transmission miniature GABAergique montrent que 100% des neurones GAD65 positifs (GABAergiques) enregistrés (n=4) traités au FC reçoivent des entrées GABAergique facilitées par l'application de NMDA contre 28.6% sur des neurones non identifiés de tranches de souris C57bl/6 en condition FC (FC C57BL/6 : n= 7 sur 19 neurones ; FC GAD65::EGFP : n=4 sur 4 neurones ; test exact de Fisher, p=0.037) (Figure 38B).

Effet du NMDA

L'effet de l'application de NMDA sur la fréquence des mCPSIs GABAergiques a été évalué sur les tranches de souris C57BL/6 pré-incubées avec le FC (FC C57BL/6) (FC C57BL/6 : 0.038 ± 0.019 Hz ; +NMDA : 0.113 ± 0.033 Hz, n=6 ; test de Student pour données appariées, p=0.012). Nous avons aussi évalué l'effet de l'application de NMDA sur les tranches de souris transgéniques GAD65::EGFP pré-incubées avec le FC (FC GAD65::EGFP : 0.0349 ± 0.019 Hz ; +NMDA : 0.156 ± 0.08 Hz, n=4 ; test de Student pour données appariées, p=0.15) (Figure 38 C). L'application de NMDA augmente la fréquence des mCPSIs GABAergiques en condition FC sur les tranches de souris C57BL/6 et GAD65::EGFP de façon similaire. Les paramètres cinétiques des mCPSIs GABAergiques dans les deux groupes sont inchangés (Tableau 6) (Figure 38D, E et F).

Ces résultats préliminaires indiquent que les cellules gliales modulent la libération de GABA de façon différente selon le type de synapse. En effet, un maillon glial ne semble pas nécessaire à l'effet facilitateur du NMDA au niveau des synapses GABAergiques ciblant un neurone GABAergique. Notre

Tableau 6 : Caractéristiques des CPSI spontanée et miniature dans les différentes conditions présentés dans la partie II en absence ou en présence de NMDA.

Transmission spontanée		Ctrl		FC sur C57BL/6		FC+D-sérine		DAAO	
		Baseline	+NMDA	Baseline	+NMDA	Baseline	+NMDA	Baseline	+NMDA
Cellules avec un effet du NMDA	Fréquence (Hz)	0.116±0.01	0.809±0.08 n= 67	0.029±0.01	0.29±0.07 n= 7	0.097±0.03	0.56±0.17 n= 12	0.065±0.03	0.04±0.014 n= 6
	Amplitude (pA)	-24.2±1.67	-23.5±1.21 n= 67	-25.6±3.46	-24.6±3.4 n= 7	-24.6±5.68	-23.2±2.55 n= 12	-17.99±0.78	-16.95±1.11 n= 6
Cellules sans effet du NMDA	Fréquence Hz)	0.161±0.04	0.138±0.03 n= 15	0.071±0.02	0.064±0.02 n= 12	0.041±0.014	0.038±0.018 n= 4	/	/
	Amplitude (pA)	-23.2±2.2	-25.06±3.38 n= 15	-22.7±3.74	-19.6±3.84 n= 12	-19.1±0.99	-15.4±2.55 n= 4	/	/

Transmission miniature		Ctrl		FC sur C57BL/6		FC sur GAD65::GFP		FC+D-sérine	
		Baseline	+NMDA	Baseline	+NMDA	Baseline	+NMDA	Baseline	+NMDA
Cellules avec un effet du NMDA	Fréquence	0.072±0.009	0.314±0.062 n= 36	0.038±0.019	0.113±0.033 n= 6	0.035±0.018	0.156±0.082 n= 4	0.053±0.013	0.57±0.18 n= 8
	Amplitude	-19.99±0.85	-19.39±0.82 n= 36	-22.32±4.27	-17.42±2.88 n= 6	-12.89±2.59	-14.85±0.97 n= 4	-21.25±2.24	-20.86±2.55 n= 8
	τ activation	1.41±0.07	1.37±0.08 n= 36	1.12±0.11	1.24±0.14 n= 6	1.408±0.33	1.407±0.31 n= 4	1.40±0.15	1.47±0.15 n= 8
	τ déactivation	31.52±1.5	31.02±1.82 n= 36	39.7±4.72	34.41±11.37 n= 6	39.21±10.18	29.57±4.04 n= 4	27.03±2.47	18.99±1.85 n= 8
Cellules sans effet du NMDA	Fréquence	0.096±0.014	0.086±0.018 n= 30	0.069±0.022	0.048±0.017 n= 15	/	/	0.033±0.008	0.035±0.005 n= 2
	Amplitude	-20.99±0.9	-18.93±1.11 n= 30	-19.79±1.19	-18.28±1.31 n= 15	/	/	-18.33±4.98	-20.95±1.92 n= 2
	τ activation	1.3±0.09	1.37±0.1 n= 30	0.89±0.13	1.13±0.18 n= 15	/	/	1.35±0.06	1.48±0.01 n= 2
	τ déactivation	33.17±2.35	31.78±2.39 n= 30	34.19±4.12	33.47±4.67 n= 15	/	/	30.59±5.52	33.87±16.4 n= 2

hypothèse est donc que la glie aurait un rôle particulièrement important dans l'effet du NMDA aux synapses GABAergiques ciblant un neurone glutamatergique.

Discussion partie II

1) Rôle des cellules gliales dans la modulation de la transmission synaptique inhibitrice de base

1.1) Le fluorocitrate induit une diminution de l'activité synaptique GABAergique dans la lamina II

Dans cette étude, nous avons montré que le traitement des tranches de ME au FC (100 μ M ; 30min) diminue la fréquence d'apparition des sCPSIs GABAergiques. Cet effet sur la transmission GABAergique de base est observé sur les neurones où le NMDA va ensuite avoir un effet modulateur. Il a également été noté une tendance à la diminution des mCPSIs GABAergiques sur les neurones où, encore une fois, un effet du NMDA a été observé. Le traitement au FC n'a induit aucun changement de l'amplitude de ces courants en condition spontanée et miniature. Ces résultats indiquent une diminution de la probabilité de libération de neurotransmetteur GABA en condition spontanée ainsi qu'une tendance à la diminution en condition miniature. Le blocage du métabolisme des cellules gliales a donc un effet modulateur négatif sur la transmission synaptique GABAergique basale par un effet réseau et aussi potentiellement par un effet directement sur les terminaisons synaptiques qui est à confirmer. Des résultats similaires ont été obtenus dans des cultures de neurones hippocampiques où le FC diminue la fréquence des mCPSIs GABAergiques sans changement de l'amplitude des courants synaptiques (Kaczor et al., 2015). Le mécanisme n'est pas décrit mais les auteurs émettent l'hypothèse que cet effet sur la transmission synaptique GABAergique est dû à l'absence d'un gliotransmetteur (l'ATP) en condition FC. D'autres résultats obtenus sur des tranches de ME de rat n'ont pas mis en évidence d'effet du FC sur la fréquence de base des mCPSIs GABAergiques (Seibt et Schlichter, 2015). De même, l'injection intrathécale *in vivo* de fluoroacétate, le composé précurseur du FC, chez le rat pendant 2 semaines n'empêche pas la détection de stimuli mécaniques nociceptifs et non nociceptifs chez ces animaux. Ces données comportementales semblent indiquer que le fluoroacétate ne supprime pas l'activité neuronale (Lefèvre et al., 2015). Dans nos conditions, une tendance à la diminution de la fréquence des mCPSIs GABAergiques est détectée. La différence entre les espèces utilisées peut expliquer ces divergences d'effet du FC sur la transmission synaptique inhibitrice.

1.2) L'effet du fluorocitrate est uniquement observé sur les neurones répondant par la suite à l'application de NMDA

De façon intéressante, l'effet du FC semble dépendre de la nature neurochimique du neurone enregistré. En effet, la diminution de la fréquence d'apparition des sCPSIs GABAergiques et la tendance à la diminution des mCPSIs GABAergiques sont observées sur le sous-groupe de neurones où le NMDA

induit un effet. Au cours de notre étude, nous avons mis en évidence que l'effet du NMDA est presque toujours observé aux synapses GABAergiques contactant un neurone GABAergique. On peut donc émettre l'hypothèse que les synapses sensibles au FC soient en majorité des synapses GABAergiques contactant un neurone GABAergique.

Nos résultats sont cohérents avec d'autres études montrant, sur tranches ou culture de neurones d'hippocampe, une facilitation de la transmission synaptique inhibitrice impliquant les astrocytes et la libération de gliotransmetteurs tel que le glutamate (Liu et al., 1996; Liu et al., 1997; Kang et al., 1998; Kaczor et Mozrzymas, 2017). Il est possible que la diminution de la transmission synaptique GABAergique que nous observons, due au blocage des cellules gliales, mette en jeu des mécanismes similaires en impliquant des gliotransmetteurs tels que la D-sérine, le glutamate ou l'ATP. La gliotransmission peut modifier l'activité synaptique (Kozlov et al., 2006; Panatier et al., 2006; Lee et al., 2010), nous avons voulu déterminer dans un premier temps si l'absence de D-sérine induisait la diminution de la transmission synaptique GABAergique.

1.3) Un changement de la gliotransmission en condition FC peut-il expliquer la diminution de la transmission synaptique GABAergique ?

Dans plusieurs régions du SNC, les astrocytes libèrent de la D-sérine (Panatier et al., 2006; Lefèvre et al., 2015), l'un des deux principaux co-agonistes des récepteurs NMDA, pouvant moduler la transmission synaptique (Miraucourt et al., 2011). Nous avons cherché à déterminer si une diminution de libération de la D-sérine avait lieu et pouvait rendre compte de la diminution de la transmission synaptique GABAergique en condition FC. La perfusion de D-sérine a partiellement restauré la transmission synaptique GABAergique spontanée. Cependant, la fréquence des sCPSIs GABAergiques reste inférieure à celle observée en condition contrôle. Ce résultat indique d'une part que la diminution de la libération de GABA en condition FC est en partie due à une diminution de libération de D-sérine, potentiellement d'origine astrocytaire. D'autre part, cela indique un effet réseau de la D-sérine étant donné que seule la transmission spontanée est modulée.

Les astrocytes libèrent d'autres gliotransmetteurs dans le SNC, tel que le GABA, le glutamate et l'ATP, qui peuvent moduler les communications entre les neurones au sein des réseaux synaptiques (Newman, 2003; Pougnet et al., 2014). Il est envisageable qu'en condition normale, ces gliotransmetteurs agissent sur les neurones par l'activation de récepteurs ionotropes (AMPA, NMDA, Kainate, P2X) ou métabotropes (mGluR, P2Y) et modulent la transmission synaptique GABAergique. Il est par exemple connu que l'ATP libérée par les astrocytes dans l'hippocampe induit une augmentation de la fréquence des mCPSIs GABAergiques. Cette augmentation serait induite par l'activation des récepteurs P2Y1 (Torres et al., 2012). De plus, dans la ME de rat, il existe une facilitation de la transmission GABAergique par l'activation de récepteurs P2X présynaptiques via l'ATP (Hugel

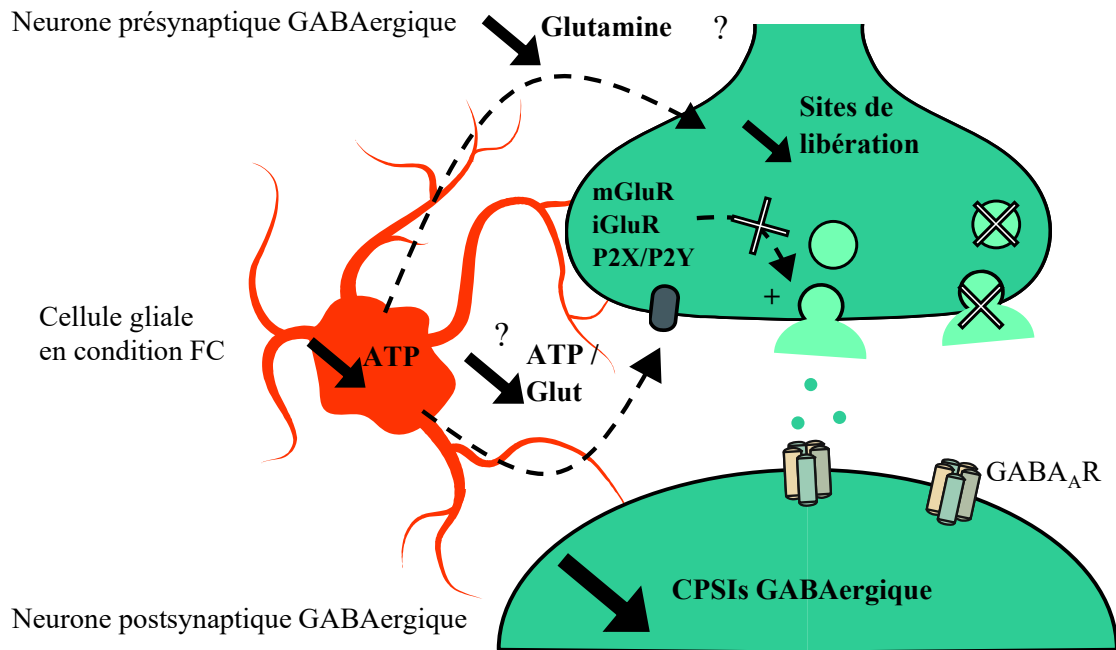


Figure 39 : Hypothèses de régulations de la transmission synaptique GABAergique par les cellules gliales dans la lamina II.

Les résultats obtenus indiquent une diminution de la fréquence des sCPSIs GABAergiques et une tendance à la diminution de la fréquence des mCPSIs GABAergiques en condition FC. Cet effet est observé sur les neurones où le NMDA a un effet modulateur. D'après nos résultats, on émet l'hypothèse que le FC diminue la fréquence des CPSIs GABAergiques aux synapses GABAergiques contactant un neurone GABAergique. Deux hypothèses sont envisagées pour expliquer la tendance à la diminution de la fréquence des mCPSIs GABAergiques en condition miniature. D'une part, un gliotransmetteur, tel que l'ATP ou le glutamate, pourrait en temps normal augmenter la probabilité de libération de GABA. L'absence de gliotransmission en condition FC pourrait être responsable de la tendance à la diminution de la fréquence des mCPSIs GABAergiques observée. D'autre part, la diminution de glutamine acheminée des cellules gliales aux neurones en condition FC pourrait entraîner la diminution de synthèse de GABA et au final la diminution du nombre de vésicules synaptiques libérées. Les neurones en bleu sont inhibiteurs et utilisent le GABA comme neurotransmetteurs. Les neurotransmetteurs GABA sont illustrés par les cercles bleus. Les cellules gliales sont représentées en orange. Leur métabolisme est bloqué par l'incubation des tranches dans le fluorocitrate.

et Schlichter, 2000). Il sera intéressant de vérifier, pour la suite de notre étude, si l'ATP, le GABA ou le glutamate d'origine astrocytaire pourraient moduler la libération de GABA et d'identifier les récepteurs sur lesquels ils agissent (Figure 39).

1.4) Le rôle de soutien des cellules gliales est-il altéré en condition FC et induit-il la diminution de la transmission GABAergique ?

Les cellules gliales jouent un rôle de soutien important pour les neurones. Les cellules gliales acheminent par exemple jusqu'aux neurones les substrats métaboliques essentiels à la synthèse des neurotransmetteurs tel que la glutamine (Araque et al., 1999; Nedergaard et al., 2003). On pourrait penser que l'apport en glutamine aux neurones soit diminué en condition FC. Il est notamment montré dans le cortex que le fluoroacétate, le composé précurseur du FC, diminue la formation de glutamine et pourrait être responsable de la diminution du nombre de vésicules GABAergiques prêtes à être libérées (Paulsen et al., 1987; Waagepetersen et al., 1999). Cependant nos résultats indiquent que le traitement au FC ne change pas l'amplitude des mCPSIs GABAergiques, ce qui montre que le contenu des vésicules GABAergiques n'est pas fortement diminué. La durée de l'incubation des neurones avec le FC dans nos conditions (30min) ne semble pas suffisante pour avoir un effet sur la quantité de GABA présente dans une vésicule. On peut cependant imaginer que la diminution de glutamine, si elle a lieu, pourrait être responsable d'une diminution du nombre de vésicules prêtes à être libérées. Une diminution du nombre de la libération de vésicules synaptiques pourrait se traduire par la diminution de la fréquence des mCPSIs GABAergiques que l'on observe (Figure 39).

1.5) Le fluorocitrate induit-il une diminution de la transmission synaptique GABAergique par un effet direct sur les neurones ?

Enfin, il est possible que le fluorocitrate agisse directement sur le métabolisme des neurones et induise la diminution de la transmission synaptique GABAergique. En effet, bien que le fluorocitrate soit principalement recapturé par les cellules gliales (Swanson et Graham, 1994), il peut aussi, à forte concentration, affecter directement la transmission synaptique (Fonnum et al., 1997). Plusieurs points sont cependant en défaveur d'un tel effet. Tout d'abord, les données de la littérature indiquent que dans nos conditions (30minutes d'incubation), le fluorocitrate n'affecte pas directement la transmission synaptique sur des tranches d'hippocampe et de ME de rat (Nakanishi et al., 1996; Schurr et al., 1997; Seibt et Schlichter, 2015). De plus, nos résultats sont aussi en défaveur d'un effet direct. En effet, nous observons en condition FC une modulation de la transmission GABAergique sur un type de neurone particulier, ceux qui répondent à une application de NMDA. En revanche, nous n'observons pas d'effet significatif du FC sur les neurones où le NMDA n'induit pas de facilitation de la transmission

GABAergique (Figure 33 et 34). Cet effet spécifique aux synapses GABAergiques ciblant un neurone GABAergique semble exclure un effet direct du FC sur le métabolisme neuronal.

1.6) Effet du fluorocitrate sur les cinétiques des récepteurs GABA_A

L'incubation des tranches au FC diminue le τ activation des courants GABAergiques lorsque l'on considère l'ensemble des neurones enregistrés (Figure 34). Il a aussi été observé une tendance à l'augmentation du τ déactivation des mCPSIs GABAergiques sur les neurones où un effet du NMDA est observé. La perfusion de D-sérine restaure des cinétiques d'activation et de déactivation similaires à celles obtenues en condition contrôle. Cela semble indiquer que la D-sérine, possiblement d'origine astrocytaire, module en condition normale les cinétiques des courants GABAergiques. Il n'a cependant jamais été décrit dans le SNC que la D-sérine pouvait moduler les cinétiques des courants GABAergiques. Les variations des cinétiques ont lieu relativement rapidement après le traitement au FC et à la D-sérine. Cela exclut a priori l'hypothèse d'un changement de la composition en sous-unités des récepteurs GABA_A, qui aurait pu être responsable d'une variation des cinétiques des courants (Lavoie et al., 1997).

Par rapport au τ déactivation, il a déjà été montré dans le thalamus que le FC puisse augmenter le τ déactivation des mCPSIs GABAergiques bien que le mécanisme d'action ne soit pas clairement défini (Christian et Huguenard, 2013). Les transporteurs membranaires du GABA 2 et 3 (GAT2 et 3) sont principalement exprimés par les cellules gliales (Gadea et López-Colomé, 2001). On peut émettre l'hypothèse en condition FC que la recapture du GABA par les cellules gliales soit diminuée ce qui entrainerait une augmentation de la concentration extracellulaire de GABA responsable de l'augmentation du τ déactivation des mCPSIs GABAergiques. Cependant on ne s'attendrait pas à ce que la perfusion de D-sérine diminue le τ déactivation des mCPSIs GABAergiques. Il est donc difficile d'interpréter ces résultats à l'heure actuelle.

2) Rôle des cellules gliales dans la facilitation de la transmission synaptique GABAergique observé après l'application de NMDA

2.1) Les cellules gliales sont impliquées dans l'effet facilitateur du NMDA à un type de synapse GABAergique particulière

Nous avons montré que le traitement des tranches au FC, en condition spontanée et miniature, diminue la fraction de neurones dans lesquelles le NMDA induit une augmentation de la fréquence d'apparition des CPSIs GABAergiques (Figure 35 et 36). La perfusion de D-sérine permet de restaurer complètement la proportion de neurones répondant au NMDA en condition spontanée et miniature

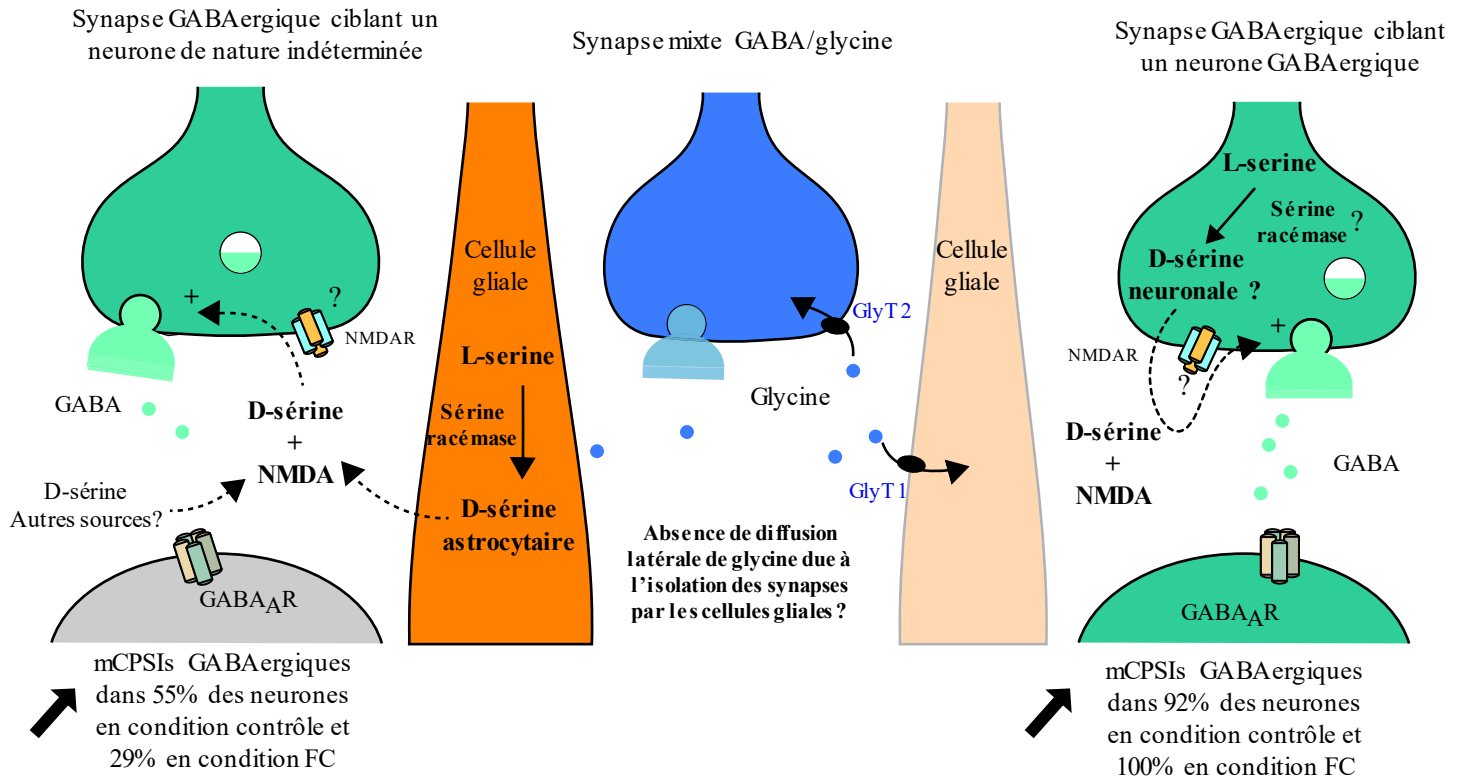


Figure 40 : Quelles sont les possibles sources de co-agoniste des récepteurs NMDA ?

Nos résultats montrent que la D-sérine est requise pour observer l'effet du NMDA peu importe le type de synapses considérées. Cependant le rôle de la glie est différent selon la synapse que l'on étudie. En effet le blocage de la glie avec le FC provoque une diminution de la proportion de neurones où le NMDA induit un effet, passant de 55 à 29% quand on enregistre un neurone de nature indéterminé. Etant donné que les neurones GABAergiques reçoivent toujours une transmission GABAergique potentialisée par le NMDA en condition FC, nous proposons que les neurones glutamatergiques sont les principales cibles de l'effet du FC. La perfusion de D-sérine restaure la proportion de réponse des neurones non-identifiés au NMDA. Cela semble indiquer que l'effet observé dépend en partie de la libération de D-sérine astrocytaire qui permet l'activation de récepteurs NMDA. Ces récepteurs ont été placés à l'élément présynaptique sur ce schéma mais cette localisation reste à confirmer. Aux synapses GABAergiques contactant un neurone GABAergique, il est envisageable que la D-sérine soit d'origine neuronale et facilite la transmission GABAergique en permettant l'activation de récepteurs NMDA présynaptiques par exemple. Enfin, concernant l'absence d'effet de la glycine, on peut spéculer que la localisation des récepteurs NMDA impliqués dans l'effet soit inaccessible à ce co-agoniste. Les neurones GABAergiques sont représentés en bleu, les neurones non-identifiés en gris, les neurones mixtes GABA/glycine en bleu foncé et les cellules gliales en orange.

(Figure 35 et 36). De manière intéressante, cette diminution de réponse observée en condition FC n'est pas retrouvée sur les synapses GABAergiques ciblant un autre neurone GABAergique (Figure 38). Cela suggère que les interneurons glutamatergiques sont les cibles de cette diminution d'entrée GABAergique en condition FC. Enfin, la perfusion de la DAAO, qui dégrade la D-sérine, bloque totalement l'effet sur tous les neurones (Figure 37).

Ces résultats signifient que la transmission synaptique GABAergique est régulée de façon spécifique par les cellules gliales en fonction de la nature neurochimique du neurone cible. Dans la lamina II, on retrouve donc des synapses GABAergiques contactant un neurone postsynaptique glutamatergique qui requièrent la glie environnante et la D-sérine pour permettre la facilitation de la transmission GABAergique par le NMDA. En revanche, l'effet du NMDA sur les synapses GABAergiques contactant un neurone GABAergique n'est pas dépendant de la glie mais requiert aussi la D-sérine (Figure 40).

2.2) Rôle et source de la D-sérine dans l'effet observé

Les expériences réalisées avec la DAAO (n=6) indiquent que la D-sérine est essentielle pour obtenir l'activation des récepteurs NMDA impliqués dans l'effet facilitateur que l'on observe. Dans le SNC, la D-sérine est principalement d'origine astrocytaire (Schell et al., 1995; Panatier et al., 2006) bien qu'il ait aussi été montré qu'elle puisse être libérée par les neurones dans le cervelet et le cortex (Kartvelishvily et al., 2006; Miya et al., 2008; Rosenberg et al., 2010). Il semble d'après les résultats obtenus, que la D-sérine d'origine astrocytaire soit essentielle pour permettre l'effet du NMDA sur les synapses GABAergiques ciblant un neurone glutamatergique. Cela est cohérent avec une étude menée dans la ME montrant une forte colocalisation (70%) de la sérine racémase, l'enzyme de synthèse de la D-sérine, avec la GFAP exprimée par certains astrocytes (Lefèvre et al., 2015). De façon intéressante, nos résultats indiquent que la D-sérine est aussi requise aux synapses GABAergiques ciblant un neurone GABAergique pour observer l'effet du NMDA, mais pas les cellules gliales. Il est donc possible que la D-sérine soit d'origine neuronale à ces synapses bien qu'aucune étude n'indique la présence de D-sérine neuronale dans la ME (Figure 40). Une approche d'immunocytochimie pourrait permettre de révéler si la D-sérine d'origine neuronale existe dans la ME.

Ces résultats indiquent donc que la D-sérine est le co-agoniste essentiel des récepteurs NMDA que l'on étudie. Il faut souligner qu'au sein des CDME, la transmission synaptique glycinergique est très représentée (Zeilhofer et al., 2012). La glycine étant également un co-agoniste du récepteur NMDA, il était surprenant de bloquer totalement l'effet du NMDA avec la perfusion de la DAAO. En effet, on aurait pu s'attendre à ce que la glycine joue le rôle de co-agoniste des récepteurs NMDA en absence de D-sérine. Des expériences menées avec une autre enzyme de dégradation de la D-sérine, comme la RgDAAO, permettraient de vérifier l'effet spécifique de la DAAO et de confirmer nos résultats (Molla

et al., 1998). Si ces résultats sont confirmés, on peut émettre l'hypothèse que les récepteurs NMDA que l'on étudie sont spécifiquement régulés par la D-sérine. C'est par exemple le cas dans l'hippocampe où il est montré que le co-agoniste préférentiel des récepteurs NMDA synaptiques est la D-sérine (Papouin et al., 2012). L'affinité des récepteurs NMDA composés des sous-unités GluN2C/D est similaire pour la glycine et la D-sérine (Chen et al., 2008; Dravid et al., 2010). Le ciblage spécifique des récepteurs NMDA étudiés par la D-sérine pourrait donc être dû à des disponibilités différentes des co-agonistes.

2.3) Rôle et source de la glycine dans l'effet observé

Dans la ME, la glycine provient des interneurons glycinergiques spinaux et est retrouvée, par microdialyse, en quantité suffisante dans la lamina II (2.6 μ M) pour jouer son rôle de co-agoniste des récepteurs NMDA (Whitehead et al., 2001a; Ahmadi et al., 2003). Les expériences réalisées montrent cependant qu'en absence de D-sérine, le NMDA n'induit plus aucun effet. On peut spéculer que la localisation des récepteurs NMDA impliqués dans l'effet soit inaccessible à la glycine libérée aux terminaisons mixtes GABA/glycine. En effet, les cellules gliales environnantes créent peut être une barrière physique infranchissable pour la glycine provenant de synapses voisines autour de la synapse où sont localisés les récepteurs NMDA synaptiques (Figure 40) (Cholet et al., 2002). De plus, il est possible que la glycine libérée aux terminaisons mixtes GABA/glycine soit rapidement recapturée par les transporteurs GlyT localisés sur la glie et les terminaisons des neurones glycinergiques (Adams et al., 1995; Zafra et al., 1995). Dans la lamina X, la blocage pharmacologique des transporteurs GlyT1 et GlyT2 facilite l'activation des récepteurs NMDA (Bradaïa et al., 2004). Il serait intéressant de bloquer ces transporteurs dans la lamina II afin de déterminer si une augmentation de la concentration extracellulaire de glycine pourrait remplacer la D-sérine dégradée par la DAAO.

En conclusion

Cette étude a permis de montrer que les cellules gliales de la lamina II chez la souris adulte saine régulent la transmission synaptique GABAergique de base de façon spécifique selon la nature neurochimique du neurone cible. Nos résultats montrent aussi un rôle important des cellules gliales dans l'effet du NMDA sur la transmission synaptique GABAergique. En effet, ces cellules facilitent l'effet du NMDA, potentiellement par la libération de D-sérine, seulement aux synapses GABAergiques contactant un neurone probablement glutamatergique.

En condition neuropathique, on sait que les cellules gliales présentent des modifications morphologiques et fonctionnelles. A titre d'exemple, en condition neuropathique, la microglie est impliquée dans le changement du gradient des ions chlorure menant à la mise en place de la sensibilisation centrale (Coull et al., 2003; Rivera et al., 2004; Coull et al., 2005; Thacker et al., 2009).

En ce qui concerne les astrocytes, on sait que ceux-ci ont une expression réduite des transporteurs du glutamate (GLT-1) à leur membrane en condition neuropathique (Rothstein et al., 1996; Sung et al., 2003; Inquimbert et al., 2012). Cela pourrait entraîner l'augmentation de la concentration de glutamate ambiant et l'activation des récepteurs NMDA. Il sera donc intéressant d'évaluer le rôle des cellules gliales dans la régulation de la transmission synaptique GABAergique dans des conditions neuropathiques.

Résultat partie III

Modulation de l'inhibition spinale par l'activation des récepteurs NMDA en condition de douleur neuropathique.

Contexte de l'étude :

Dans des conditions de douleur neuropathique, les fibres C développent une activité spontanée exacerbée (Wall et al., 1974; Liu et al., 2000; Wu et al., 2001). Ces fibres étant glutamatergiques, cela entraîne une augmentation de la libération de glutamate dans la ME. Notre hypothèse est que l'augmentation de la concentration de glutamate extracellulaire est suffisante pour activer les récepteurs NMDA impliqués dans la modulation et la plasticité de la transmission GABAergique et pourrait être en partie responsable du développement et du maintien des douleurs neuropathiques.

Pour répondre à cette hypothèse, nous utilisons le modèle du "spared nerve injury" (SNI) qui se caractérise par le développement d'une allodynie mécanique et thermique au froid fortes et irréversibles (Decosterd et Woolf, 2000). Nous avons cherché à savoir si on observait, dans ce modèle, une modulation de la transmission GABAergique spontanée et miniature ainsi qu'une activation endogène des récepteurs NMDA. De plus, nous avons analysé l'effet du NMDA sur des tranches de ME de souris neuropathique afin de le comparer avec l'effet du NMDA observé chez des souris naïves. Des expériences pharmacologiques préliminaires ont aussi été réalisées pour déterminer si la neuropathie induisait un changement dans la composition en sous-unités des récepteurs NMDA impliqués dans la modulation de la transmission synaptique GABAergique.

Des données récentes de la littérature montrent que le récepteur NMDA dans la ME est responsable du passage de la phase aiguë à la phase chronique de la neuropathie (Inquimbert et al., 2018). Pour notre étude, nous avons choisi deux points temporels pour réaliser nos enregistrements. Nous nous sommes placés à 1 et 2 semaines post-SNI pour étudier l'évolution de la neuropathie (Figure 41A). Sur les figures, la condition 1 semaine post-SNI est appelée « SNI 1s » et la condition 2 semaines post-SNI est appelée « SNI 2s ».

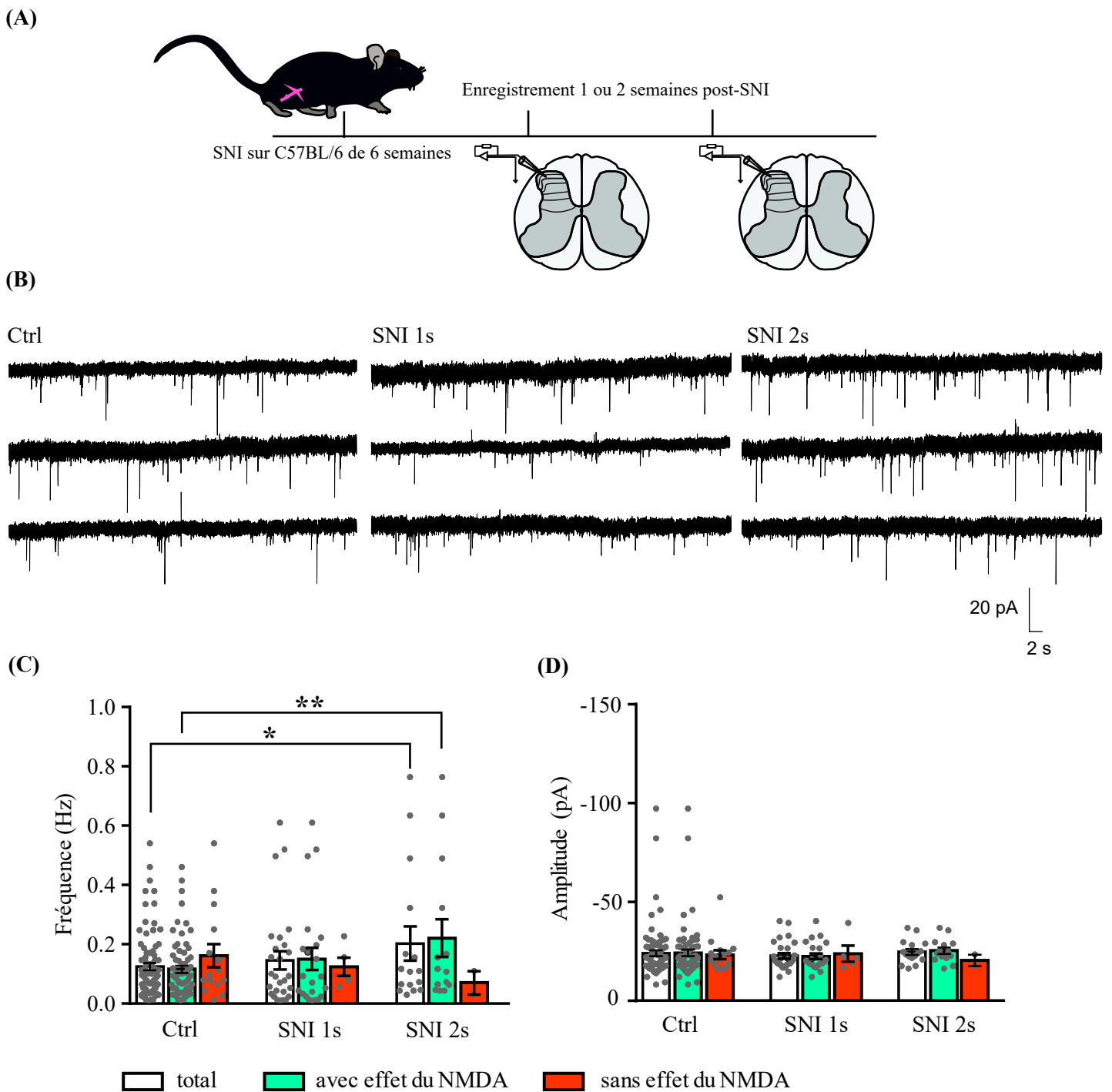


Figure 41 : Effet de la neuropathie sur la transmission GABAergique spontanée.

(A) La SNI est réalisée sur des souris C57BL/6 mâles âgées de 6 semaines environ et les enregistrements sont réalisés 1 ou 2 semaines après la SNI.

(B) Exemples de traces représentatives des sCPSIs GABAergiques de neurones de la lamina II en condition contrôle (ctrl), 1 semaine post-SNI (SNI 1s) et 2 semaines post-SNI (SNI 2s). (C-D) Effet de la neuropathie à 1 et 2 semaines post-SNI sur la fréquence (C) et l'amplitude (D) des sCPSIs GABAergiques. En blanc est représenté la totalité des neurones enregistrés. En bleu, les neurones où un effet du NMDA a été observé. En orange, les neurones où aucun effet du NMDA n'a été observé par la suite. Test de Student pour données appariées * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$.

1) Effet de la neuropathie sur la transmission synaptique GABAergique basale

1.1 Etude sur la transmission spontanée

Nous avons commencé par comparer les fréquences d'apparitions des sCPSIs GABAergiques obtenues sur des tranches de souris naïves (contrôle) et 1 semaine post-SNI (condition SNI 1s). Nous n'avons observé aucune variation de la fréquence d'apparition des sCPSIs GABAergiques entre ces deux conditions (Tableau 7). Cependant, 2 semaines post-SNI, la fréquence des sCPSIs GABAergiques est augmentée dans la lamina II par rapport à la condition contrôle si l'on considère l'ensemble des neurones (contrôle : 0.124 ± 0.009 Hz, $n=82$; SNI 2s : 0.202 ± 0.04 , $n=16$; test de Student pour données non appariées, $p=0.039$). De même, on observe à 2 semaines post-SNI cette augmentation de la fréquence des sCPSIs GABAergiques si on considère seulement le sous-groupe de neurones répondant à une application de NMDA (contrôle avec réponse : 0.116 ± 0.009 Hz, $n=67$; SNI 2s avec réponse : 0.221 ± 0.05 , $n=14$; test de Student pour données non appariées, $p=0.009$) (Figure 41C). L'amplitude des sCPSIs GABAergiques a été analysé suite au développement de la neuropathie et aucun changement de l'amplitude moyenne de ces courants n'a été observé (Tableau 7) (Figure 41D). Ces résultats indiquent une facilitation de la transmission synaptique GABAergique au sein du réseau de la lamina II 2 semaines après la réalisation de la SNI.

1.2 Etude sur la transmission miniature

Nous avons réalisé les mêmes expériences en présence de TTX ($0.5\mu\text{M}$) afin d'évaluer l'effet de la neuropathie sur la synapse GABAergique. Les résultats indiquent une augmentation de la fréquence d'apparition des mCPSIs GABAergiques dans le sous-groupe de neurones où le NMDA n'a eu aucun effet à 1 semaine post-SNI (contrôle : 0.096 ± 0.01 Hz, $n=30$; SNI 1s : 0.212 ± 0.08 Hz, $n=4$; test de Student pour données non appariées, $p=0.042$) (Figure 42A). A 2 semaines post-SNI, on retrouve l'augmentation de la fréquence d'apparition des mCPSIs GABAergiques sur le sous-groupe de neurones où le NMDA n'a eu aucun effet (contrôle : 0.096 ± 0.01 Hz, $n=30$; SNI 2s : 0.181 ± 0.03 Hz, $n=6$; test de Student pour données non appariées, $p=0.027$). En revanche, sur les neurones où le NMDA a eu un effet, aucun changement de la fréquence des mCPSIs GABAergiques n'a été constaté (Tableau 7). L'effet de la neuropathie sur l'amplitude des mCPSIs GABAergiques a été évalué et aucun effet n'est observé (tableau 7) (Figure 42B). Ces résultats montrent une augmentation de la fréquence d'apparition des mCPSIs GABAergiques en condition neuropathique sur les neurones où le NMDA n'a pas d'effet. On peut émettre l'hypothèse que la transmission synaptique GABAergique est modulé en condition neuropathique due à l'augmentation de glutamate ambiant.

Effet de la neuropathie sur les cinétiques des mCPSIs GABAergiques

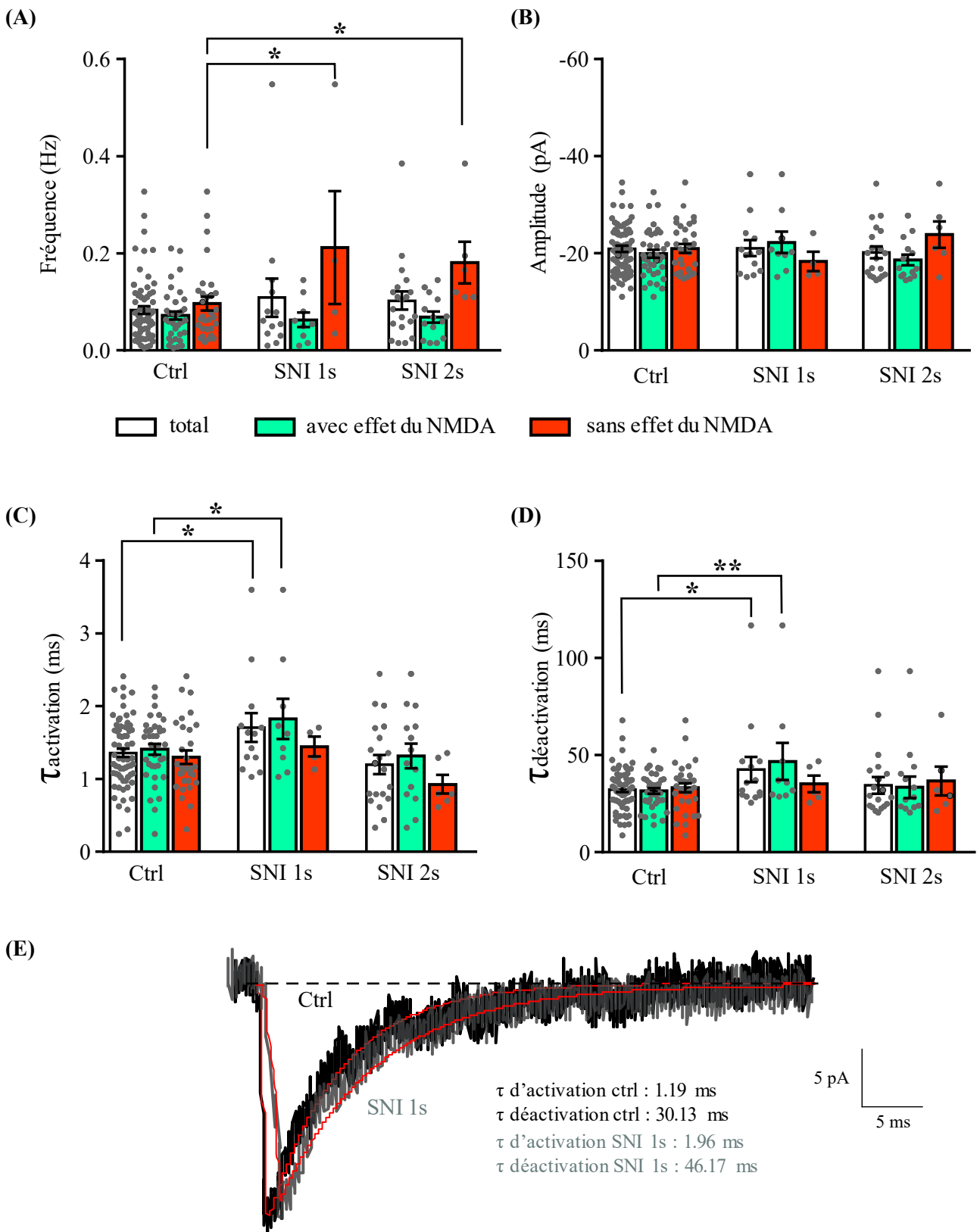


Figure 42 : Effet de la neuropathie sur la fréquence et les cinétiques des mCPSIs GABAergiques.

(A-B-C-D) Effet de la neuropathie à 1 semaine post-SNI (SNI 1s) et 2 semaines post-SNI (SNI 2s) sur la fréquence (A), l'amplitude (B), le τ activation (C) et le τ désactivation (D) des mCPSIs GABAergiques de la totalité des neurones et sur les neurones avec ou sans effet du NMDA. Test de Student pour données appariées * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$. (E) Traces moyennes obtenues à partir de 10 traces individuelles d'évènement GABAergiques miniature en condition contrôle (noir) et 1 semaine post-SNI (gris foncé).

Nous avons analysé l'effet du développement de la neuropathie sur les cinétiques d'activation (τ activation) des mCPSIs GABAergiques 1 semaine post-SNI (contrôle : 1.358 ± 0.05 ms, $n=66$; SNI 1s : 1.708 ± 0.13 ms, $n=14$; test de Student pour données non appariées, $p=0.028$). Nous avons constaté une augmentation du τ activation des mCPSIs GABAergiques à 1 semaine post-SNI comparé à la condition contrôle lorsque l'ensemble des neurones est considéré. Cette augmentation du τ activation des mCPSIs GABAergique à une semaine post-SNI est retrouvée dans le sous-groupe de neurones répondant à une application de NMDA (contrôle : 1.408 ± 0.006 ms, $n=36$; SNI 1s : 1.825 ± 0.2 ms, $n=9$; test de Student pour données non appariées, $p=0.043$) (Figure 42C et E).

Nous avons ensuite analysé l'effet du développement de la neuropathie sur les cinétiques de désactivation (τ désactivation) des mCPSIs GABAergiques 1 semaine post-SNI (contrôle : 32.27 ± 1.0 ms, $n=66$; SNI 1s : 42.59 ± 4.1 ms, $n=14$; test de Student pour données non appariées, $p=0.014$). Comme pour le τ activation, une augmentation du τ désactivation est observé 1 semaine post-SNI sur l'ensemble des neurones. On retrouve cet effet dans le sous-groupe de neurones où le NMDA a un effet (contrôle avec réponse : 31.52 ± 1.3 ms, $n=36$; SNI 1s avec réponse : 46.73 ± 6.5 ms, $n=9$; test de Student pour données non appariées, $p=0.009$) (Figure 42D et E).

Ces résultats montrent une augmentation des cinétiques d'activation et de désactivation des mCPSIs GABAergiques à 1 semaine post-SNI dans le sous-groupe de neurones où le NMDA a un effet.

2) Activation endogène des récepteurs NMDA au cours de la neuropathie

Notre hypothèse est que la libération endogène de glutamate dans des conditions de douleurs neuropathiques serait suffisante pour activer les récepteurs NMDA et moduler la transmission synaptique inhibitrice locale dans le réseau de la CD. Pour vérifier ce point, nous avons utilisé l'AP5, qui est un antagoniste des récepteurs NMDA, que nous avons perfusé sur nos tranches en condition contrôle, 1 semaine post-SNI et 2 semaines post-SNI. Le protocole que nous avons utilisé consistait en 5 minutes d'enregistrement en condition spontanée ou 10 minutes en condition miniature, suivi d'une application de NMDA ($100\mu\text{M}$; 1min). Sur les neurones répondant à la première application par une augmentation de la fréquence d'apparition des CPSI GABAergiques, une perfusion d'AP5 a été réalisée pendant 20 minutes avant la 2ème application de NMDA. Le protocole utilisé était le même que celui décrit dans la partie I des résultats.

2.1 Etude sur la transmission miniature

Effet de l'AP5 sur les mCPSIs GABAergiques en condition contrôle et neuropathique

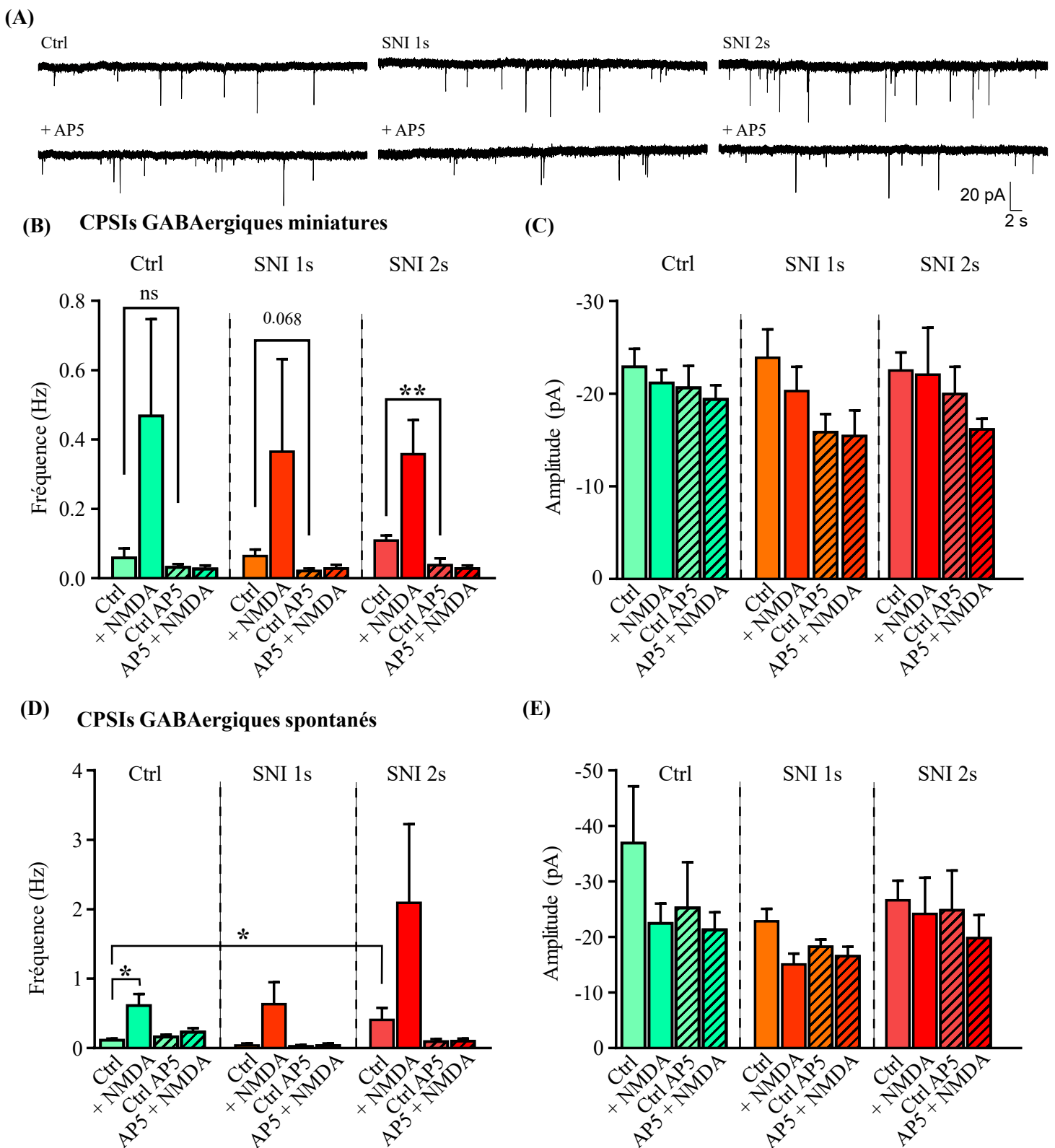


Figure 43 : Activation endogène des récepteurs NMDA durant la neuropathie.

Les données obtenues sans AP5 sont présentées sous forme de colonnes pleines en condition contrôle, 1 semaine après la SNI et 2 semaines après la SNI. Sur ces cellules, une première application de NMDA a été réalisée (+ NMDA). Une perfusion d'AP5 a ensuite été réalisée pendant 15 à 20 minutes (Ctrl AP5) et une deuxième application de NMDA a été effectuée en présence d'AP5 (AP5 + NMDA). Les données obtenues en présence d'AP5 sont présentées sous forme de colonnes hachurées. **(A)** Exemples de traces représentatives des mCPSIs GABAergiques de neurones de la lamina II en condition contrôle (ctrl), 1 semaine post-SNI (SNI 1s) et 2 semaines post-SNI (SNI 2s) en absence et en présence d'AP5. **(B-C)** Effet de la perfusion d'AP5 sur la fréquence **(B)** et l'amplitude **(C)** des mCPSIs GABAergiques en condition contrôle (ctrl), 1 semaine post-SNI (SNI 1s) et 2 semaines post-SNI. **(D-E)** Effet de la perfusion d'AP5 sur la fréquence **(D)** et l'amplitude **(E)** des sCPSIs GABAergiques en condition contrôle (ctrl), 1 semaine post-SNI (SNI 1s) et 2 semaines post-SNI (SNI 2s). Test de Student pour données appariées * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$.

L'effet du NMDA sera présenté en détail dans les figures 44 et 45. Dans un premier temps, nous avons évalué l'effet de la perfusion d'AP5 sur les mCPSIs GABAergiques. Dans la partie I, nous avons vu que l'application d'AP5 empêche l'effet modulateur du NMDA à la fois en conditions miniature et spontanée. Ici, on remarque que dans tous les neurones testés (n=6 en SNI 1s et n=5 en SNI 2s), l'effet du NMDA est bloqué par l'AP5 (Figure 43B). Nous avons ensuite comparé la fréquence des mCPSIs GABAergiques entre les conditions contrôle et contrôle+AP5 sur les tranches de souris naïves, 1 semaine post-SNI et 2 semaines post-SNI. Sur les tranches de souris naïves (contrôle), on remarque que la perfusion d'AP5 ne modifie pas la fréquence des mCPSIs GABAergiques (contrôle : 0.059 ± 0.027 Hz ; contrôle+AP5 : 0.032 ± 0.01 Hz, n=7 ; test de Student pour données appariées, p=0.18). De façon intéressante, on remarque qu'à 1 semaine post-SNI, la perfusion d'AP5 tend à réduire la fréquence de base des mCPSIs GABAergiques (SNI 1s : 0.064 ± 0.019 Hz ; SNI 1s+AP5 : 0.021 ± 0.008 Hz, n=6 ; test de Student pour données appariées, p=0.068). A 2 semaines post-SNI, cet effet de l'AP5 devient significatif (SNI 2s : 0.11 ± 0.014 Hz ; SNI 2s+AP5 : 0.0285 ± 0.008 Hz, n=6 ; test de Student pour données appariées, p=0.01) (Figure 43B). L'effet de l'AP5 sur les cinétiques des mCPSIs GABAergiques a été évalué. Celui-ci n'induit aucun changement significatif des caractéristiques cinétiques des mCPSIs GABAergiques (Figure 43C). Dans l'ensemble, ces résultats indiquent une activation endogène des récepteurs NMDA durant la neuropathie qui facilite la transmission GABAergique.

Composition en sous-unité des récepteurs NMDA en condition neuropathique

Nous avons voulu déterminer si une modification de la composition en sous-unité des récepteurs NMDA impliqué dans la facilitation de la transmission synaptique GABAergique avait lieu en condition neuropathique. Nous avons commencé par tester l'effet de l'ifenprodil ($3\mu\text{M}$; 20 min), un antagoniste des récepteurs NMDA contenant les sous-unités GluN2B, sur des tranches de souris à 1 semaine post-SNI (SNI 1s ifenprodil : 0.029 ± 0.005 Hz ; SNI 1s ifenprodil+NMDA : 0.422 ± 0.214 Hz, n=3 ; test de Student pour données appariées, p=0.2). Ces résultats non illustrés montrent que l'ifenprodil ne bloque pas l'effet du NMDA sur 3 neurones testés à 1 semaine post-SNI. L'ifenprodil a ensuite été perfusé sur des tranches de souris à 2 semaines post-SNI (SNI 2semaine ifenprodil : 0.038 ± 0.015 Hz ; SNI 2s ifenprodil+NMDA : 0.144 ± 0.06 Hz, n=4 ; test de Student pour données appariées, p=0.19). L'ifenprodil n'a pas eu d'effet sur les 4 neurones enregistrés à 2 semaines post-SNI.

Un essai avec l'UBP141 ($10\mu\text{M}$; 20 min), un antagoniste des récepteurs NMDA contenant les sous-unités NR2C/D, a été réalisé à 2 semaines post-SNI en condition miniature. Comme sur les tranches de souris naïves, l'UBP141 bloque l'effet du NMDA (n=2 sur 3 neurones).

Ces résultats préliminaires obtenues par des approches pharmacologiques semblent indiquer que les récepteurs NMDA impliqués dans la facilitation de la transmission synaptique GABAergique en conditions physiologiques basales et en condition neuropathique soient composés des sous-unités

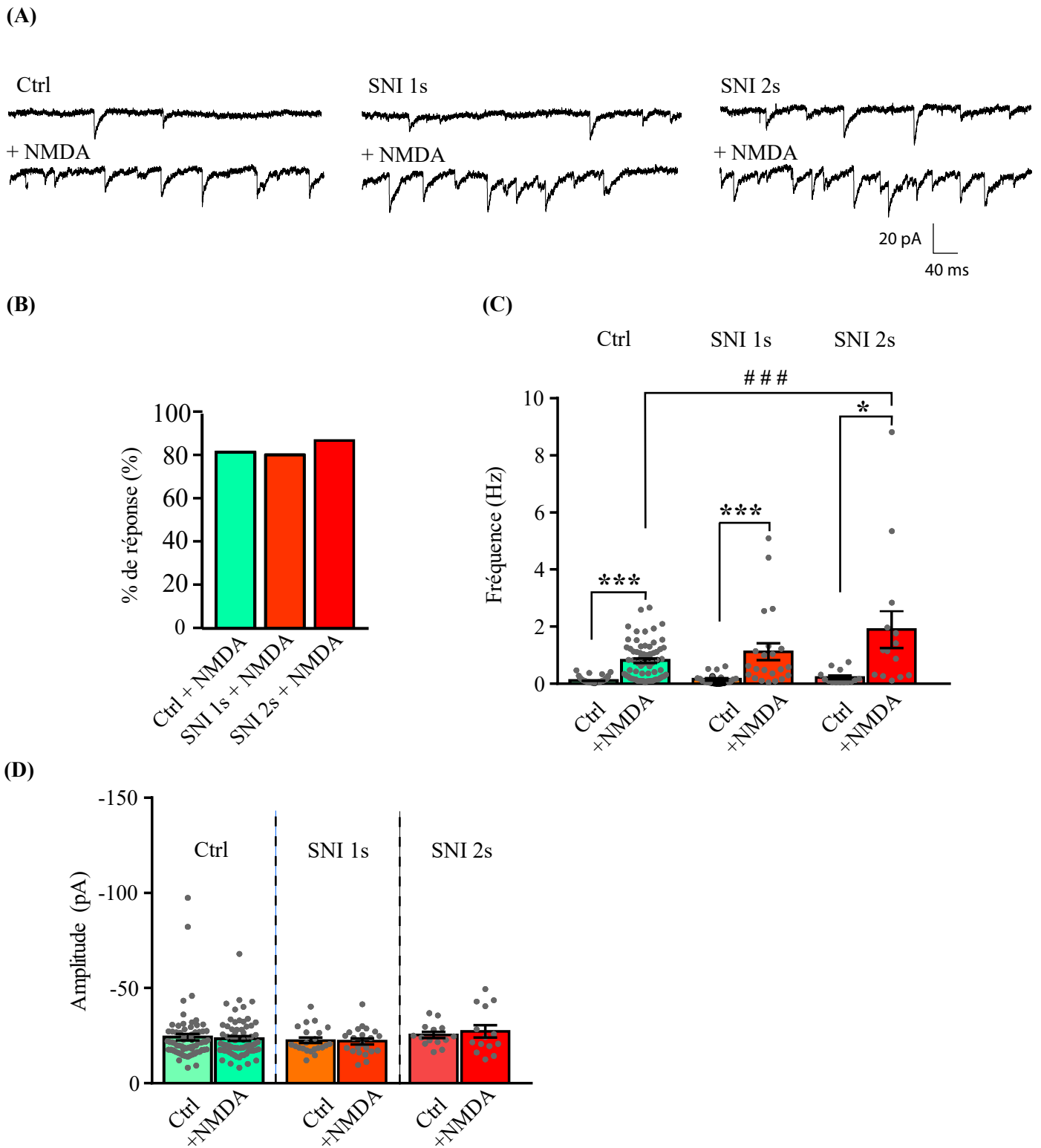


Figure 44 : Effet de l'application de NMDA sur la transmission GABAergique spontanée pendant la neuropathie.

(A) Exemples de traces représentatives des sCPSIs GABAergiques de neurones de la lamina II en condition contrôle, 1 semaine post-SNI (SNI 1s) et 2 semaines post-SNI (SNI 2s) avant et après application de NMDA (100 μ M). (B) Fraction de neurones répondant à l'application de NMDA en condition contrôle, SNI 1s et SNI 2s. (C-D) Effet du NMDA sur la fréquence (C) et l'amplitude (D) des sCPSIs GABAergiques en condition contrôle, SNI 1s et SNI 2s. Test de Student pour données appariées * $p < 0.05$; *** $p < 0.001$. Test de Student pour données non appariées # # # $p < 0.001$.

GluN2C/D. Il n'y aurait donc pas de changement des sous-unités impliquées entre les conditions contrôle et neuropathique. Ces résultats restent néanmoins à être confirmés.

2.2 Etude sur la transmission spontanée

Comme en condition miniature, l'application d'AP5 en condition spontanée bloque l'effet du NMDA (n= 3 en SNI 1s et n=4 en SNI 2s) (Figure 43D). L'absence de significativité est sous doute liée au faible nombre de neurones enregistrés dans ces conditions. L'effet de l'AP5 sur la fréquence de base des sCPSIs GABAergiques est aussi difficile à évaluer à cause du faible nombre de neurones enregistrés. On peut cependant noter que la perfusion d'AP5 ne diminue pas la fréquence des sCPSIs GABAergiques sur des tranches de souris naïves (Tableau 7). En revanche, on note une tendance à la diminution de la fréquence des sCPSIs GABAergiques à 2 semaines post-SNI après la perfusion d'AP5 (SNI 2s : 0.41 ± 0.17 Hz ; SNI 2s+AP5 : 0.094 ± 0.04 Hz, n=4 ; test de Student pour données appariées, p=0.13) (Figure 43D). On retrouve aussi l'augmentation de la fréquence d'apparition des sCPSIs GABAergiques chez les souris à 2 semaines post-SNI par rapport aux souris naïves (Figure 43D) (contrôle : 0.115 ± 0.024 Hz ; SNI 2s contrôle : 0.405 ± 0.17 Hz ; test de Student pour données appariées, p=0.028). Dans ces conditions, nous n'avons pas observé d'effet sur l'amplitude des sCPSIs GABAergiques (Figure 43E) (Tableau 7).

3) Conséquence de la neuropathie sur l'effet du NMDA

Afin de déterminer si la neuropathie modifie l'effet du NMDA observé sur des tranches de souris naïves, des applications de NMDA ont été réalisées sur des tranches 1 et 2 semaines post-SNI.

3.1 Etude sur la transmission spontanée

En premier lieu, nous avons constaté que la fraction de neurones répondant à l'application de NMDA en condition spontanée ne varie pas entre les différentes conditions. 81.7% des neurones (n=67 sur 82 neurones) présentent une augmentation de la fréquence d'apparition des sCPSIs GABAergiques suite à une application de NMDA en condition contrôle. 81.5% des neurones (n= 22 sur 27 neurones) présentent une augmentation de la fréquence d'apparition des sCPSIs GABAergiques suite à une application de NMDA 1 semaine post-SNI (test exact de Fisher entre condition contrôle et SNI 1s, p=1). Enfin, 87.5% des neurones (n= 14 sur 16 neurones) présentent une augmentation de la fréquence d'apparition des sCPSIs GABAergiques suite à une application de NMDA 2 semaines post-SNI (test exact de Fisher entre condition contrôle et SNI 2s, p=0.73) (Figure 44B). On n'observe donc pas d'effet de la neuropathie sur la proportion de neurones qui répondent au NMDA.

En termes d'effet du NMDA, nous avons observé une augmentation de la fréquence des sCPSIs GABAergiques suite à l'application de NMDA à 1 semaine post-SNI (SNI 1s : 0.15 ± 0.04 Hz ; SNI

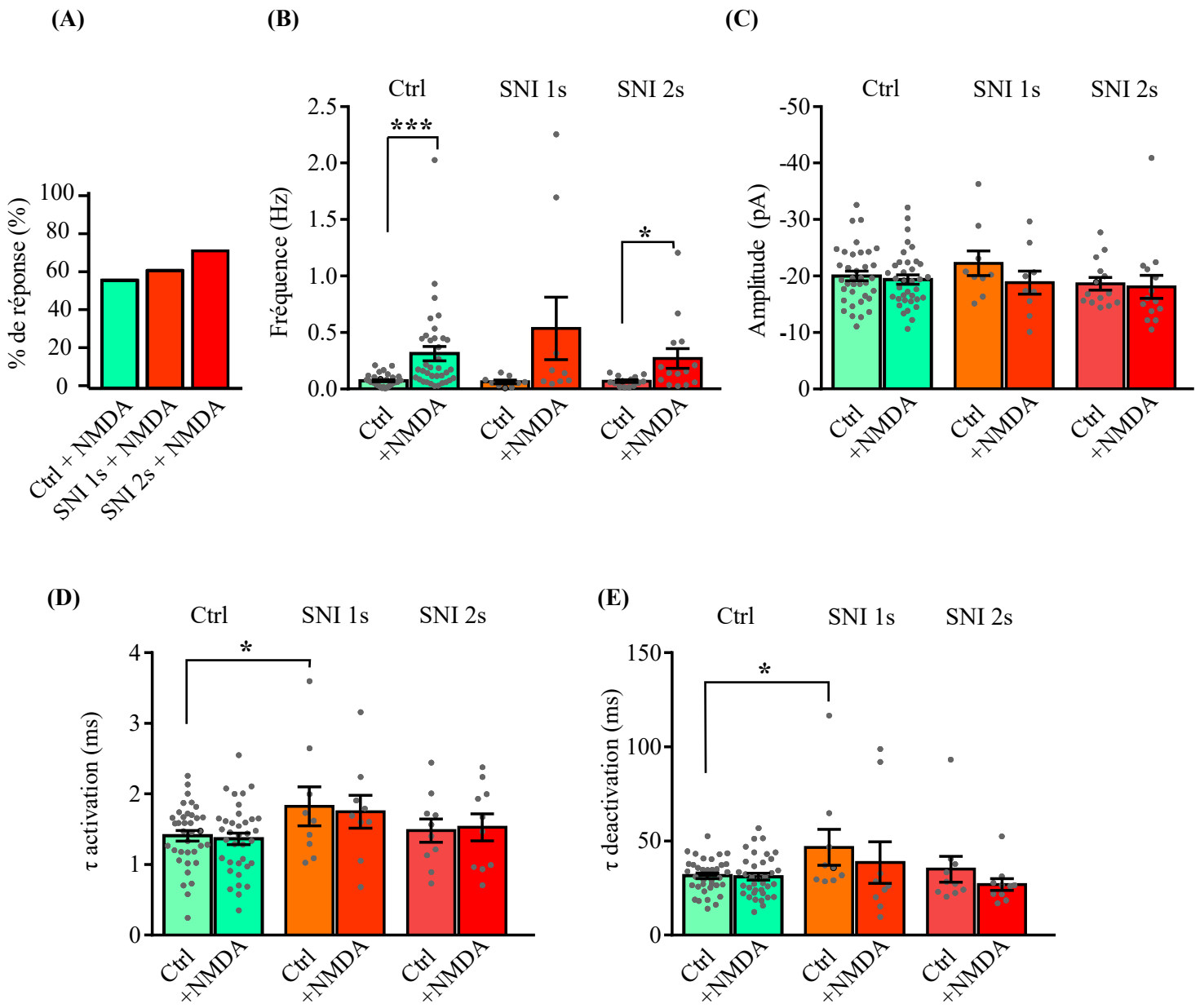


Figure 45 : Effet de l'application de NMDA sur la transmission GABAergique miniature suite au développement de la neuropathie.

(A) Fraction de neurones répondant à l'application de NMDA en condition contrôle (ctrl), 1 semaine post-SNI (SNI 1s) et 2 semaines post-SNI (SNI 2s). **(B-C-D-E)** Effet du NMDA sur la fréquence **(B)**, l'amplitude **(C)**, le τ activation **(D)** et le τ déactivation **(E)** des mCPSIs GABAergiques en condition contrôle, SNI 1s et SNI 2s. Test de Student pour données appariées * $p < 0.05$; *** $p < 0.001$.

1s+NMDA : 1.12 ± 0.29 Hz, n=22 ; test de Student pour données appariées, p=0.0019). Cette augmentation de la fréquence des sCPSIs GABAergiques dû au NMDA est retrouvé à 2 semaines post-SNI (SNI 2s : 0.221 ± 0.06 Hz ; SNI 2s+NMDA : 1.897 ± 0.65 Hz, n=14 ; test de Student pour données appariées, p=0.017) (Figure 44C). Il est intéressant de noter que l'amplitude de l'effet du NMDA 2 semaines post-SNI est plus important que dans la condition contrôle (contrôle+NMDA : 0.809 ± 0.079 Hz n=67 ; SNI 2s+NMDA : 1.897 ± 0.65 Hz, n=14 ; test de Student pour données non appariées, p=0.0018) (Figure 44C). Aucun changement n'a été observé pour les caractéristiques cinétiques des sCPSIs GABAergiques suite à l'application de NMDA en condition neuropathique (tableau 7 et Figure 44D). Ces résultats indiquent que l'effet du NMDA est potentialisé en condition de douleur neuropathique.

3.2 Etude sur la transmission miniature

En condition miniature, nous avons noté une tendance à l'augmentation de la proportion de neurones répondant à l'application de NMDA à 1 semaine puis 2 semaines post-SNI. 54.5% des neurones (n= 36 sur 66 neurones) ont répondu à l'application de NMDA en condition contrôle contre 60% des neurones (n= 9 sur 13 neurones) une semaine post-SNI (test exact de Fisher entre condition contrôle et SNI 1s, p=0.38). A 2 semaine post-SNI, 70% des neurones (n= 14 sur 20 neurones) répondent à l'application de NMDA (test exact de Fisher entre condition contrôle et SNI 2s, p=0.30) (Figure 45A).

Nous avons évalué la fréquence des mCPSIs GABAergiques après application de NMDA à 1 et 2 semaine post-SNI. A 1 semaine post-SNI, on observe une tendance à l'augmentation de la fréquence des mCPSIs GABAergiques après l'application de NMDA (SNI 1s : 0.063 ± 0.015 Hz ; SNI 1semaine+NMDA : 0.54 ± 0.28 Hz, n=9 ; test de Student pour données appariées, p=0.10) (Figure 45B). A 2 semaines post-SNI, l'effet du NMDA est significativement augmenté (SNI 2s : 0.069 ± 0.017 Hz ; SNI 2s+NMDA : 0.27 ± 0.09 Hz, n=14 ; test de Student pour données appariées, p=0.026). Le NMDA n'a pas eu d'effet sur les cinétiques des mCPSIs GABAergiques (Figure 45C, D et E).

Tableau 7 : Caractéristiques des CPSI spontanée et miniature dans les différentes conditions présentés dans la partie III en absence ou en présence de NMDA.

Transmission spontanée		Ctrl		SNI 1 semaine		SNI 2 semaines	
		Baseline	+NMDA	Baseline	+NMDA	Baseline	+NMDA
Cellules avec un effet du NMDA	Fréquence (Hz)	0.116±0.01	0.809±0.08 n= 67	0.15±0.04	1.12±0.29 n= 22	0.221±0.06	1.897±0.65 n= 14
	Amplitude (pA)	-24.2±1.67	-23.5±1.21 n= 67	-22.47±1.47	-22.01±1.53 n= 22	-25.3±1.6	-27.17±3.22 n= 14
Cellules sans effet du NMDA	Fréquence Hz)	0.161±0.04	0.138±0.03 n= 15	0.124±0.03	0.111±0.03 n= 5	0.07±0.04	0.065±0.03 n= 16
	Amplitude (pA)	-23.2±2.2	-25.06±3.38 n= 15	-23.76±4.01	-18.35±1.86 n= 5	-19.13±1.32	-20±3.94 n= 16

Transmission miniature		Ctrl		SNI 1 semaine		SNI 2 semaines	
		Baseline	+NMDA	Baseline	+NMDA	Baseline	+NMDA
Cellules avec un effet du NMDA	Fréquence	0.072±0.009	0.314±0.062 n= 36	0.063±0.015	0.54±0.28 n= 9	0.069±0.017	0.27±0.09 n= 14
	Amplitude	-19.99±0.85	-19.39±0.82 n= 36	-22.24±2.19	-18.8±2.04 n= 9	-18.63±1.11	-18.63±2.03 n= 14
	τ activation	1.41±0.07	1.37±0.08 n= 36	1.83±0.28	1.75±0.23 n= 9	1.38±0.16	1.38±0.17 n= 14
	τ désactivation	31.52±1.5	31.02±1.82 n= 36	46.73±9.56	38.61±11 n= 9	33.48±5.62	26.6±2.48 n= 14
Cellules sans effet du NMDA	Fréquence	0.096±0.014	0.086±0.018 n= 30	0.21±0.12	0.17±0.11 n= 4	0.18±0.04	0.15±0.04 n= 6
	Amplitude	-20.99±0.9	-18.93±1.11 n= 30	-18.33±2.02	-19.15±2.21 n= 4	-23.86±2.74	-22.94±3.37 n= 6
	τ activation	1.3±0.09	1.37±0.1 n= 30	1.44±0.14	2.28±0.34 n= 4	0.93±0.13	1.28±0.17 n= 6
	τ désactivation	33.17±2.35	31.78±2.39 n= 30	32.02±5.14	34.23±3.72 n= 4	36.39±7.41	39.39±9.5 n= 6

Discussion partie III

1) Modulation de la transmission synaptique inhibitrice de base en condition neuropathique

1.1) La transmission synaptique GABAergique spontanée est augmentée en condition neuropathique

Nous avons observé, 2 semaines post-SNI, une augmentation de la fréquence d'apparition des sCPSIs GABAergiques sans changement de l'amplitude de ces courants (Figure 41C et 43D). Ce résultat indique une augmentation de la probabilité de libération synaptique de GABA au sein du réseau de la lamina II à 2 semaine post-SNI. Les réseaux synaptiques au sein des CDME ont une activité accrue dans des conditions de douleurs neuropathiques (Wall et al., 1974; Liu et al., 2000; Wu et al., 2001), en partie responsable de l'apparition des symptômes d'allodynie et d'hyperalgésie (Latremoliere et Woolf, 2009). Il n'est pas étonnant d'observer une augmentation de la transmission synaptique GABAergique spontanée étant donné que l'ensemble du réseau est dans un état sensibilisé.

D'autre part, l'augmentation de la fréquence des sCPSIs GABAergiques a lieu spécifiquement sur les neurones où un effet du NMDA est observé. D'après nos résultats, on peut ainsi suggérer que l'augmentation de la probabilité de libération de GABA a principalement lieu aux synapses GABAergiques contactant un neurone GABAergique. Dans la lamina II, une augmentation de l'amplitude des mCPSIs glycinergiques, impliquant l'activation des récepteurs NMDA, a été mise en évidence à une synapse glycinergique contactant un neurone GABAergique (Kloc et al., 2019). Ces mécanismes pourraient éventuellement mener à la désinhibition du réseau et jouer un rôle dans le développement et le maintien de la neuropathie.

1.2) Activation endogène des récepteurs NMDA en condition neuropathique

Si on s'affranchit de l'activité de décharge de potentiels d'actions dans le réseau en ajoutant de la TTX à notre milieu extracellulaire, on constate sur des tranches de souris naïves que l'AP5, un antagoniste des récepteurs NMDA, ne modifie pas la fréquence ou l'amplitude des mCPSIs GABAergiques. Cela est cohérent avec le fait que les récepteurs NMDA sont dans un état dit « silencieux » dans le réseau de la lamina II en condition physiologique de base et ne participent pas ou peu à la transmission synaptique excitatrice (Petrenko et al., 2003). En condition neuropathique, 1 et 2 semaines post-SNI, nous avons constaté que la perfusion d'AP5 induit une diminution de la fréquence

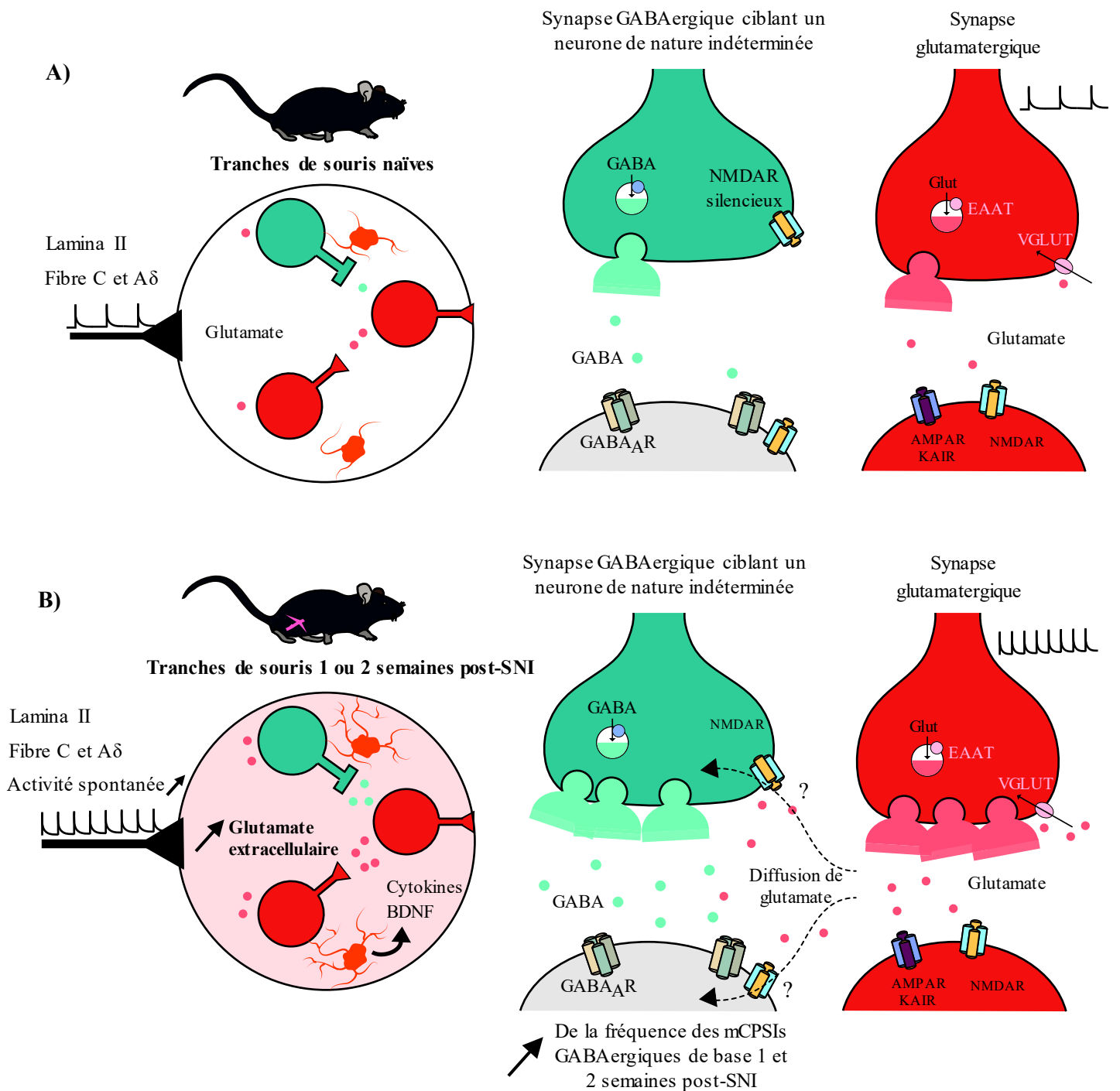


Figure 46 : Modulation de la transmission GABAergique en condition neuropathique et activation endogène des récepteurs NMDA

A) Nos résultats montrent que la perfusion d'AP5 sur des tranches de souris saines n'a aucun effet sur la transmission synaptique GABAergique. Les récepteurs NMDA sont dans un état dit « silencieux » dans les conditions physiologiques de base aux synapses GABAergiques.

B) 1 et 2 semaines post-SNI, les fibres afférentes développent une activité exacerbée. Cela induit une augmentation de la concentration de glutamate extracellulaire. Dans des conditions neuropathiques, on observe une augmentation de la fréquence des sCPSIs GABAergiques sans changement de l'amplitude des événements à 2 semaines post-SNI comparés à la fréquence des sCPSIs GABAergiques observée sur des tranches de souris saines.

En condition miniature, la fréquence des mCPSIs GABAergiques augmente à 1 et 2 semaines post-SNI dans les neurones où le NMDA n'a pas d'effet. Aucun changement d'amplitude de ces courants n'est observé. La perfusion d'AP5 sur ces tranches induit une diminution de la fréquence des mCPSIs GABAergiques. Ces résultats indiquent que les récepteurs NMDA auparavant silencieux sont maintenant activés et modulent la transmission synaptique GABAergique. Le débordement de glutamate en condition SNI peut être à l'origine de cette activation endogène et de l'augmentation de la fréquence des mCPSIs GABAergiques observée. Les neurones GABAergique sont représentés en bleu, les neurones glutamatergiques en rouge et les neurones de nature neurochimique non déterminés en gris.

des mCPSIs GABAergiques (Figure 43) sans changement de l'amplitude de ces courants. On en conclut qu'une activation endogène des récepteurs NMDA a lieu dans la lamina II en condition neuropathique. L'activation des récepteurs NMDA que l'on observe est cohérente avec les résultats d'autres études obtenues par l'injection intrathécale d'antagonistes des récepteurs NMDA en condition neuropathique. Dans ces études, il est montré un effet anti-nociceptif de ces antagonistes ce qui indique une activation endogène de ces récepteurs en condition neuropathique (Seltzer et al., 1991; Yamamoto et Yaksh, 1992; Tal et Bennett, 1994; Carlton et Hargett, 1995; Bennett et al., 2000).

Sources de glutamate envisagées

Nous avons montré, dans la première partie des résultats, que la diffusion latérale de glutamate induite par le blocage pharmacologique des transporteurs du glutamate sur des tranches de souris saines induisait l'activation des récepteurs NMDA. En condition neuropathique, les fibres afférentes libèrent plus de glutamate dans la lamina II (Wall et al., 1974; Liu et al., 2000; Wu et al., 2001). Cette libération accrue n'est pas compensée par une augmentation de la recapture du glutamate (Inquimbert et al., 2012). L'augmentation de la concentration de glutamate extracellulaire qui en résulte pourrait être responsable de l'activation endogène des récepteurs NMDA observée dans nos conditions (Figure 46B).

Les cellules gliales pourraient aussi jouer un rôle dans cette activation endogène des récepteurs NMDA. En effet, en condition neuropathique, il a été montré sur des neurones et cellules gliales de ME en culture que le blocage des transporteurs du glutamate exprimés par la glie (GLT-1) induit l'augmentation de la concentration extracellulaire de glutamate (Rothstein et al., 1996). De plus, il est montré en condition neuropathique une diminution d'expression des transporteurs du glutamate par la glie (Sung et al., 2003). On peut donc penser que les cellules gliales sont impliquées dans la modulation de la transmission synaptique GABAergique en condition neuropathique.

Conséquences fonctionnelles au sein du réseau

A long terme, l'activation des récepteurs NMDA au sein du réseau de la lamina II pourrait induire de profondes modifications de la transmission synaptique. Cette activation pourrait par exemple jouer un rôle dans la dérégulation de l'homéostasie du chlorure observée en condition neuropathique par un effet sur les transporteurs KCC2 (Lee et al., 2011; Zhou et al., 2012; Li et al., 2016). D'autre part, si l'activation endogène des récepteurs NMDA a lieu à l'élément présynaptique des neurones GABAergiques, elle pourrait mener à la perte de ces neurones GABAergiques par des mécanismes d'apoptose (Scholz et al., 2005; Yowtak et al., 2013; Inquimbert et al., 2018). La perte de ce contrôle inhibiteur pourrait être en partie responsable de la chronicisation des états douloureux. Les récepteurs NMDA activés de façon endogène dans les CDME en condition neuropathique sont donc une cible thérapeutique très intéressante. La délétion conditionnelle de la sous-unité GluN1 des récepteurs NMDA dans la CD a déjà apporté des résultats très prometteurs dans l'inhibition de la chronicisation des douleurs neuropathiques (Inquimbert et al., 2018).

1.3) Modulation de la transmission synaptique inhibitrice GABAergique miniature en condition neuropathique

En condition miniature, nous avons constaté une augmentation de la fréquence des mCPSIs GABAergiques sans changement de l'amplitude de ces courants à 1 et 2 semaines post-SNI sur les neurones où aucun effet du NMDA n'a été observé par la suite (Figure 42). Ces résultats semblent indiquer une augmentation de la probabilité de libération de GABA aux synapses où le NMDA n'a pas d'effet (Figure 46B). Toutefois nos expériences de perfusion d'AP5 tendent à indiquer, de façon non significative, une augmentation de la fréquence des mCPSIs GABAergiques à 1 et 2 semaines post-SNI sur les neurones où un effet du NMDA a été observé après application de NMDA (Figure 43B). Des enregistrements supplémentaires devraient permettre de déterminer si la neuropathie facilite la transmission GABAergique à un type spécifique de synapses ou non. Des études indiquent une diminution de la fréquence des mCPSIs GABAergiques en conditions neuropathiques (Yowtak et al., 2011; Inquimbert et al., 2018). Ces résultats opposés aux nôtres s'expliquent par le fait que ces études ont été réalisées en présence d'antagonistes des récepteurs NMDA dans le milieu extracellulaire, tels que l'acide kynurénique ou l'AP5. L'activation endogène des récepteurs NMDA et l'effet sur la transmission GABAergique était donc bloqué.

En condition miniature, les résultats indiquent une augmentation de la probabilité de libération de GABA aux synapses GABAergiques où le NMDA n'induit pas d'effet. Nous avons vu précédemment que les neurones GABAergiques reçoivent presque toujours une transmission synaptique GABAergique augmentée après application de NMDA. On peut donc penser que les synapses où le NMDA n'a pas d'effet sont les synapses GABAergiques contactant un neurone glutamatergique. On peut ensuite émettre l'hypothèse que l'activation des récepteurs NMDA à ces synapses soit due à l'augmentation de glutamate ambiant en condition neuropathique. Cette activation augmenterait la probabilité de libération de GABA sur les neurones excitateurs et permettrait ainsi de rétablir l'inhibition synaptique GABAergique. Cela diminuerait la transmission synaptique excitatrice durant la neuropathie, protégeant ainsi le réseau spinal d'une activité spontanée exacerbée. Il faut cependant noter qu'une facilitation de la transmission GABAergique en condition neuropathique ne permettra pas forcément de maintenir les fonctions principales de la transmission synaptique inhibitrice (Tableau 1) (Sandkühler, 2009). En effet, la diminution de l'expression du co-transporteur KCC2 décrite en condition neuropathique induit une hyperpolarisation plus faible des neurones lors de l'ouverture des récepteurs GABA_A qu'en condition physiologique (van den Pol et al., 1996; Coull et al., 2003; Coull et al., 2005).

1.4) Effet de la neuropathie sur les cinétiques des récepteurs GABA_A

Nous avons observé 1 semaine post-SNI, une augmentation du τ activation et du τ déactivation des mCPSIs GABAergiques (Figure 42). Dans les ganglions rachidiens, la composition en sous-unités des récepteurs GABA_A change en condition neuropathique (Obata et al., 2003). Une modification de la composition en sous-unité des récepteurs GABA_A dans la ME est envisageable et pourrait être à l'origine des augmentations des cinétiques que nous observons (Lavoie et al., 1997). La modification des cinétiques des mCPSIs GABAergiques pourrait être impliquée dans des régulations fines de la transmission synaptique GABAergique en conditions neuropathiques.

2) Effet de la neuropathie dans la facilitation de la transmission synaptique GABAergique observée après l'application de NMDA

Conséquence de la neuropathie sur l'activation des récepteurs NMDA

Au cours de la neuropathie, l'activité des récepteurs NMDA change et modifie le traitement des informations nociceptives (Latremoliere et Woolf, 2009). Cependant le rôle de ces récepteurs sur la modulation et/ou plasticité de la transmission GABAergique n'a jamais été étudié dans la lamina II. Dans le but d'étudier ces mécanismes, nous avons comparé l'effet d'une application de NMDA en condition physiologique à une application de NMDA à 1 et 2 semaines post-SNI.

Nous avons observé que la neuropathie ne modifie pas la proportion de neurones, déjà très élevée, qui répond au NMDA en condition spontanée. En condition miniature, nous avons cependant noté une tendance à l'augmentation, non significative, de la proportion de neurones présentant une augmentation de la fréquence de mCPSIs GABAergiques suite à l'application de NMDA (Figure 44 et 45). Cette tendance à l'augmentation de la proportion de neurones qui répond au NMDA pourrait éventuellement indiquer une nouvelle expression de récepteurs NMDA en condition neuropathique. Cette tendance à l'augmentation de la proportion de neurones répondant au NMDA pourrait aussi être due à la diminution du nombre de synapses GABAergiques où le NMDA n'induit pas d'effet. D'après nos résultats, les synapses où le NMDA induit plus rarement un effet sont les synapses GABAergiques contactant un neurone glutamatergique. La mort cellulaire des interneurons inhibiteurs, contactant des neurones glutamatergiques, pourrait correspondre au 20% de perte d'interneurones GABAergiques observée en condition neuropathique (Scholz et al., 2005; Yowtak et al., 2013; Inquimbert et al., 2018).

En termes d'amplitude d'effet du NMDA, nos résultats montrent que l'augmentation de la fréquence des sCPSIs GABAergiques suite à une application de NMDA en condition spontanée est significativement plus importante à 2 semaines post-SNI qu'en condition contrôle (Figure 44). En condition neuropathique, l'activité du réseau spinal est exacerbée et pourrait expliquer cette augmentation de l'amplitude de l'effet. On pourrait aussi envisager que des mécanismes de plasticités

de la transmission synaptique GABAergique aient lieu en condition neuropathique et renforcent la transmission synaptique GABAergique.

En conclusion

Ces résultats montrent pour la première fois dans la lamina II une activation endogène des récepteurs NMDA modulant la transmission synaptique GABAergique en condition neuropathique. Les résultats préliminaires indiquent que ces récepteurs sont composés des sous-unités GluN2C/D peu sensibles au blocage par les ions Mg^{2+} . Leur activation pourrait donc avoir lieu potentiellement en absence de dépolarisation de la membrane. On pourrait par exemple imaginer des récepteurs de ce type exprimés aux terminaisons de synapses GABAergiques et qui pourraient faciliter la libération de GABA lorsque la concentration extracellulaire de glutamate augmente comme en condition neuropathique.

L'activation endogène des récepteurs NMDA et l'augmentation de la transmission GABAergique que nous avons observées pourraient jouer un rôle clef dans la mise en place ainsi que dans le maintien de la neuropathie. En effet, nous avons mis en évidence que l'activation des récepteurs NMDA augmente la probabilité de libération de GABA sur tous les neurones GABAergiques enregistrés. Au sein du réseau de la lamina II, cela pourrait mener à un mécanisme de désinhibition. La perte de ce contrôle inhibiteur pourrait être en partie responsable de l'augmentation de l'activité excitatrice observé en condition neuropathique.

A plus long terme, si on considère que les récepteurs NMDA sont exprimés par les interneurones inhibiteurs, on peut spéculer que l'exposition prolongée de glutamate sur ces récepteurs NMDA initie des processus d'apoptose menant à la diminution du nombre d'interneurones inhibiteurs dans le réseau spinal.

*Discussion et
Perspectives*

Principaux résultats obtenus

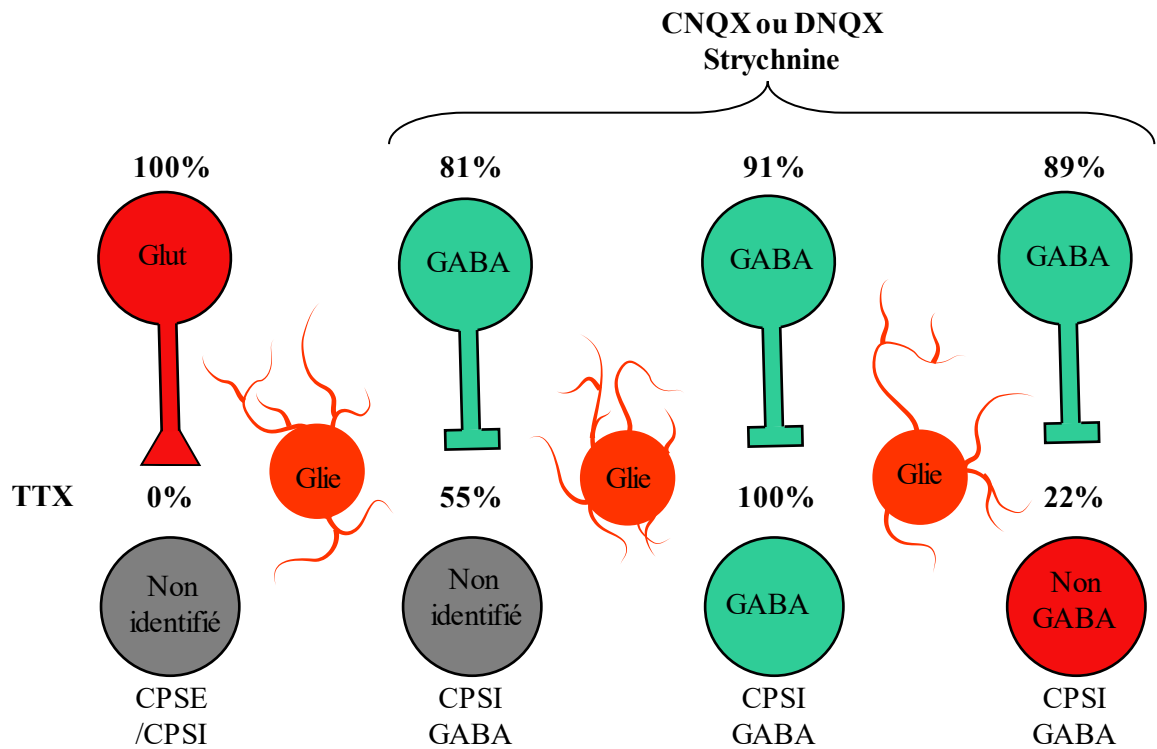
Au cours de ces travaux, nous avons caractérisé l'effet du NMDA sur la transmission synaptique inhibitrice chez des souris saines et dans un modèle de douleur neuropathique, en enregistrant les neurones de la lamina II de la ME de souris. Les principaux résultats obtenus sont résumés en trois points.

1. Nous avons décrit une facilitation de la transmission synaptique GABAergique par l'application de NMDA. Cet effet implique l'activation des récepteurs NMDA contenant les sous-unités GluN2C/D. Il apparaît que cette facilitation cible principalement les interneurons GABAergiques dans la lamina II. Un tel mécanisme pourrait mener à la désinhibition du réseau et donc jouer un rôle important dans le traitement des informations nociceptives. Enfin, une augmentation extracellulaire de glutamate au sein du réseau de la lamina II, induite par le blocage de la recapture du glutamate, est suffisante pour induire la facilitation de la libération de GABA observée et dépend de l'activation des récepteurs NMDA.

2. Nous avons cherché à déterminer le rôle des cellules gliales dans l'effet du NMDA. Les résultats obtenus ont permis de montrer que la transmission synaptique GABAergique de base dans la ME requiert un réseau de cellules gliales fonctionnelles. De plus, lorsque le métabolisme des cellules gliales est bloqué par du fluorocitrate, l'application de NMDA n'induit plus d'effet modulateur de la transmission synaptique GABAergique aux synapses GABAergiques ciblant un neurone glutamatergique, possiblement dû au déficit de libération de D-sérine dans ces conditions.

3. Enfin, nous avons procédé à la caractérisation de l'effet du NMDA chez des souris sur lesquelles une SNI a été réalisée. Dans ces conditions neuropathiques, la transmission GABAergique est facilitée à 2 semaines suivant la SNI. L'utilisation d'antagonistes spécifiques a permis de révéler que cette modulation de la transmission GABAergique était due, au moins en partie, à une activation endogène des récepteurs NMDA contenant les sous-unités GluN2C/D. De plus, il apparaît que l'amplitude de l'effet facilitateur du NMDA sur la transmission GABAergique est plus importante 2 semaines après la SNI. Ces données pourraient indiquer la mise en place de mécanismes de plasticité de la transmission GABAergique en condition neuropathique.

A)



B)

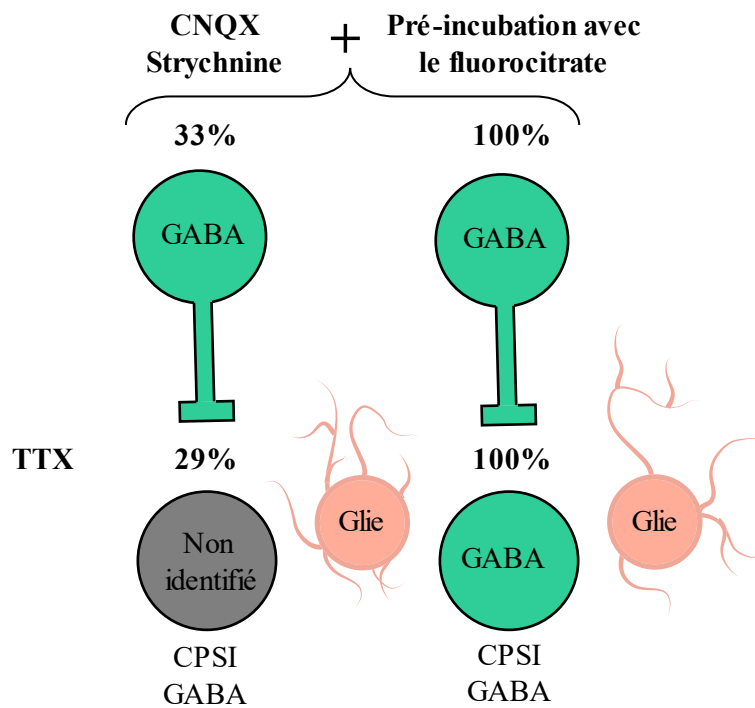


Figure 47 : Effet de l'activation des récepteurs NMDA dans la lamina II et rôle de la glie dans leurs activations.

A) l'activité au sein du réseau de la lamina II a été enregistrée en présence de CNQX ou DNQX et de strychnine, sauf pour l'étude de la transmission synaptique excitatrice. Nous avons ajouté de la TTX à notre milieu extracellulaire pour étudier l'effet de l'activation des récepteurs NMDA à la synapse. Les proportions de réponses en conditions spontanée sont présentées sur le corps cellulaire des neurones présynaptiques. Les proportions de réponses en conditions miniatures sont présentées à la synapse.

B) La pré-incubation des tranches dans le fluorocitrate a permis de mettre en évidence une régulation spécifique des synapses GABAergiques par la glie.

Les neurones GABAergique sont représentés en bleu, les neurones glutamatergiques en rouge, les neurones de nature neurochimique non déterminés en gris et les cellules gliales en orange. Les cellules gliales dont le métabolisme est bloqué sont représentées en orange clair.

I) Identification des différentes populations de récepteurs NMDA dans la lamina II

1) Effet de l'activation des récepteurs NMDA dans la lamina II

Nous avons enregistré l'activité synaptique au sein du réseau de la lamina II (transmission spontanée) et appliqué du NMDA afin de déterminer l'effet de l'activation des récepteurs NMDA. Les résultats obtenus montrent que l'activation des récepteurs NMDA induit une facilitation de la transmission synaptique chez la souris (Figure 47A). Notre observation est cohérente avec les données de la littérature indiquant une large expression de récepteurs NMDA fonctionnels dans la lamina II et dans toutes les CDME plus généralement (Yung, 1998; Boyce et al., 1999; Nagy et al., 2004). La plupart de ces données ont cependant été obtenues chez le rat et notre étude permet de confirmer que l'activation des récepteurs NMDA augmente la transmission synaptique de manière générale dans la majorité des neurones enregistrés dans la lamina II de souris.

Nous avons aussi montré que les cellules gliales sont importantes dans l'effet engendré par l'activation des récepteurs NMDA aux synapses entre neurones GABAergiques et neurones glutamatergiques. Cette modulation par la glie pourrait impliquer la libération de D-sérine, un des co-agonistes du récepteur NMDA (Voir la discussion de la partie II des résultats) (Figure 47B).

Afin de déterminer si l'application de NMDA a un effet à la synapse, nous avons ajouté de la TTX à notre milieu extracellulaire. La TTX inhibe les canaux sodiums voltage-dépendants ce qui permet de s'affranchir de l'activité de décharge de potentiels d'actions dans le réseau. Nos résultats ont permis de mettre en évidence trois points importants.

Premièrement, l'application de NMDA n'induit aucun effet aux synapses glutamatergiques. Cela peut signifier une absence d'expression de récepteurs NMDA fonctionnels, ou alors que ceux-ci ne sont pas activés dans nos conditions en présence d'une concentration de magnésium physiologique (2 mM) (Figure 47A). Dans la ME, deux études montrent par des approches d'imagerie électronique l'expression de récepteurs NMDA aux terminaisons de synapses glutamatergiques chez le rat (Liu et al., 1994; Zeng et al., 2006). De plus, les auteurs montrent que cette expression est restreinte à environ 30% des terminaisons des fibres afférentes de types C et que l'activation de ces récepteurs NMDA présynaptiques peut moduler la libération de substance P (Bardoni et al., 2004; Bardoni et al., 2013). Il est possible que le magnésium extracellulaire présent dans notre préparation ait bloqué ces récepteurs NMDA. Pour clarifier ce point, des expériences en absence de magnésium extracellulaire pourraient être réalisées.

Deuxièmement, nous avons montré une proportion de réponses au NMDA très différente en fonction de la cible du neurone GABAergique présynaptique. Aux synapses entre deux neurones GABAergiques, l'activation des récepteurs NMDA facilite la transmission synaptique GABAergique dans 92% des neurones enregistrés. Cela semble indiquer une forte expression de récepteurs NMDA fonctionnels aux synapses entre deux neurones GABAergiques. A l'inverse, aux synapses GABAergiques contactant un neurone glutamatergique, l'activation des récepteurs NMDA facilite la transmission synaptique GABAergique dans seulement 22% des neurones enregistrés (Figure 47A). Ce résultat pourrait être dû à une faible expression de récepteurs NMDA fonctionnels à ces synapses. Aux synapses entre un neurone GABAergique et un neurone non-identifié, l'application de NMDA a aussi été réalisée en absence de magnésium extracellulaire et le même effet modulateur du NMDA a été observé. Cela indique que les pores des récepteurs NMDA ne sont pas bloqués par les ions magnésiums dans nos conditions.

Troisièmement, la glie n'affecte pas l'effet modulateur dû à l'activation des récepteurs NMDA aux synapses entre deux neurones GABAergiques. En revanche, nous avons constaté que la glie fonctionnelle est requise pour obtenir l'effet du NMDA dans une sous-population de neurones non-identifiés (Figure 47B). Par déduction d'après nos résultats, nous avons émis l'hypothèse que cette sous population est principalement constituée de neurones glutamatergiques. En effet, après l'incubation au fluorocitrate, la proportion de réponse diminue de moitié aux synapses GABAergiques contactant un neurone non-identifié, passant de 55% à 29%. En revanche, aucune synapse GABAergique contactant un neurone GABAergique n'est affectée (Figure 47B). On peut donc supposer que la glie est requise aux synapses GABAergiques contactant un neurone glutamatergique. De plus, nos enregistrements montrent 22% de réponses après l'application de NMDA à ces synapses GABAergiques contactant un neurone glutamatergique en présence de cellules gliales fonctionnelles. La perte de ces 22% de réponses pourrait correspondre à la proportion de neurones ne répondant plus au NMDA après l'incubation au fluorocitrate qu'on observe aux synapses GABAergiques sur un neurone non-identifié, ce qui conforte notre hypothèse. Des enregistrements de neurones GAD65::EGFP- après incubation avec du fluorocitrate permettraient de confirmer notre hypothèse.

2) Localisation des récepteurs NMDA à la synapse GABAergique

Trois hypothèses ont été envisagées par rapport à la localisation des récepteurs NMDA aux synapses GABAergiques : l'expression sur la terminaison du neurone GABAergique présynaptique, sur le neurone postsynaptique et/ou sur les cellules gliales environnantes.

Localisation postsynaptique

L'hypothèse d'une localisation postsynaptique des récepteurs NMDA implique la production et la libération d'un messager rétrograde qui agirait sur l'élément présynaptique ou sur la glie. Lors des expériences en absence de magnésium extracellulaire, nous avons ajouté du MK-801 (2mM), un bloquant du pore des récepteurs NMDA, dans la pipette d'enregistrement afin de stabiliser le neurone postsynaptique enregistré. En effet, l'application de NMDA en absence de magnésium induisait une forte instabilité du neurone postsynaptique enregistré, possiblement due à l'activation de récepteurs NMDA postsynaptiques. Dans ces conditions, l'effet modulateur du NMDA sur la transmission GABAergique a persisté en présence de MK-801. Ces données indiquent que l'activation des récepteurs NMDA postsynaptiques, c'est-à-dire exprimés par le neurone postsynaptique enregistré, n'est pas impliquée dans l'augmentation de fréquence des CPSIs GABAergiques observés. Des expériences complémentaires seraient cependant nécessaires. En effet, notre protocole a consisté à enregistrer le neurone 20 minutes avant d'appliquer le NMDA afin de permettre au MK-801 de bloquer le pore des récepteurs NMDA. Ce type de protocole a été utilisé avec succès pour bloquer les récepteurs NMDA postsynaptiques sur des neurones corticaux en culture ou des larves de Xénope par exemple (Lien et al., 2006; Liu et al., 2007b). Cependant, le MK-801 est un bloquant qui ne peut s'insérer dans le pore que si les récepteurs NMDA sont activés. Dans de futures expériences, il faudrait réaliser une première activation des récepteurs NMDA afin que le pore soit complètement bloqué avant d'analyser l'effet du NMDA sur la transmission synaptique GABAergique.

La libération d'un messager rétrograde implique généralement une augmentation de Ca^{2+} dans le neurone postsynaptique. Dans l'aire tegmentale ventrale par exemple, l'activation de récepteurs NMDA postsynaptiques induit une augmentation de Ca^{2+} intracellulaire libre dans le neurone postsynaptique permettant la libération du messager rétrograde NO (Nugent et al., 2007). Dans l'hippocampe, l'augmentation de Ca^{2+} permet la libération de BDNF (Sivakumaran et al., 2009). Il faudrait donc pratiquer des expériences avec des pipettes d'enregistrements contenant du MK-801 et un chélateur des ions Ca^{2+} , tel que le BAPTA, afin de bloquer la libération Ca^{2+} dépendante d'un messager rétrograde éventuel. Enfin, On pourrait envisager une modulation de la transmission synaptique GABAergique par le NO dans la lamina II. Il est montré dans la lamina I une plasticité hétérosynaptique de la synapse GABAergique induite par le NO (Fenselau et al., 2011). La potentialisation à long terme de la transmission GABAergique montrée dans cette étude implique les récepteurs mGluR1 mais on pourrait imaginer un mécanisme similaire mettant en jeu les récepteurs NMDA dans la lamina II. Dans les laminae I à III, la forme neuronale de la synthèse du monoxyde d'azote est principalement exprimée dans les neurones inhibiteurs (Sardella et al., 2011), ce qui serait cohérent avec cette hypothèse.

Localisation gliale

L'hypothèse que des récepteurs NMDA soient localisés sur la glie concerne les terminaisons GABAergiques contactant un neurone glutamatergique où nous avons observé que la glie fonctionnelle est nécessaire à l'activation des récepteurs NMDA. A ces terminaisons, la perfusion de D-sérine permet de restaurer l'activation des récepteurs NMDA dans des proportions similaires aux conditions contrôles (voir la partie résultat II).

Le fait que la D-sérine restaure l'effet dû à l'activation des récepteurs NMDA n'est pas en faveur d'une localisation uniquement gliale de ces récepteurs. Si on considère que des récepteurs NMDA sont localisés sur des cellules gliales, dont le métabolisme a été bloqué par le fluorocitrate, la perfusion de D-sérine ne devrait pas suffire à restaurer l'effet du NMDA. En effet, même si les récepteurs NMDA gliaux sont activés, la libération de gliotransmetteurs devrait être fortement diminuée car elle nécessite la présence de concentrations suffisantes d'ATP dans ces cellules (Pour revue voir : Parpura et Zorec (2010). Or, en présence de fluorocitrate, la production d'ATP est réduite (Fonnum et al., 1997). En revanche, si les récepteurs NMDA sont situés sur l'élément présynaptique des neurones GABAergiques, la perfusion de D-sérine exogène pourrait restaurer le déficit de sécrétion endogène de D-sérine induit par le fluorocitrate, et par conséquent rétablir l'effet d'une application de NMDA. C'est ce que nous avons effectivement observé dans nos expériences. La présence de récepteurs NMDA sur la glie reste cependant envisageable. L'activation de récepteurs NMDA gliaux pourrait avoir un effet synergique avec l'activation de récepteurs NMDA localisés ailleurs à la synapse.

Un certain nombre de données indique la présence de récepteurs NMDA sur la glie dans la corne dorsale de la moelle épinière. Une étude, menée sur des cultures et des tranches aigües de ME de jeunes rats, montre l'expression de récepteurs NMDA par les cellules gliales (Ziak et al., 1998). Ces récepteurs sont peu sensibles au blocage par les ions magnésiums. Des données préliminaires non présentées, que nous avons obtenues par enregistrement de canaux unitaires, indiquent l'expression des récepteurs NMDA fonctionnels par les cellules gliales de la CDME de souris. Ces canaux NMDA présentent une conductance faible (15pS), compatible avec la présence de sous-unités GluN2C/D ou GluN3 (Dravid et al., 2007; Paoletti et al., 2013). Ces résultats sont par ailleurs cohérents avec nos données pharmacologiques concernant les récepteurs NMDA impliqués dans la modulation de la transmission GABAergique dans notre étude (Voir partie I des résultats).

Ces résultats peuvent aussi suggérer la présence de deux populations de récepteurs NMDA impliqués dans des effets différents. On peut supposer d'une part, que les récepteurs NMDA potentiellement localisés sur les neurones GABAergiques soient impliqués dans la modulation de la transmission synaptique que l'on observe. D'autre part, les récepteurs NMDA localisés sur les cellules gliales pourraient avoir un rôle différent. Il est par exemple montré sur des cultures d'astrocytes d'hippocampe, que le glutamate induit la génération et la propagation de vagues calciques entre les astrocytes (Cornell-Bell et al., 1990; Hassinger et al., 1995). Le NMDA et/ou glutamate dans la lamina

Il pourrait activer des récepteurs NMDA sur la glie et générer une vague calcique au sein du réseau glial. Celle-ci pourrait se propager localement par le réseau de cellules gliales et réguler la transmission synaptique par la libération de gliotransmetteurs à d'autres synapses. Il est par exemple montré sur des co-cultures de neurones et d'astrocytes d'hippocampe de rat qu'une augmentation de calcium libre intracellulaire dans les astrocytes induit la libération de glutamate. Cette libération de glutamate peut ensuite agir sur la synapse et moduler la transmission synaptique (Araque et al., 1998). En perspective de notre étude, il sera donc intéressant de clarifier l'effet de l'activation des récepteurs NMDA exprimés par la glie sur la transmission synaptique (Voir perspectives).

Localisation sur la terminaison des neurones GABAergiques

Finalement, les récepteurs NMDA impliqués dans la modulation de la libération de GABA pourraient être localisés directement sur les terminaisons synaptiques des interneurons GABAergiques. Il semble que cette hypothèse soit la plus probable. Dans les laminae I à III, l'expression de récepteurs NMDA est montrée sur environ 40% des terminaisons GABAergiques chez le rat (Lu et al., 2005). Cette proportion est proche de celle que nous avons obtenue chez la souris où 55% des neurones enregistrés répondent à l'application de NMDA. Pour la suite de cette discussion, il sera considéré que les récepteurs NMDA modulant la transmission synaptique GABAergiques sont localisés à la terminaison des neurones GABAergiques. Cependant, Pour confirmer cette hypothèse, des expériences d'immunohistochimie en microscopie électronique seront nécessaires (voir perspectives).

Nos expériences de pharmacologie ont permis de montrer que les récepteurs NMDA étudiés contiennent les sous-unités GluN2C/D. Dans la ME, deux études indiquent que les récepteurs NMDA composés des sous-unités GluN2C/D sont plus fortement exprimés sur les neurones inhibiteurs (Shiokawa et al., 2010; Häring et al., 2018). Nos résultats renforcent l'idée d'une localisation spécifique sur une sous-population d'interneurones GABAergiques.

Les récepteurs NMDA exprimés à la terminaison de neurones GABAergiques agiraient comme des hétérorécepteurs et pourraient être activés par le glutamate provenant de cellules gliales et de synapses excitatrices voisines. La présence des sous-unités GluN2C/D confèrerait des propriétés pharmacologiques particulièrement intéressantes aux récepteurs NMDA localisés aux terminaisons de neurones GABAergiques. Ces hétérorécepteurs seraient par exemple plus sensibles aux agonistes et co-agonistes (Erreger et al., 2007; Chen et al., 2008; Dravid et al., 2010) ce qui leur permettrait de détecter des variations fines de glutamate ambiant. De plus, il est montré par des approches d'électrophysiologie sur des cellules HEK 293, que ces récepteurs sont moins sensibles à la désensibilisation que ceux composés des sous-unités GluN2 A ou B (Medina et al., 1995). Cette propriété rendrait les récepteurs NMDA aptes à répondre à de longues expositions de glutamate, comme en condition de douleur neuropathique par exemple où la concentration de glutamate extracellulaire augmente (Wall et al., 1974; Liu et al., 2000; Wu et al., 2001; Inquimbert et al., 2012). Enfin, les récepteurs NMDA contenant les

sous-unités GluN2C/D sont peu sensibles au Mg^{2+} extracellulaire (Dravid et al., 2007; Paoletti et al., 2013). En raison de leur faible sensibilité au blocage par les ions magnésiums, des récepteurs NMDA contenant ces sous-unités pourraient être activables en absence de dépolarisation membranaire ce qui constitue une autre propriété intéressante pour des récepteurs NMDA présynaptiques (Reichling et MacDermott, 1996; Henson et al., 2010). Cela est de plus cohérent avec nos résultats obtenus en condition miniature où l'on observe une forte activation de ces récepteurs NMDA.

Composition des récepteurs NMDA

D'après nos résultats, il est envisageable que les récepteurs NMDA localisés aux terminaisons GABAergiques soient des récepteurs composés de 2 sous-unités GluN1, 1 sous-unité GluN2 et 1 sous-unité GluN3. En effet, les récepteurs NMDA identifiés sont très peu sensibles au ions Mg^{2+} . Cela pourrait correspondre à des récepteurs NMDA hétérotrimériques comportant une sous-unité GluN3 dont la sensibilité au magnésium est encore plus faible que les récepteurs NMDA composés des sous-unités GluN2C/D (Henson et al., 2010; Pérez-Otaño et al., 2016; Stroebel et al., 2018). Cette possibilité est renforcée par le fait que le gène *Grin3A* codant pour la sous-unité GluN3A est retrouvé dans tous les neurones de la CDME (Häring et al., 2018). Nous n'avons pas testé l'éventualité de la présence d'une sous-unité GluN3A due à l'absence de substances pharmacologiques disponibles pour manipuler les récepteurs NMDA contenant cette sous-unité. Récemment cependant, un modulateur allostérique positif des récepteurs NMDA contenant les sous-unités GluN3A a été développé et testé (le CGP-78608) (Grand et al., 2018). Des expériences pharmacologiques avec le CGP-78608 pourraient permettre de déterminer si les récepteurs impliqués dans nos effets contiennent une sous-unité GluN3A. En raison de leur faible sensibilité au blocage par les ions magnésiums, des récepteurs NMDA incorporant une sous-unité GluN3A pourraient être encore moins sensible au blocage par les ions magnésiums (Henson et al., 2010).

II) Conséquence de l'activation des récepteurs NMDA sur la transmission synaptique

1) Modulation de la transmission GABAergique par un effet d'origine présynaptique

L'activation des récepteurs NMDA exprimés aux synapses GABAergiques module la probabilité de libération synaptique de GABA. Deux arguments nous permettent de conforter cette hypothèse. Tout d'abord, on observe une augmentation de la fréquence des mCPSIs GABAergiques sans changement de l'amplitude de ces courants suite à l'activation des récepteurs NMDA. Ensuite, nos expériences de paired-pulse ratio entre deux neurones inhibiteurs indiquent un changement du ratio entre les amplitudes de pic de stimulations (Voir la partie résultat I). Ces deux résultats sont des indicateurs en faveur d'un effet d'origine présynaptique. Des récepteurs NMDA exprimés à la terminaison des

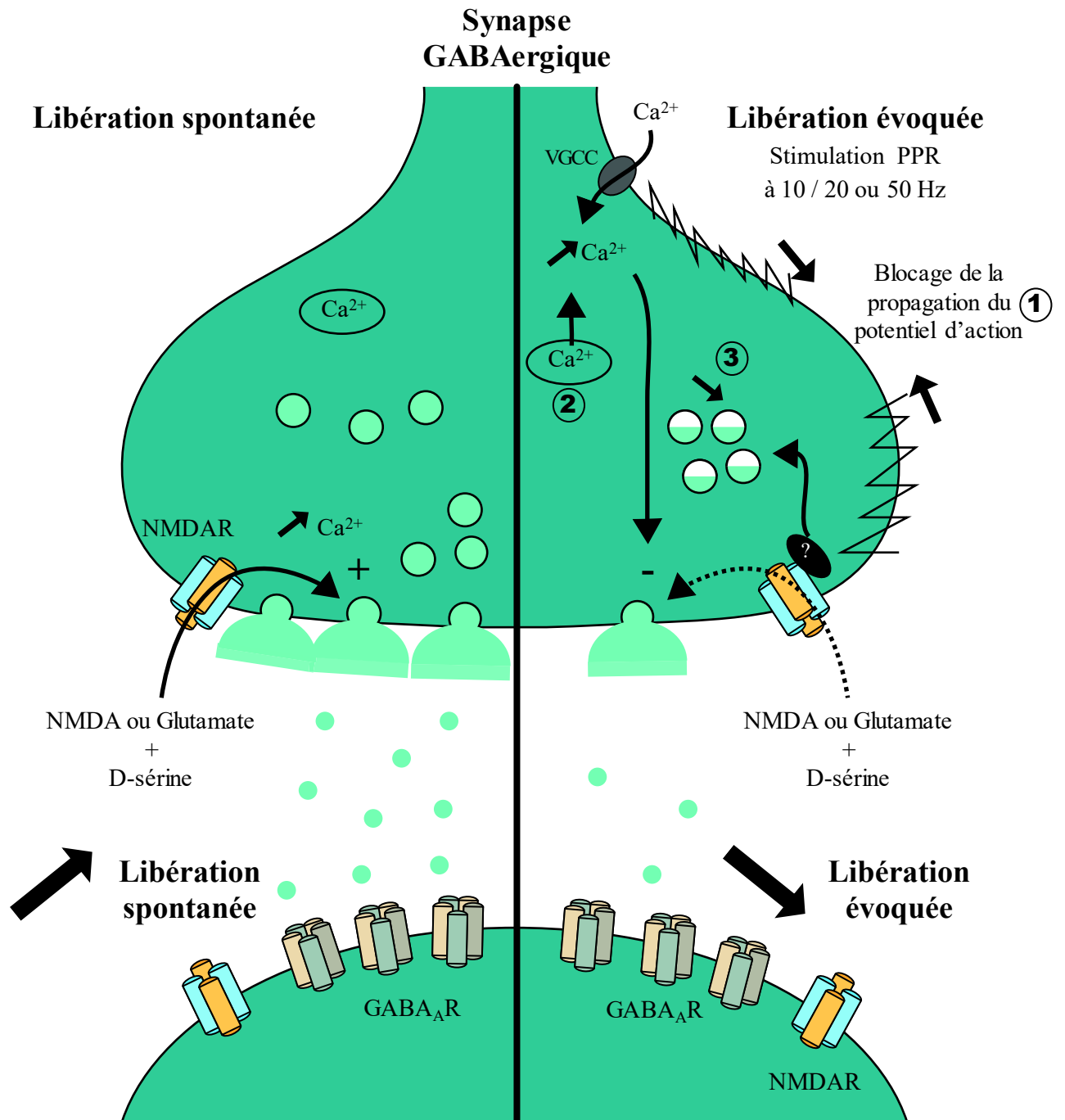


Figure 48 : Conséquence de l'activation des récepteurs NMDA sur la libération spontanée ou évoquée de GABA.

La modulation de la libération de GABA par l'activation des récepteurs NMDA est d'origine présynaptique. En condition spontanée, l'activation des récepteurs NMDA augmente la probabilité de libération du GABA. En revanche, en condition évoquée, l'activation des récepteurs NMDA diminue la probabilité de libération du GABA. On en conclut que l'activation de récepteurs NMDA peut faciliter ou diminuer la transmission synaptique GABAergique en fonction de l'activité au sein du réseau. Les hypothèses pouvant expliquer cette dichotomie sont expliquées plus en détails dans la discussion. Brièvement : **1)** l'entrée de calcium par les récepteurs NMDA pourrait dépolariiser la membrane du neurone et bloquer la propagation du potentiel d'action. **2)** L'entrée de calcium par le récepteur NMDA et les canaux calciums voltage-dépendants (VGCC) pourrait induire la libération de calcium provenant de stocks intracellulaire et diminuer la libération de GABA. **3)** Le couplage des récepteurs NMDA à une voie de signalisation non-déterminée pourrait induire une diminution du taux de remplissage des vésicules et donc une diminution du nombre de vésicules de réserves.

neurones GABAergiques auraient une localisation idéale pour contrôler la libération synaptique de GABA, ce qui est cohérent avec l'effet d'origine présynaptique que l'on observe et conforte notre hypothèse concernant la localisation de ces récepteurs NMDA.

Bien que le mode d'action des récepteurs NMDA localisés sur les terminaisons de neurones GABAergiques contactant un neurone GABAergique reste assez méconnu à l'heure actuelle, quelques études montrent que ces hétérorécepteurs modulent la probabilité de libération synaptique de GABA. Deux études réalisées dans le cervelet montrent notamment que l'activation de récepteurs NMDA présynaptiques facilite la transmission GABAergique. Cette facilitation implique l'augmentation de calcium intracellulaire libre dans l'élément présynaptique dû à l'entrée de calcium par les récepteurs NMDA ou par la libération de calcium par les stocks intracellulaires présynaptiques (Glitsch et Marty, 1999; Duguid et Smart, 2004). Un mécanisme similaire pourrait avoir lieu dans la lamina II où l'augmentation de calcium intracellulaire dans l'élément présynaptique augmenterait la probabilité de fusion des vésicules synaptiques avec la membrane plasmique, augmentant ainsi la libération de GABA. Nous n'excluons pas, cependant, la possibilité que la modulation de la libération de GABA soit due à un mécanisme n'impliquant pas l'augmentation de calcium. En effet, bien que les mécanismes de modulation de l'élément présynaptique par les récepteurs NMDA semblent majoritairement impliquer le calcium, des mécanismes plus rares ont été décrits où des récepteurs NMDA couplés à des voies de signalisation permettent de réguler la transmission synaptique (Dore et al., 2017).

2) Facilitation ou diminution de la libération de GABA par l'activation des récepteurs NMDA ?

De façon intéressante, nous avons observé que l'activation des récepteurs NMDA localisés aux terminaisons GABAergiques a des effets opposés sur la libération spontanée et la libération évoquée de GABA. D'un côté, l'activation des récepteurs NMDA augmente la transmission synaptique GABAergique en condition spontanée. D'un autre côté, l'activation des récepteurs NMDA diminue la transmission synaptique GABAergique lorsque le neurone GABAergique présynaptique est stimulé électriquement (Figure 48). Nos résultats suggèrent donc que les récepteurs NMDA modulent la libération spontanée et évoquée de GABA de manière opposée. Plusieurs hypothèses permettent d'expliquer cette dichotomie.

Premièrement, contrairement à la libération spontanée, la libération évoquée implique l'arrivée d'un potentiel d'action à la terminaison. L'activation des récepteurs NMDA présynaptiques pourrait induire la dépolarisation de la terminaison présynaptique et empêcher ainsi la propagation du potentiel d'action (Figure 48). La dépolarisation de la terminaison présynaptique pourrait mener à une inactivation des canaux calcium voltage-dépendants et réduire ainsi l'influx de Ca^{2+} présynaptique et par conséquent la libération de neurotransmetteur. Cela pourrait aussi bloquer la propagation du potentiel d'action par un effet de shunt de la résistance membranaire. Ce phénomène est notamment décrit aux terminaisons

des fibres afférentes, où l'activation de récepteurs NMDA présynaptiques diminue la libération de glutamate (Bardoni et al., 2004).

Deuxièmement, il est possible que les récepteurs NMDA en condition spontanée augmentent la fusion des vésicules synaptiques GABAergiques seulement via l'entrée de calcium à travers leur pore. En revanche, en condition évoquée, l'augmentation de calcium provient à la fois de l'ouverture des récepteurs NMDA mais aussi de l'entrée de calcium par des canaux calcium voltage-dépendants suite à l'arrivée du potentiel d'action. Dans ces conditions, la concentration de calcium intracellulaire libre à l'élément présynaptique serait suffisante pour induire la libération de calcium par les stocks présynaptiques. Comme il a été évoqué précédemment, un tel mécanisme peut entraîner une augmentation de la libération de neurotransmetteur (Duguid et Smart, 2004). Cependant l'effet inverse a aussi été montré. Sur des tranches d'hippocampe de jeunes rats, la libération de calcium par les stocks intracellulaires présynaptiques entraîne la diminution de la libération de GABA (Caillard et al., 2000). Cette hypothèse permettrait d'expliquer l'effet inverse du NMDA que nous observons. Le mécanisme précis de ce phénomène reste cependant inconnu à l'heure actuelle (Figure 48).

Enfin, on peut émettre l'hypothèse que les récepteurs NMDA étudiés soient directement couplés à une voie de signalisation intracellulaire. Cette voie de signalisation qui est indéterminée pourrait par exemple induire la diminution du taux de remplissage des vésicules synaptiques GABAergiques de réserves lorsque les récepteurs sont activés. Ainsi l'ouverture de ces récepteurs et l'entrée de calcium permettrait la libération des vésicules synaptiques prêtes à être libérées et induirait donc une augmentation de la transmission GABAergique en condition spontanée. En parallèle à ce mécanisme, le couplage à une voie de signalisation intracellulaire diminuant le taux de remplissage des vésicules de réserve induirait une diminution de la libération de GABA en condition évoquée. Cette hypothèse qui est proposée dans le cas de récepteurs NMDA présynaptiques dans la lamina II a été montrée dans le cortex visuel de souris. Dans cette étude, les auteurs rapportent l'existence de récepteurs NMDA présynaptiques couplés à deux voies de signalisations différentes. Le couplage des récepteurs à la kinase JNK2 permet le contrôle de la libération spontanée tandis que le couplage à la protéine RIM1 permet de réguler la transmission évoquée, notamment en régulant le taux de remplissage des vésicules synaptiques (Abrahamsson et al., 2017).

III) Rôle d'une modulation de la transmission synaptique GABAergique par l'activation des récepteurs NMDA dans la lamina II

Dans cette dernière partie, nous allons tenter de replacer et d'interpréter les observations que nous avons réalisées dans un contexte physiologique et pathologique.

1) Dans un état physiologique

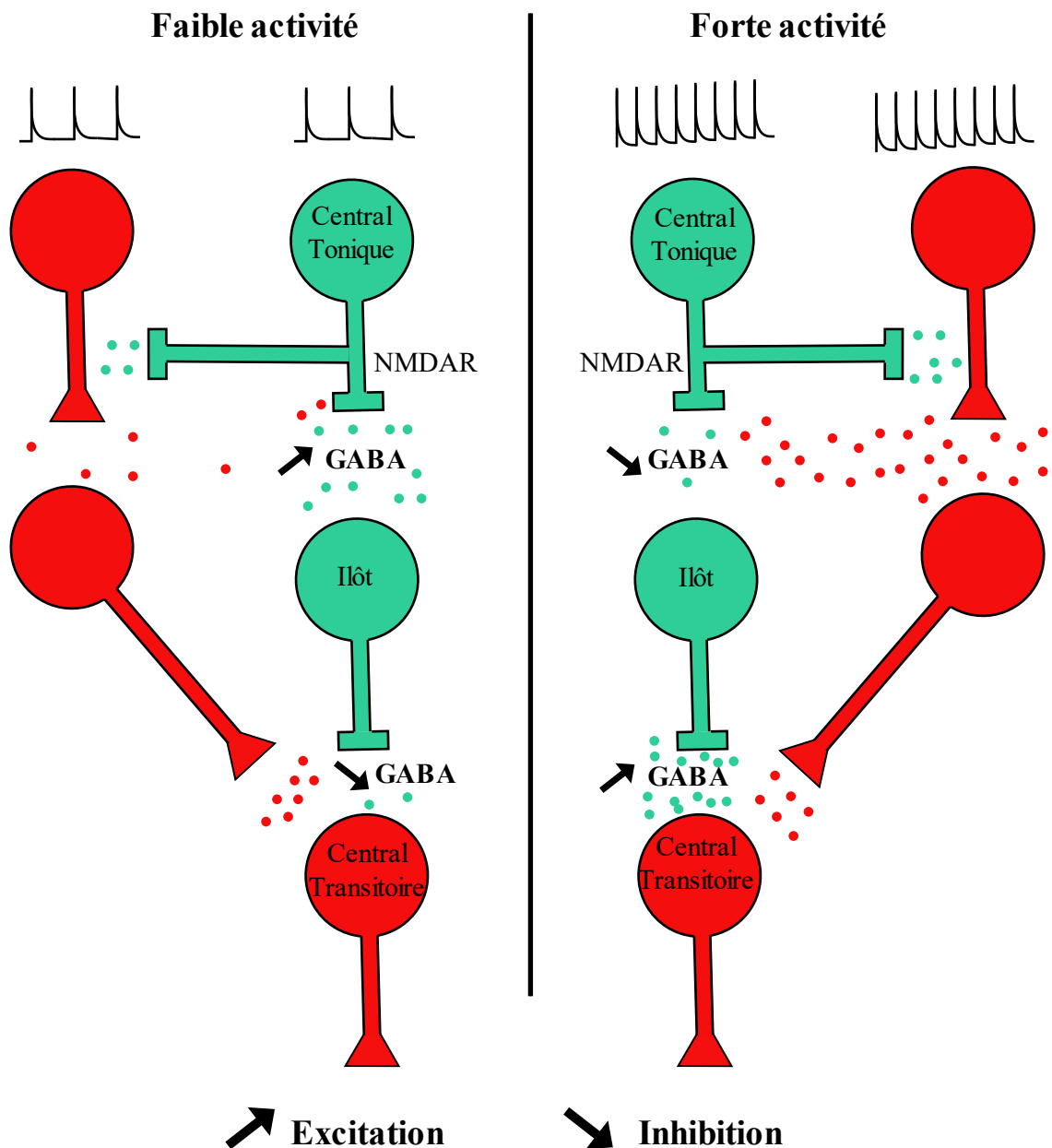


Figure 49 : Fonction possible des récepteurs NMDA localisés à la terminaison des neurones GABAergiques dans la lamina II en condition physiologique.

Le rôle physiologique des récepteurs NMDA localisés aux synapses GABAergiques pourrait être de maintenir une balance excitation/inhibition stable dans le réseau de la lamina II. En cas de faible activité, l'activation des récepteurs permettrait d'augmenter la probabilité de libération synaptique de GABA sur un autre interneurone inhibiteur. Cela induirait la levée d'un filtre inhibiteur et l'augmentation de l'excitation au sein du réseau de la lamina II. En cas de forte activité, l'effet inverse serait observé. Les neurones en rouge sont glutamatergiques et les neurones en bleu sont GABAergiques. L'identification des neurones est hypothétique mais repose sur des connections démontrées dans la lamina II.

La lamina II est une structure dont l'activité intrinsèque peut être très hétérogène en fonction des informations transmises par les fibres afférentes. Cependant, pour maintenir un traitement relativement stable des informations nociceptives, il est nécessaire de maintenir une régulation de l'équilibre entre l'excitation et l'inhibition au sein du réseau. Les récepteurs NMDA que nous avons identifiés pourraient jouer un rôle important dans un mécanisme de plasticité homéostatique. C'est-à-dire dans un mécanisme permettant de maintenir l'excitabilité neuronale à un niveau stable.

En se basant sur les connexions neuronales identifiées dans la lamina II, on peut représenter notre hypothèse sous forme d'un schéma simplifié (Figure 49). Sur ce schéma, un neurone central inhibiteur contacte un neurone en îlot inhibiteur (Zheng et al., 2010). Si on considère une activité faible au sein du réseau (fréquence de décharge des fibres afférentes $<$ à 10Hz), l'activation des récepteurs NMDA aux terminaisons GABAergiques des neurones centraux inhibiteurs pourrait induire une augmentation de la probabilité de libération synaptique de GABA sur le neurone en îlot. Ce ciblage spécifique de l'augmentation de la probabilité de libération de GABA sur un neurone GABAergique mènerait à la désinhibition du réseau. Il y aurait donc une levée d'un filtre inhibiteur sur le neurone central exciteur (Lu et Perl, 2003). Cela permettrait d'augmenter l'excitation dans la lamina II dans le cas où l'activité au sein du réseau est faible ou modérée.

A l'inverse, si l'activité est forte au sein du réseau (fréquence de décharge des fibres afférentes $>$ à 10Hz et jusqu'à 50Hz), l'effet sera inverse à celui décrit précédemment. En effet, nous avons vu dans ces conditions que la probabilité de libération synaptique de GABA est diminuée par l'activation des récepteurs NMDA (Figure 48). Le résultat sera donc un renforcement du filtre inhibiteur et donc de la transmission synaptique inhibitrice au sein du réseau de la lamina II (Figure 49).

Notre hypothèse requiert des récepteurs NMDA peu sensibles au magnésium, ce qui est le cas comme l'ont montré nos expériences de pharmacologie. Ces récepteurs NMDA pourraient donc être des senseurs de l'activité du réseau dont la fonction physiologique serait de préserver un équilibre entre l'excitation et l'inhibition au sein de la lamina II.

2) Dans un état neuropathique

Nos résultats ont permis de mettre en évidence que les récepteurs NMDA exprimés aux terminaisons GABAergiques sont activés en condition neuropathique, potentiellement par l'augmentation de la concentration de glutamate extracellulaire. Nous émettons l'hypothèse que ces récepteurs NMDA perdent leurs fonctions d'adaptions homéostatiques dans ces conditions et deviennent délétères dû à une exposition prolongée au glutamate.

2.1) A court terme

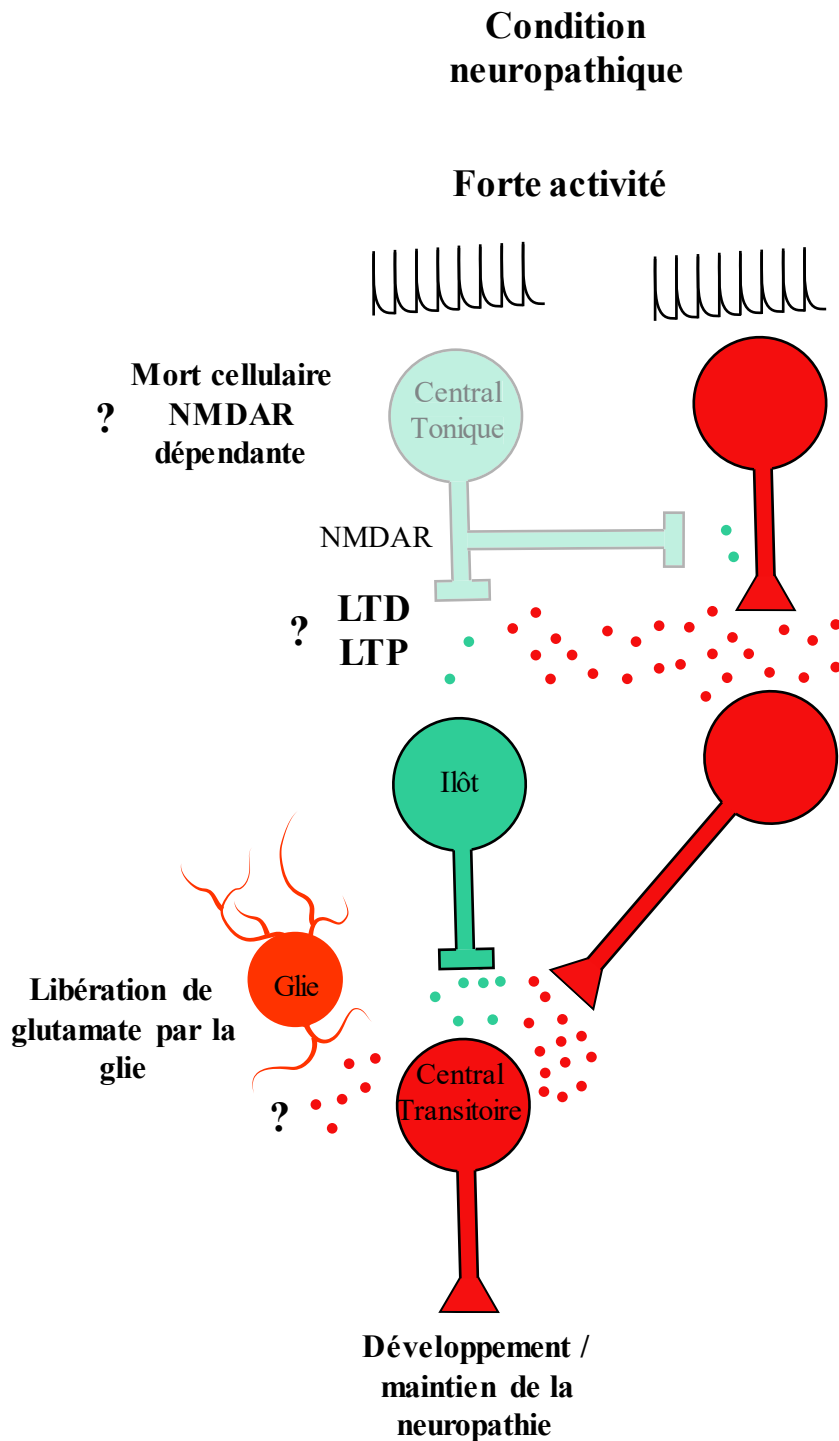


Figure 50 : Hypothèses sur l'implication des récepteurs NMDA dans le développement et le maintien d'un état neuropathique.

Une exposition prolongée des récepteurs NMDA localisés aux synapses GABAergiques au glutamate pourrait induire des mécanismes de plasticités facilitant ou diminuant la transmission synaptique GABAergique. Cette exposition prolongée pourrait aussi à long terme être responsable de la perte par apoptose des interneurons inhibiteurs exprimant ces récepteurs. Ces différents mécanismes et phénomènes pourraient jouer un rôle important dans le développement et le maintien de la neuropathie. Les neurones en rouge sont excitateurs, les neurones en bleu sont inhibiteurs et la cellule gliale est représentée en orange.

L'effet de l'activation des récepteurs NMDA durant la phase précoce de la neuropathie n'a pas été étudié dans notre étude. Bien que les récepteurs NMDA contenant les sous-unités GluN2C/D soient moins sensibles à la désensibilisation que ceux contenant les sous-unités GluN2A (Medina et al., 1995), une exposition prolongée au glutamate pourrait désensibiliser ces récepteurs NMDA dans un premier temps. Cette désensibilisation pourrait empêcher le récepteur NMDA de réduire la transmission synaptique GABAergique en condition neuropathique où l'activité est forte. Cela induirait, de façon indirecte, une augmentation de la transmission GABAergique ciblant spécifiquement un autre neurone GABAergique et pourrait avoir comme conséquence fonctionnelle une désinhibition du réseau. Dans la lamina II, il est montré que la délétion conditionnelle des récepteurs NMDA ne permet pas de réduire les symptômes de douleurs neuropathiques durant la phase précoce de la neuropathie (Inquimbert et al., 2018). Cette étude n'est pas en désaccord avec notre hypothèse. En effet, de notre point de vue, il s'agirait en fait de l'absence de ces récepteurs NMDA présynaptiques qui pourrait être délétère durant la phase précoce de la neuropathie. Reproduire les expériences de paired-pulse ratio sur des tranches de souris 3 jours post-SNI pourrait nous permettre de déterminer si la transmission synaptique GABAergique ciblant un neurone GABAergique est facilitée.

2.2) A long terme

Plusieurs hypothèses peuvent relier l'activation des récepteurs NMDA dans la lamina II et le maintien des états de douleurs neuropathiques. Nous aborderons dans cette dernière partie deux principaux points pouvant mener à la désinhibition du réseau nociceptif spinal qui sont : les mécanismes de plasticité de la transmission synaptique GABAergique et les phénomènes de mort cellulaires d'interneurones GABAergiques.

Plasticité de la transmission synaptique GABAergique dépendante des récepteurs NMDA

En condition neuropathique, dû à l'activation répétée des récepteurs NMDA, des mécanismes de plasticités activité-dépendantes de la transmission synaptique GABAergique pourraient se mettre en place. L'activation des récepteurs NMDA présynaptiques et l'augmentation de calcium intracellulaire libre dans l'élément présynaptique pourraient par exemple mener à une potentialisation à long terme (LTP) de la transmission GABAergique (Figure 50). Un mécanisme de LTP de la transmission GABAergiques entre deux interneurones inhibiteurs et impliquant l'activation de récepteurs NMDA présynaptiques a été montré dans le cervelet mais jamais dans les CDME (Liu et Lachamp, 2006; Lachamp et al., 2009). Les auteurs montrent de plus que ce mécanisme requiert une augmentation du taux d'AMP cyclique ainsi que l'activation de la protéine kinase A et de la protéine RIM1 α . Une voie de signalisation similaire pourrait avoir lieu dans la lamina II. Ce renforcement de la transmission

synaptique GABAergique ciblant un autre neurone GABAergique mènerait à un phénomène de désinhibition au sein du réseau nociceptif spinal. Cette désinhibition du réseau pourrait jouer un rôle dans le développement de symptômes de douleur neuropathique. A la bordure de la lamina II-III par exemple, la perte du contrôle inhibiteur sur les neurones PKC γ /SOM⁺ de nature excitatrice induit la transmission d'information non nociceptive provenant de fibres A β vers les couches superficielles, responsable en partie de l'allodynie mécanique observée en condition neuropathique (Miraucourt et al., 2007; Peirs et al., 2015; Petitjean et al., 2015).

L'hypothèse d'une diminution à long terme (LTD) de la transmission synaptique GABAergique est aussi envisageable après l'activation répétée des récepteurs NMDA présynaptiques. Nos résultats montrent d'ailleurs une dépression à court terme de la transmission GABAergique suite à l'activation des récepteurs NMDA en condition évoqué, ce qui conforte cette hypothèse. Il est de plus observé, dans le nerf optique de Xénope, une LTD hétérosynaptique de la transmission synaptique GABAergique par un mécanisme encore inconnu (Lien et al., 2006). Si une LTD de la transmission GABAergique a lieu aux synapses entre deux neurones GABAergiques, cela permettrait un renforcement du contrôle inhibiteur dans la lamina II. On peut cependant supposer que l'excitation au sein du réseau soit alors déjà trop élevée pour que ce mécanisme rétablisse la balance excitation/inhibition.

Mort cellulaire par apoptose dépendante des récepteurs NMDA

A long terme, l'activation endogène des récepteurs NMDA exprimés aux terminaisons GABAergiques peut induire des changements irréversibles au sein du réseau de la lamina II tel que la mort neuronale des interneurons inhibiteurs (Figure 50). En effet, l'entrée de calcium en excès pourrait initier un processus d'apoptose, notamment par la libération du cytochrome C des mitochondries et l'activation de caspases (Youle et Strasser, 2008). Un tel phénomène est décrit dans la lamina II de souris et implique l'activation des récepteurs NMDA (Inquimbert et al., 2018) ce qui conforte notre hypothèse. Cibler spécifiquement les récepteurs NMDA composés des sous-unités GluN2C/D exprimés par les interneurons GABAergiques dans la lamina II permettrait d'étudier le rôle de ces récepteurs dans la mort cellulaire des interneurons GABAergiques (Voir partie perspectives).

Perspectives

Au cours de cette étude, nos résultats ont soulevé de nouvelles questions dont certaines sont restées en suspens et nécessitent des investigations supplémentaires. Les principaux points que nous voudrions élucider à l'avenir sont les suivants.

Localisation subcellulaire des récepteurs NMDA

Nos résultats ont permis de montrer que l'activation de récepteurs NMDA à la synapse facilite la transmission GABAergique. Par élimination, nous avons émis l'hypothèse que ces récepteurs sont probablement localisés sur la terminaison d'interneurones GABAergiques. Toutefois nos données fonctionnelles ne sont pas suffisantes pour valider cette hypothèse. Des approches d'immunohistochimie et de microscopie électronique permettraient de déterminer la localisation exacte des récepteurs NMDA impliqués dans l'effet observé. Pour démontrer l'expression de récepteurs NMDA sur les terminaisons GABAergiques, on pourrait par exemple réaliser un triple marquage immunohistochimique ciblant les sous-unités GluN1 des récepteurs NMDA, la synaptophysine associée à l'élément présynaptique et la GAD. Dans d'autres expériences, nous pourrions utiliser de la géphyrine, qui est une protéine associée à l'élément postsynaptique, à la place de la synaptophysine, pour montrer ou non une expression postsynaptique des récepteurs NMDA. Enfin un marquage contre la GFAP permettrait de vérifier la localisation gliale des récepteurs NMDA. Il serait aussi intéressant de réaliser ce type d'expériences sur des tranches de souris neuropathiques afin de déterminer si l'expression des récepteurs NMDA change en condition neuropathique dans la lamina II.

Evaluation du rôle des récepteurs NMDA dans la mise en place et le maintien des douleurs neuropathiques

En condition neuropathique, les récepteurs NMDA contenant les sous-unités GluN2C/D semblent activés de manière endogène et leur activation est responsable de la modulation de la transmission synaptique GABAergique. Ces résultats préliminaires doivent être confirmés. Nous aimerions ensuite étudier l'implication de cette plasticité de l'inhibition dépendante des récepteurs NMDA dans le développement et le maintien de douleurs neuropathiques. Pour cela, nous pourrions utiliser des shRNA pour réduire l'expression des gènes (« silencing ») codant pour les sous-unités GluN2C ou GluN2D dans la corne dorsale de la moelle épinière. Des microinjections intraspinales de vecteurs viraux codant pour les shRNA permettraient une intégration stable du shRNA dans les interneurones spinaux et un « silencing » soutenu des gènes cibles. Nous évaluerons ensuite l'impact de ce silencing soutenu sur l'activité synaptique inhibitrice au sein des réseaux nociceptifs de la corne

dorsale, mais surtout sur le développement et le maintien de la douleur neuropathique. Pour cela, une approche électrophysiologique (réponse au NMDA sur la fréquence des CPSIs) et comportementale pourraient être utilisées (évaluation des changements des sensibilités mécanique et thermique nociceptives chez des animaux témoins et des animaux porteurs d'une douleur neuropathique).

Implication des cellules gliales dans la régulation de la transmission synaptique GABAergique dans des conditions physiologiques et pathologiques

Aspect méthodologique

Malgré les études montrant que nos conditions d'utilisation du FC permettent d'éviter un effet direct sur le métabolisme neuronal, il sera nécessaire de valider nos résultats par une autre approche. En effet, l'utilisation du FC est courante mais le FC peut également affecter le métabolisme des neurones suite à des incubations de plus de 3h (Fonnum et al., 1997). Afin de vérifier nos résultats par une autre approche, on pourra charger les astrocytes en tranche avec du BAPTA pour chélater le calcium intracellulaire libre. Cela nous permettrait de déterminer si les cellules gliales modulent l'activation des récepteurs NMDA par un effet dépendant du calcium aux synapses entre un neurone GABAergique et un neurone glutamatergique.

Le fluorocitrate bloque l'ensemble des cellules gliales. Le rôle exact des astrocytes et de la microglie reste donc à être étudié. La minocycline est une substance pharmacologique fréquemment utilisée pour bloquer spécifiquement la microglie. La perfusion de la minocycline sur des tranches de ME de souris permettrait de voir si l'effet de la minocycline est similaire à celui du fluorocitrate.

En condition neuropathique

En condition neuropathique, les cellules gliales présentent des modifications morphologiques et fonctionnelles et jouent un rôle important dans le développement et maintien des états douloureux chroniques (Ji et al., 2014; Nam et al., 2016). De plus, des données préliminaires montrent une expression de récepteurs NMDA par ces cellules dans la lamina II. Il serait donc intéressant à l'avenir de déterminer le rôle des cellules gliales dans la modulation de la transmission synaptique GABAergique en condition neuropathique. Pour cela, On pourrait reproduire nos expériences de traitement au fluorocitrate sur des tranches de ME de souris SNI.

Conclusion

En conclusion, nos résultats ont permis de mettre en évidence dans la lamina II de souris que l'activation de récepteurs NMDA module la transmission synaptique GABAergique différemment en fonction de la nature neurochimique du neurone postsynaptique. D'une part, les récepteurs NMDA module seulement dans 22% des neurones enregistrés la transmission synaptique GABAergique aux terminaisons GABAergiques contactant un neurone glutamatergique. Ces récepteurs NMDA nécessitent de plus un maillon glial fonctionnel pour être activés. D'autre part, les récepteurs NMDA module la transmission synaptique GABAergiques à la quasi-totalité des synapses entre deux neurones GABAergiques, et ne nécessitent pas de maillon glial pour être activés. A ces synapses entre deux neurones GABAergiques, l'activation des récepteurs NMDA module la transmission synaptique GABAergique par un effet d'origine présynaptique. Nos données suggèrent une localisation de ces récepteurs NMDA sur la terminaison des neurones GABAergiques.

Nous avons ensuite remarqué que l'activation de ces récepteurs NMDA présynaptiques peut mener à deux effets opposés sur la probabilité de libération de GABA. En présence d'une faible activité au sein de la lamina II, l'activation de ces récepteurs NMDA induit une augmentation de la probabilité de libération synaptique de GABA. A l'inverse, lorsque le neurone présynaptique est stimulé électriquement, l'activation des récepteurs NMDA diminue la probabilité de libération de GABA.

A l'heure actuelle, le rôle précis des récepteurs NMDA présynaptiques exprimés aux synapses entre deux neurones GABAergiques n'est pas connu dans la lamina II. Ces récepteurs NMDA présynaptiques apparaissent cependant idéalement placés pour moduler la transmission synaptique GABAergique en fonction de l'activité du réseau. Nous avons donc émis l'hypothèse qu'en condition physiologique, ces récepteurs NMDA présynaptiques soient impliqués dans un mécanisme d'adaptation homéostatique. L'intérêt de ce mécanisme serait d'atténuer l'activité au sein du réseau lorsque celle-ci est trop forte et au contraire, d'augmenter l'activité quand celle-ci est trop faible, permettant ainsi de maintenir une balance excitation/inhibition relativement stable au sein du réseau nociceptif spinal.

En condition neuropathique, Les récepteurs NMDA exprimés aux terminaisons des neurones GABAergiques sont activés de façon endogène. Nous observons aussi une activation endogène de ces récepteurs NMDA par le glutamate lorsque la concentration de glutamate extracellulaire augmente en condition physiologique. Ces résultats semblent indiquer que l'augmentation de glutamate en condition neuropathique est responsable de l'activation de ces récepteurs. L'exposition prolongée de ces récepteurs NMDA à son ligand pourrait entraîner des mécanismes de plasticité de la transmission

GABAergique ainsi que des phénomènes d'excitotoxicité impliqués dans le développement et maintien des douleurs neuropathiques.

Dans l'ensemble, nos résultats permettent de mieux comprendre comment la composante excitatrice module la composante inhibitrice dans la lamina II. Nos résultats ouvrent de plus des perspectives intéressantes quant aux rôles des récepteurs NMDA présynaptiques ainsi que des cellules gliales dans les douleurs neuropathiques.

Résumé en français

Dans les cornes dorsales (CD), la transmission synaptique inhibitrice joue un rôle clef dans le traitement des informations nociceptives. Cette inhibition peut subir des changements plastiques menant à des symptômes d'hyperalgésie et d'allodynie liés aux douleurs neuropathiques. Dans les CD, les récepteurs NMDA sont recrutés suite à une lésion nerveuse, bien que leur rôle dans les phénomènes de plasticités de la synapse excitatrice soit bien étudié, leur implication dans la plasticité de l'inhibition spinale reste peu connue.

Mon projet de thèse a visé à déterminer l'effet de l'activation des récepteurs NMDA sur l'inhibition synaptique spinale en condition normale et en condition de douleur neuropathique. Pour cela nous utilisons des approches d'électrophysiologies sur tranches aiguës de moelle épinière de souris adultes.

Les résultats obtenus ont permis d'améliorer la compréhension des mécanismes de modulation et plasticité de l'inhibition au sein du réseau nociceptif spinal.

Mot clés : Moelle épinière ; Lamina II ; Transmission synaptique inhibitrice ; Récepteurs NMDA ; Plasticité ; Douleur neuropathique ; Cellules gliales.

Résumé en anglais

In the dorsal horn (DH) of the spinal cord, inhibitory synaptic transmission plays a key role in the processing of nociceptive information. This inhibition can display plastic changes linked with hyperalgesia and allodynia associated with neuropathic pain. In the DH, NMDA receptors are recruited following a nerve injury. Although their role in plastic phenomenon is well established, little is known about their involvement in spinal inhibition plasticity.

My research project aims at studying the effect of NMDA receptor activation on spinal synaptic inhibition in a normal state and during neuropathic pain. To do so we used an electrophysiological approach on acute spinal cord slices of adult mice.

Results obtained allow a better understanding of the mechanism underlying the modulation and plasticity of inhibitory transmission within the spinal nociceptive network.

Key words : Spinal cord ; Lamina II ; Inhibitory synaptic transmission ; NMDA receptors ; Plasticity ; Neuropathic pain; Glial cells.

Bibliographie

- Aanonsen LM, Wilcox GL (1987) Nociceptive action of excitatory amino acids in the mouse: effects of spinally administered opioids, phencyclidine and sigma agonists. *J Pharmacol Exp Ther* 243:9-19.
- Aanonsen LM, Lei S, Wilcox GL (1990) Excitatory amino acid receptors and nociceptive neurotransmission in rat spinal cord. *Pain* 41:309-321.
- Abrahamsson T, Chou CYC, Li SY, Mancino A, Costa RP, Brock JA, Nuro E, Buchanan KA, Elgar D, Blackman AV, Tudor-Jones A, Oyrer J, Farmer WT, Murai KK, Sjöström PJ (2017) Differential Regulation of Evoked and Spontaneous Release by Presynaptic NMDA Receptors. *Neuron* 96:839-855.e835.
- Adams RH, Sato K, Shimada S, Tohyama M, Puschel AW, Betz H (1995) Gene structure and glial expression of the glycine transporter GlyT1 in embryonic and adult rodents. *The Journal of Neuroscience* 15:2524.
- Ahmadi S, Muth-Selbach U, Lauterbach A, Lipfert P, Neuhuber WL, Zeilhofer HU (2003) Facilitation of spinal NMDA receptor currents by spillover of synaptically released glycine. *Science* 300:2094.
- Akazawa C, Shigemoto R, Bessho Y, Nakanishi S, Mizuno N (1994) Differential expression of five N-methyl-D-aspartate receptor subunit mRNAs in the cerebellum of developing and adult rats. *Journal of Comparative Neurology* 347:150-160.
- Al-Khater KM, Kerr R, Todd AJ (2008) A quantitative study of spinothalamic neurons in laminae I, III, and IV in lumbar and cervical segments of the rat spinal cord. *J Comp Neurol* 511:1-18.
- Aldskogius H, Kozlova EN (1998) Central neuron–glial and glial–glial interactions following axon injury. *Prog Neurobiol* 55:1-26.
- Almarestani L, Waters SM, Krause JE, Bennett GJ, Ribeiro-da-Silva A (2007) Morphological characterization of spinal cord dorsal horn lamina I neurons projecting to the parabrachial nucleus in the rat. *Journal of Comparative Neurology* 504:287-297.
- Alvarez FJ, Fyffe REW (2000) Nociceptors for the 21st Century. *Current Review of Pain* 4:451-458.
- Alvarez FJ, Villalba RM, Zerda R, Schneider SP (2004) Vesicular glutamate transporters in the spinal cord, with special reference to sensory primary afferent synapses. *Journal of Comparative Neurology* 472:257-280.
- Alvarez FJ, Villalba RM, Carr PA, Grandes P, Somohano PM (2000) Differential distribution of metabotropic glutamate receptors 1a, 1b, and 5 in the rat spinal cord. *Journal of Comparative Neurology* 422:464-487.
- Araque A, Parpura V, Sanzgiri RP, Hayton PG (1998) Glutamate-dependent astrocyte modulation of synaptic transmission between cultured hippocampal neurons. *Eur J Neurosci* 10.
- Araque A, Parpura V, Sanzgiri RP, Haydon PG (1999) Tripartite synapses: glia, the unacknowledged partner. *Trends in Neurosciences* 22:208-215.
- Araque A, Carmignoto G, Haydon Philip G, Oliet Stéphane HR, Robitaille R, Volterra A (2014) Gliotransmitters Travel in Time and Space. *Neuron* 81:728-739.
- Aronica E, Catania MV, Geurts J, Yankaya B, Troost D (2001) Immunohistochemical localization of group I and II metabotropic glutamate receptors in control and

- amyotrophic lateral sclerosis human spinal cord: upregulation in reactive astrocytes. *Neuroscience* 105:509-520.
- Attal N, Jazat F, Kayser V, Guilbaud G (1990) Further evidence for 'pain-related' behaviours in a model of unilateral peripheral mononeuropathy. *Pain* 41:235-251.
- Attwell D, Gibb A (2005) Neuroenergetics and the kinetic design of excitatory synapses. *Nat Rev Neurosci* 6:841-849.
- Aubrey KR, Rossi FM, Ruivo R, Alboni S, Belenchi GC, Le Goff A, Gasnier B, Supplisson S (2007) The Transporters GlyT2 and VIAAT Cooperate to Determine the Vesicular Glycinergic Phenotype. *The Journal of Neuroscience* 27:6273.
- Azkue JJ, Liu X-G, Zimmermann M, Sandkühler J (2003) Induction of long-term potentiation of C fibre-evoked spinal field potentials requires recruitment of group I, but not group II/III metabotropic glutamate receptors. *Pain* 106:373-379.
- Azkue JJ, Mateos JMa, Elezgarai I, Benítez Ro, Osorio A, Díez J, Bilbao A, Bidaurrazaga A, Grandes P (2000) The metabotropic glutamate receptor subtype mGluR 2/3 is located at extrasynaptic loci in rat spinal dorsal horn synapses. *Neuroscience Letters* 287:236-238.
- Baba H, Ji R-R, Kohno T, Moore KA, Ataka T, Wakai A, Okamoto M, Woolf CJ (2003) Removal of GABAergic inhibition facilitates polysynaptic A fiber-mediated excitatory transmission to the superficial spinal dorsal horn. *Molecular and Cellular Neuroscience* 24:818-830.
- Bannai H, Lévi S, Schweizer C, Inoue T, Launey T, Racine V, Sibarita J-B, Mikoshiba K, Triller A (2009) Activity-Dependent Tuning of Inhibitory Neurotransmission Based on GABAAR Diffusion Dynamics. *Neuron* 62:670-682.
- Barber RP, Vaughn JE, Roberts E (1982) The cytoarchitecture of gabaergic neurons in rat spinal cord. *Brain Research* 238:305-328.
- Bardoni R, Torsney C, Tong C-K, Prandini M, MacDermott AB (2004) Presynaptic NMDA receptors modulate glutamate release from primary sensory neurons in rat spinal cord dorsal horn. *The Journal of Neuroscience* 24:2774.
- Bardoni R, Takazawa T, Tong C-K, Choudhury P, Scherrer G, MacDermott AB (2013) Pre- and postsynaptic inhibitory control in the spinal cord dorsal horn. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1279:90-96.
- Basbaum AI, Bautista DM, Scherrer G, Julius D (2009) Cellular and molecular mechanisms of pain. *Cell* 139:267-284.
- Bazargani N, Attwell D (2016) Astrocyte calcium signaling: the third wave. *Nature Neuroscience* 19:182-189.
- Bennett AD, Everhart AW, Hulsebosch CE (2000) Intrathecal administration of an NMDA or a non-NMDA receptor antagonist reduces mechanical but not thermal allodynia in a rodent model of chronic central pain after spinal cord injury. *Brain Research* 859:72-82.
- Bennett GJ, Xie YK (1988) A peripheral mononeuropathy in rat that produces disorders of pain sensation like those seen in man. *Pain* 33:87-107.
- Beyer C, Roberts LA, Komisaruk BR (1985) Hyperalgesia induced by altered glycinergic activity at the spinal cord. *Life Sciences* 37:875-882.
- Bloomenthal AB, Goldwater E, Pritchett DB, Harrison NL (1994) Biphasic modulation of the strychnine-sensitive glycine receptor by Zn²⁺. *Molecular Pharmacology* 46:1156.
- Bohlhalter S, Weinmann O, Mohler H, Fritschy JM (1996) Laminar compartmentalization of GABAA-receptor subtypes in the spinal cord: an immunohistochemical study. *The Journal of Neuroscience* 16:283.
- Borden LA (1996) GABA TRANSPORTER HETEROGENEITY: PHARMACOLOGY AND CELLULAR LOCALIZATION. *Neurochemistry International* 29:335-356.

- Bouvier G, Bidoret C, Casado M, Paoletti P (2015) Presynaptic NMDA receptors: Roles and rules. *Neuroscience* 311:322-340.
- Boyce S, Wyatt A, Webb JK, O'Donnell R, Mason G, Rigby M, Sirinathsinghji D, Hill RG, Rupniak NMJ (1999) Selective NMDA NR2B antagonists induce antinociception without motor dysfunction: correlation with restricted localisation of NR2B subunit in dorsal horn. *Neuropharmacology* 38:611-623.
- Boyle KA, Gutierrez-Mecinas M, Polgár E, Mooney N, O'Connor E, Furuta T, Watanabe M, Todd AJ (2017) A quantitative study of neurochemically defined populations of inhibitory interneurons in the superficial dorsal horn of the mouse spinal cord. *Neuroscience* 363:120-133.
- Bradaña A, Schlichter R, Trouslard J (2004) Role of glial and neuronal glycine transporters in the control of glycinergic and glutamatergic synaptic transmission in lamina X of the rat spinal cord. *The Journal of Physiology* 559:169-186.
- Braz J, Solorzano C, Wang X, Basbaum Allan I (2014) Transmitting Pain and Itch Messages: A contemporary view of the spinal cord circuits that generate gate control. *Neuron* 82:522-536.
- Braz JM, Nassar MA, Wood JN, Basbaum AI (2005) Parallel "Pain" Pathways arise from subpopulations of primary afferent nociceptor. *Neuron* 47:787-793.
- Bráz JM, Wang X, Guan Z, Rubenstein JL, Basbaum AI (2015) Transplant-mediated enhancement of spinal cord GABAergic inhibition reverses paclitaxel-induced mechanical and heat hypersensitivity. *Pain* 156:1084-1091.
- Bráz João M, Sharif-Naeini R, Vogt D, Kriegstein A, Alvarez-Buylla A, Rubenstein John L, Basbaum Allan I (2012) Forebrain GABAergic neuron precursors integrate into adult spinal cord and reduce injury-induced neuropathic pain. *Neuron* 74:663-675.
- Bresink I, Benke TA, Collett VJ, Seal AJ, Parsons CG, Henley JM, Collingridge GL (1996) Effects of memantine on recombinant rat NMDA receptors expressed in HEK 293 cells. *British Journal of Pharmacology* 119:195-204.
- Brown AG (1982) REVIEW ARTICLE THE DORSAL HORN OF THE SPINAL CORD. *Quarterly Journal of Experimental Physiology* 67:193-212.
- Brown AG, Koerber HR, Noble R (1987) An intracellular study of spinocervical tract cell responses to natural stimuli and single hair afferent fibres in cats. *The Journal of Physiology* 382:331-354.
- Burnashev N, Zhou Z, Neher E, Sakmann B (1995) Fractional calcium currents through recombinant GluR channels of the NMDA, AMPA and kainate receptor subtypes. *The Journal of Physiology* 485:403-418.
- Caillard O, Ben-Ari Y, Gaiarsa J-L (2000) Activation of presynaptic and postsynaptic ryanodine-sensitive calcium stores is required for the induction of long-term depression at GABAergic synapses in the neonatal rat hippocampus amphetamine. *The Journal of Neuroscience* 20:RC94.
- Cantaut-Belarif Y, Antri M, Pizzarelli R, Colasse S, Vaccari I, Soares S, Renner M, Dallel R, Triller A, Bessis A (2017) Microglia control the glycinergic but not the GABAergic synapses via prostaglandin E2 in the spinal cord. *The Journal of Cell Biology* 216:2979-2989.
- Carlton SM, Hargett GL (1995) Treatment with the NMDA antagonist memantine attenuates nociceptive responses to mechanical stimulation in neuropathic rats. *Neuroscience Letters* 198:115-118.
- Carroll RC, Zukin RS (2002) NMDA-receptor trafficking and targeting: implications for synaptic transmission and plasticity. *Trends in Neurosciences* 25:571-577.

- Carroll RC, Lissin DV, Zastrow Mv, Nicoll RA, Malenka RC (1999) Rapid redistribution of glutamate receptors contributes to long-term depression in hippocampal cultures. *Nature Neuroscience* 2:454-460.
- Casado M, Dieudonné S, Ascher P (2000) Presynaptic N-methyl-D-aspartate receptors at the parallel fiber–Purkinje cell synapse. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 97:11593.
- Casado M, Isope P, Ascher P (2002) Involvement of Presynaptic N-Methyl-D-Aspartate Receptors in Cerebellar Long-Term Depression. *Neuron* 33:123-130.
- Castro-Lopes J, Tavares I, Coimbra A (1993) GABA decreases in the spinal cord dorsal horn after peripheral neurectomy. *Brain Research* 620:287-291.
- Cervero F, Iggo A, Ogawa H (1976) Nociceptor-driven dorsal horn neurones in the lumbar spinal cord of the cat. *Pain* 2:5-24.
- Chatterton JE, Awobuluyi M, Premkumar LS, Takahashi H, Talantova M, Shin Y, Cui J, Tu S, Sevarino KA, Nakanishi N, Tong G, Lipton SA, Zhang D (2002) Excitatory glycine receptors containing the NR3 family of NMDA receptor subunits. *Nature* 415:793-798.
- Chen N, Moshaver A, Raymond LA (1997) Differential Sensitivity of Recombinant N-methyl-D-aspartate receptor subtypes to zinc inhibition. *Molecular Pharmacology* 51:1015.
- Chen PE, Geballe MT, Katz E, Erreger K, Livesey MR, O'Toole KK, Le P, Lee CJ, Snyder JP, Traynelis SF, Wyllie DJA (2008) Modulation of glycine potency in rat recombinant NMDA receptors containing chimeric NR2A/2D subunits expressed in *Xenopus laevis* oocytes. *The Journal of Physiology* 586:227-245.
- Chen Z, Jalabi W, Shpargel KB, Farabaugh KT, Dutta R, Yin X, Kidd GJ, Bergmann CC, Stohlman SA, Trapp BD (2012) Lipopolysaccharide-induced microglial activation and neuroprotection against experimental brain injury is independent of hematogenous TLR4. *The Journal of Neuroscience* 32:11706.
- Cheng HT, Suzuki M, Hegarty DM, Xu Q, Weyerbacher AR, South SM, Ohata M, Inturrisi CE (2008) Inflammatory pain-induced signaling events following a conditional deletion of the N-methyl-d-aspartate receptor in spinal cord dorsal horn. *Neuroscience* 155:948-958.
- Chéry N, De Koninck Y (1999) Junctional versus Extrajunctional Glycine and GABA(A) Receptor-Mediated IPSCs in Identified Lamina I Neurons of the Adult Rat Spinal Cord. *The Journal of Neuroscience* 19:7342.
- Chessell IP, Hatcher JP, Bountra C, Michel AD, Hughes JP, Green P, Egerton J, Murfin M, Richardson J, Peck WL, Grahames CBA, Casula MA, Yiangou Y, Birch R, Anand P, Buell GN (2005) Disruption of the P2X7 purinoceptor gene abolishes chronic inflammatory and neuropathic pain. *Pain* 114:386-396.
- Chirila AM, Brown TE, Bishop RA, Bellono NW, Pucci FG, Kauer JA (2014) Long-term potentiation of glycinergic synapses triggered by interleukin 1 β . *Proc Natl Acad Sci U S A* 111:8263-8268.
- Choi DW (1994) Chapter 6 Glutamate receptors and the induction of excitotoxic neuronal death. In: *Progress in Brain Research* (Bloom FE, ed), pp 47-51: Elsevier.
- Cholet N, Pellerin L, Magistretti PJ, Hamel E (2002) Similar Perisynaptic Glial Localization for the Na⁺,K⁺-ATPase α 2 Subunit and the Glutamate Transporters GLAST and GLT-1 in the Rat Somatosensory Cortex. *Cerebral Cortex* 12:515-525.
- Christian CA, Huguenard JR (2013) Astrocytes potentiate GABAergic transmission in the thalamic reticular nucleus via endozepine signaling. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 110:20278.
- Clark GD, Cufford DB, Zorumski CF (1990) The effect of agonist concentration, membrane voltage and calcium on n-methyl-d-aspartate receptor desensitization. *Neuroscience* 39:787-797.

- Clements JD, Lester RA, Tong G, Jahr CE, Westbrook GL (1992) The time course of glutamate in the synaptic cleft. *Science* 258:1498.
- Cochilla AJ, Alford S (1997) Glutamate receptor-mediated synaptic excitation in axons of the lamprey. *The Journal of physiology* 499 (Pt 2):443-457.
- Conn PJ, Pin JP (1997) Pharmacology and functions of metabotropic glutamate receptors. *Annual review of pharmacology and toxicology* 37:205-237.
- Conti F, DeBiasi S, Minelli A, Melone M (1996) Expression of NR1 and NR2A/B subunits of the NMDA receptor in cortical astrocytes. *Glia* 17:254-258.
- Cook AJ, Woolf CJ, Wall PD, McMahon SB (1987) Dynamic receptive field plasticity in rat spinal cord dorsal horn following C-primary afferent input. *Nature* 325:151-153.
- Cordero-Erausquin M, Inquimbert P, Schlichter R, Hugel S (2016) Neuronal networks and nociceptive processing in the dorsal horn of the spinal cord. *Neuroscience* 338:230-247.
- Cordero-Erausquin M, Allard S, Dolique T, Bachand K, Ribeiro-da-Silva A, De Koninck Y (2009) Dorsal horn neurons presynaptic to lamina I spinoparabrachial neurons revealed by transynaptic labeling. *Journal of Comparative Neurology* 517:601-615.
- Cornell-Bell AH, Finkbeiner SM, Cooper MS, Smith SJ (1990) Glutamate induces calcium waves in cultured astrocytes: long-range glial signaling. *Science* 247.
- Coull JAM, Boudreau D, Bachand K, Prescott SA, Nault F, Sík A, Koninck PD, Koninck YD (2003) Trans-synaptic shift in anion gradient in spinal lamina I neurons as a mechanism of neuropathic pain. *Nature* 424:938-942.
- Coull JAM, Beggs S, Boudreau D, Boivin D, Tsuda M, Inoue K, Gravel C, Salter MW, De Koninck Y (2005) BDNF from microglia causes the shift in neuronal anion gradient underlying neuropathic pain. *Nature* 438:1017-1021.
- Cowan AI, Stricker C, Reece LJ, Redman SJ (1998) Long-Term Plasticity at Excitatory Synapses on Apsinous Interneurons in Area CA1 Lacks Synaptic Specificity. *Journal of Neurophysiology* 79:13-20.
- Cronin JN, Bradbury EJ, Lidiert M (2004) Laminar distribution of GABAA- and glycine-receptor mediated tonic inhibition in the dorsal horn of the rat lumbar spinal cord: effects of picrotoxin and strychnine on expression of Fos-like immunoreactivity. *Pain* 112:156-163.
- Cubelos B, González-González IM, Giménez C, Zafra F (2005) The scaffolding protein PSD-95 interacts with the glycine transporter GLYT1 and impairs its internalization. *Journal of Neurochemistry* 95:1047-1058.
- Cui L, Kim Y, Kim H, Lee S, Shin H-S, Szabó G, Erdélyi F, Kim J, Kim SJ (2010) Modulation of synaptic transmission from primary afferents to spinal substantia gelatinosa neurons by group III mGluRs in GAD65-EGFP transgenic mice. *Journal of neurophysiology* 105:1102-1111.
- Cui L, Miao X, Liang L, Abdus-Saboor I, Olson W, Fleming MS, Ma M, Tao Y-X, Luo W (2016) Identification of Early RET+ Deep Dorsal Spinal Cord Interneurons in Gating Pain. *Neuron* 91:1137-1153.
- Cumberbatch M, Chizh B, Headley P (2002) Spinal nociceptive processing: NMDA receptors and modulation by neuropeptides.
- De Leo JA, Tawfik VL, LaCroix-Fralish ML (2006) The tetrapartite synapse: Path to CNS sensitization and chronic pain. *PAIN* 122:17-21.
- Decosterd I, Woolf CJ (2000) Spared nerve injury: an animal model of persistent peripheral neuropathic pain. *Pain* 87:149-158.
- Dingledine R, Borges K, Bowie D, Traynelis SF (1999) The Glutamate Receptor Ion Channels. *Pharmacol Rev* 51:7.

- Djoughri L, Lawson SN (2004) A β -fiber nociceptive primary afferent neurons: a review of incidence and properties in relation to other afferent A-fiber neurons in mammals. *Brain Research Reviews* 46:131-145.
- Djoughri L, Bleazard L, Lawson SN (1998) Association of somatic action potential shape with sensory receptive properties in guinea-pig dorsal root ganglion neurones. *The Journal of Physiology* 513:857-872.
- Dore K, Stein IS, Brock JA, Castillo PE, Zito K, Sjöström PJ (2017) Unconventional NMDA Receptor Signaling. *The Journal of Neuroscience* 37:10800.
- Dougherty PM, Willis WD (1992) Enhanced responses of spinothalamic tract neurons to excitatory amino acids accompany capsaicin-induced sensitization in the monkey. *The Journal of Neuroscience* 12:883.
- Dravid SM, Burger PB, Prakash A, Geballe MT, Yadav R, Le P, Vellano K, Snyder JP, Traynelis SF (2010) Structural Determinants of D-Cycloserine Efficacy at the NR1/NR2C NMDA Receptors. *The Journal of Neuroscience* 30:2741.
- Dravid SM, Erreger K, Yuan H, Nicholson K, Le P, Lyuboslavsky P, Almonte A, Murray E, Mosley C, Barber J, French A, Balster R, Murray TF, Traynelis SF (2007) Subunit-specific mechanisms and proton sensitivity of NMDA receptor channel block. *The Journal of Physiology* 581:107-128.
- Druzin M, Haage D, Johansson S (2004) Bicuculline free base blocks voltage-activated K⁺ currents in rat medial preoptic neurons. *Neuropharmacology* 46:285-295.
- Duan B, Cheng L, Bourane S, Britz O, Padilla C, Garcia-Campmany L, Krashes M, Knowlton W, Velasquez T, Ren X, Ross Sarah E, Lowell Bradford B, Wang Y, Goulding M, Ma Q (2014) Identification of Spinal Circuits Transmitting and Gating Mechanical Pain. *Cell* 159:1417-1432.
- Dubner R, Ruda MA (1992) Activity-dependent neuronal plasticity following tissue injury and inflammation. *Trends in Neurosciences* 15:96-103.
- Duguid IC, Smart TG (2004) Retrograde activation of presynaptic NMDA receptors enhances GABA release at cerebellar interneuron–Purkinje cell synapses. *Nature Neuroscience* 7:525-533.
- Eaton MJ, Plunkett JA, Karmally S, Martinez MA, Montanez K (1998) Changes in GAD- and GABA- immunoreactivity in the spinal dorsal horn after peripheral nerve injury and promotion of recovery by lumbar transplant of immortalized serotonergic precursors. *Journal of Chemical Neuroanatomy* 16:57-72.
- Erreger K, Chen PE, Wyllie DJA, Traynelis SF (2004) Glutamate receptor gating. *Crit Rev Neurobiol* 16:187-224.
- Erreger K, Geballe MT, Dravid SM, Snyder JP, Wyllie DJA, Traynelis SF (2005) Mechanism of Partial Agonism at NMDA Receptors for a Conformationally Restricted Glutamate Analog. *The Journal of Neuroscience* 25:7858.
- Erreger K, Geballe MT, Kristensen A, Chen PE, Hansen KB, Lee CJ, Yuan H, Le P, Lyuboslavsky PN, Micale N, Jørgensen L, Clausen RP, Wyllie DJA, Snyder JP, Traynelis SF (2007) Subunit-Specific Agonist Activity at NR2A-, NR2B-, NR2C-, and NR2D-Containing Erreger K, Geballe MT, Kristensen A, Chen PE, Hansen KB, Lee CJ, Yuan H, Le P, Lyuboslavsky PN, Micale N, Jørgensen L, Clausen RP, Wyllie DJA, Snyder JP, Traynelis SF (2007) Subunit-Specific Agonist Activity at NR2A-, NR2B-, NR2C-, and NR2D containing N-Methyl-D-aspartate Glutamate Receptors. *Molecular Pharmacology* 72:907.
- Etlin A, Bráz JM, Kuhn JA, Wang X, Hamel KA, Llewellyn-Smith IJ, Basbaum AI (2016) Functional Synaptic Integration of Forebrain GABAergic Precursors into the Adult Spinal Cord. *J Neurosci* 36:11634-11645.

- Farquhar-Smith WP, Egertová M, Bradbury EJ, McMahon SB, Rice ASC, Elphick MR (2000) Cannabinoid CB1 Receptor Expression in Rat Spinal Cord. *Molecular and Cellular Neuroscience* 15:510-521.
- Fellin T, Pascual O, Gobbo S, Pozzan T, Haydon PG, Carmignoto G (2004) Neuronal Synchrony Mediated by Astrocytic Glutamate through Activation of Extrasynaptic NMDA Receptors. *Neuron* 43:729-743.
- Feng B, Morley RM, Jane DE, Monaghan DT (2005) The effect of competitive antagonist chain length on NMDA receptor subunit selectivity. *Neuropharmacology* 48:354-359.
- Fenselau H, Heinke B, Sandkühler J (2011) Heterosynaptic Long-Term Potentiation at GABAergic Synapses of Spinal Lamina I Neurons. *The Journal of Neuroscience* 31:17383.
- Fink K, Bönisch H, Göthert M (1990) Presynaptic NMDA receptors stimulate noradrenaline release in the cerebral cortex. *Eur J Pharmacol* 185:115-117.
- Foley JC, McIver SR, Haydon PG (2011) Gliotransmission modulates baseline mechanical nociception. *Mol Pain* 7:93.
- Fonnum F, Johnsen A, Hassel B (1997) Use of fluorocitrate and fluoroacetate in the study of brain metabolism. *Glia* 21:106-113.
- Foster E, Wildner H, Tudeau L, Haueter S, Ralvenius William T, Jegen M, Johannssen H, Hösli L, Haenraets K, Ghanem A, Conzelmann K-K, Bösl M, Zeilhofer Hanns U (2015) Targeted Ablation, Silencing, and Activation Establish Glycinergic Dorsal Horn Neurons as Key Components of a Spinal Gate for Pain and Itch. *Neuron* 85:1289-1304.
- Gadea A, López-Colomé AM (2001) Glial transporters for glutamate, glycine, and GABA: II. GABA transporters. *J Neurosci Res* 63:461-468.
- Gérard F, Hansson E (2012) Inflammatory activation enhances NMDA-triggered Ca²⁺ signalling and IL-1 β secretion in primary cultures of rat astrocytes. *Brain Research* 1473:1-8.
- Glitsch M, Marty A (1999) Presynaptic Effects of NMDA in Cerebellar Purkinje Cells and Interneurons. *The Journal of Neuroscience* 19:511.
- Glitsch MD (2008) Spontaneous neurotransmitter release and Ca²⁺. How spontaneous is spontaneous neurotransmitter release? *Cell Calcium* 43:9-15.
- Grand T, Abi Gerges S, David M, Diana MA, Paoletti P (2018) Unmasking GluN1/GluN3A excitatory glycine NMDA receptors. *Nature Communications* 9:4769.
- Green GM, Gibb AJ (2001) Characterization of the single-channel properties of NMDA receptors in laminae I and II of the dorsal horn of neonatal rat spinal cord. *European Journal of Neuroscience* 14:1590-1602.
- Grudt TJ, Perl ER (2002) Correlations between neuronal morphology and electrophysiological features in the rodent superficial dorsal horn. *The Journal of Physiology* 540:189-207.
- Grudzinska J, Schemm R, Haeger S, Nicke A, Schmalzing G, Betz H, Laube B (2005) The β Subunit Determines the Ligand Binding Properties of Synaptic Glycine Receptors. *Neuron* 45:727-739.
- Gubellini P, Ben-Ari Y, Gaïarsa J-L (2005) Endogenous Neurotrophins Are Required for the Induction of GABAergic Long-Term Potentiation in the Neonatal Rat Hippocampus. *The Journal of Neuroscience* 25:5796.
- Gutierrez-Mecinas M, Furuta T, Watanabe M, Todd AJ (2016) A quantitative study of neurochemically defined excitatory interneuron populations in laminae I-III of the mouse spinal cord. *Mol Pain* 12:1744806916629065.
- Handwerker HO, Iggo A, Zimmermann M (1975) Segmental and supraspinal actions on dorsal horn neurons responding to noxious and non-noxious skin stimuli. *PAIN* 1:147-165.

- Hansen KB, Yi F, Perszyk RE, Furukawa H, Wollmuth LP, Gibb AJ, Traynelis SF (2018) Structure, function, and allosteric modulation of NMDA receptors. *J Gen Physiol* 150:1081-1105.
- Hardingham GE, Fukunaga Y, Bading H (2002) Extrasynaptic NMDARs oppose synaptic NMDARs by triggering CREB shut-off and cell death pathways. *Nature Neuroscience* 5:405-414.
- Häring M, Zeisel A, Hochgerner H, Rinwa P, Jakobsson JET, Lönnerberg P, La Manno G, Sharma N, Borgius L, Kiehn O, Lagerström MC, Linnarsson S, Ernfors P (2018) Neuronal atlas of the dorsal horn defines its architecture and links sensory input to transcriptional cell types. *Nature neuroscience* 21:869-880.
- Harney SC, Jane DE, Anwyl R (2008) Extrasynaptic NR2D-Containing NMDARs Are Recruited to the Synapse during LTP of NMDAR-EPSCs. *The Journal of Neuroscience* 28:11685.
- Harvey RJ, Depner UB, Wässle H, Ahmadi S, Heindl C, Reinold H, Smart TG, Harvey K, Schütz B, Abo-Salem OM, Zimmer A, Poisbeau P, Welzl H, Wolfer DP, Betz H, Zeilhofer HU, Müller U (2004) GlyR $\alpha 3$: An Essential Target for Spinal PGE2-Mediated Inflammatory Pain Sensitization. *Science* 304:884-887.
- Hashimoto A, Nishikawa T, Hayashi T, Fujii N, Harada K, Oka T, Takahashi K (1992) The presence of free D-serine in rat brain. *FEBS Letters* 296:33-36.
- Hassinger TD, Atkinson PB, Strecker GJ, Whalen LR, Dudek FE, Kossel AH, Kater SB (1995) Evidence for glutamate-mediated activation of hippocampal neurons by glial calcium waves. *Journal of Neurobiology* 28:159-170.
- Haynes SE, Hollopeter G, Yang G, Kurpius D, Dailey ME, Gan W-B, Julius D (2006) The P2Y12 receptor regulates microglial activation by extracellular nucleotides. *Nature Neuroscience* 9:1512-1519.
- Heifets BD, Chevaleyre V, Castillo PE (2008) Interneuron activity controls endocannabinoid-mediated presynaptic plasticity through calcineurin. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 105:10250.
- Henson MA, Roberts AC, Pérez-Otaño I, Philpot BD (2010) Influence of the NR3A subunit on NMDA receptor functions. *Prog Neurobiol* 91:23-37.
- Heresco-Levy U, Javitt DC (1998) The role of N-Methyl-D-Aspartate (NMDA) receptor-mediated neurotransmission in the pathophysiology and therapeutics of psychiatric syndromes. *European Neuropsychopharmacology* 8:141-152.
- Hess SD, Daggett LP, Deal C, Lu C-C, Johnson EC, Veliçelebi G (1998) Functional Characterization of Human N-Methyl-d-Aspartate Subtype 1A/2D Receptors. *Journal of Neurochemistry* 70:1269-1279.
- Hildebrand ME, Pitcher GM, Harding EK, Li H, Beggs S, Salter MW (2014) GluN2B and GluN2D NMDARs dominate synaptic responses in the adult spinal cord. *Scientific Reports* 4:4094.
- Ho Kim S, Mo Chung J (1992) An experimental model for peripheral neuropathy produced by segmental spinal nerve ligation in the rat. *PAIN* 50:355-363.
- Hollmann M, Boulter J, Maron C, Beasley L, Sullivan J, Pecht G, Heinemann S (1993) Zinc potentiates agonist-induced currents at certain splice variants of the NMDA receptor. *Neuron* 10:943-954.
- Hu X-D, Ge Y-X, Hu N-W, Zhang H-M, Zhou L-J, Zhang T, Li W-M, Han Y-F, Liu X-G (2006) Diazepam inhibits the induction and maintenance of LTP of C-fiber evoked field potentials in spinal dorsal horn of rats. *Neuropharmacology* 50:238-244.
- Hugel S, Schlichter R (2000) Presynaptic P2X Receptors Facilitate Inhibitory GABAergic Transmission between Cultured Rat Spinal Cord Dorsal Horn Neurons. *The Journal of Neuroscience* 20:2121.

- Humeau Y, Shaban H, Bissière S, Lüthi A (2003) Presynaptic induction of heterosynaptic associative plasticity in the mammalian brain. *Nature* 426:841-845.
- Ibuki T, Hama AT, Wang XT, Pappas GD, Sagen J (1996) 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, Molony V, Steedman WM (1988) Membrane properties of nociceptive neurones in lamina II of lumbar spinal cord in the cat. *The Journal of Physiology* 400:367-380.
- Iii AWM, Chafee MV (2006) Translational and developmental perspective on N-methyl-D-aspartate synaptic deficits in schizophrenia. *Development and Psychopathology* 18:853-876.
- Ikeda H, Heinke B, Ruscheweyh R, Sandkühler J (2003) Synaptic plasticity in spinal lamina I projection neurons that mediate hyperalgesia. *Science (New York, NY)* 299:1237-1240.
- Ikeda H, Stark J, Fischer H, Wagner M, Drdla R, Jäger T, Sandkühler J (2006) Synaptic amplifier of inflammatory pain in the spinal dorsal horn. *Science (New York, NY)* 312:1659-1662.
- Inagaki T, Begum T, Reza F, Horibe S, Inaba M, Yoshimura Y, Komatsu Y (2008) Brain-derived neurotrophic factor-mediated retrograde signaling required for the induction of long-term potentiation at inhibitory synapses of visual cortical pyramidal neurons. *Neuroscience Research* 61:192-200.
- Inquimbert P, Rodeau J-L, Schlichter R (2007) Differential contribution of GABAergic and glycinergic components to inhibitory synaptic transmission in lamina II and laminae III-IV of the young rat spinal cord. *European Journal of Neuroscience* 26:2940-2949.
- Inquimbert P, Rodeau J-L, Schlichter R (2008) Regional Differences in the Decay Kinetics of GABA_A Receptor-Mediated Miniature IPSCs in the Dorsal Horn of the Rat Spinal Cord Are Determined by Mitochondrial Transport of Cholesterol. *The Journal of Neuroscience* 28:3427.
- Inquimbert P, Bartels K, Babaniyi OB, Barrett LB, Tegeder I, Scholz J (2012) Peripheral nerve injury produces a sustained shift in the balance between glutamate release and uptake in the dorsal horn of the spinal cord. *PAIN®* 153:2422-2431.
- Inquimbert P, Moll M, Latremoliere A, Tong C-K, Whang J, Sheehan GF, Smith BM, Korb E, Athié MCP, Babaniyi O, Ghasemlou N, Yanagawa Y, Allis CD, Hof PR, Scholz J (2018) NMDA Receptor Activation Underlies the Loss of Spinal Dorsal Horn Neurons and the Transition to Persistent Pain after Peripheral Nerve Injury. *Cell Reports* 23:2678-2689.
- Ji R-R, Xu Z-Z, Gao Y-J (2014) Emerging targets in neuroinflammation-driven chronic pain. *Nature Reviews Drug Discovery* 13:533-548.
- Ji R-R, Kawasaki Y, Zhuang Z-Y, Wen Y-R, Decosterd I (2007) Possible role of spinal astrocytes in maintaining chronic pain sensitization: review of current evidence with focus on bFGF/JNK pathway. *Neuron Glia Biology* 2:259-269.
- Johnson JW, Ascher P (1987) Glycine potentiates the NMDA response in cultured mouse brain neurons. *Nature* 325:529-531.
- Jonas P, Bischofberger J, Sandkühler J (1998) Corelease of Two Fast Neurotransmitters at a Central Synapse. *Science* 281:419.
- Jourdain P, Bergersen LH, Bhaukaurally K, Bezzi P, Santello M, Domercq M, Matute C, Tonello F, Gundersen V, Volterra A (2007) Glutamate exocytosis from astrocytes controls synaptic strength. *Nature Neuroscience* 10:331-339.
- Kaczor P, Rakus D, Mozrzymas JW (2015) Neuron-astrocyte interaction enhance GABAergic synaptic transmission in a manner dependent on key metabolic enzymes. *Front Cell Neurosci* 9:120-120.

- Kaczor PT, Mozrzymas JW (2017) Key Metabolic Enzymes Underlying Astrocytic Upregulation of GABAergic Plasticity. *Front Cell Neurosci* 11:144-144.
- Kahle KT, Deeb TZ, Puskarjov M, Silayeva L, Liang B, Kaila K, Moss SJ (2013) Modulation of neuronal activity by phosphorylation of the K-Cl cotransporter KCC2. *Trends in Neurosciences* 36:726-737.
- Kanaka C, Ohno K, Okabe A, Kuriyama K, Itoh T, Fukuda A, Sato K (2001) The differential expression patterns of messenger RNAs encoding K-Cl cotransporters (KCC1,2) and Na-K-2Cl cotransporter (NKCC1) in the rat nervous system. *Neuroscience* 104:933-946.
- Kang J, Jiang L, Goldman SA, Nedergaard M (1998) Astrocyte-mediated potentiation of inhibitory synaptic transmission. *Nature Neuroscience* 1:683-692.
- Kano M, Rexhausen U, Dreessen J, Konnerth AA (1992) Synaptic excitation produces a long-lasting rebound potentiation of inhibitory synaptic signals in cerebellar Purkinje cells. *Nature* 356.
- Kano M, Ohno-Shosaku T, Hashimoto-dani Y, Uchigashima M, Watanabe M (2009) Endocannabinoid-Mediated Control of Synaptic Transmission. *Physiol Rev* 89:309-380.
- Karlin A, Akabas MH (1995) Toward a structural basis for the function of nicotinic acetylcholine receptors and their cousins. *Neuron* 15:1231-1244.
- Karlsson U, Sjödin J, Ängeby Möller K, Johansson S, Wikström L, Näsström J (2002) Glutamate-induced currents reveal three functionally distinct NMDA receptor populations in rat dorsal horn – effects of peripheral nerve lesion and inflammation. *Neuroscience* 112:861-868.
- Kartvelishvily E, Shleper M, Balan L, Dumin E, Wolosker H (2006) Neuron-derived D-serine release provides a novel means to activate N-methyl-D-aspartate receptors. *J Biol Chem* 281:14151-14162.
- Keay KA, Feil K, Gordon BD, Herbert H, Bandler R (1997) Spinal afferents to functionally distinct periaqueductal gray columns in the rat: An anterograde and retrograde tracing study. *Journal of Comparative Neurology* 385:207-229.
- Keller AF, Beggs S, Salter MW, De Koninck Y (2007) Transformation of the output of spinal lamina I neurons after nerve injury and microglia stimulation underlying neuropathic pain. *Mol Pain* 3:27.
- Keller AF, Coull JAM, Chéry N, Poisbeau P, De Koninck Y (2001) Region-Specific Developmental Specialization of GABA-Glycine Cosynapses in Laminas I-II of the Rat Spinal Dorsal Horn. *The Journal of Neuroscience* 21:7871.
- Kim MJ, Dunah AW, Wang YT, Sheng M (2005) Differential Roles of NR2A- and NR2B-Containing NMDA Receptors in Ras-ERK Signaling and AMPA Receptor Trafficking. *Neuron* 46:745-760.
- Kleckner NW, Dingledine R (1988) Requirement for glycine in activation of NMDA-receptors expressed in *Xenopus* oocytes. *Science* 241:835.
- Kloc ML, Pradier B, Chirila AM, Kauer JA (2019) NMDA receptor activation induces long-term potentiation of glycine synapses. *PLoS One* 14:e0222066-e0222066.
- Knabl J, Witschi R, Hösl K, Reinold H, Zeilhofer UB, Ahmadi S, Brockhaus J, Sergejeva M, Hess A, Brune K, Fritschy J-M, Rudolph U, Möhler H, Zeilhofer HU (2008) Reversal of pathological pain through specific spinal GABAA receptor subtypes. *Nature* 451:330-334.
- Kontinen V, Dickenson A (2000) EFFECTS OF MIDAZOLAM IN THE SPINAL NERVE LIGATION MODEL OF NEUROPATHIC PAIN IN RATS. *Journal of the Peripheral Nervous System* 5:246-246.

- Kosugi M, Kato G, Lukashov S, Pendse G, Puskar Z, Kozsurek M, Strassman AM (2013) Subpopulation-specific patterns of intrinsic connectivity in mouse superficial dorsal horn as revealed by laser scanning photostimulation. *The Journal of Physiology* 591:1935-1949.
- Kotermanski SE, Johnson JW (2009) Mg²⁺ Imparts NMDA Receptor Subtype Selectivity to the Alzheimer's Drug Memantine. *The Journal of Neuroscience* 29:2774.
- Kozlov AS, Angulo MC, Audinat E, Charpak S (2006) Target cell-specific modulation of neuronal activity by astrocytes. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 103:10058.
- Kullmann DM, Ruiz A, Rusakov DM, Scott R, Semyanov A, Walker MC (2005) Presynaptic, extrasynaptic and axonal GABAA receptors in the CNS: where and why? *Progress in Biophysics and Molecular Biology* 87:33-46.
- Kuner R (2015) Spinal excitatory mechanisms of pathological pain. *Pain* 156 Suppl 1:S11-S17.
- Kuner R, Flor H (2017) Structural plasticity and reorganisation in chronic pain. *Nature Reviews Neuroscience* 18:20-30.
- Kuner T, Schoepfer R (1996) Multiple Structural Elements Determine Subunit Specificity of Mg²⁺ Block in NMDA Receptor Channels. *The Journal of Neuroscience* 16:3549.
- Kunz PA, Roberts AC, Philpot BD (2013) Presynaptic NMDA Receptor Mechanisms for Enhancing Spontaneous Neurotransmitter Release. *The Journal of Neuroscience* 33:7762.
- Labrakakis C, MacDermott AB (2003) Neurokinin receptor 1-expressing spinal cord neurons in lamina I and III/IV of postnatal rats receive inputs from capsaicin sensitive fibers. *Neuroscience Letters* 352:121-124.
- Lachamp PM, Liu Y, Liu SJ (2009) Glutamatergic Modulation of Cerebellar Interneuron Activity Is Mediated by an Enhancement of GABA Release and Requires Protein Kinase A/RIM1 α Signaling. *The Journal of Neuroscience* 29:381-392.
- Lalo U, Pankratov Y, Kirchhoff F, North RA, Verkhratsky A (2006) NMDA Receptors Mediate Neuron-to-Glia Signaling in Mouse Cortical Astrocytes. *The Journal of Neuroscience* 26:2673.
- Lamsa K, Heeroma JH, Kullmann DM (2005) Hebbian LTP in feed-forward inhibitory interneurons and the temporal fidelity of input discrimination. *Nature Neuroscience* 8:916-924.
- Langosch D, Thomas L, Betz H (1988) Conserved quaternary structure of ligand-gated ion channels: the postsynaptic glycine receptor is a pentamer. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 85:7394.
- Larsson M, Broman J (2008) Translocation of GluR1-Containing AMPA Receptors to a Spinal Nociceptive Synapse during Acute Noxious Stimulation. *The Journal of Neuroscience* 28:7084.
- Latremoliere A, Woolf CJ (2009) Central Sensitization: A Generator of Pain Hypersensitivity by Central Neural Plasticity. *The Journal of Pain* 10:895-926.
- Lavoie AM, Tingey JJ, Harrison NL, Pritchett DB, Twyman RE (1997) Activation and deactivation rates of recombinant GABA(A) receptor channels are dependent on alpha-subunit isoform. *Biophysical Journal* 73:2518-2526.
- Lee HHC, Deeb TZ, Walker JA, Davies PA, Moss SJ (2011) NMDA receptor activity downregulates KCC2 resulting in depolarizing GABAA receptor-mediated currents. *Nature Neuroscience* 14:736-743.
- Lee S, Yoon B-E, Berglund K, Oh S-J, Park H, Shin H-S, Augustine GJ, Lee CJ (2010) Channel-Mediated Tonic GABA Release from Glia. *Science* 330:790.

- Lefèvre Y, Amadio A, Vincent P, Descheemaeker A, Oliet SHR, Dallel R, Voisin DL (2015) Neuropathic pain depends upon D-serine co-activation of spinal NMDA receptors in rats. *Neuroscience letters* 603:42-47.
- Legendre P (2001) The glycinergic inhibitory synapse. *Cell Mol Life Sci* 58:760-793.
- Legendre P, Rosenmund C, Westbrook GL (1993) Inactivation of NMDA channels in cultured hippocampal neurons by intracellular calcium. *The Journal of Neuroscience* 13:674.
- Leitner J, Westerholz S, Heinke B, Forsthuber L, Wunderbaldinger G, Jäger T, Schoffnegger D, Braun K, Sandkühler J (2013) Impaired Excitatory Drive to Spinal Gabaergic Neurons of Neuropathic Mice. *PLoS One* 8:e73370.
- Lerma J (2003) Roles and rules of kainate receptors in synaptic transmission. *Nature Reviews Neuroscience* 4:481-495.
- Lester RAJ, Clements JD, Westbrook GL, Jahr CE (1990) Channel kinetics determine the time course of NMDA receptor-mediated synaptic currents. *Nature* 346:565-567.
- Lever I, Cunningham J, Grist J, Yip PK, Malcangio M (2003) Release of BDNF and GABA in the dorsal horn of neuropathic rats. *European Journal of Neuroscience* 18:1169-1174.
- Li L, Chen S-R, Chen H, Wen L, Hittelman WN, Xie J-D, Pan H-L (2016) Chloride Homeostasis Critically Regulates Synaptic NMDA Receptor Activity in Neuropathic Pain. *Cell Reports* 15:1376-1383.
- Lien C-C, Mu Y, Vargas-Caballero M, Poo M-m (2006) Visual stimuli-induced LTD of GABAergic synapses mediated by presynaptic NMDA receptors. *Nature Neuroscience* 9:372-380.
- Light AR, Perl ER (1979) Reexamination of the dorsal root projection to the spinal dorsal horn including observations on the differential termination of coarse and fine fibers. *Journal of Comparative Neurology* 186:117-131.
- Lim S-H, Park E, You B, Jung Y, Park AR, Park SG, Lee J-R (2013) Neuronal Synapse Formation Induced by Microglia and Interleukin 10. *PLoS One* 8:e81218.
- Lipton SA (2004) Failures and successes of NMDA receptor antagonists: molecular basis for the use of open-channel blockers like memantine in the treatment of acute and chronic neurologic insults. *NeuroRx* 1:101-110.
- Lisman J, Schulman H, Cline H (2002) The molecular basis of CaMKII function in synaptic and behavioural memory. *Nature Reviews Neuroscience* 3:175-190.
- Lissin DV, Gomperts SN, Carroll RC, Christine CW, Kalman D, Kitamura M, Hardy S, Nicoll RA, Malenka RC, von Zastrow M (1998) Activity differentially regulates the surface expression of synaptic AMPA and NMDA glutamate receptors. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 95:7097.
- Liu H, Wang H, Sheng M, Jan LY, Jan YN, Basbaum AI (1994) Evidence for presynaptic N-methyl-D-aspartate autoreceptors in the spinal cord dorsal horn. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 91:8383.
- Liu Q-Y, Schaffner AE, Li Y-X, Dunlap V, Barker JL (1996) Upregulation of GABAA Current by Astrocytes in Cultured Embryonic Rat Hippocampal Neurons. *The Journal of Neuroscience* 16:2912.
- Liu Q-Y, Schaffner AE, Chang YH, Vaszil K, Barker JL (1997) Astrocytes regulate amino acid receptor current densities in embryonic rat hippocampal neurons. *Journal of Neurobiology* 33:848-864.
- Liu SJ, Lachamp P (2006) The Activation of Excitatory Glutamate Receptors Evokes a Long-Lasting Increase in the Release of GABA from Cerebellar Stellate Cells. *The Journal of Neuroscience* 26:9332.
- Liu X, Eschenfelder S, Blenk K-H, Jänig W, Häbler H-J (2000) Spontaneous activity of axotomized afferent neurons after L5 spinal nerve injury in rats. *PAIN®* 84:309-318.

- Liu XG, Sandkühler J (1995) Long-term potentiation of C-fiber-evoked potentials in the rat spinal dorsal horn is prevented by spinal N-methyl-d-aspartic acid receptor blockage. *Neuroscience Letters* 191:43-46.
- Liu Y, Zhang LI, Tao HW (2007a) Heterosynaptic Scaling of Developing GABAergic Synapses: Dependence on Glutamatergic Input and Developmental Stage. *The Journal of Neuroscience* 27:5301.
- Liu Y, Wong TP, Aarts M, Rooyackers A, Liu L, Lai TW, Wu DC, Lu J, Tymianski M, Craig AM, Wang YT (2007b) NMDA Receptor Subunits Have Differential Roles in Mediating Excitotoxic Neuronal Death Both in vitro and in vivo. *The Journal of Neuroscience* 27:2846.
- Llano I, Leresche N, Marty A (1991) Calcium entry increases the sensitivity of cerebellar Purkinje cells to applied GABA and decreases inhibitory synaptic currents. *Neuron* 6:565-574.
- Llewellyn-Smith IJ, Basbaum AI, Bráz JM (2018) Long-term, dynamic synaptic reorganization after GABAergic precursor cell transplantation into adult mouse spinal cord. *J Comp Neurol* 526:480-495.
- Loomis CW, Khandwala H, Osmond G, Hefferan MP (2001) Coadministration of Intrathecal Strychnine and Bicuculline Effects Synergistic Allodynia in the Rat: An Isobolographic Analysis. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 296:756.
- Lorenzo L-E, Ramien M, St. Louis M, De Koninck Y, Ribeiro-Da-Silva A (2008) Postnatal changes in the Rexed lamination and markers of nociceptive afferents in the superficial dorsal horn of the rat. *Journal of Comparative Neurology* 508:592-604.
- Lu C-R, Willcockson HH, Phend KD, Lucifora S, Darstein M, Valtschanoff JG, Rustioni A (2005) Ionotropic glutamate receptors are expressed in GABAergic terminals in the rat superficial dorsal horn. *Journal of Comparative Neurology* 486:169-178.
- Lu Y, Perl ER (2003) A Specific Inhibitory Pathway between Substantia Gelatinosa Neurons Receiving Direct C-Fiber Input. *The Journal of Neuroscience* 23:8752.
- Lu Y, Perl ER (2005) Modular Organization of Excitatory Circuits between Neurons of the Spinal Superficial Dorsal Horn (Laminae I and II). *The Journal of Neuroscience* 25:3900.
- Lu Y, Dong H, Gao Y, Gong Y, Ren Y, Gu N, Zhou S, Xia N, Sun Y-Y, Ji R-R, Xiong L (2013) A feed-forward spinal cord glycinergic neural circuit gates mechanical allodynia. *J Clin Invest* 123:4050-4062.
- Luque JM, Nelson N, Richards JG (1995) Cellular expression of glycine transporter 2 messenger RNA exclusively in rat hindbrain and spinal cord. *Neuroscience* 64:525-535.
- Luque JM, Bleuel Z, Malherbe P, Richards JG (1994) Alternatively spliced isoforms of the N-methyl-d-aspartate receptor subunit 1 are differentially distributed within the rat spinal cord. *Neuroscience* 63:629-635.
- Lüscher C, Malenka RC (2012) NMDA receptor-dependent long-term potentiation and long-term depression (LTP/LTD). *Cold Spring Harb Perspect Biol* 4:a005710.
- Lynch JW (2004) Molecular Structure and Function of the Glycine Receptor Chloride Channel. *Physiol Rev* 84:1051-1095.
- Lynskey JV, Belanger A, Jung R (2008) Activity-dependent plasticity in spinal cord injury. *J Rehabil Res Dev* 45:229-240.
- Macdonald RL, Olsen RW (1994) GABAA Receptor Channels. *Annual Review of Neuroscience* 17:569-602.
- MacDonald RL, Rogers CJ, Twyman RE (1989) Barbiturate regulation of kinetic properties of the GABAA receptor channel of mouse spinal neurones in culture. *The Journal of Physiology* 417:483-500.

- Mackie M, Hughes DI, Maxwell DJ, Tillakaratne NJK, Todd AJ (2003) Distribution and colocalisation of glutamate decarboxylase isoforms in the rat spinal cord. *Neuroscience* 119:461-472.
- Malayev A, Gibbs TT, Farb DH (2002) Inhibition of the NMDA response by pregnenolone sulphate reveals subtype selective modulation of NMDA receptors by sulphated steroids. *British Journal of Pharmacology* 135:901-909.
- Maldonado PP, Vélez-Fort M, Angulo MC (2011) Is neuronal communication with NG2 cells synaptic or extrasynaptic? *Journal of Anatomy* 219:8-17.
- Malenka RC, Nicoll RA (1993) NMDA-receptor-dependent synaptic plasticity: multiple forms and mechanisms. *Trends Neurosci* 16.
- Marsden KC, Beattie JB, Friedenthal J, Carroll RC (2007) NMDA Receptor Activation Potentiates Inhibitory Transmission through GABA Receptor-Associated Protein-Dependent Exocytosis of GABAA Receptors. *The Journal of Neuroscience* 27:14326.
- Marsden KC, Shemesh A, Bayer KU, Carroll RC (2010) Selective translocation of Ca²⁺/calmodulin protein kinase II α (CaMKII α) to inhibitory synapses. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 107:20559-20564.
- Maxwell DJ, Belle MD, Cheunsuang O, Stewart A, Morris R (2007) Morphology of inhibitory and excitatory interneurons in superficial laminae of the rat dorsal horn. *The Journal of Physiology* 584:521-533.
- Mayer ML, Vyklicky Jr L (1989) The action of zinc on synaptic transmission and neuronal excitability in cultures of mouse hippocampus. *The Journal of Physiology* 415:351-365.
- Mayer ML, Westbrook GL, Guthrie PB (1984) Voltage-dependent block by Mg²⁺ of NMDA responses in spinal cord neurones. *Nature* 309:261-263.
- McGuinness L, Taylor C, Taylor RDT, Yau C, Langenhan T, Hart ML, Christian H, Tynan PW, Donnelly P, Emptage NJ (2010) Presynaptic NMDARs in the Hippocampus Facilitate Transmitter Release at Theta Frequency. *Neuron* 68:1109-1127.
- McIntire SL, Reimer RJ, Schuske K, Edwards RH, Jorgensen EM (1997) Identification and characterization of the vesicular GABA transporter. *Nature* 389:870-876.
- McLaughlin BJ, Barber R, Saito K, Roberts E, Wu JY (1975) Immunocytochemical localization of glutamate decarboxylase in rat spinal cord. *Journal of Comparative Neurology* 164:305-321.
- McMahon LL, Kauer JA (1997) Hippocampal Interneurons Express a Novel Form of Synaptic Plasticity. *Neuron* 18:295-305.
- Medina I, Filippova N, Charton G, Rougeole S, Ben-Ari Y, Khrestchatsky M, Bregestovski P (1995) Calcium-dependent inactivation of heteromeric NMDA receptor-channels expressed in human embryonic kidney cells. *The Journal of Physiology* 482:567-573.
- Melzack R, Wall PD (1965) Pain Mechanisms: A New Theory. *Science* 150:971.
- Mi R, Sia G-M, Rosen K, Tang X, Moghekar A, Black JL, McEnery M, Haganir RL, O'Brien RJ (2004) AMPA Receptor-Dependent Clustering of Synaptic NMDA Receptors Is Mediated by Stargazin and NR2A/B in Spinal Neurons and Hippocampal Interneurons. *Neuron* 44:335-349.
- Miletic G, Draganic P, Pankratz MT, Miletic V (2003) Muscimol prevents long-lasting potentiation of dorsal horn field potentials in rats with chronic constriction injury exhibiting decreased levels of the GABA transporter GAT-1. *Pain* 105:347-353.
- Millan MJ (1999) The induction of pain: an integrative review. *Prog Neurobiol* 57:1-164.
- Millan MJ (2002) Descending control of pain. *Prog Neurobiol* 66:355-474.
- Miracourt LS, Dallel R, Voisin DL (2007) Glycine inhibitory dysfunction turns touch into pain through PKC γ interneurons. *PLoS One* 2:e1116-e1116.
- Miracourt LS, Peirs C, Dallel R, Voisin DL (2011) Glycine inhibitory dysfunction turns touch into pain through astrocyte-derived d-serine. *PAIN* 152:1340-1348.

- Miya K, Inoue R, Takata Y, Abe M, Natsume R, Sakimura K, Hongou K, Miyawaki T, Mori H (2008) Serine racemase is predominantly localized in neurons in mouse brain. *Journal of Comparative Neurology* 510:641-654.
- Molla G, Vegezzi C, Pilone MS, Pollegioni L (1998) Overexpression in *Escherichia coli* of a Recombinant Chimeric *Rhodotorula gracilis*-Amino Acid Oxidase. *Protein Expression and Purification* 14:289-294.
- Momiyama A (2000) Distinct synaptic and extrasynaptic NMDA receptors identified in dorsal horn neurones of the adult rat spinal cord. *The Journal of physiology* 523 Pt 3:621-628.
- Monyer H, Burnashev N, Laurie DJ, Sakmann B, Seeburg PH (1994) Developmental and regional expression in the rat brain and functional properties of four NMDA receptors. *Neuron* 12:529-540.
- Moore KA, Kohno T, Karchewski LA, Scholz J, Baba H, Woolf CJ (2002) Partial Peripheral Nerve Injury Promotes a Selective Loss of GABAergic Inhibition in the Superficial Dorsal Horn of the Spinal Cord. *The Journal of Neuroscience* 22:6724.
- Moriyoshi K, Masu M, Ishii T, Shigemoto R, Mizuno N, Nakanishi S (1991) Molecular cloning and characterization of the rat NMDA receptor. *Nature* 354:31-37.
- Moss SJ, Smart TG (2001) Constructing inhibitory synapses. *Nature Reviews Neuroscience* 2:240-250.
- Mullasseril P, Hansen KB, Vance KM, Ogden KK, Yuan H, Kurtkaya NL, Santangelo R, Orr AG, Le P, Vellano KM, Liotta DC, Traynelis SF (2010) A subunit-selective potentiator of NR2C- and NR2D-containing NMDA receptors. *Nature Communications* 1:90.
- Nagy GG, Watanabe M, Fukaya M, Todd AJ (2004) Synaptic distribution of the NR1, NR2A and NR2B subunits of the N-methyl-d-aspartate receptor in the rat lumbar spinal cord revealed with an antigen-unmasking technique. *European Journal of Neuroscience* 20:3301-3312.
- Nakanishi H, Kawachi A, Okada M, Fujiwara M, Yamamoto K (1996) Protective effect of MK-801 on the anoxia-aglycemia induced damage in the fluorocitrate-treated hippocampal slice of the rat. *Brain Research* 732:232-236.
- Nam Y, Kim J-H, Kim J-H, Jha MK, Jung JY, Lee M-G, Choi I-S, Jang I-S, Lim DG, Hwang S-H, Cho H-J, Suk K (2016) Reversible Induction of Pain Hypersensitivity following Optogenetic Stimulation of Spinal Astrocytes. *Cell Reports* 17:3049-3061.
- Navarrete M, Araque A (2008) Endocannabinoids Mediate Neuron-Astrocyte Communication. *Neuron* 57:883-893.
- Nedergaard M, Ransom B, Goldman SA (2003) New roles for astrocytes: Redefining the functional architecture of the brain. *Trends in Neurosciences* 26:523-530.
- Newman EA (2003) Glial Cell Inhibition of Neurons by Release of ATP. *The Journal of Neuroscience* 23:1659.
- Niswender CM, Conn PJ (2010) Metabotropic Glutamate Receptors: Physiology, Pharmacology, and Disease. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology* 50:295-322.
- Novak V, Kanard R, Kissel JT, Mendell JR (2001) Treatment of painful sensory neuropathy with tiagabine: a pilot study. *Clin Auton Res* 11:357-361.
- Nugent FS, Penick EC, Kauer JA (2007) Opioids block long-term potentiation of inhibitory synapses. *Nature* 446:1086-1090.
- Obata K, Yamanaka H, Fukuoka T, Yi D, Tokunaga A, Hashimoto N, Yoshikawa H, Noguchi K (2003) Contribution of injured and uninjured dorsal root ganglion neurons to pain behavior and the changes in gene expression following chronic constriction injury of the sciatic nerve in rats. *Pain* 101:65-77.

- Olsen RW, Sieghart W (2008) International Union of Pharmacology. LXX. Subtypes of γ -Aminobutyric Acid Receptors: Classification on the Basis of Subunit Composition, Pharmacology, and Function. Update. *Pharmacol Rev* 60:243-260.
- Ormond J, Woodin MA (2009) Disinhibition mediates a form of hippocampal long-term potentiation in area CA1. *PLoS One* 4:e7224-e7224.
- Orre M, Kamphuis W, Osborn LM, Melief J, Kooijman L, Huitinga I, Klooster J, Bossers K, Hol EM (2014) Acute isolation and transcriptome characterization of cortical astrocytes and microglia from young and aged mice. *Neurobiology of Aging* 35:1-14.
- Otsu Y, Darceq E, Pietrajtis K, Mátyás F, Schwartz E, Bessaih T, Abi Gerges S, Rousseau CV, Grand T, Dieudonné S, Paoletti P, Acsády L, Agulhon C, Kieffer BL, Diana MA (2019) Control of aversion by glycine-gated GluN1/GluN3A NMDA receptors in the adult medial habenula. *Science* 366:250.
- Palygin O, Lalo U, Verkhatsky A, Pankratov Y (2010) Ionotropic NMDA and P2X1/5 receptors mediate synaptically induced Ca²⁺ signalling in cortical astrocytes. *Cell Calcium* 48:225-231.
- Panatier A, Theodosis DT, Mothet J-P, Touquet B, Pollegioni L, Poulain DA, Oliet SHR (2006) Glia-Derived d-Serine Controls NMDA Receptor Activity and Synaptic Memory. *Cell* 125:775-784.
- Paoletti P, Neyton J (2007) NMDA receptor subunits: function and pharmacology. *Current Opinion in Pharmacology* 7:39-47.
- Paoletti P, Ascher P, Neyton J (1997) High-Affinity Zinc Inhibition of NMDA NR1–NR2A Receptors. *The Journal of Neuroscience* 17:5711.
- Paoletti P, Bellone C, Zhou Q (2013) NMDA receptor subunit diversity: impact on receptor properties, synaptic plasticity and disease. *Nature Reviews Neuroscience* 14:383-400.
- Paoletti P, Vergnano AM, Barbour B, Casado M (2009) Zinc at glutamatergic synapses. *Neuroscience* 158:126-136.
- Papouin T, Ladépêche L, Ruel J, Sacchi S, Labasque M, Hanini M, Groc L, Pollegioni L, Mothet J-P, Oliet Stéphane HR (2012) Synaptic and Extrasynaptic NMDA Receptors Are Gated by Different Endogenous Coagonists. *Cell* 150:633-646.
- Park H, Popescu A, Poo M-m (2014) Essential Role of Presynaptic NMDA Receptors in Activity-Dependent BDNF Secretion and Corticostriatal LTP. *Neuron* 84:1009-1022.
- Parpura V, Zorec R (2010) Gliotransmission: Exocytotic release from astrocytes. *Brain Research Reviews* 63:83-92.
- Paulsen RE, Contestabile A, Villani L, Fonnum F (1987) An In Vivo Model for Studying Function of Brain Tissue Temporarily Devoid of Glial Cell Metabolism: The Use of Fluorocitrate. *Journal of Neurochemistry* 48:1377-1385.
- Peirs C, Seal RP (2016) Neural circuits for pain: Recent advances and current views. *Science* 354:578.
- Peirs C, Williams S-Paul G, Zhao X, Walsh Claire E, Gedeon Jeremy Y, Cagle Natalie E, Goldring Adam C, Hioki H, Liu Z, Marell Paulina S, Seal Rebecca P (2015) Dorsal Horn Circuits for Persistent Mechanical Pain. *Neuron* 87:797-812.
- Pérez-Otaño I, Larsen RS, Wesseling JF (2016) Emerging roles of GluN3-containing NMDA receptors in the CNS. *Nat Rev Neurosci* 17:623-635.
- Petitjean H, Pawlowski SA, Fraine SL, Sharif B, Hamad D, Fatima T, Berg J, Brown CM, Jan L-Y, Ribeiro-da-Silva A, Braz JM, Basbaum AI, Sharif-Naeini R (2015) Dorsal Horn Parvalbumin Neurons Are Gate-Keepers of Touch-Evoked Pain after Nerve Injury. *Cell Reports* 13:1246-1257.
- Petralia RS, Yokotani N, Wenthold RJ (1994) Light and electron microscope distribution of the NMDA receptor subunit NMDAR1 in the rat nervous system using a selective anti-peptide antibody. *The Journal of Neuroscience* 14:667.

- Petralia RS, Wang Y-X, Wenthold RJ (2002) NMDA receptors and PSD-95 are found in attachment plaques in cerebellar granular layer glomeruli. *European Journal of Neuroscience* 15:583-587.
- Petralia RS, Wang YX, Hua F, Yi Z, Zhou A, Ge L, Stephenson FA, Wenthold RJ (2010) Organization of NMDA receptors at extrasynaptic locations. *Neuroscience* 167:68-87.
- Petrenko AB, Yamakura T, Baba H, Shimoji K (2003) The role of N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptors in pain: a review. *Anesth Analg* 97:1108-1116.
- Petrosino S, Palazzo E, de Novellis V, Bisogno T, Rossi F, Maione S, Di Marzo V (2007) Changes in spinal and supraspinal endocannabinoid levels in neuropathic rats. *Neuropharmacology* 52:415-422.
- Petrovic M, Sedlacek M, Horak M, Chodounska H, Vyklický L (2005) 20-Oxo-5 β -Pregnan-3 α -yl Sulfate Is a Use-Dependent NMDA Receptor Inhibitor. *The Journal of Neuroscience* 25:8439-8450.
- Pfeiffer F, Betz H (1981) Solubilization of the glycine receptor from rat spinal cord. *Brain Research* 226:273-279.
- Pfeiffer F, Graham D, Betz H (1982) Purification by affinity chromatography of the glycine receptor of rat spinal cord. *J Biol Chem* 257:9389-9393.
- Piña-Crespo JC, Talantova M, Micu I, States B, Chen HSV, Tu S, Nakanishi N, Tong G, Zhang D, Heinemann SF, Zamponi GW, Stys PK, Lipton SA (2010) Excitatory glycine responses of CNS myelin mediated by NR1/NR3 "NMDA" receptor subunits. *J Neurosci* 30:11501-11505.
- Pitcher GM, Ritchie J, Henry JL (1999) Nerve constriction in the rat: model of neuropathic, surgical and central pain. *PAIN* 83:37-46.
- Pitler TA, Alger BE (1992) Postsynaptic spike firing reduces synaptic GABAA responses in hippocampal pyramidal cells. *The Journal of Neuroscience* 12:4122.
- Pittaluga A, Raiteri M (1992) N-methyl-D-aspartic acid (NMDA) and non-NMDA receptors regulating hippocampal norepinephrine release. I. Location on axon terminals and pharmacological characterization. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 260:232.
- Pockett S (1995) Spinal cord synaptic plasticity and chronic pain. *Anesth Analg* 80:173-179.
- Poisbeau P, Patte-Mensah C, Keller AF, Barrot M, Breton J-D, Luis-Delgado OE, Freund-Mercier MJ, Mensah-Nyagan AG, Schlichter R (2005) Inflammatory Pain Upregulates Spinal Inhibition via Endogenous Neurosteroid Production. *The Journal of Neuroscience* 25:11768.
- Polgár E, Todd AJ (2008) Tactile allodynia can occur in the spared nerve injury model in the rat without selective loss of GABA or GABAA receptors from synapses in laminae I–II of the ipsilateral spinal dorsal horn. *Neuroscience* 156:193-202.
- Polgár E, Hughes DI, Arham AZ, Todd AJ (2005) Loss of Neurons from Laminas I-III of the Spinal Dorsal Horn Is Not Required for Development of Tactile Allodynia in the Spared Nerve Injury Model of Neuropathic Pain. *The Journal of Neuroscience* 25:6658.
- Polgár E, Sardella TCP, Watanabe M, Todd AJ (2011) Quantitative study of NPY-expressing GABAergic neurons and axons in rat spinal dorsal horn. *Journal of Comparative Neurology* 519:1007-1023.
- Polgár E, Durrieux C, Hughes DI, Todd AJ (2013) A quantitative study of inhibitory interneurons in laminae I-III of the mouse spinal dorsal horn. *PLoS One* 8:e78309-e78309.
- Polgár E, Hughes DI, Riddell JS, Maxwell DJ, Puskár Z, Todd AJ (2003) Selective loss of spinal GABAergic or glycinergic neurons is not necessary for development of thermal hyperalgesia in the chronic constriction injury model of neuropathic pain. *Pain* 104:229-239.

- Pougnat J-T, Toulme E, Martinez A, Choquet D, Hosy E, Boué-Grabot E (2014) ATP P2X Receptors Downregulate AMPA Receptor Trafficking and Postsynaptic Efficacy in Hippocampal Neurons. *Neuron* 83:417-430.
- Qu X-X, Cai J, Li M-J, Chi Y-N, Liao F-F, Liu F-Y, Wan Y, Han J-S, Xing G-G (2009) Role of the spinal cord NR2B-containing NMDA receptors in the development of neuropathic pain. *Experimental Neurology* 215:298-307.
- Rachline J, Perin-Dureau F, Le Goff A, Neyton J, Paoletti P (2005) The Micromolar Zinc-Binding Domain on the NMDA Receptor Subunit NR2B. *The Journal of Neuroscience* 25:308.
- Rajalu M, Müller UC, Caley A, Harvey RJ, Poisbeau P (2009) Plasticity of synaptic inhibition in mouse spinal cord lamina II neurons during early postnatal development and after inactivation of the glycine receptor $\alpha 3$ subunit gene. *European Journal of Neuroscience* 30:2284-2292.
- Rajendra S, Lynch JW, Pierce KD, French CR, Barry PH, Schofield PR (1995) Mutation of an arginine residue in the human glycine receptor transforms β -alanine and taurine from agonists into competitive antagonists. *Neuron* 14:169-175.
- Randić M, Jiang MC, Cerne R (1993) Long-term potentiation and long-term depression of primary afferent neurotransmission in the rat spinal cord. *J Neurosci* 13:5228-5241.
- Regalado MP, Villarroel A, Lerma J (2001) Intersubunit Cooperativity in the NMDA Receptor. *Neuron* 32:1085-1096.
- Reichling DB, MacDermott AB (1996) NMDA receptor-mediated calcium entry in the absence of AMPA receptor activation in rat dorsal horn neurons. *Neuroscience Letters* 204:17-20.
- Ren K, Dubner R (1993) NMDA receptor antagonists attenuate mechanical hyperalgesia in rats with unilateral inflammation of the hindpaw. *Neuroscience Letters* 163:22-26.
- Rexed B (1954) A cytoarchitectonic atlas of the spinal cord in the cat. *Journal of Comparative Neurology* 100:297-379.
- Ribera AB, Spitzer NC (1987) Both barium and calcium activate neuronal potassium currents. *Proc Natl Acad Sci U S A* 84:6577-6581.
- Rivera C, Voipio J, Thomas-Crusells J, Li H, Emri Z, Sipilä S, Payne JA, Minichiello L, Saarna M, Kaila K (2004) Mechanism of Activity-Dependent Downregulation of the Neuron-Specific K-Cl Cotransporter KCC2. *The Journal of Neuroscience* 24:4683.
- Roche KW, Standley S, McCallum J, Dune Ly C, Ehlers MD, Wenthold RJ (2001) Molecular determinants of NMDA receptor internalization. *Nature Neuroscience* 4:794-802.
- Rogers M, Dani JA (1995) Comparison of quantitative calcium flux through NMDA, ATP, and ACh receptor channels. *Biophysical Journal* 68:501-506.
- Rosenberg D, Kartvelishvily E, Shleper M, Klinker CMC, Bowser MT, Wolosker H (2010) Neuronal release of d-serine: a physiological pathway controlling extracellular d-serine concentration. *The FASEB Journal* 24:2951-2961.
- Rothstein JD, Dykes-Hoberg M, Pardo CA, Bristol LA, Jin L, Kuncl RW, Kanai Y, Hediger MA, Wang Y, Schielke JP, Welty DF (1996) Knockout of Glutamate Transporters Reveals a Major Role for Astroglial Transport in Excitotoxicity and Clearance of Glutamate. *Neuron* 16:675-686.
- Roux MJ, Supplisson S (2000) Neuronal and Glial Glycine Transporters Have Different Stoichiometries. *Neuron* 25:373-383.
- Ruscheweyh R, Sandkühler J (2003) Epileptiform activity in rat spinal dorsal horn in vitro has common features with neuropathic pain. *Pain* 105:327-338.
- Ruscheweyh R, Sandkühler J (2005) Long-range oscillatory Ca²⁺ waves in rat spinal dorsal horn. *European Journal of Neuroscience* 22:1967-1976.

- Rusnakova V, Honsa P, Dzamba D, Ståhlberg A, Kubista M, Anderova M (2013) Heterogeneity of astrocytes: from development to injury - single cell gene expression. *PLoS One* 8:e69734-e69734.
- Ryan TJ, Emes RD, Grant SGN, Komiyama NH (2008) Evolution of NMDA receptor cytoplasmic interaction domains: implications for organisation of synaptic signalling complexes. *BMC Neuroscience* 9:6.
- Saadé NE, Tabet MS, Banna NR, Atweh SF, Jabbur SJ (1985) Inhibition of nociceptive evoked activity in spinal neurons through a dorsal column-brainstem-spinal loop. *Brain Research* 339:115-118.
- Saeed AW, Ribeiro-da-Silva A (2013) De novo expression of neurokinin-1 receptors by spinoparabrachial lamina I pyramidal neurons following a peripheral nerve lesion. *Journal of Comparative Neurology* 521:1915-1928.
- Sagné C, El Mestikawy S, Isambert M-F, Hamon M, Henry J-P, Giros B, Gasnier B (1997) Cloning of a functional vesicular GABA and glycine transporter by screening of genome databases. *FEBS Letters* 417:177-183.
- Sandkühler J (2009) Models and Mechanisms of Hyperalgesia and Allodynia. *Physiol Rev* 89:707-758.
- Sandkühler J, Liu X (1998) Induction of long-term potentiation at spinal synapses by noxious stimulation or nerve injury. *European Journal of Neuroscience* 10:2476-2480.
- Sandkühler J, Chen JG, Cheng G, Randić M (1997) Low-Frequency Stimulation of Afferent A δ -Fibers Induces Long-Term Depression at Primary Afferent Synapses with Substantia Gelatinosa Neurons in the Rat. *The Journal of Neuroscience* 17:6483-6491.
- Sanna E, Talani G, Busonero F, Pisu MG, Purdy RH, Serra M, Biggio G (2004) Brain Steroidogenesis Mediates Ethanol Modulation of GABA_A Receptor Activity in Rat Hippocampus. *The Journal of Neuroscience* 24:6521.
- Santos SFA, Luz LL, Szucs P, Lima D, Derkach VA, Safronov BV (2009) Transmission Efficacy and Plasticity in Glutamatergic Synapses Formed by Excitatory Interneurons of the Substantia Gelatinosa in the Rat Spinal Cord. *PLoS One* 4:e8047.
- Sardella TCP, Polgár E, Watanabe M, Todd AJ (2011) A quantitative study of neuronal nitric oxide synthase expression in laminae I–III of the rat spinal dorsal horn. *Neuroscience* 192:708-720.
- Satoh O, Omote K (1996) Roles of monoaminergic, glycinergic and GABAergic inhibitory systems in the spinal cord in rats with peripheral mononeuropathy. *Brain Research* 728:27-36.
- Schell MJ, Molliver ME, Snyder SH (1995) D-serine, an endogenous synaptic modulator: localization to astrocytes and glutamate-stimulated release. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92:3948-3952.
- Schneider SP (1992) Functional properties and axon terminations of interneurons in laminae III-V of the mammalian spinal dorsal horn in vitro. *Journal of Neurophysiology* 68:1746-1759.
- Schneider SP (2003) Spike Frequency Adaptation and Signaling Properties of Identified Neurons in Rodent Deep Spinal Dorsal Horn. *Journal of Neurophysiology* 90:245-258.
- Schneider SP, Walker TM (2007) Morphology and electrophysiological properties of hamster spinal dorsal horn neurons that express VGLUT2 and enkephalin. *Journal of Comparative Neurology* 501:790-809.
- Scholz J, Woolf CJ (2007) The neuropathic pain triad: neurons, immune cells and glia. *Nature Neuroscience* 10:1361-1368.
- Scholz J, Broom DC, Youn D-H, Mills CD, Kohno T, Suter MR, Moore KA, Decosterd I, Coggeshall RE, Woolf CJ (2005) Blocking Caspase Activity Prevents Transsynaptic

- Neuronal Apoptosis and the Loss of Inhibition in Lamina II of the Dorsal Horn after Peripheral Nerve Injury. *The Journal of Neuroscience* 25:7317.
- Schurr A, Payne RS, Miller JJ, Rigor BM (1997) Glia are the main source of lactate utilized by neurons for recovery of function posthypoxia. *Brain Research* 774:221-224.
- Schwartz EJ, Rothman JS, Dugué GP, Diana M, Rousseau C, Silver RA, Dieudonné S (2012) NMDA Receptors with Incomplete Mg²⁺ Block Enable Low-Frequency Transmission through the Cerebellar Cortex. *The Journal of Neuroscience* 32:6878.
- Seal RP, Wang X, Guan Y, Raja SN, Woodbury CJ, Basbaum AI, Edwards RH (2009) Injury-induced mechanical hypersensitivity requires C-low threshold mechanoreceptors. *Nature* 462:651-655.
- Seibt F, Schlichter R (2015) Noradrenaline-mediated facilitation of inhibitory synaptic transmission in the dorsal horn of the rat spinal cord involves interlaminar communications. *European Journal of Neuroscience* 42:2654-2665.
- Seltzer Ze, Cohn S, Ginzburg R, Beilin B (1991) Modulation of neuropathic pain behavior in rats by spinal disinhibition and NMDA receptor blockade of injury discharge. *Pain* 45:69-75.
- Shih A, Miletic V, Miletic G, Smith LJ (2008) Midazolam administration reverses thermal hyperalgesia and prevents gamma-aminobutyric acid transporter loss in a rodent model of neuropathic pain. *Anesth Analg* 106:1296-contents.
- Shiokawa H, Kaftan EJ, MacDermott AB, Tong C-K (2010) NR2 subunits and NMDA receptors on lamina II inhibitory and excitatory interneurons of the mouse dorsal horn. *Mol Pain* 6:26.
- Simmons DR, Spike RC, Todd AJ (1995) Galanin is contained in GABAergic neurons in the rat spinal dorsal horn. *Neuroscience Letters* 187:119-122.
- Sivakumaran S, Mohajerani MH, Cherubini E (2009) At Immature Mossy-Fiber-CA3 Synapses, Correlated Presynaptic and Postsynaptic Activity Persistently Enhances GABA Release and Network Excitability via BDNF and cAMP-Dependent PKA. *The Journal of Neuroscience* 29:2637.
- Sivilotti L, Woolf CJ (1994) The contribution of GABA_A and glycine receptors to central sensitization: disinhibition and touch-evoked allodynia in the spinal cord. *Journal of Neurophysiology* 72:169-179.
- Snider WD, McMahon SB (1998) Tackling pain at the source: new ideas about nociceptors. *Neuron* 20:629-632.
- Somogyi R, Wen X, Ma W, Barker JL (1995) Developmental kinetics of GAD family mRNAs parallel neurogenesis in the rat spinal cord. *The Journal of Neuroscience* 15:2575.
- Song I, Huganir RL (2002) Regulation of AMPA receptors during synaptic plasticity. *Trends in Neurosciences* 25:578-588.
- South SM, Kohno T, Kaspar BK, Hegarty D, Vissel B, Drake CT, Ohata M, Jenab S, Sailer AW, Malkmus S, Masuyama T, Horner P, Bogulavsky J, Gage FH, Yaksh TL, Woolf CJ, Heinemann SF, Inturrisi CE (2003) A Conditional Deletion of the NR1 Subunit of the NMDA Receptor in Adult Spinal Cord Dorsal Horn Reduces NMDA Currents and Injury-Induced Pain. *The Journal of Neuroscience* 23:5031.
- Spike RC, Watt C, Zafra F, Todd AJ (1997) An ultrastructural study of the glycine transporter GLYT2 and its association with glycine in the superficial laminae of the rat spinal dorsal horn. *Neuroscience* 77:543-551.
- Spike RC, Puskár Z, Andrew D, Todd AJ (2003) A quantitative and morphological study of projection neurons in lamina I of the rat lumbar spinal cord. *European Journal of Neuroscience* 18:2433-2448.
- Stroebel D, Casado M, Paoletti P (2018) Triheteromeric NMDA receptors: from structure to synaptic physiology. *Curr Opin Physiol* 2:1-12.

- Sucher NJ, Akbarian S, Chi CL, Leclerc CL, Awobuluyi M, Deitcher DL, Wu MK, Yuan JP, Jones EG, Lipton SA (1995) Developmental and regional expression pattern of a novel NMDA receptor-like subunit (NMDAR-L) in the rodent brain. *The Journal of Neuroscience* 15:6509.
- Sung B, Lim G, Mao J (2003) Altered Expression and Uptake Activity of Spinal Glutamate Transporters after Nerve Injury Contribute to the Pathogenesis of Neuropathic Pain in Rats. *The Journal of Neuroscience* 23:2899.
- Swanger SA, Vance KM, Pare J-F, Sotty F, Fog K, Smith Y, Traynelis SF (2015) NMDA Receptors Containing the GluN2D Subunit Control Neuronal Function in the Subthalamic Nucleus. *The Journal of Neuroscience* 35:15971.
- Swanger SA, Vance KM, Acker TM, Zimmerman SS, DiRaddo JO, Myers SJ, Bundgaard C, Mosley CA, Summer SL, Menaldino DS, Jensen HS, Liotta DC, Traynelis SF (2018) A Novel Negative Allosteric Modulator Selective for GluN2C/2D-Containing NMDA Receptors Inhibits Synaptic Transmission in Hippocampal Interneurons. *ACS Chem Neurosci* 9:306-319.
- Swanson RA, Graham SH (1994) Fluorocitrate and fluoroacetate effects on astrocyte metabolism in vitro. *Brain Research* 664:94-100.
- Tal M, Bennett GJ (1994) Extra-territorial pain in rats with a peripheral mononeuropathy: mechano-hyperalgesia and mechano-allodynia in the territory of an uninjured nerve. *Pain* 57:375-382.
- Tamamaki N, Yanagawa Y, Tomioka R, Miyazaki J-I, Obata K, Kaneko T (2003) Green fluorescent protein expression and colocalization with calretinin, parvalbumin, and somatostatin in the GAD67-GFP knock-in mouse. *J Comp Neurol* 467:60-79.
- Thacker MA, Clark AK, Bishop T, Grist J, Yip PK, Moon LDF, Thompson SWN, Marchand F, McMahan SB (2009) CCL2 is a key mediator of microglia activation in neuropathic pain states. *European Journal of Pain* 13:263-272.
- Thomson LM, Zeng J, Terman GW (2006) Differential effect of glutamate transporter inhibition on EPSCs in the morphine naïve and morphine tolerant neonatal spinal cord slice. *Neuroscience Letters* 407:64-69.
- Tingley WG, Ehlers MD, Kameyama K, Doherty C, Ptak JB, Riley CT, Huganir RL (1997) Characterization of protein kinase A and protein kinase C phosphorylation of the N-methyl-D-aspartate receptor NR1 subunit using phosphorylation site-specific antibodies. *J Biol Chem* 272:5157-5166.
- Todd AJ (2010) Neuronal circuitry for pain processing in the dorsal horn. *Nature Reviews Neuroscience* 11:823-836.
- Todd AJ (2015) Plasticity of inhibition in the spinal cord. *Handb Exp Pharmacol* 227:171-190.
- Todd AJ (2017) Identifying functional populations among the interneurons in laminae I-III of the spinal dorsal horn. *Mol Pain* 13:1744806917693003-1744806917693003.
- Todd AJ, McKenzie J (1989) GABA-immunoreactive neurons in the dorsal horn of the rat spinal cord. *Neuroscience* 31:799-806.
- Todd AJ, Sullivan AC (1990) Light microscope study of the coexistence of GABA-like and glycine-like immunoreactivities in the spinal cord of the rat. *Journal of Comparative Neurology* 296:496-505.
- Todd AJ, Hughes DI, Polgár E, Nagy GG, Mackie M, Ottersen OP, Maxwell DJ (2003) The expression of vesicular glutamate transporters VGLUT1 and VGLUT2 in neurochemically defined axonal populations in the rat spinal cord with emphasis on the dorsal horn. *European Journal of Neuroscience* 17:13-27.
- Tolle TR, Berthele A, Zieglansberger W, Seeburg PH, Wisden W (1993) The differential expression of 16 NMDA and non-NMDA receptor subunits in the rat spinal cord and in periaqueductal gray. *The Journal of Neuroscience* 13:5009.

- Torres A, Wang F, Xu Q, Fujita T, Dobrowolski R, Willecke K, Takano T, Nedergaard M (2012) Extracellular Ca²⁺ Acts as a Mediator of Communication from Neurons to Glia. *Science Signaling* 5:ra8.
- Torsney C (2011) Inflammatory Pain Unmasks Heterosynaptic Facilitation in Lamina I Neurokinin 1 Receptor-Expressing Neurons in Rat Spinal Cord. *The Journal of Neuroscience* 31:5158.
- Traynelis SF, Burgess MF, Zheng F, Lyuboslavsky P, Powers JL (1998) Control of Voltage-Independent Zinc Inhibition of NMDA Receptors by the NR1 Subunit. *The Journal of Neuroscience* 18:6163.
- Traynelis SF, Wollmuth LP, McBain CJ, Menniti FS, Vance KM, Ogden KK, Hansen KB, Yuan H, Myers SJ, Dingledine R (2010) Glutamate Receptor Ion Channels: Structure, Regulation, and Function. *Pharmacol Rev* 62:405.
- Tsuda M, Inoue K, Salter MW (2005) Neuropathic pain and spinal microglia: a big problem from molecules in ‘small’ glia. *Trends in Neurosciences* 28:101-107.
- Tsuda M, Koga K, Chen T, Zhuo M (2017) Neuronal and microglial mechanisms for neuropathic pain in the spinal dorsal horn and anterior cingulate cortex. *Journal of Neurochemistry* 141:486-498.
- Tsuda M, Shigemoto-Mogami Y, Koizumi S, Mizokoshi A, Kohsaka S, Salter MW, Inoue K (2003) P2X₄ receptors induced in spinal microglia gate tactile allodynia after nerve injury. *Nature* 424:778-783.
- Twyman RE, Rogers CJ, Macdonald RL (1989) Differential regulation of γ -aminobutyric acid receptor channels by diazepam and phenobarbital. *Annals of Neurology* 25:213-220.
- Um JW (2017) Roles of Glial Cells in Sculpting Inhibitory Synapses and Neural Circuits. *Front Mol Neurosci* 10:381-381.
- Valerio A, Paterlini M, Boifava M, Memo M, Spano P (1997) Metabotropic glutamate receptor mRNA expression in rat spinal cord. *Neuroreport* 8:2695-2699.
- Valtschanoff JG, Burette A, Wenthold RJ, Weinberg RJ (1999) Expression of NR2 receptor subunit in rat somatic sensory cortex: Synaptic distribution and colocalization with NR1 and PSD-95. *Journal of Comparative Neurology* 410:599-611.
- van den Pol AN, Obrietan K, Chen G (1996) Excitatory Actions of GABA after Neuronal Trauma. *The Journal of Neuroscience* 16:4283.
- Verkhratsky A, Nedergaard M (2018) Physiology of Astroglia. *Physiol Rev* 98:239-389.
- Verkhratsky A, Chvátal A (2019) NMDA Receptors in Astrocytes. *Neurochemical Research*.
- Verkhratsky A, Parpura V, Rodríguez JJ (2011) Where the thoughts dwell: The physiology of neuronal–glial “diffuse neural net”. *Brain Research Reviews* 66:133-151.
- Vissel B, Krupp JJ, Heinemann SF, Westbrook GL (2001) A use-dependent tyrosine dephosphorylation of NMDA receptors is independent of ion flux. *Nature Neuroscience* 4:587-596.
- Vithlani M, Terunuma M, Moss SJ (2011) The Dynamic Modulation of GABA_A Receptor Trafficking and Its Role in Regulating the Plasticity of Inhibitory Synapses. *Physiol Rev* 91:1009-1022.
- Vogt K, Mellor J, Tong G, Nicoll R (2000) The Actions of Synaptically Released Zinc at Hippocampal Mossy Fiber Synapses. *Neuron* 26:187-196.
- Waagepetersen HS, Sonnewald U, Larsson OM, Schousboe A (1999) Synthesis of vesicular GABA from glutamine involves TCA cycle metabolism in neocortical neurons. *J Neurosci Res* 57:342-349.
- Wall PD, Waxman S, Basbaum AI (1974) Ongoing activity in peripheral nerve: Injury discharge. *Experimental Neurology* 45:576-589.

- Wanaverbecq N, Semyanov A, Pavlov I, Walker MC, Kullmann DM (2007) Cholinergic Axons Modulate GABAergic Signaling among Hippocampal Interneurons via Postsynaptic $\alpha 7$ Nicotinic Receptors. *The Journal of Neuroscience* 27:5683-5693.
- Wang CX, Shuaib A (2005) NMDA/NR2B selective antagonists in the treatment of ischemic brain injury. *Current drug targets CNS and neurological disorders* 4:143-151.
- Wang J-H, Kelly P (2001) Calcium-calmodulin signalling pathway up-regulates glutamatergic synaptic function in non-pyramidal, fast spiking rat hippocampal CA1 neurons. *The Journal of Physiology* 533:407-422.
- Wang YT, Yu XM, Salter MW (1996) Ca²⁺-independent reduction of N-methyl-D-aspartate channel activity by protein tyrosine phosphatase. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 93:1721.
- Wang Z, Li J-Y, Dahlström A, Danscher G (2001) Zinc-enriched GABAergic terminals in mouse spinal cord. *Brain Research* 921:165-172.
- Watanabe M, Inoue Y, Sakimura K, Mishina M (1993) Distinct distributions of five N-methyl-D-aspartate receptor channel subunit mRNAs in the forebrain. *Journal of Comparative Neurology* 338:377-390.
- Watkins JC, Evans RH (1981) Excitatory Amino Acid Transmitters. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology* 21:165-204.
- Watkins JC, Jane DE (2006) The glutamate story. *British Journal of Pharmacology* 147:S100-S108.
- Watkins LR, Hutchinson MR, Johnston IN, Maier SF (2005) Glia: novel counter-regulators of opioid analgesia. *Trends in Neurosciences* 28:661-669.
- Weishaupt N, Blesch A, Fouad K (2012) BDNF: The career of a multifaceted neurotrophin in spinal cord injury. *Experimental Neurology* 238:254-264.
- Weyerbacher AR, Xu Q, Tamasdan C, Shin SJ, Inturrisi CE (2010) N-Methyl-d-aspartate receptor (NMDAR) independent maintenance of inflammatory pain. *PAIN* 148:237-246.
- Whitehead KJ, Manning JP, Smith CG, Bowery NG (2001a) Determination of the extracellular concentration of glycine in the rat spinal cord dorsal horn by quantitative microdialysis. *Brain research* 910:192-194.
- Whitehead KJ, Manning JP, Smith CGS, Bowery NG (2001b) Determination of the extracellular concentration of glycine in the rat spinal cord dorsal horn by quantitative microdialysis. *Brain Research* 910:192-194.
- Williams K (1993) Ifenprodil discriminates subtypes of the N-methyl-D-aspartate receptor: selectivity and mechanisms at recombinant heteromeric receptors. *Molecular Pharmacology* 44:851.
- Woolf CJ (1983) Evidence for a central component of post-injury pain hypersensitivity. *Nature* 306:686-688.
- Woolf CJ, Salter MW (2000) Neuronal Plasticity: Increasing the Gain in Pain. *Science* 288:1765.
- Wu G, Ringkamp M, Hartke TV, Murinson BB, Campbell JN, Griffin JW, Meyer RA (2001) Early onset of spontaneous activity in uninjured C-fiber nociceptors after injury to neighboring nerve fibers. *J Neurosci* 21:RC140-RC140.
- Wu L-J, Zhuo M (2009) Targeting the NMDA receptor subunit NR2B for the treatment of neuropathic pain. *Neurotherapeutics* 6:693-702.
- Wyllie DJA, Béhé P, Colquhoun D (1998) Single-channel activations and concentration jumps: comparison of recombinant NR1a/NR2A and NR1a/NR2D NMDA receptors. *The Journal of Physiology* 510:1-18.

- Yaksh TL (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.
- Yalcin I, Megat S, Barthas F, Waltisperger E, Kremer M, Salvat E, Barrot M (2014) The sciatic nerve cuffing model of neuropathic pain in mice. *J Vis Exp*:51608.
- Yamamoto T, Yaksh TL (1992) Spinal pharmacology of thermal hyperesthesia induced by constriction injury of sciatic nerve. Excitatory amino acid antagonists. *Pain* 49:121-128.
- Yamamoto T, Yaksh TL (1993) Effects of intrathecal strychnine and bicuculline on nerve compression-induced thermal hyperalgesia and selective antagonism by MK-801. *Pain* 54:79-84.
- Yasaka T, Tiong SYX, Hughes DI, Riddell JS, Todd AJ (2010) Populations of inhibitory and excitatory interneurons in lamina II of the adult rat spinal dorsal horn revealed by a combined electrophysiological and anatomical approach. *PAIN®* 151:475-488.
- Yasaka T, Kato G, Furue H, Rashid MH, Sonohata M, Tamae A, Murata Y, Masuko S, Yoshimura M (2007) Cell-type-specific excitatory and inhibitory circuits involving primary afferents in the substantia gelatinosa of the rat spinal dorsal horn in vitro. *The Journal of Physiology* 581:603-618.
- Youle RJ, Strasser A (2008) The BCL-2 protein family: opposing activities that mediate cell death. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 9:47-59.
- Yowtak J, Wang J, Kim HY, Lu Y, Chung K, Chung JM (2013) Effect of antioxidant treatment on spinal GABA neurons in a neuropathic pain model in the mouse. *PAIN®* 154:2469-2476.
- Yowtak J, Lee KY, Kim HY, Wang J, Kim HK, Chung K, Chung JM (2011) Reactive oxygen species contribute to neuropathic pain by reducing spinal GABA release. *PAIN®* 152:844-852.
- Yung KKL (1998) Localization of ionotropic and metabotropic glutamate receptors in distinct neuronal elements of the rat substantia nigra. *Neurochemistry International* 33:313-326.
- Zafra F, Aragon C, Olivares L, Danbolt NC, Gimenez C, Storm-Mathisen J (1995) Glycine transporters are differentially expressed among CNS cells. *The Journal of Neuroscience* 15:3952.
- Zeilhofer HU, Wildner H, Yévenes GE (2012) Fast synaptic inhibition in spinal sensory processing and pain control. *Physiol Rev* 92:193-235.
- Zeilhofer HU, Studler B, Arabadzisz D, Schweizer C, Ahmadi S, Layh B, Bösl MR, Fritschy J-M (2005) Glycinergic neurons expressing enhanced green fluorescent protein in bacterial artificial chromosome transgenic mice. *Journal of Comparative Neurology* 482:123-141.
- Zeng J, Thomson LM, Aicher SA, Terman GW (2006) Primary Afferent NMDA Receptors Increase Dorsal Horn Excitation and Mediate Opiate Tolerance in Neonatal Rats. *The Journal of Neuroscience* 26:12033.
- Zhang E-T, Craig AD (1997) Morphology and Distribution of Spinothalamic Lamina I Neurons in the Monkey. *The Journal of Neuroscience* 17:3274.
- Zhang Y, Liu S, Zhang Y-Q, Goulding M, Wang Y-Q, Ma Q (2018) Timing Mechanisms Underlying Gate Control by Feedforward Inhibition. *Neuron* 99:941-955.e944.
- Zheng J, Lu Y, Perl ER (2010) Inhibitory neurones of the spinal substantia gelatinosa mediate interaction of signals from primary afferents. *The Journal of Physiology* 588:2065-2075.
- Zhou H-Y, Chen S-R, Byun H-S, Chen H, Li L, Han H-D, Lopez-Berestein G, Sood AK, Pan H-L (2012) N-methyl-D-aspartate receptor- and calpain-mediated proteolytic cleavage of K⁺-Cl⁻ cotransporter-2 impairs spinal chloride homeostasis in neuropathic pain. *J Biol Chem* 287:33853-33864.

- Zhou X, Chen Z, Yun W, Ren J, Li C, Wang H (2015) Extrasynaptic NMDA Receptor in Excitotoxicity: Function Revisited. *Neuroscientist* 21:337-344.
- Zhu S, Stein Richard A, Yoshioka C, Lee C-H, Goehring A, McHaourab Hassane S, Gouaux E (2016) Mechanism of NMDA Receptor Inhibition and Activation. *Cell* 165:704-714.
- Ziak D, Chvátal A, Syková E (1998) Glutamate-, kainate- and NMDA-evoked membrane currents in identified glial cells in rat spinal cord slice. *Physiol Res* 47:365-375.
- Zieglgänsberger W, Sutor B (1983) Responses of substantia gelatinosa neurons to putative neurotransmitters in an in vitro preparation of the adult rat spinal cord. *Brain Research* 279:316-320.
- Zylka MJ (2005) Nonpeptidergic Circuits Feel Your Pain. *Neuron* 47:771-772.