



**HAL**  
open science

# Modulation sexe-dépendante du traitement des informations nociceptives par l'inhibition GABAergique spinale

Robin Kuster

► **To cite this version:**

Robin Kuster. Modulation sexe-dépendante du traitement des informations nociceptives par l'inhibition GABAergique spinale. Neurosciences. Université de Strasbourg, 2024. Français. NNT : 2024STRAJ016 . tel-04681159

**HAL Id: tel-04681159**

**<https://theses.hal.science/tel-04681159>**

Submitted on 29 Aug 2024

**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.

# UNIVERSITÉ DE STRASBOURG

ÉCOLE DOCTORALE DES SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTE (ED414)

Institut de Neurosciences Cellulaires et Intégratives

**THÈSE** présentée par :

**Robin KUSTER**

soutenue le : **19 Juin 2024**

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

Discipline / Spécialité : Neurosciences

**Modulation sexe-dépendante  
du traitement des informations nociceptives  
par l'inhibition GABAergique spinale**

**THÈSE dirigée par :**

**M. HUGEL Sylvain**

CR, Université de Strasbourg, INCI UPR 3212

**RAPPORTEURS EXTERNES :**

**Mme PANATIER Aude**

DR, Université de Bordeaux, Neurocentre Magendie U1215

**M. FOSSAT Pascal**

PR, Université de Bordeaux, IMN UMR5293

**EXAMINATRICE INTERNE :**

**Mme BEFORT Katia**

DR, Université de Strasbourg, LNCA UMR 7364



Ce travail de thèse a été réalisé en quatre ans, grâce à l'obtention d'un contrat doctoral d'une durée de trois ans à l'Université de Strasbourg, puis d'un contrat d'un an en tant qu'attaché temporaire d'enseignement et de recherche à l'Université de Strasbourg.

Ce projet a également été financièrement soutenu par EURIDOL, Graduate School of Pain, ANR-17-EURE-0022.

## Remerciements

Ces quatre années de thèse ont été l'occasion de rencontrer et d'être aidé par de nombreuses personnes qui ont eu un impact considérable sur moi, tant sur un aspect scientifique que sur un aspect personnel. J'aimerais vous remercier ici pour votre contribution dans cet épanouissement.

Merci aux membres de mon équipe pour les discussions intéressantes qu'on ait pu avoir, votre implication à diverses échelles dans mon projet, mais aussi pour les moments plus conviviaux qui ont permis de garder une dynamique de travail agréable tout au long de mon doctorat. Merci Chantal, Catherine, Virginie, Yann, Domi. Je souhaite remercier plus particulièrement Perrine et Rémy : nos discussions et vos suggestions ont toujours été pertinentes, vous avez été des acteurs principaux dans le suivi de mes travaux de thèse.

Lou, malgré ton entrée en 4<sup>e</sup> de thèse lorsque j'ai commencé, tu as pris le temps de m'habituer au patch et de superviser une partie de mon travail, je t'en suis très reconnaissant. Tu m'as aussi démontré que si Patchakamak ne veut pas, ça ne sert à rien de s'acharner. Je n'oublie pas non plus nos sorties forestières pré-Covid, nos discussions-café, nos ateliers pâte à modeler, ... et du coup, quel Pokémon es-tu ?

Louise et Lucien, alias Dupond et Dupont (ou l'inverse je ne sais plus), impossible de vous faire des remerciements individuels tellement vous êtes complices. Vous illuminez chaque jour les journées de travail. Peut-être que c'était une mauvaise idée pour l'institut de nous mettre tous ensemble dans un même bureau vues les heures de procrastination accumulées, mais qu'est-ce que c'était plaisant. Vous avez été des collègues en or.

Patrick, Patoche pour les intimes, c'est vrai que ton caractère plus réservé a fait que nous avons légèrement moins interagi que les autres membres du bureau. Par contre, j'ai relevé ta bonne humeur constante et surtout une passion très singulière pour tes projets scientifiques et personnels. C'était toujours très captivant de discuter avec toi.

Karim, tu es maintenant l'aîné des étudiants et ton devoir ne sera pas des moindres. Mais avant de te rajouter encore plus de responsabilités, je tenais à te remercier pour l'ambiance si joyeuse que tu as amenée au sein du labo et de l'équipe. Sache aussi que tes questions ne sont pas naïves, au contraire ! Elles m'ont clairement fait comprendre qu'il fallait que j'explique mieux ce que faisait, donc toi aussi tu as ajouté une pierre à l'édifice.

Un merci à la nouvelle génération, Mila, Nabila, Ferdaous, le bureau sera bientôt tout à vous. Je vous souhaite de réussir dans ce que vous allez entreprendre et de faire de belles rencontres durant vos carrières.

Je voudrais remercier tous les collègues qui sont devenus de très bons amis durant ces quatre années : Jarion, Jangel, Jammille, Toto, Sarah, Tatin, Zélie, Flo (ne vous inquiétez pas, Diego mange très bien et ses dents sont super), Quentin, Robin. Je suis si heureux d'avoir pu vous rencontrer et je serai toujours partant pour partager une bière ou un jus de tomate avec vous.

Je remercie aussi tous les étudiants du 3<sup>e</sup> étage avec qui j'ai pu discuter et bien rigoler. J'espère avoir été un Père Noël exemplaire. Un plus grand merci à Mélanie pour ton implication directe dans mon projet.

Je souhaite aussi remercier les différentes personnes avec qui j'ai pu monter de beaux projets grâce à Doctoneuro, et à tous les volontaires qui ont rendu chaque événement très vivant et passionnant.

Je n'oublie pas non plus les très bons potes du Master, Etienne, Baptiste, Florian et Seb notamment. C'est quand même grâce à l'entente qu'on a qu'on en est arrivé là. Je vous remercie pour tout ce que vous m'avez apporté (Etienne il faut que tu récupères ta cuisine par contre). Une petite pensée aussi, même vous n'étiez pas dans notre promo, à Dohan et Colette. Je vous remercie tous les deux pour les super moments qu'on a passés ensemble.

Un grand merci à quatre personnes en particulier : Valod, Amira, Ammra et Alex. Avec vous, ces quatre années étaient un grand-huit d'émotions (oui, la sauce piquante à 36000 sur l'échelle de Scoville en fait partie). Notre complicité m'a vraiment fait du bien. Alors oui, je triche un peu parce qu'on se connaît depuis la licence, mais ces dernières années étaient vraiment particulières sur tous les points. Et surtout n'oubliez pas : TATAKAE.

Sylvain, je ne sais même pas par où commencer mais je ne vais ni me priver d'adverbes, ni de termes poétiques. Tu es l'artisan principal de mon mûrissement personnel durant ces années de thèse. Ton apport scientifique a été fantastique. Je relèverai surtout deux points fondamentaux que tu as su me faire développer : la diplomatie et la didactique. Tu as cette facilité déconcertante, que j'admire honnêtement, à mettre quasiment tout le monde d'accord. En ajoutant à cela de la patience, de l'humour et des répliques d'OSS 117, ça donne une relation idyllique. Certains ont peut-être regretté tes absences, moi j'y ai vu une forme de confiance que tu m'apportais et ça m'a énormément rassuré sur mes capacités à conduire un projet. Si j'en avais l'occasion, j'aurais bien rajouté quatre années supplémentaires à cette thèse. Bien qu'il faille une fin à ce projet, ce ne sera pas la fin de la complicité qu'on a pu construire.

Evidemment, je remercie aussi mes proches, Maman, Papa, Elisa, Thomas. Même si vous n'avez rien compris ou que vous pensez avoir compris, ça m'a toujours fait plaisir que vous vous intéressiez à mon travail. Mine de rien, ça m'a fait travailler mes compétences de vulgarisation !

Et puis je ne pouvais pas terminer sans remercier la personne qui a dû me supporter au quotidien. Mélanie, je m'excuse du rythme que je me suis imposé et je conçois que tu aies pu être jalouse de Sylvain (ce ne serait pas étonnant en tout cas). Malgré le peu d'heures qu'on a passées ensemble ces dernières semaines, tu as continué à t'impliquer plus ou moins indirectement dans mon doctorat, que ce soit en me faciliter la vie avec de petites attentions ou par tes relectures soigneuses digne d'une professeure des écoles impliquée dans son travail. Merci de me soutenir dans tout ce que j'entreprends et de m'aider lorsque le moral n'est pas là.

# Table des matières

<b>Abréviations</b> .....	<b>7</b>
<b>INTRODUCTION</b> .....	<b>9</b>
Avant-propos .....	9
<b>I. La corne dorsale de la moelle épinière, bien plus qu'un simple relais d'informations</b> .....	<b>12</b>
1. Le réseau nociceptif spinal .....	14
a. Fibres afférentes et partage des modalités .....	14
b. Connexions entre interneurons du réseau nociceptif spinal .....	16
2. Cytologie et micro-réseau de la lamina II .....	20
<b>II. Codage et traitement des informations nociceptives</b> .....	<b>24</b>
1. Codage du message nociceptif .....	26
a. Codage dans les fibres afférentes et pré-traitement de l'information nociceptive .....	26
b. Arrivée des messages nociceptifs dans le réseau nociceptif spinal .....	30
2. Rôles de l'inhibition dans la CDME .....	34
a. Sources de l'inhibition dans la CDME .....	35
b. Impacts de l'inhibition dans la CDME .....	38
c. Plasticité synaptique à court-terme de l'inhibition .....	40
3. Inflammation périphérique aiguë et modification de la balance excitation-inhibition spinale .....	46
a. Sensibilisation des fibres afférentes .....	47
b. Conséquences centrales de l'inflammation périphérique aiguë sur l'inhibition .....	50
<b>III. Modulation sexe-dépendante du traitement des informations nociceptives</b> .....	<b>55</b>
1. Nociception et sexe en condition physiologique de base .....	57
a. Nociception, douleur et sexe chez l'humain .....	58
b. Nociception et sexe chez les rongeurs .....	59
2. Stéroïdes et traitement des informations nociceptives .....	60
a. Les neurostéroïdes dans la corne dorsale de la moelle épinière .....	60
b. Stéroïdes et inhibition .....	62
c. Action des stéroïdes en condition d'inflammation périphérique aiguë .....	66
d. Différences sexuelles : de l'inflammation aiguë vers la chronicité .....	67
<b>MATERIELS ET METHODES – RESULTATS</b> .....	<b>69</b>
Article 1 .....	69
Compléments des matériels et méthodes .....	128
Compléments des résultats .....	133
<b>DISCUSSION</b> .....	<b>135</b>
1. Modèle et choix expérimentaux .....	136
2. Sensibilité mécanique et thermique au chaud entre mâles et femelles .....	141
3. Modulation du traitement des informations nociceptives durant le cycle œstral .....	144
4. Synapses GABAergiques de la lamina II : différents états fonctionnels selon l'état physiologique ? .....	152
<b>CONCLUSION ET PERSPECTIVES</b> .....	<b>156</b>
<b>ANNEXE</b> .....	<b>157</b>

## Abréviations

**ALLO** : allop rég n anolone

**AMPA** :  $\alpha$ -amino-3-hydroxy-5-méthylisoxazol-4-propionate

**ATP** : adénosine-5'-triphosphate

**BDNF** : *brain-derived neurotrophic factor* (facteur neurotrophique issu du cerveau)

**CFA** : *Freund's complete adjuvant* (adjuvant complet de Freund)

**CGRP** : *calcitonin gene-related peptide* (peptide relié au gène de la calcitonine)

**CDME** : corne dorsale de la moelle épinière

**CPSE** : courant postsynaptique excitateur évoqué (**CPSEe**) ou spontané (**CPSEs**)

**CPSI** : courant postsynaptique inhibiteur évoqué (**CPSIe**) ou miniature (**CPSIm**)

**D / E / M / P** : phases du cycle œstral murin, respectivement diœstrus / œstrus / métœstrus / proœstrus

**eGFP-** : neurone n'exprimant pas l'eGFP (souris GAD65-eGFP)

**eGFP+** : neurone exprimant l'eGFP (souris GAD65-eGFP)

**GABA** : acide  $\gamma$ -aminobutyrique (agissant sur les récepteurs ionotropiques **GABA<sub>A</sub>** et métabotropiques **GABA<sub>B</sub>**)

**GAD65 / GAD67** : glutamate décarboxylase 65 ou 67

**GPR30** (ou GPER) : récepteur aux estrogènes couplé aux protéines G

**IL-1 $\beta$**  : interleukine 1 $\beta$

**KCC2** : *Potassium-Chloride transporter member 5* (co-transporteur potassium-chlorure)

**L2 / L4 / L5 / L6** : segment lombaire n°2-4-5-6

**LTD** : *long-term depression* (dépression à long-terme)

**LTP** : *long-term potentiation* (potentialisation à long-terme)

**mGluR** : récepteur métabotrope du glutamate

**NKCC1** : co-transporteur sodium-potassium-chlorure

**NMDA** : N-méthyl-D-aspartate

**PA** : potentiel d'action

**PPSEe** : potentiel postsynaptique excitateur évoqué

**THDOC** : tétrahydrodéoxycorticostérone

**TNF $\alpha$**  : *tumor necrosis factor  $\alpha$*  (facteur de nécrose tumorale  $\alpha$ )

**TRPV1** : *transient receptor potential vanilloid 1*



# INTRODUCTION

## Avant-propos

Un organisme vivant est constamment soumis aux perturbations de l'environnement externe ou interne. Chez les Vertébrés, ces événements physiques, appelés stimulations, peuvent être détectés grâce à des systèmes sensoriels dédiés appartenant au système nerveux. Ainsi, le système somatosensoriel est responsable de la mécanocception (pressions ou frictions mécaniques), thermoception, proprioception (position des différentes parties du corps) et nociception. Cette dernière correspond à la détection des stimulations néfastes, pouvant réellement ou potentiellement endommager notre organisme. Il peut s'agir de stimulations mécaniques, thermiques ou chimiques. La conversion de ces informations en message nerveux résulte d'une transduction effectuée par des neurones sensoriels primaires, nommés nocicepteurs. Les nocicepteurs convoient ces messages vers différentes couches de la corne dorsale de la moelle épinière (CDME). Les structures qui y traitent ces messages sont regroupées sous le nom de système nociceptif spinal.

La lamina II est l'une des six couches de la CDME. Tous les neurones de la lamina II reçoivent des projections de nocicepteurs. Celle-ci ne contient pas de neurones de projection et concentre la plus forte densité de neurones inhibiteurs libérant de l'acide  $\gamma$ -aminobutyrique (GABA) dans la CDME. De ce fait, cette structure joue un rôle important dans l'intégration, le traitement et la modulation des messages nociceptifs. Ces trois processus mettent en jeu des phénomènes de plasticité synaptique à court-terme, prenant place durant une activité synaptique répétée et ayant un décours temporel court (de la milliseconde à quelques minutes). Les neurones de la lamina II contactent à leur tour les neurones de projection de la lamina I. Ces derniers projettent vers des centres supraspinaux, dont certains sont impliqués dans l'interprétation consciente des informations nociceptives : la douleur.

Selon la définition revisitée par l'*International Association for the Study of Pain* (IASP) en 2020, la douleur est « une expérience sensorielle et émotionnelle désagréable associée ou ressemblant à celle associée à une lésion tissulaire réelle ou potentielle ». Les descriptions verbales ou manuscrites ne sont que deux des nombreux comportements permettant d'exprimer la douleur ; « l'incapacité de communiquer n'écarte pas la possibilité qu'un humain ou un animal non-humain ressente de la douleur ». Physiologiquement, la douleur constitue un signal d'alerte qui engage des comportements d'évitement permettant de prévenir une lésion ou de favoriser la guérison de ladite lésion.

La douleur est à distinguer de la nociception, puisqu'elle ne résulte pas uniquement de l'activité des neurones sensoriels et peut apparaître sans stimulation nociceptive. Il s'agit toujours d'une expérience personnelle qui dépend des conditions sociales, biologiques et physiologiques, à degrés divers. De ce fait, le sexe est à prendre en considération dans l'évaluation des seuils et de la tolérance à la douleur, cette dernière correspondant à l'intensité douloureuse maximale pouvant être supportée par un patient. Chez l'humain, les éventuelles différences sexuelles mises à jour sont également à replacer dans un contexte psychosocial et culturel. Les sociétés occidentales actuelles accepteraient davantage l'expression de la douleur par les femmes que par les hommes, chez lesquels sa dissimulation serait favorisée.

Si les évaluations subjectives et expérimentales de la douleur entre hommes et femmes peuvent présenter des biais, les seuils nociceptifs peuvent eux aussi dépendre du sexe. L'inhibition ou l'augmentation de l'activité du système nociceptif peut modifier l'intensité de la douleur. Les hormones stéroïdiennes sexuelles jouent sur ce levier, la progestérone et la testostérone ayant des propriétés antinociceptives, tandis que l'estradiol a plutôt un effet pronociceptif. L'impact des hormones sur le système nociceptif et les seuils de sensibilité tactile est préférentiellement étudié sur modèle animal, ce qui permet en principe d'éviter les biais évoqués précédemment.

Ces mêmes stéroïdes peuvent être produits au sein du système nerveux central, dont la CDME, notamment à la suite d'une inflammation périphérique. Il peut s'agir d'une synthèse locale ou d'une métabolisation des stéroïdes circulants dans le tissu nerveux. On parle dans ce cas de neurostéroïdes, c'est-à-dire de stéroïdes synthétisés et libérés par des cellules du système nerveux central. Les métabolites de la progestérone agissent notamment sur les récepteurs GABA<sub>A</sub> en tant que modulateurs allostériques positifs ou négatifs. En modulant la transmission synaptique GABAergique dans la lamina II, les variations de concentration sanguine des hormones sexuelles et de leurs métabolites pourraient moduler différemment le traitement des informations nociceptives entre les mâles et les femelles. De même, la production de neurostéroïdes dans certaines conditions pourrait affecter le traitement de ces informations.

Le traitement des informations nociceptives dans la lamina II a été étudié par Lou Cathenaut. Ses données, illustrées à travers son article « *Inhibitory interneurons with differential plasticities at their connections tune excitatory/inhibitory balance in the spinal nociceptive system* », publié dans le journal *Pain* en 2022 (Annexe), montrent que la transmission synaptique GABAergique dans la lamina II est dépendante de la nature excitatrice ou inhibitrice du neurone postsynaptique. Cependant, cette étude a été réalisée uniquement avec des souris mâles.

Pour ces raisons, mon projet de thèse consistait à étudier les caractéristiques de la transmission synaptique GABAergique et la plasticité à court-terme des synapses GABAergiques dans la lamina II entre souris mâles et femelles, en condition physiologique basale ou lors d'une inflammation périphérique.

Mes travaux de thèse visent à généraliser aux femelles les résultats obtenus par Lou Cathenaut en réalisant des protocoles électrophysiologiques identiques sur des tranches de moelle épinière, mais également à déterminer l'impact d'une inflammation périphérique sur la transmission synaptique GABAergique dans la lamina II chez les mâles et les femelles. De plus, j'ai étudié l'incidence de l'inhibition sur le codage des informations par les interneurons de la lamina II. Ces résultats sont présentés dans l'article intitulé « *Different inhibitory-disinhibitory balance in the spinal nociceptive system in male and female mice during peripheral inflammation* » (Article 1).

Dans un projet secondaire, j'ai comparé les caractéristiques de transmission synaptique GABAergique sur un même neurone postsynaptique, en fonction de la localisation des neurones GABAergiques présynaptiques dans la lamina II.

L'introduction de ma thèse comprend trois parties. Le système nociceptif spinal est tout d'abord décrit, avec un focus sur l'organisation du réseau nociceptif de la lamina II. La deuxième partie est dédiée au codage de l'information nociceptive et au traitement de cette dernière par les neurones des couches superficielles de la CDME, dont les neurones de la lamina II. La modification de ce traitement en condition d'inflammation périphérique aiguë est également évoquée. Enfin, les modulations du traitement des messages nociceptifs en fonction du sexe sont développées, et l'action des stéroïdes est détaillée.

Bien que les Matériels et Méthodes ainsi que les Résultats soient décrits dans l'Article 1, des précisions sont développées dans des sections complémentaires. Les résultats préliminaires de mon projet secondaire y sont également exposés, mais des expériences supplémentaires seront néanmoins nécessaires pour la publication future de ces données.

Ma discussion de ma thèse porte tant sur les aspects techniques, les choix expérimentaux et leurs limitations, puis sur les implications et les perspectives offertes par mon travail de thèse.

## **I. La corne dorsale de la moelle épinière, bien plus qu'une structure relais d'informations**

Les stimulations nociceptives sont détectées et les informations nociceptives transduites en message nerveux par les terminaisons libres des nocicepteurs présentes dans les tissus internes ou les couches superficielles de la peau. Les corps cellulaires des nocicepteurs sont localisés dans les ganglions crâniens et rachidiens. Les neurones des ganglions rachidiens projettent vers différentes couches de la CDME, la corne ventrale étant impliquée dans le traitement des commandes motrices (Peirs & Seal, 2016 ; Prescott & Ratté, 2012).

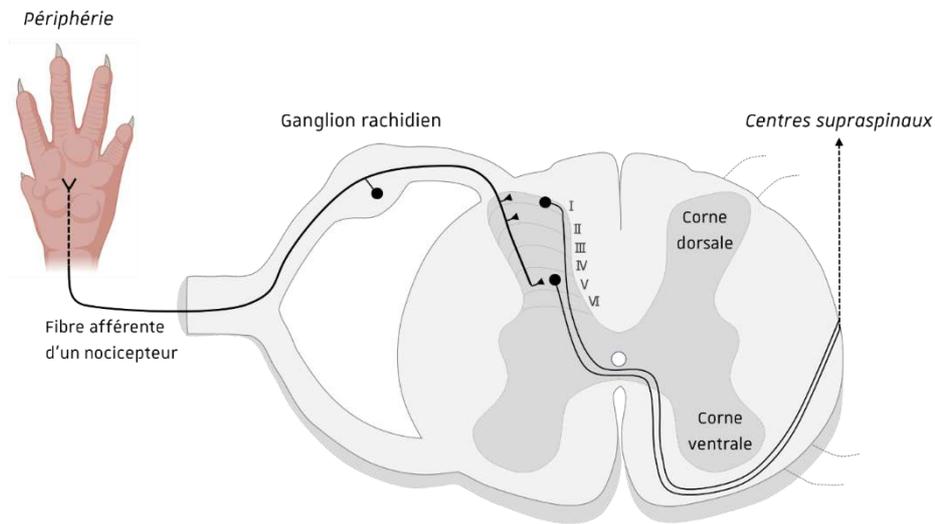
La CDME est un lieu de convergence des fibres véhiculant des informations sensorielles. Ces dernières y sont modulées par des contrôles excitateurs et inhibiteurs : il s'agit de la première structure d'intégration des informations somatosensorielles. Dans la CDME superficielle (laminae I-II-III), les informations nociceptives et non-nociceptives sont traitées par des réseaux relativement séparés. La sortie du réseau nociceptif est constituée de neurones de projection dont les axones effectuent une décussation au sein de la moelle. Ils projettent, via plusieurs voies ascendantes, directement dans les structures modulant les informations nociceptives ou indirectement dans les centres supraspinaux impliqués dans la douleur.

Il existe huit voies ascendantes différentes qui permettent la transmission des informations nociceptives vers les centres supraspinaux. Des voies ascendantes distinctes sont utilisées, d'une part pour la composante sensori-discriminative, qui définit la localisation et l'intensité de la stimulation, et d'autre part pour les composantes affectives, émotionnelles et motivationnelles.

Dans le premier cas, les informations nociceptives transitent principalement via la voie spinothalamique jusqu'au noyau ventro-postérieur latéral du thalamus. Les informations nociceptives sont ensuite transmises vers le cortex somatosensoriel.

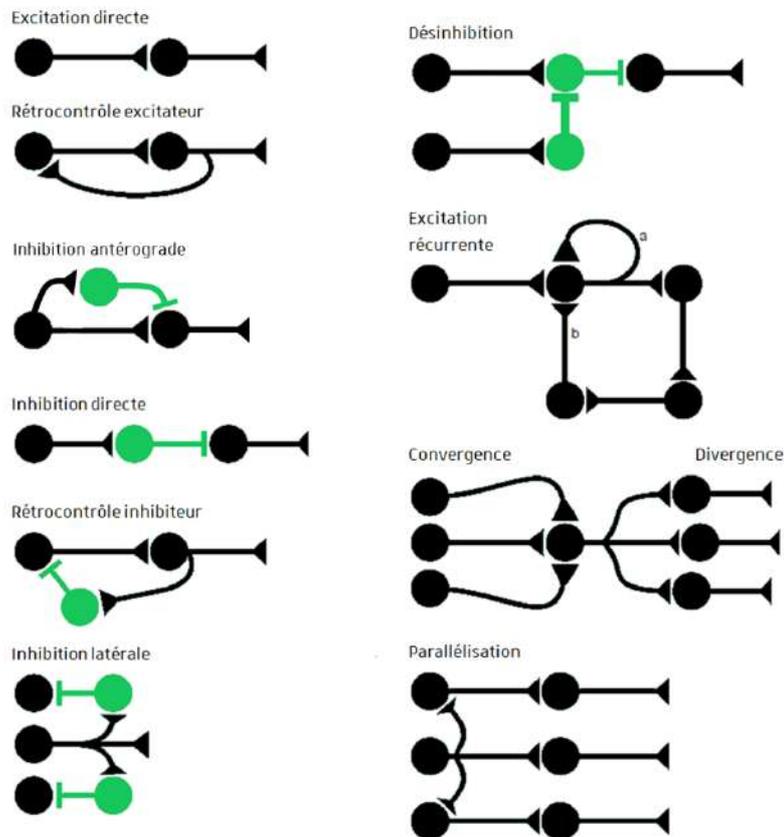
Dans le second cas, les informations sont convoyées majoritairement via les voies spinoréticulaires et spinomésencéphaliques. Les diverses cibles de ces voies dans le tronc cérébral servent de relais vers l'amygdale et le cortex insulaire, notamment. Ces deux voies permettent également l'activation des contrôles descendants de la douleur engageant des neurones de la substance grise périaqueducule et de la formation réticulée bulbaire (Basbaum et al., 2009 ; Millan, 1999 ; Peirs & Seal, 2016).

La CDME n'est donc pas qu'un simple relais des informations nociceptives. Elle se comporte tel un *hub* qui reçoit, sépare et traite les informations sensorielles, tout en étant sous influence de contrôles descendants de nombreuses structures supraspinales. La compréhension des réseaux neuronaux qui la composent, dont les caractéristiques anatomo-fonctionnelles sont développées dans cette section, est primordiale pour étudier le traitement des informations qui y transitent.



**Figure 1 :** schéma simplifié du système nociceptif spinal.

Les nocicepteurs cutanés d'origine spinale, dont les corps cellulaires se situent dans les ganglions rachidiens, présentent des terminaisons libres périphériques. Ils projettent majoritairement vers les laminae I, II et V de la corne dorsale de la moelle épinière. Cette dernière est riche en interneurons organisés en micro-réseaux (non représentés), permettant le traitement des informations sensorielles. Les informations nociceptives traitées sont essentiellement envoyées vers les centres supraspinaux par les neurones de projection des laminae I et V.



**Figure 2 :** exemples de circuits neuronaux typiques des systèmes sensoriels.

Les neurones excitateurs sont représentés en noir et les neurones inhibiteurs en vert. L'excitation récurrente peut provenir (a) d'une auto-excitation ou (b) d'une chaîne fermée de neurones excitateurs. Adapté et complété de Knierim, 2014.

## 1. Le réseau nociceptif spinal

Dans les années 1950, Bror Rexed a distingué six couches dans la substance grise de la CDME chez le chat. Appelées laminae, ces couches diffèrent selon des caractéristiques anatomiques et cellulaires. Cette classification est applicable chez tous les Mammifères (Figure 1).

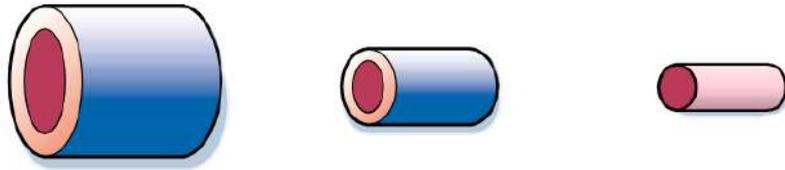
Parmi les six couches de la CDME, les laminae I, II et V sont les zones les plus riches en terminaisons de fibres des nocicepteurs. Les neurones excitateurs et inhibiteurs qui intègrent et traitent les informations nociceptives dans la CDME forment le réseau nociceptif spinal. Ce réseau comprend des circuits neuronaux de différents types qui présentent des rôles fonctionnels différents (Figure 2).

### a. Fibres afférentes et partage des modalités

**Note :** la classification et la description proposées dans ce paragraphe tiennent seulement compte des fibres afférentes cutanées, et n'abordent que partiellement la multitude de classes neurochimiques de ces fibres, mentionnée par exemple dans les revues de Peirs et Seal (2016) et de Todd (2010).

Les nocicepteurs sont des neurones pseudo-unipolaires. Les axones de ces neurones sont appelés fibres afférentes primaires. Celles-ci sont classées selon leur vitesse de conduction de potentiels d'action (PA), les modalités sensorielles qu'elles détectent et leur neurochimie peptidergique (Basbaum et al., 2009 ; Peirs & Seal, 2016). Les travaux d'Erlanger & Gasser en 1924 ont permis de définir trois classes des fibres afférentes : les fibres  $A\alpha/A\beta$ , les fibres  $A\delta$  et les fibres C (Tableau 1). Les fibres  $A\alpha$  innervent les cellules musculaires pour former les fuseaux neuro-musculaires, et ne seront donc pas évoquées dans ce manuscrit. Les vitesses de conduction permettent la discrimination des réponses de chaque type de fibres à une stimulation cutanée, grâce à la mesure de la latence d'arrivée du message nerveux dans la CDME.

Les fibres  $A\beta$  détectent généralement les stimulations non-nociceptives de faible intensité (toucher), et sont qualifiées pour cela de fibres à bas seuil. Elles projettent directement vers les noyaux Gracile et Cunéen du tronc cérébral par la voie des cordons dorsaux, mais forment également des collatérales dans la CDME. Les fibres  $A\delta$  détectent les stimulations mécaniques, chimiques et thermiques chaudes, nociceptives ou non. Les fibres C sont principalement des fibres à haut seuil qui ne détectent que les stimulations nociceptives mécaniques et thermiques chaud ou froid.



	<b>Fibre A<math>\beta</math></b>	<b>Fibre A<math>\delta</math></b>	<b>Fibre C</b>
<b>Diamètre</b> ( $\mu\text{m}$ )	6 – 12	1 – 5	0,2 – 0,5
<b>Myélinisation</b>	Forte	Faible	Absente
<b>Vitesse de conduction</b> ( $\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$ )	30 – 70	12 – 30	0,5 – 2
<b>Projections dans la CDME</b> (laminae)	III – III – IV – V – VI (collatérales uniquement)	I – III – III – V	I – II – V

**Tableau 1 :** caractéristiques des fibres afférentes.

La vitesse de conduction des fibres est dépendante de leur diamètre et de leur myélinisation. Les fibres A $\delta$  participent à la phase rapide de la réponse à une stimulation nociceptive, tandis que la phase lente est portée par les fibres C. Adapté de Julius & Basbaum, 2001.

Les fibres véhiculant les informations non-nociceptives contactent majoritairement les neurones des laminae I, III, IV et V, tandis que les fibres qui transmettent les informations nociceptives projettent dans les laminae I, II et V de la CDME (Basbaum et al., 2009 ; Bullitt, 1991 ; Fernandes et al., 2016 ; Millan, 1999 ; Nishida et al., 2014 ; Peirs & Seal, 2016 ; Prescott & Ratté, 2012).

La grande majorité des fibres C à haut seuil projette vers les laminae I, II et V (Schouenborg, 1984). Néanmoins, une population de fibres C répondant à des stimulations mécaniques à bas seuil, soit non-nociceptives, projette vers la partie interne de la lamina II (III ; Salio et al., 2020). 10 à 20% des neurones de cette zone répondent à des stimulations mécaniques, nociceptives ou non (Nishida et al., 2014).

Le système somatosensoriel présente une somatotopie, c'est-à-dire une organisation spatiale du traitement des informations qui correspond à la représentation de la surface de réception cutanée. Cela est également le cas pour le système nociceptif. En effet, des stimulations nociceptives localisées sur les

doigts latéraux d'une patte arrière de rat entraînent l'expression de *c-fos* (facteur de transcription qui indique une forte activité neuronale) dans des neurones de l'étage spinal lombaire n°5 (L5), principalement dans les laminae I et II. De plus, des stimulations sur les doigts médians entraînent l'activation de différents neurones au segment lombaire L4, dans les mêmes laminae mais dans une zone plus médiane. Des stimulations de la hanche engendrent l'activation de neurones aux étages spinaux L2 à L6. Cela suggère une somatotopie spinale médio-latérale et rostro-caudale du traitement des informations nociceptives (Bullitt, 1991). Une étude récente a par ailleurs mis en évidence l'existence de fibres A $\delta$  et C dont des collatérales contactent des neurones des laminae I et II controlatérales. Ces projections sont constamment sous contrôle inhibiteur, mais pourraient participer à la bilatéralisation de la douleur dans des conditions pathologiques où l'inhibition est atténuée (Luz et al., 2023).

La répartition des connexions des fibres afférentes dans la CDME permet ainsi d'avoir une première séparation des informations somatosensorielles et de leurs modalités. Néanmoins, cette distinction est à nuancer puisqu'un certain nombre de fibres afférentes véhiculant des informations non-nociceptives projette vers les neurones du réseau nociceptif spinal (Abraira et al., 2017). L'organisation des connexions entre les neurones de la CDME doit donc permettre de séparer spécifiquement les différentes informations somatosensorielles.

#### **b. Connexions entre interneurons du réseau nociceptif spinal**

**Note :** la grande majorité des fibres afférentes convoyant les informations nociceptives contactent les neurones des laminae I et II, bien que les neurones de la lamina I traitent également les informations thermiques non-nociceptives (Christensen & Perl, 1970 ; Todd, 2010). Ainsi, cette section ne détaillera que les connexions dans la CDME superficielle. Les micro-réseaux neuronaux des laminae III, IV, V et VI sont beaucoup moins caractérisés. Ils ont notamment été étudiés par le groupe de Stephen Schneider, dont les principaux articles sont mentionnés dans la revue de Cordero-Erausquin et ses collaborateurs (2016). Pour résumer, les neurones des laminae III, IV et V sont très majoritairement contactés par des fibres A $\beta$  et A $\delta$  à bas seuil, véhiculant des informations non-nociceptives. Il existe néanmoins le cas particulier des neurones de projection polymodaux dans la lamina V (« Wide Dynamic Range ») sur lesquels convergent des informations non-nociceptives et nociceptives. La lamina V est également un lieu important de convergence des informations nociceptives cutanées et viscérales. La lamina VI, quant à elle, est très peu étudiée : elle est uniquement présente aux renflements cervicaux et lombaires de la moelle épinière et les neurones qu'elle contient ne recevraient pas d'informations nociceptives.

De nombreux auteurs ont schématisé l'organisation des connexions neuronales dans la CDME superficielle. Les différents modèles proposés mettent en évidence l'implication de micro-réseaux neuronaux spécifiques pour le traitement d'une modalité somatosensorielle particulière (Koch et al., 2018), ou la distinction spatiale du traitement des informations nociceptives et non-nociceptives (Merighi, 2018 ; Peirs & Seal, 2016 ; Prescott & Ratté, 2012 ; Todd, 2015 ; Zeilhofer et al., 2012).

Dans le second cas, des neurones inhibiteurs importants sont généralement disposés à l'interface entre la lamina II et la lamina III. Ces neurones permettraient d'éviter l'entrée d'informations non-nociceptives dans le réseau nociceptif spinal. Selon les études, ces interneurons inhibiteurs expriment la parvalbumine, la dynorphine ou le neuropeptide Y, qui peuvent être utilisés comme marqueurs (Duan et al., 2014 ; Peirs & Seal, 2016 ; Todd, 2015). Il a été montré que l'inhibition et l'ablation des neurones exprimant le neuropeptide Y dans la CDME superficielle entraînent une forte augmentation de neurones marqués par *c-fos* dans les laminae I et II, à la suite d'une stimulation optogénétique des fibres A $\beta$  (Tashima et al., 2018). Cette étude démontre le rôle important de cette sous-population d'interneurones inhibiteurs dans le partage des informations nociceptives et non-nociceptives dans la CDME superficielle.

Néanmoins, les laminae ne constituent pas des zones isolées : ce sont des unités anatomiques, mais il existe des interactions fonctionnelles. Celles-ci ont été étudiées par plusieurs auteurs, dont Kato et ses collaborateurs, qui ont notamment montré que les neurones de la lamina I reçoivent principalement des connexions inhibitrices et excitatrices de neurones de la lamina II. De plus, les connexions inhibitrices et excitatrices sur les neurones de la lamina II proviennent très majoritairement d'interneurones locaux de la lamina II, hors fibres afférentes. Seules les cellules verticales, situées en lamina II externe (IIe) et dont l'arborisation dendritique dorso-ventrale atteint la lamina III, sont contactées par des interneurons excitateurs de la lamina III (Kato et al., 2009). Les cellules verticales sont des neurones essentiellement excitateurs qui contactent les neurones de la lamina I (Duan et al., 2014 ; Gobel, 1978 ; Lu & Perl, 2005 ; Merighi, 2018).

La lamina I contient les neurones de projection, excitateurs, dont certains contactent indirectement les centres supraspinaux impliqués dans l'interprétation consciente des informations nociceptives. Seuls 5% des neurones de cette lamina sont des neurones de projection, et environ 80% d'entre eux présentent une immunoréactivité au récepteur de la substance P (Spike et al., 2003). Certains de ces neurones contactent également, via des collatérales, des neurones de la corne ventrale et pourraient donc contribuer au réflexe nociceptif de retrait (Kokai et al., 2022a).

Les neurones de projection sont directement contactés par les fibres C. Ils peuvent être divisés en trois catégories, en fonction du nombre de PA qu'ils sont capables de générer à la suite d'une stimulation électrique, grâce à une électrode de succion, des fibres afférentes primaires :

- les neurones *low-output*, qui ne génèrent qu'un seul PA (population majoritaire).
- les neurones *medium-output*, qui génèrent 2 à 6 PA en salves à haute fréquence (40-100 Hz).
- les neurones *high-output*, qui génèrent plus de 10 PA à fréquence moyenne (10-30 Hz).

Les neurones *low-output* ne semblent recevoir que des informations des fibres afférentes, et ne serviraient donc que de relais vers les centres supraspinaux. Les neurones *high-output* reçoivent également des messages qui ont été traités par les interneurones du réseau nociceptif spinal superficiel (Agashkov et al., 2019).

**Note :** *les laminae III et IV sont généralement définies comme spécifiques au traitement des informations non-nociceptives. Néanmoins, des neurones de la lamina II peuvent transmettre des informations nociceptives vers les neurones des laminae III, IV et V (Petitjean et al., 2012). De plus, des neurones de projection de ces laminae, dont les prolongements dendritiques atteignent les laminae superficielles, sont également contactés par des fibres de nocicepteurs (Kokai et al., 2022b). La notion de réseau nociceptif spinal ne dépend donc pas de la cartographie des terminaisons des nocicepteurs. Cette nuance et l'hétérogénéité des modalités traitées par les neurones de projection de la CDME sont développées par Werberger et Basbaum dans leur revue parue en 2019.*

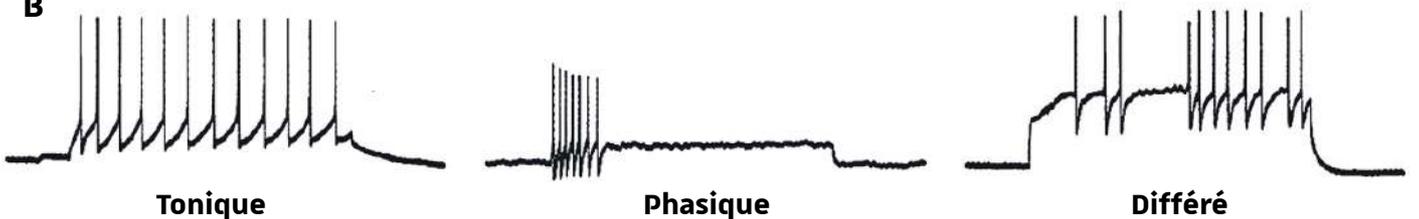
L'ensemble des études sur les connexions au sein du réseau nociceptif spinal superficiel a récemment permis de mettre en place un modèle *in silico* de ce dernier, qui présente des propriétés fonctionnelles très similaires à la réalité (Medlock et al., 2022). Cependant, cette modélisation ne prend en compte que la connectique du réseau, sans les plasticités activité-dépendantes de ces connexions dont le rôle dans le traitement des informations nociceptives est majeur. Ces notions sont développées dans le paragraphe II.

Environ 88% des neurones GABAergiques de la CDME superficielle sont directement contactés par les différentes fibres afférentes (plus de la moitié par les fibres C), ce qui laisse une proportion importante de neurones inhibiteurs ne recevant pas d'informations sensorielles de premier ordre (Liu et al., 2021). Cui et ses collaborateurs ont également mis en évidence, en 2014, que les entrées des fibres afférentes sur les neurones GABAergiques de la lamina II sont majoritairement monosynaptiques, tandis qu'elles sont plutôt polysynaptiques sur les neurones non-GABAergiques. Les entrées polysynaptiques impliquent un premier traitement des informations nociceptives par les interneurones de la lamina II.

**A**

Classe morphologique	Axe(s) majeur(s) de l'arborisation dendritique	Position du soma dans la lamina II	Profil de décharge de PA (voir panneau B)	Type de transmission synaptique	Marqueur(s) spécifique(s)
 <p><b>Îlot</b></p>	<b>Rostro-caudal</b>	Interface I-IIe Davies et al., 2023 Dougherty & Chen, 2016 Lu & Perl, 2003  Interface II-III Abreira et al., 2017 Maxwell et al., 2007	<b>Tonique</b> Davies et al., 2023 Grudt & Perl, 2002 Maxwell et al., 2007 Zheng et al., 2010	<b>Inhibiteur</b> Lu & Perl, 2003 Maxwell et al., 2007 Zheng et al., 2010	Parvalbumine Abreira et al., 2017  Calrétinine Davies et al., 2023
 <p><b>Centrale</b></p>	<b>Rostro-caudal</b> (2X moins large que les cellules en îlot)	Interface II-III Grudt & Perl, 2002 Lu & Perl, 2003, 2005 Maxwell et al., 2007	<b>Phasique</b> Lu & Perl, 2005	<b>Excitateur</b> Lu & Perl, 2005	X
			<b>Tonique</b> Lu & Perl, 2003 Zheng et al., 2010	<b>Inhibiteur</b> Grudt & Perl, 2002 Zheng et al., 2010	
 <p><b>Verticale</b></p>	<b>Rostro-caudal</b> (2X moins large que les cellules en îlot)	IIe Lu & Perl, 2005 Maxwell et al., 2007	<b>Différé</b> Grudt & Perl, 2002 Lu & Perl, 2005 Maxwell et al., 2007	<b>Excitateur (majoritaire)</b> Lu & Perl, 2005 Maxwell et al., 2007	Somatostatine Duan et al., 2014
	<b>Dorso-ventral</b> (orientation ventrale vers la lamina III)			<b>Inhibiteur (minoritaire)</b> Maxwell et al., 2007	Dynorphine Duan et al., 2014

**B**



**Figure 3 :** principaux types de neurones de la lamina II selon leurs caractéristiques morphologiques et électrophysiologiques.

**A :** les études citées ont toutes été menées sur des rongeurs (hamsters, rats et souris). Les dimensions de l'arborisation dendritique des neurones sont mentionnées dans Grudt & Perl, 2002 ; Maxwell et al., 2007 ; Yasaka et al., 2007. De façon intéressante, les dendrites ne sont jamais étendues dans l'axe médio-latéral. Cette architecture particulière pourrait expliquer la somatotopie médio-latérale observée dans la lamina II. Un autre type cellulaire, les cellules radiales, ont également été documentées : celles-ci présentent une faible arborisation, mais leurs caractéristiques fonctionnelles n'ont été que très peu étudiées. D'après Grudt et Perl, seules les cellules en îlot ont un potentiel membranaire de repos de -50 mV environ, tandis que tous les autres types de cellules ont leur potentiel membranaire aux alentours de -60 mV. Davantage d'informations sont évoquées dans les revues de Peirs et Seal (2016) ou Merighi (2018).

**B :** le profil **tonique** se caractérise par des décharges continues et régulières durant toute la durée de la dépolarisation. Le profil **phasique**, aussi appelé *initial bursting*, consiste en des décharges à haute fréquence, uniquement lors de l'initiation de la dépolarisation. Le profil **différé** se présente sous la forme de décharges générées tardivement et de façon irrégulière lors d'une dépolarisation. Adapté de Prescott et Ratté, 2012

En outre, la lamina II est la région de la CDME superficielle avec la plus forte densité de neurones, dont environ 25% sont GABAergiques (Polgar et al., 2013). Ne contenant aucun neurone de projection, il s'agit d'une zone assurant uniquement le traitement et la modulation de l'information nociceptive. Ce traitement implique des connexions complexes entre interneurons inhibiteurs et excitateurs.

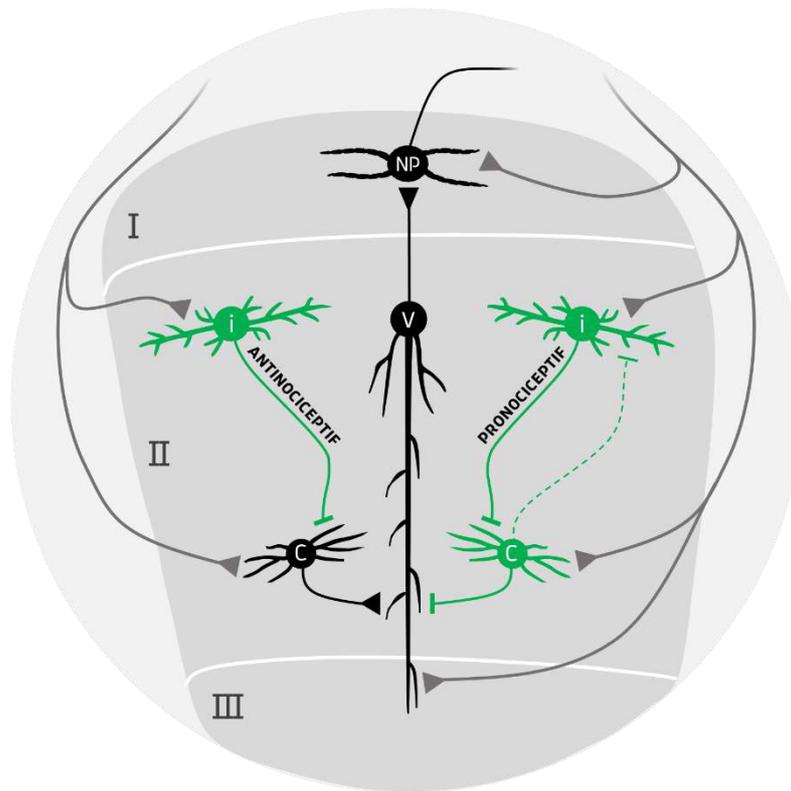
## 2. Cytologie et micro-réseau de la lamina II

**Note :** *un historique précis de l'étude de la lamina II et une description anatomo-fonctionnelle complète de cette structure ont été réalisés par Adalberto Merighi en 2018. Nous avons choisi ici de nous attarder davantage sur une description fonctionnelle de micro-réseaux de la lamina II et sur les nouveautés qui ne sont pas évoquées dans la revue précédemment citée.*

La lamina II de la CDME est aussi appelée *Substantia gelatinosa* à cause de sa transparence sur des coupes de moelle épinière, de la forte densité de neurones de petite taille et de l'absence de passage de fibres myélinisées. En effet, ce sont majoritairement des fibres C non-myélinisées qui projettent dans cette lamina (Cordero-Erausquin et al., 2016 ; Liu et al., 2021 ; Lu & Perl, 2003, 2005 ; Rexed, 1952 ; Schouenborg, 1984 ; Yasaka et al., 2007).

La lamina II peut être anatomiquement divisée en lamina IIe et lamina Iii. Cette dernière peut elle-même être séparée en zone dorsale et ventrale. Cette cartographie est déterminée en fonction de la distribution des terminaisons de divers types neurochimiques des fibres C (Abraira et al., 2017 ; Salio et al., 2020).

Les neurones de la lamina II sont communément répertoriés en fonction de leurs caractéristiques morphologiques et électrophysiologiques. La terminologie des groupes de cellules morphologiquement distincts a été définie par Gobel dans les années 70, en étudiant la cytologie de la lamina II de la partie caudale du noyau spinal du trijumeau (noyau associé à la nociception et la thermoception de la face) chez le chat. Cette classification a été reprise par Grudt & Perl en 2002 qui étudiaient les caractéristiques des neurones de la lamina II de la CDME chez le hamster. Les types neuronaux ainsi que la cytoarchitecture de la lamina II spinale présentent de grandes similitudes chez de nombreux Mammifères, dont les rongeurs. Certains groupes de neurones peuvent également être révélés par des marqueurs spécifiques. Les différentes populations de neurones et leurs caractéristiques sont synthétisées dans la Figure 3.



**Figure 4 :** schéma simplifié du réseau nociceptif de la lamina II en condition physiologique basale.

Les principales connexions sont représentées sur ce schéma. Virtuellement, tous les neurones sont contactés par les fibres des nocicepteurs, en gris. Les neurones excitateurs sont symbolisés en noir et les neurones inhibiteurs en vert. La position des neurones et leurs dimensions ne sont pas respectées. Les connexions des cellules en îlot sur les cellules centrales sont ici séparées pour former deux voies distinctes, antinoceptive et pronociceptive, mais des travaux de mon équipe d'accueil ont mis en évidence qu'une cellule inhibitrice peut contacter une cellule inhibitrice et une cellule excitatrice simultanément (Cathenaut et al., 2022). La voie antinoceptive implique une inhibition antérograde et la voie pronociceptive met en jeu une désinhibition (voir Figure 2). i : cellule en îlot ; c : cellule centrale ; v : cellule verticale ; NP : neurone de projection.

Les interneurons de la lamina II sont fonctionnellement connectés, et forment un micro-réseau au sein du réseau nociceptif spinal. Les cellules en îlot, qui présentent une vaste arborisation rostro-caudale, constituent une voie d'entrée importante des informations nociceptives dans la lamina II. Ces cellules contactent les cellules centrales, dont les axones projettent sur les cellules verticales. Ces dernières intègrent les informations nociceptives traitées par le micro-réseau d'interneurones de la lamina II. Les cellules en îlot exercent un contrôle inhibiteur sur les cellules centrales. Celles-ci se distinguent par leur

profil de décharge de PA, corrélant avec leur nature excitatrice ou inhibitrice. Les cellules centrales toniques inhibent les cellules verticales, tandis que les cellules centrales phasiques les excitent. Les cellules verticales, essentiellement excitatrices, contactent des neurones de projection et des interneurons de la lamina I. Toutes ces connexions sont considérées comme unidirectionnelles, bien qu'une connexion inhibitrice réciproque entre cellule en îlot et cellule centrale ait parfois été observée (Liu & al., 2021 ; Lu & Perl, 2003 ; Lu & Perl, 2005 ; Zheng et al., 2010). Les connexions entre ces neurones suggèrent l'existence de deux voies distinctes : une voie antinociceptive par inhibition directe des cellules centrales excitatrices et une voie pronociceptive par désinhibition des cellules verticales (Figure 4).

Parmi les cellules de la lamina II, les interneurons GABAergiques ont été particulièrement étudiés grâce à des modèles de souris transgéniques. Les neurones GABAergiques sont mis en évidence par l'expression de protéines de fusion formées d'une enzyme de synthèse du GABA, la glutamate décarboxylase 65 (GAD65) ou 67 (GAD67), liée à une protéine fluorescente. La majorité des neurones exprimant la GAD65-eGFP (eGFP+) est distribuée dans la CDME superficielle (Cui et al., 2011 ; Liu et al., 2021). La morphologie de ces neurones correspond principalement à des cellules en îlot ou centrales, bien que quelques cellules verticales aient pu être observées (Liu et al., 2021). Sur le plan électrophysiologique, l'essentiel des neurones eGFP+ présente un profil de décharge de PA tonique, tandis que les neurones n'exprimant pas la GAD65-eGFP (eGFP-), considérés comme majoritairement glutamatergiques, présentent plutôt un profil de décharge de PA différé ou phasique (se référer à la Figure 3 pour les profils de décharge ; Cathenaut et al., 2022 ; Cui et al., 2011 ; Kloc et al., 2019 ; Liu et al., 2021). Dans la lamina II, des immunomarquages montrent qu'environ 80% des neurones eGFP+ seraient bien GABAergiques, mais qu'approximativement 60% des neurones GABAergiques ne seraient pas eGFP+ (Cui et al., 2011 ; Liu et al., 2021). De ce fait, une importante population d'interneurones GABAergiques pourrait être omise dans les études utilisant ce type de modèle. Dans la CDME, la lamina II concentre la plus forte densité de neurones positifs à la GAD67 (Zhang & Dougherty, 2011). Les profils de décharge de PA et les propriétés électriques membranaires de ces neurones sont très similaires à celles des neurones eGFP+ (Cui et al., 2011 ; Zhang & Dougherty, 2011 ; Zhang et al., 2018).

Au-delà de la distinction entre neurones GABAergiques ou non-GABAergiques, de récentes études ont également mis en évidence un nombre important de sous-populations de neurones inhibiteurs et excitateurs dans la CDME par séquençage d'ARNm de cellules uniques. Une méta-analyse, synthétisant et harmonisant les résultats de six études, a permis la description de 20 classes de neurones excitateurs et de 14 classes de neurones inhibiteurs dans la CDME. Parmi elles, 15 classes de neurones excitateurs et 10 classes de neurones inhibiteurs sont retrouvées dans la lamina II (Russ et al., 2021). Toutefois, il s'agit là

d'une classification sur critère d'expression d'ARNm, ce qui ne correspond pas forcément à des groupes fonctionnels différents. Outre cette classification, Browne et ses collaborateurs se sont basés sur les propriétés morphologiques et électrophysiologiques de neurones des laminae I et II exprimant le transporteur vésiculaire du GABA ou du glutamate. Les données obtenues permettent de définir seulement 2 groupes de neurones excitateurs et 3 groupes de neurones inhibiteurs. Le regroupement des sous-populations de neurones est plus robuste lorsqu'il se repose sur les critères électrophysiologiques (Browne et al., 2020).

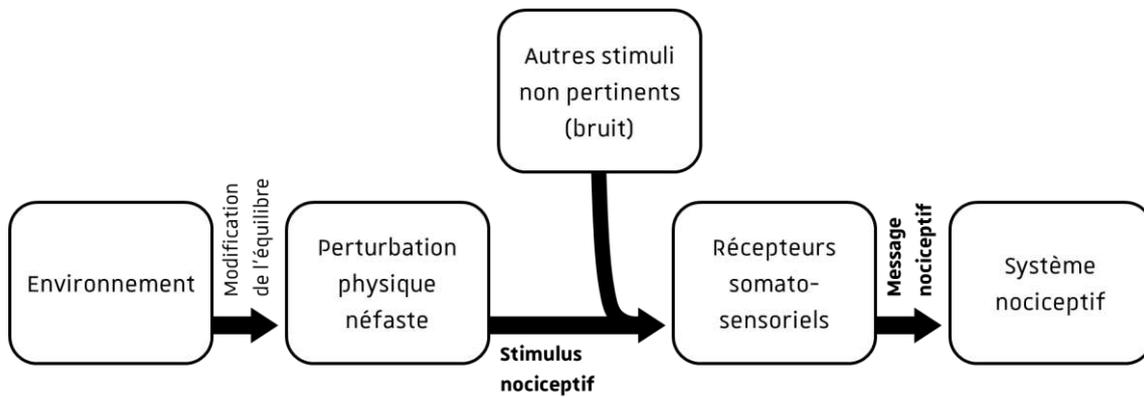
Les transmissions synaptiques inhibitrices et excitatrices au sein de la moelle épinière sont soumises à des phénomènes de plasticité synaptique, qui modifient le codage des informations nociceptives envoyées aux neurones de projection (Labrakakis et al., 2009 ; Santos et al., 2009). De plus, seuls les neurones de projection *high-output* de la lamina I semblent contactés par les cellules verticales. Lors de fortes stimulations des fibres C, ces neurones de projection présentent un plateau de dépolarisation sur lequel se déclenche une dizaine de PA tardifs. De façon intéressante, l'initiation du plateau permet de générer 2 à 8 PA qui respectent toujours le même motif temporel. Les PA tardifs, qui résulteraient du traitement de l'information par le réseau nociceptif de la CDME, sont générés avec une distribution temporelle aléatoire. Le nombre total de PA sur la durée du plateau varie en fonction de l'intensité de la stimulation. L'assemblage des phases initiales et tardives du plateau crée un code temporel qui se distingue du codage dans les fibres afférentes, impliquant des contrôles facilitateurs et inhibiteurs prenant place dans les laminae inférieures (Agashkov et al., 2019). La compréhension de cette modification du codage de l'information nociceptive par les neurones de la CDME nécessite l'étude du traitement des informations nociceptives depuis la périphérie jusqu'à la sortie du réseau nociceptif spinal.

## II. Codage et traitement des informations nociceptives

Selon la théorie de l'information, initiée par Claude Shannon avec son article « *A Mathematical Theory of Communication* » publié en 1948, une information est un ensemble de données (message), contenues dans un signal, et organisées de façon à être reconnues par une unité réceptrice. Cela implique que l'unité réceptrice décrypte le sens (signification) du message à l'aide d'un code spécifique au travers de perturbations aléatoires, regroupées sous l'expression « bruit de fond ». Le codage de l'information se rapporte à la « représentation » de celle-ci sous une certaine forme afin de la manipuler, la stocker ou la transmettre (Figure 5).

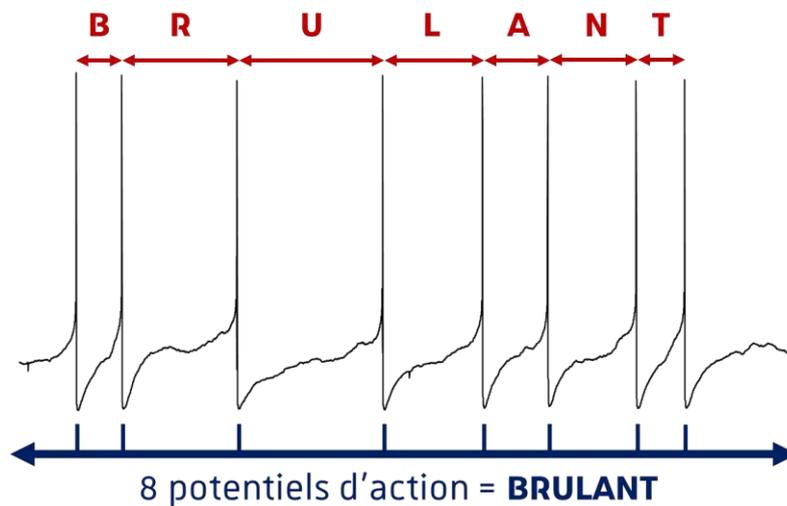
Dans le système nerveux, les informations prennent la forme de signaux électriques distinguables du bruit électrique, dont les paramètres sont « interprétables » par les cellules neurales. L'information d'une stimulation sensorielle périphérique n'est pas portée par un signal électrique, et implique une étape de transduction : il s'agit du processus par lequel un signal physique (baryonique) ou énergétique (photonique) est transformé en signal biologique. La transduction des stimulations nociceptives est réalisée par des récepteurs-canaux situés sur les terminaisons libres des fibres des nocicepteurs, en périphérie. Ces récepteurs-canaux sont perméables aux cations et leur activation engendre une dépolarisation locale, appelée potentiel récepteur, qui permet de générer un ou des PA (Dubin & Patapoutian, 2010). Ces PA sont transmis aux terminaisons contactant les neurones sensoriels de second ordre dans la CDME. Un neurone sensoriel peut répondre de manière spécifique à l'intégration de plusieurs signaux électriques en fonction de leur lieu d'arrivée (dendrites, soma ou axone), de leur durée et du délai qui les séparent, c'est-à-dire leur fréquence (Jubileum et al., 2022). Ce traitement de l'information sensorielle implique divers mécanismes cellulaires et moléculaires, dont des phénomènes de plasticité synaptique à court-terme. La discrimination spatiotemporelle réalisée par les neurones sensoriels permet un remodelage des signaux électriques portant l'information, qui sont transmis aux neurones sensoriels d'ordre supérieur (Motanis et al., 2018). Ainsi, les messages entrants dans le réseau nociceptif spinal ne correspondent pas aux messages qui en sortent, la différence résultant d'un traitement où les informations sont intégrées, et leur codage est modifié.

Le ré-encodage des informations nociceptives dans le réseau nociceptif spinal dépend de leur intégration par les interneurones dans lesquels elles transitent, mais aussi de l'excitation et l'inhibition exercées sur ces neurones (Prescott & Ratté, 2012). La balance excitation-inhibition façonne la représentation de la stimulation (modalité, durée et intensité) et la propagation de l'information (Zhou & Yu, 2018). L'équilibre de cette balance peut être altéré dans certaines conditions physiologiques, lors d'une inflammation périphérique aiguë par exemple.



**Figure 5 :** modèle de communication de Shannon-Weaver, simplifié et appliqué à la nociception.

Exemple de la transduction d'une information environnementale vers un système biologique. L'environnement est ici considéré comme la **source** d'information. Dans le cas présent, une modification de l'équilibre environnemental peut générer une perturbation potentiellement lésionnelle pour l'organisme. Cette dernière crée et « émet » une stimulation nociceptive (signal physique ou énergétique), analysable par des **récepteurs** somatosensoriels au travers d'un **bruit** de fond. La reconnaissance d'une information dans un bruit se fait de manière probabiliste : l'information diminue l'incertitude dans un signal. La transduction permet l'encodage de l'information en **message** nerveux nociceptif (signal électrique). Ce message est ensuite transféré vers le système nociceptif, considéré comme la **destination**, pour y être intégré et traité.



**Figure 6 :** représentation simplifiée et symbolique du codage en fréquence de l'information.

Dans le codage en fréquence d'un message nerveux, les PA, générés suivant la loi binaire du « tout ou rien », forment des événements discrets dont la distribution non-aléatoire permet de contenir une information. Celle-ci peut résider dans l'intervalle de temps entre les PA (flèches rouges) et/ou dans le nombre de PA pendant un intervalle donné (flèches et graduations bleues). On parle respectivement de codage temporel et de codage en taux d'événements. Les messages codés en fréquence sont particulièrement sensibles aux plasticités synaptiques activité-dépendantes, qui ajustent la fidélité de transmission entre les neurones, c'est-à-dire la probabilité d'un transfert complet de l'information.

## 1. Codage du message nociceptif

**Note :** *la détection et la transduction des stimulations nociceptives par les terminaisons périphériques des fibres afférentes ne seront pas développées dans ce manuscrit. La revue de Dubin et Patapoutian (2010) décrit ces phénomènes. Les travaux d'Ardem Patapoutian lui ont permis d'être co-lauréat du Prix Nobel de Médecine en 2021 pour la découverte des récepteurs de la température et du toucher.*

L'ensemble des PA générés par la stimulation périphérique des terminaisons libres des nocicepteurs forme un message nociceptif, porteur d'informations. Ce message nociceptif contient un certain nombre de PA séparés par un délai plus ou moins régulier. Cette association d'événements dans un intervalle temporel fini permet de définir une fréquence : le codage en fréquence de PA correspond à la représentation de l'information nociceptive (localisation, modalité et intensité) dans les fibres afférentes primaires (Figure 6).

### a. Codage dans les fibres afférentes et pré-traitement de l'information nociceptive

Dès les années 1920, les travaux d'Adrian ont permis de relier l'intensité d'une stimulation mécanique, appliquée sur la surface plantaire d'une patte de chat spinalisé, à la fréquence de PA enregistrés sur l'un des nerfs digitaux. Plus la stimulation est exercée avec un poids élevé, plus la fréquence de PA augmente. Lors de la première seconde de la stimulation, la fréquence atteint 100 Hz pour 250 g et 170 Hz pour 500 g. La fréquence diminue très rapidement par la suite, atteignant un plateau de 20 Hz quel que soit le poids appliqué (Adrian & Zotterman, 1926). Ces fréquences très élevées proviennent de l'enregistrement simultané d'un ensemble de fibres, nociceptives ou non.

Les progrès dans les techniques d'enregistrement ont permis d'isoler l'activité d'une seule fibre afférente, c'est-à-dire d'enregistrer la réponse d'une fibre A $\delta$  ou d'une fibre C à une stimulation nociceptive. Ces études, mentionnées dans la revue de Cathenaut et ses collaborateurs (2023), ont également mis en évidence qu'il n'y a pas d'activité spontanée dans ces fibres hors stimulations périphériques en conditions physiologiques basales.

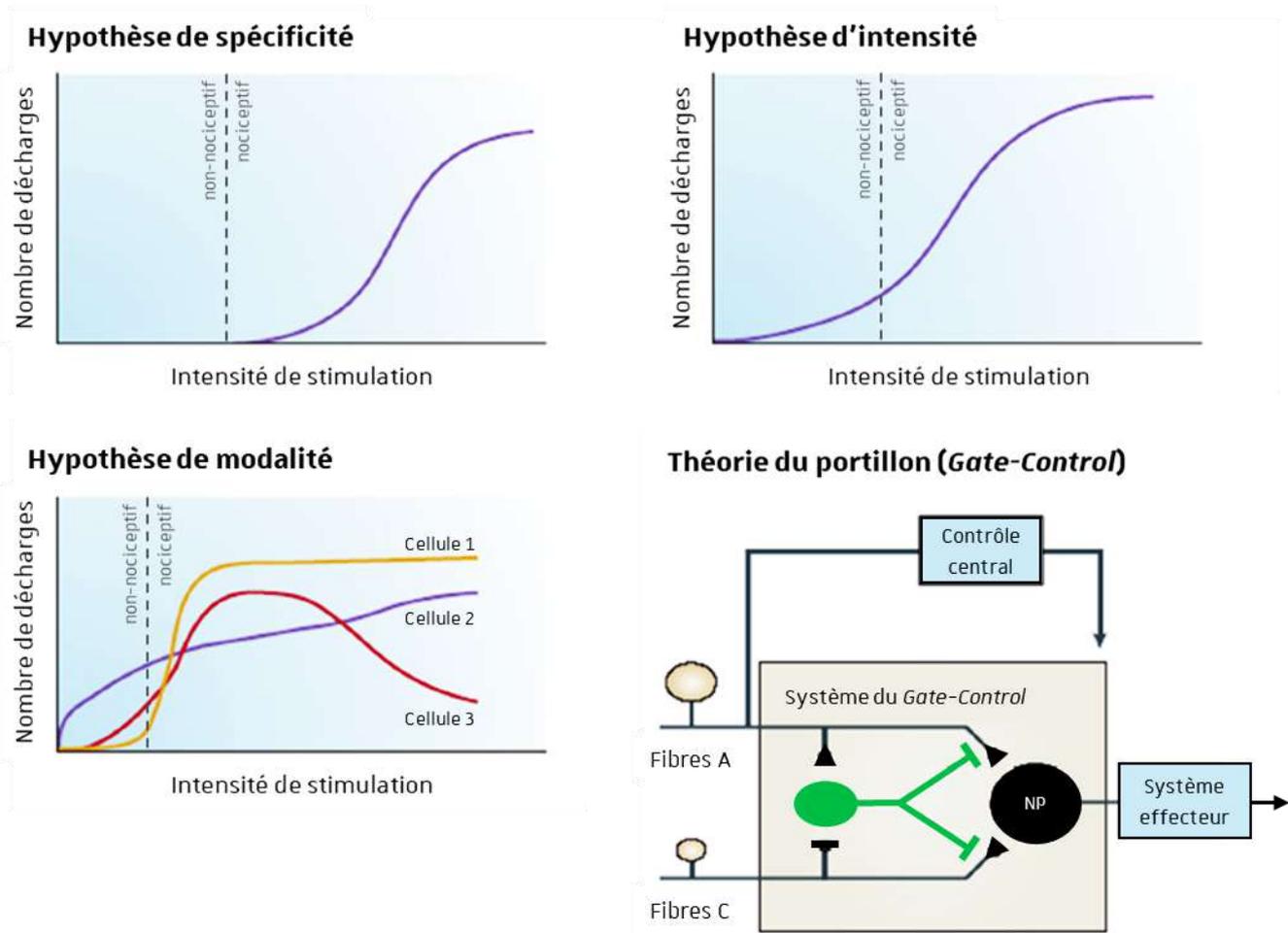
La relation entre l'intensité de stimulation mécanique et la fréquence de PA dans une fibre C unitaire est retrouvée chez l'humain. Lors de la première seconde d'une stimulation avec une aiguille, la fréquence de décharge atteint 30 Hz. Lors d'une incision au niveau de la peau, considérée comme une stimulation mécanique nociceptive plus importante, la fréquence atteint 40 Hz. Dans les deux cas, celle-ci diminue

rapidement à 10 Hz pendant la stimulation mécanique. Des PA sont également générés à faible fréquence pendant une dizaine de secondes après la fin de la stimulation. Le rapprochement d'une flamme vers la peau engendre la genèse progressive de PA, avec une fréquence maximale de 50-60 Hz. De manière intéressante, le message nerveux se présente généralement sous la forme d'une succession de salves de PA, appelés trains de PA. De plus, les fibres C enregistrées ne répondent pas à des stimulations mécaniques ou thermiques non-nociceptives, confirmant leur spécificité à la détection de stimulations nociceptives (Torebjörk & Hallin, 1974).

Une autre étude a décrit, dans une fibre C, des fréquences initiales de PA bien plus faibles lors de stimulations nociceptives. Des fréquences de 11 Hz, 8 Hz et 4 Hz ont été respectivement retrouvées pour une forte stimulation mécanique (filament de von Frey calibré), une stimulation thermique à 50°C et une stimulation thermique à 0°C. Cette différence de fréquence pourrait s'expliquer par une calibration précise des stimulations dans cette étude. D'autre part, plus la température de la stimulation thermique au froid baisse, plus la fréquence de PA générés augmente. La fréquence des PA pendant les quelques secondes post-stimulation est toujours inférieure à 2 Hz (Campero et al., 1996).

Une fréquence de PA inférieure à 2 Hz est également retrouvée lors de l'enregistrement d'une fibre C chez le rat, pendant une stimulation thermique au chaud non-nociceptive. Cette fréquence est dépassée lorsque le seuil de 45°C est atteint, température qui permet l'activation du *transient receptor potential vanilloid 1* (TRPV1), récepteur-canal exprimé sur les terminaisons libres de certains nocicepteurs. Cela suggère que la fréquence de décharge des fibres C doit être supérieure à 2 Hz pour stimuler le réseau nociceptif spinal. La fréquence des PA n'excède cependant pas 10 Hz pendant la stimulation, même si le seuil nociceptif thermique au chaud est largement franchi, ce qui concorde avec les résultats obtenus chez l'humain (Fleischer et al., 1983). Une forte stimulation mécanique localisée sur une patte arrière de rats déclenche des PA avec une fréquence initiale de 7-8 Hz dans une fibre C, et de 10-12 Hz dans une fibre A $\delta$ . Après 20 secondes d'application, la fréquence de décharge mesurée dans ces fibres ne dépasse pas 2 Hz (Andrew & Greenspan, 1999).

**Note :** il est important de spécifier que la fenêtre de temps, servant de repère pour le calcul de la fréquence initiale de décharge de PA dans les fibres afférentes, est très variable entre les études publiées. Puisque l'adaptation des nocicepteurs est très rapide, prendre une fenêtre de temps plus large mène à une sous-estimation de la fréquence initiale, comme cela est le cas dans les études de Campero et ses collaborateurs (1996) ou d'Andrew & Greenspan (1999).



**Figure 7 :** hypothèses d’encodage des informations nociceptives selon le profil de décharge par les fibres afférentes primaires.

L’hypothèse de **spécificité** implique un encodage des informations nociceptives et non-nociceptives par des voies séparées. S’il n’y a pas de distinction d’encodage, seule l’**intensité** de stimulation permet au réseau spinal de traiter différents les informations, dont la modalité (nociceptif ou non) dépend d’un seuil de fréquence de décharge des fibres afférentes. Dans les deux cas, la fréquence de décharge augmente lorsque l’intensité de stimulation augmente.

L’hypothèse de **modalité** propose que des récepteurs sensoriels spécifiques à une ou plusieurs modalités répondent dans une certaine gamme d’intensité de stimulation. Une convergence des informations dans le réseau spinal permettrait le traitement et l’intégration du contexte de stimulation.

La **théorie du Gate-Control** suggère que les entrées non-nociceptives empêchent l’arrivée d’informations nociceptives, et réciproquement. Ce phénomène atténuerait la transmission des messages nociceptifs vers les centres supraspinaux, et diminuerait ainsi la douleur. Cependant, le contrôle du portillon par les fibres C à haut-seuil implique l’inhibition de neurones inhibiteurs du réseau nociceptif spinal. L’inhibition de neurones de la moelle épinière par les fibres afférentes, glutamatergiques, n’a jamais été démontrée. Adapté de Moayedi et Davies, 2013. NP : neurone de projection.

Une forte pression mécanique sur la queue de rats génère des PA dont la fréquence peut initialement atteindre, voire dépasser, 100 Hz dans une fibre A $\delta$  ou une fibre C. La fréquence diminue fortement en 10 secondes et passe sous les 5 Hz pour les fibres C ou sous 10 Hz pour les fibres A $\delta$ , bien que la stimulation soit encore en cours (Handwerker et al., 1987). Cette diminution brutale de la fréquence de décharge des fibres afférentes pendant une stimulation, qui est retrouvée dans toutes les études évoquées dans cette section, est le phénomène d'adaptation des nocicepteurs. Celle-ci implique notamment la désensibilisation des récepteurs-canaux qui détectent les stimulations nociceptives et l'inactivation des canaux voltage-dépendants perméables aux cations, responsables de la genèse des PA (Schepers & Ringkamps, 2009).

Les terminaisons libres cutanées des nocicepteurs sont également sensibles à une acidification locale, pouvant être considérée comme une stimulation nociceptive chimique. L'acidification du milieu d'une préparation peau-nerf de rat engendre la genèse de PA dans les fibres C, avec une fréquence de 1-5 Hz, sans adaptation et de manière continue pendant toute la durée de la stimulation (Steen et al., 1992).

L'ensemble de ces données permet d'avoir une représentation du codage en fréquence de PA des stimulations nociceptives périphériques. Le message nociceptif, sous la forme de trains de PA, peut être divisé en deux phases : une phase initiale d'une centaine de millisecondes, où la fréquence de décharge atteint plusieurs dizaines de Hertz, suivie d'un plateau de quelques secondes où la fréquence est beaucoup plus faible. De plus, la relation entre l'intensité des stimulations nociceptives et la fréquence de décharge dans les fibres des nocicepteurs rejoint l'hypothèse de « spécificité » du transfert de l'information nociceptive vers la CDME (Figure 7 ; Moayedi & Davis, 2013).

La totalité des études citées dans cette section correspond à des enregistrements en amont des corps cellulaires des nocicepteurs. L'amplitude des PA véhiculés par la branche périphérique d'une fibre afférente amyélinisée (des terminaisons libres périphériques au soma) a tendance à diminuer avec la distance. La bifurcation en T des fibres afférentes, au niveau du corps cellulaire, contient une forte densité de canaux cationiques voltage-dépendants, responsables de la régénération des PA transitant sur la branche centrale de l'axone (du soma vers les neurones de la CDME). Néanmoins, cette bifurcation pourrait jouer un rôle de filtre passe-bas, impliquant des échecs de propagation de PA vers la branche centrale si la fréquence est supérieure à 100 Hz. De même, la conductance locale au niveau de la bifurcation et l'expression de certains canaux potassiques voltage-dépendants pourraient considérablement réduire la fréquence des PA se propageant sur la branche centrale des fibres amyélinisées (Sundt et al., 2015).

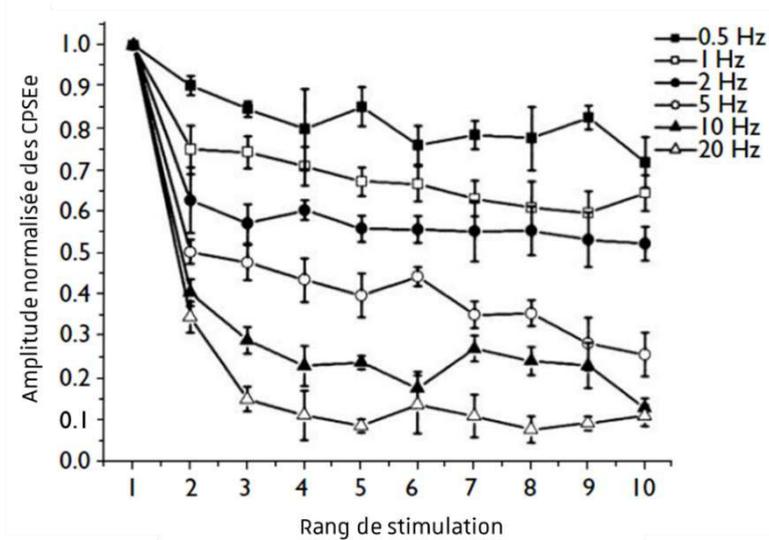
En outre, des données obtenues dans des cultures de neurones de ganglions rachidiens suggèrent que des neurones sensoriels synthétisent et libèrent spontanément du GABA qui réduit, voire abolit, la genèse de PA (Du et al., 2017). *In vivo*, l'application de GABA dans un ganglion rachidien provoque l'augmentation d'échecs de propagation de PA entre la branche périphérique et centrale des fibres C (Hao et al., 2023). Le pré-traitement des informations nociceptives par les nocicepteurs pourrait donc modifier les messages même avant qu'ils parviennent dans la CDME.

### **b. Arrivée des messages nociceptifs dans le réseau nociceptif spinal**

La fréquence de PA générés par les neurones de la CDME dépend de l'activité dans la branche centrale des nocicepteurs, mais également de la plasticité des synapses des fibres afférentes, des contrôles inhibiteurs et de l'excitabilité des neurones postsynaptiques. Il existe donc une multitude de facteurs qui pourraient modifier le codage de l'information nociceptive dès son arrivée dans la CDME.

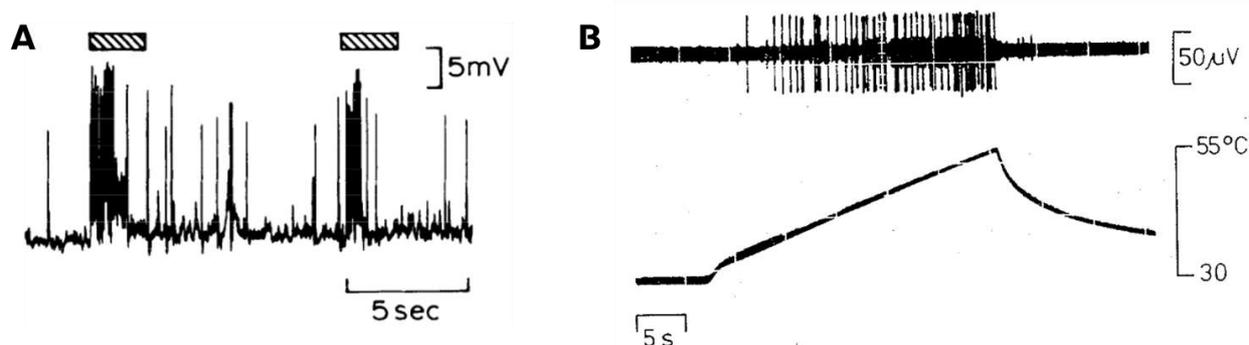
Lors de stimulations électriques répétées des fibres  $A\delta$ , la transmission synaptique excitatrice sur les neurones de la CDME diminue progressivement durant l'activité, impliquant une dépression synaptique à court-terme (voir le paragraphe II. 2. c. pour l'explication des mécanismes). Cette dépression s'accroît si la fréquence de stimulation des fibres augmente. Elle dépend également de la localisation du neurone enregistré, en étant plus prononcée sur les neurones de la lamina II lorsque la fréquence de stimulation est supérieure à 5 Hz (Figure 8 ; Wan & Hu, 2003 ; Wan et al., 2006). Ce phénomène pourrait drastiquement empêcher la genèse de PA dans les neurones de la CDME.

De surcroît, le glutamate libéré par les fibres  $A\delta$  engendre un rétrocontrôle sur sa propre libération via des récepteurs métabotropiques du glutamate (mGluR-III) situés sur le bouton présynaptique (Cui et al., 2011). Ce phénomène pourrait contribuer à la dépression synaptique à court-terme des fibres  $A\delta$ . Il n'existe pas, à notre connaissance, d'études de la plasticité à court-terme des synapses des fibres C.



**Figure 8 :** dépression à court-terme fréquence-dépendante des fibres A $\delta$  sur les neurones de la lamina II.

L'amplitude des 10 courants postsynaptiques excitateurs évoqués (CPSEe) est normalisée par rapport à l'amplitude du 1<sup>er</sup> courant pour chaque train d'une fréquence testée. À titre d'exemple, lors de 10 stimulations à 5 Hz, l'amplitude du 2<sup>ème</sup> CPSEe est réduite de moitié comparé au 1<sup>er</sup> CPSEe, tandis que les 4 dernières stimulations évoquent des CPSE dont l'amplitude est environ 70% inférieure au 1<sup>er</sup> CPSEe. Lors de 10 stimulations à 20 Hz, l'amplitude du 2<sup>ème</sup> CPSEe représente environ 35% de l'amplitude du 1<sup>er</sup> CPSEe, et seulement 10-15% pour les CPSEe suivants. Adapté de Wan et Hu, 2003.



**Figure 9 :** exemple de messages nociceptifs typiques et relation entre l'intensité de stimulation et la fréquence de décharge d'une fibre afférente.

**A :** enregistrement extracellulaire unitaire d'un neurone de la CDME superficielle d'une préparation peau-nerf de hamster jeune. Les barres hachurées correspondent à l'application d'une stimulation mécanique nociceptive sur la peau. Le message nociceptif se compose d'une phase initiale à haute fréquence de décharge de PA, suivie d'une diminution rapide de la fréquence de décharge liée à l'adaptation des nocicepteurs. Notez les décharges post-stimulation, pouvant résulter d'une activité persistante dans le réseau nociceptif spinal. Adapté de Schneider et Perl, 1994.

**B :** enregistrement unitaire d'une fibre C chez le rat pendant l'application d'un gradient de température. Des PA sont générés dès 37°C et la fréquence de décharge augmente parallèlement à l'augmentation de la température. Adapté de Fleischer et al., 1983.

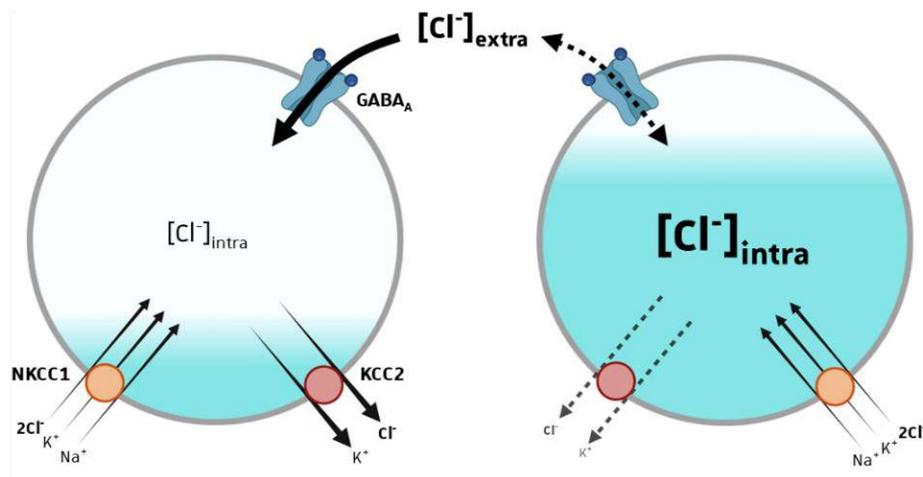
**Note :** la transmission synaptique excitatrice des fibres afférentes est également sous l'influence de contrôles inhibiteurs des interneurons de la CDME, via des contacts axo-axoniques. D'une part, l'inhibition présynaptique provoque une inhibition divisive (ou shuntante) causée par une forte augmentation locale de la conductance membranaire (Branchereau et al., 2016), diminuant l'amplitude des PA dans les terminaisons des fibres afférentes. D'autre part, une dépolarisation des fibres afférentes peut avoir lieu. Celle-ci est due à une concentration plus élevée des ions chlorures dans les terminaisons des fibres afférentes que dans le milieu extracellulaire. Dès lors, l'ouverture des canaux perméables au chlorure (tels que les récepteurs GABA<sub>A</sub>) engendre une sortie d'anions provoquant une dépolarisation locale, générant des PA antidromiques qui font collision avec ceux provenant de l'activation périphérique des fibres afférentes. Les mécanismes moléculaires sous-jacents ne sont pas explicités ici, mais peuvent être retrouvés dans la revue de Rudomin et Schmidt (1999) et dans la section XI de la revue de Zeilhofer et ses collaborateurs (2012).

Lors d'enregistrements extracellulaires unitaires de neurones de la lamina I chez le chat spinalisé, une stimulation nociceptive mécanique ou thermique au chaud induit une genèse de PA dont la fréquence initiale atteint 140 Hz durant 0,5 seconde. Cette fréquence de décharge se stabilise ensuite à environ 10-20 Hz durant le reste de la durée de la stimulation. Aucun événement n'est généré en dehors de l'application de la stimulation (Christensen & Perl, 1970). La fréquence de décharge des neurones de la CDME semble ainsi similaire à celle enregistrée dans un nerf par Adrian et Zotterman (1926), pendant une stimulation mécanique nociceptive en périphérie. Cette observation ne concorde pas avec la diminution activité-dépendante théorique de la transmission synaptique excitatrice des fibres afférentes. Cependant, des fibres afférentes de différents segments spinaux convergent sur environ un tiers des neurones de la lamina II, menant à une sommation des informations nociceptives reçues par ces neurones (Pinto et al., 2008). Cette caractéristique pourrait expliquer les fréquences de décharge mesurées par Christensen et Perl.

Lors de l'enregistrement extracellulaire unitaire d'un neurone de la CDME superficielle d'une préparation peau-nerf de hamster jeune, un pincement de la peau évoque une fréquence de décharge initiale de 30-45 Hz pendant 0,5 seconde, suivie d'une diminution rapide de celle-ci à un plateau de 1-2 Hz. L'adaptation des nocicepteurs se reflète donc sur l'activité des neurones de la CDME. À nouveau, aucune activité n'est mesurée en dehors de l'application de la stimulation (Schneider & Perl, 1994).

Lors d'enregistrements intracellulaires *in vivo* de neurones de la lamina II de rat, des courants postsynaptiques excitateurs spontanés (CPSEs) ont pu être mesurés, avec une fréquence d'apparition d'environ 5 Hz. Pendant une stimulation mécanique nociceptive, la fréquence moyenne des CPSEs est de 30 Hz environ. Aucun CPSE n'est enregistré s'il s'agit d'une stimulation thermique au chaud, nociceptive ou non (Furue et al., 1999). Cette dernière observation pourrait être liée à l'anesthésique utilisé : une trop forte concentration peut inhiber l'activité des neurones de la CDME superficielle (Sullivan & Sdrulla, 2022). L'étude ne mentionne pas si les CPSE produisent une dépolarisation suffisante pour la genèse de PA.

La fréquence de PA des neurones de projection de la lamina V augmente en fonction de la durée de l'application d'une stimulation nociceptive thermique au chaud (52°C) ou au froid (0°C). La détection par les terminaisons cutanées des nocicepteurs d'une stimulation thermique dépend de l'épaisseur de la peau et de la vitesse de conduction thermique. Ainsi, une stimulation thermique nociceptive d'une courte durée peut être considérée de faible intensité. De plus, les neurones enregistrés répondent seulement en deçà 20°C et au-delà 43°C, sans différence de fréquence entre les 2 modalités. Ces neurones répondent donc à des stimulations périphériques froides non-nociceptives (Gieré et al., 2021).



**Figure 10 :** schéma simplifié de l'homéostasie du chlorure par les transporteurs KCC2 et NKCC1

En condition physiologique, chez l'adulte, KCC2 est davantage exprimé dans les neurones que NKCC1. L'extrusion de chlorure par KCC2 permet de maintenir une faible concentration intracellulaire de chlorure et de réguler rapidement l'entrée de chlorure provenant de l'activation de récepteurs GABA<sub>A</sub>, par exemple (à gauche). À l'inverse, lorsque KCC2 est dysfonctionnel ou moins exprimé dans certaines conditions, le chlorure s'accumule dans la cellule (à droite). Ainsi, lors de l'ouverture des récepteurs GABA<sub>A</sub>, les flux d'ions chlorures s'annulent. De plus, si la concentration intracellulaire de chlorure devient plus élevée que la concentration extracellulaire, le flux des ions est sortant et le GABA est donc dépolarisant.

L'ensemble des données obtenues par l'enregistrement des différents composants du réseau nociceptif spinal met en avant un codage de l'intensité des stimulations nociceptives en fréquence de PA, et ce type de codage semble différer en fonction de la modalité de la stimulation. De plus, certaines fibres afférentes et certains neurones sensoriels de second ordre ne répondent qu'à des intensités spécifiques de stimulation (Figure 9). Cette disposition rejoint un compromis entre les hypothèses de spécificité et de modalités du transfert des informations nociceptives dans la CDME (voir Figure 7 ; Moayed & Davis, 2013). Les interneurons excitateurs et inhibiteurs de la CDME qui reçoivent et intègrent ces informations nociceptives participent à leur traitement, avant leur acheminement vers les centres supraspinaux. Le contrôle inhibiteur a un impact prédominant sur l'intégration et le ré-encodage de ces informations.

## **2. L'inhibition dans la CDME**

Le GABA et la glycine sont les principaux neurotransmetteurs inhibiteurs du réseau nociceptif spinal. L'action inhibitrice de ces neurotransmetteurs se met en place en parallèle de la modification de l'homéostasie du chlorure, au cours du développement (Shimizu-Okabe et al., 2022). En effet, l'équilibre ionique du chlorure dépend de l'expression de deux transporteurs transmembranaires du chlorure :

- le co-transporteur sodium-potassium-chlorure (NKCC1), qui permet l'import de chlorure dans la cellule.
- le co-transporteur potassium-chlorure (KCC2), responsable de l'extrusion du chlorure intracellulaire.

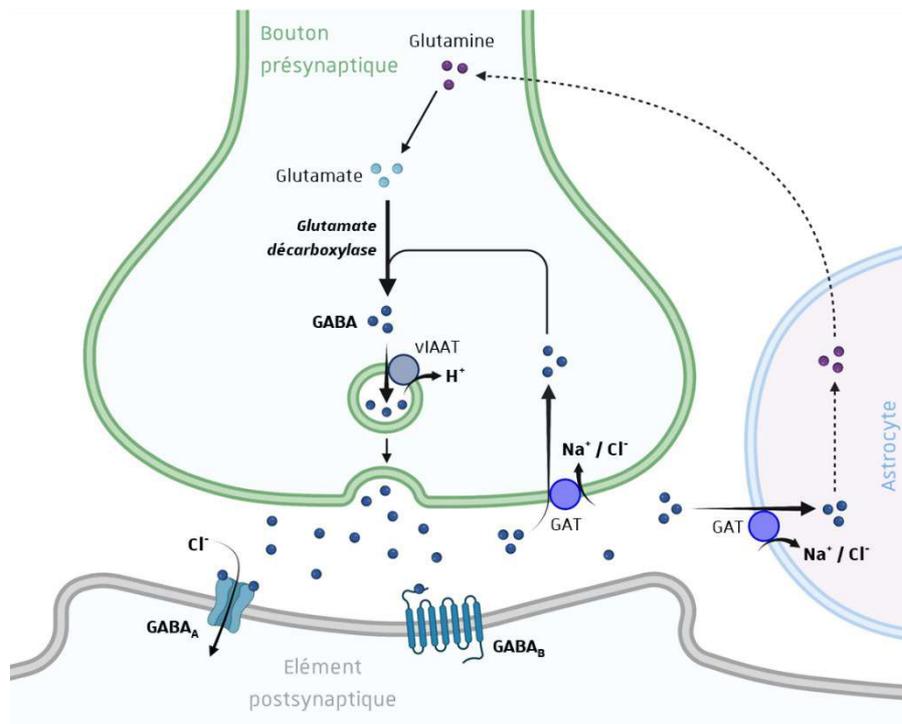
Chez le rat, la maturation de la capacité d'extrusion du chlorure dans les neurones de la lamina I prend place dans les trois premières semaines postnatales : le GABA et la glycine sont dépolarisants avant ce changement (Cordero-Erausquin et al., 2005 ; Shimizu-Okabe et al., 2022). Lorsque le système nociceptif est mature, l'expression de KCC2 prédomine dans les neurones. Ainsi, la concentration intracellulaire en chlorures des neurones de la moelle épinière est plus faible que celle du milieu extracellulaire (Figure 10).

Le GABA et la glycine sont les agonistes de récepteurs ionotropiques, respectivement les récepteurs GABA<sub>A</sub> et les GlyR, perméables aux anions, notamment aux ions chlorures. Leur ouverture engendre ainsi une entrée de chlorure dans la cellule et donc une hyperpolarisation. Dans des tranches de moelle épinière, l'inhibition des neurones de la lamina II est exclusivement effectuée par le GABA ou par une co-libération GABA/glycine (Inquimbert et al., 2007). Comme mon projet de recherche porte sur la transmission synaptique GABAergique dans la lamina II, seules les caractéristiques et les incidences de cette neurotransmission seront développées.

## a. Sources de l'inhibition dans la CDME

**Note :** la synthèse, le stockage, la recapture GABA, ainsi les acteurs moléculaires et cellulaires respectifs de ces voies, sont synthétisés en Figure 11. Pour d'avantage de détails, il est possible de se référer à la revue de Rowley et ses collaborateurs (2012).

L'inhibition glycinergique, quant à elle, sera peu de fois mentionnée dans ce manuscrit. La revue de Kirsch (2006) propose une description de cette transmission. Par ailleurs, il a été découvert très récemment que la glycine est un ligand endogène du récepteur métabotrope orphelin GPR158, dont l'activation entraîne une augmentation de l'excitabilité du neurone cible. La présence de ce récepteur n'a pas encore été étudiée dans la moelle épinière, mais il a été retrouvé dans le noyau spinal du trijumeau (Chang et al., 2023 ; Laboute et al., 2023). L'expression de ce récepteur par les neurones du réseau nociceptif spinal pourrait totalement changer la vision du rôle inhibiteur de la glycine.



**Figure 11 :** synthèse, libération et recapture du GABA.

Le GABA est synthétisé à partir du glutamate grâce à la glutamate décarboxylase (GAD). Il s'agit de l'enzyme limitante de la synthèse du GABA. Ce dernier est transporté dans des vésicules synaptiques par le transporteur vésiculaire des acides aminés inhibiteurs (VIAAT). Le GABA libéré peut activer des récepteurs GABAergiques. Le neurotransmetteur est ensuite recapté par le transporteur du GABA (GAT) localisé sur le neurone présynaptique, et peut à nouveau être transporté dans une vésicule. Il peut également être recapté par les astrocytes environnants où il est transformé en glutamine. Celle-ci est transportée vers le bouton présynaptique dans lequel elle est transformée en glutamate. Le GABA est également catabolisé par la GABA-transaminase (GABA-T, non représentée ici).

Le GABA est l'agoniste endogène des récepteurs ionotropiques GABA<sub>A</sub> et métabotropiques GABA<sub>B</sub>. Les récepteurs GABA<sub>A</sub> forment une famille de récepteurs pentamériques, possédant la plus grande diversité en sous-unités parmi tous les récepteurs aux neurotransmetteurs des Mammifères. La majorité des récepteurs GABA<sub>A</sub> dans le système nerveux central est formée de deux sous-unités  $\alpha$ , deux sous-unités  $\beta$  et une sous-unité  $\gamma$ . Dans la moelle épinière, chez le rongeur adulte, ce sont principalement les sous-unités  $\alpha 2/\alpha 3$ ,  $\beta 3$  et  $\gamma 2$  qui sont exprimées (Bohlhalter et al., 1996 ; Zeilhofer et al., 2012). Dans la CDME, la plus forte densité de récepteurs GABA<sub>A</sub> est retrouvée dans la lamina II (Schwartz-Giblin et al., 1988).

Les récepteurs GABA<sub>B</sub> sont des récepteurs à sept domaines transmembranaires couplés aux protéines G<sub>ij</sub>. La dimérisation de ce récepteur est nécessaire pour que son activation puisse induire une cascade de signalisation intracellulaire. Dans les neurones, celle-ci implique l'inhibition de l'adénylate cyclase, qui mène elle-même à l'inhibition de canaux calciques voltage-dépendants et à l'ouverture de canaux potassiques de fuite. Il en résulte une lente hyperpolarisation du neurone cible si le récepteur est situé sur l'élément postsynaptique, ou une diminution de la libération de neurotransmetteurs s'il est exprimé sur le bouton présynaptique (Gassmann & Bettler, 2012). Ce récepteur est principalement exprimé par les cellules de la CDME superficielle (Sands et al., 2003).

L'inhibition GABAergique et glycinergique dans la CDME est spatialement différenciée. Les interneurones de la lamina II sont contactés à 50% par des neurones GABAergiques uniquement, et à 50% par des neurones GABAergiques et glycinergiques. Les interneurones des laminae III et VI ne reçoivent que des connexions mixtes de GABA et de glycine (Inquimbert et al., 2007 ; Labrakakis et al., 2009).

Au sein de la lamina II, les neurones de la lamina IIe sont préférentiellement inhibés par des neurones GABAergiques, et ceux de la lamina Ili par des neurones glycinergiques, probablement localisés à la limite entre les laminae II et III ou dans des couches plus profondes (Takazawa et al., 2010, 2017). Il a été mis en évidence que des neurones GABAergiques et glycinergiques de la CDME, eux-mêmes contactés par des fibres afférentes, sont responsables de l'inhibition présynaptique des fibres afférentes (François et al., 2017). Très récemment, il a été montré que des cellules en îlot contactent simultanément des neurones de la lamina I et les synapses des fibres C sur ces neurones. Ces cellules participent à l'inhibition des neurones et des terminaisons des fibres afférentes (Davies et al., 2023). L'inhibition pourrait donc imposer un filtre spatiotemporel des messages nociceptifs entrant dans la CDME.

Les synapses inhibitrices contactant les neurones de la lamina II sont disposées plus proches du soma que les synapses excitatrices. L'amplitude des CPSEe est cependant toujours supérieure à celle des courants postsynaptiques inhibiteurs évoqués (CPSIe). Néanmoins, cette disposition synaptique pourrait servir de frein à la genèse de PA dans les neurones de la lamina II (Kato et al, 2009). Pour rappel, les laminae I, II et III comptent la plus large proportion de neurones GABAergiques dans la CDME : la principale source d'inhibition des neurones du réseau nociceptif spinal provient de connexions inhibitrices intralaminaires (Kato et al., 2009 ; Lu & Perl, 2003, 2005 ; Polgar et al., 2013).

Des afférences GABAergiques, surtout sur les neurones excitateurs des laminae I et II et provenant de neurones de la région bulbaire rostrale ventro-médiale, ont également été mises en évidence (Antal et al., 1996 ; Hossaini et al., 2012 ; Kato et al., 2006). Les synapses de ces connexions sont principalement axo-dendritiques et axo-somatiques (Antal et al., 1996). Ces neurones GABAergiques bulbaires sont contrôlés par des neurones inhibiteurs et excitateurs de la substance grise périaqueducale (Morgan et al., 2008). Les deux structures citées, qui sont localisées dans le tronc cérébral, participent aux contrôles descendants modulateurs de la douleur. Lors d'études sur tranche de moelle épinière ou sur animaux spinalisés, ces contrôles modulateurs sont en principe abolis du fait de la lésion des fibres descendantes.

**Note :** les contrôles descendants de la douleur modulent l'intégration des informations nociceptives par les neurones de la CDME. Ils engagent des réseaux neuronaux principalement sérotoninergiques et noradrénergiques de noyaux du tronc cérébral. Parmi eux, la substance grise périaqueducale dirige les contrôles vers la facilitation ou l'inhibition de la transmission du message nociceptif via des structures intermédiaires. Dans la CDME, les fibres des neurones impliqués dans les contrôles descendants contactent, entre autres, des interneurons GABAergiques qui co-libèrent des enképhalines (François et al., 2017). La revue très détaillée de Millan (2002) décrit l'organisation et le rôle de ces contrôles, qui ne seront pas développés dans ce manuscrit.

Dans une moindre mesure, d'autres neurotransmetteurs participent à l'inhibition dans la CDME. Par exemple, il existe des récepteurs muscariniques M2 exprimés par les terminaisons des fibres afférentes. Leur activation par l'application d'acétylcholine entraîne la diminution de la fréquence des CPSEe enregistrés dans des neurones de la lamina II, sans contribution de récepteurs nicotiques ou muscariniques postsynaptiques (Li et al., 2002). La lamina II concentre également une forte densité de récepteurs métabotropiques A1, principalement présynaptiques, dont l'activation par l'adénosine provoque des effets identiques à l'activation des récepteurs GABA<sub>b</sub> (Ackley et al., 2003). L'adénosine provient de la dégradation de l'adénosine triphosphate (ATP) par des ectonucléotidases extracellulaires.

L'ATP est co-libérée avec tous les neurotransmetteurs libérés par exocytose, puisqu'il participe au co-transport des neurotransmetteurs vers les vésicules synaptiques (Dunwiddie et al., 1997).

L'ensemble de ces sources d'inhibition agit sur le réseau nociceptif spinal et module le codage des messages nociceptifs qui sont ensuite intégrés dans les structures supraspinales, ce qui peut influencer les réponses physiologiques et comportementales face à des stimulations nociceptives ou non-nociceptives.

### **b. Rôles de l'inhibition dans la CDME**

Sur le plan physiologique, l'inhibition spinale impose un frein à la transmission des informations sensorielles périphériques vers les centres supraspinaux. L'injection intrathécale de bicuculline ou de phaclofène, respectivement antagonistes des récepteurs GABA<sub>A</sub> ou GABA<sub>B</sub>, entraîne le développement d'une hypersensibilité mécanique et thermique au chaud chez le rat. De manière intéressante, l'injection d'isoguvacine, un agoniste des récepteurs GABA<sub>A</sub>, ne modifie pas la sensibilité thermique au chaud. À l'inverse, l'injection de baclofène, un agoniste des récepteurs GABA<sub>B</sub>, induit un effet antinociceptif face à des stimulations thermiques au chaud. En revanche, les agonistes des récepteurs GABA<sub>B</sub> mènent à une relaxation des muscles, ce qui pourrait influencer sur la mesure des réflexes nociceptifs (Malan et al., 2002). L'inhibition optogénétique des neurones exprimant la GAD65 dans la CDME entraîne un abaissement du seuil de sensibilité mécanique, soit une hypersensibilité mécanique (Bonin et al., 2016). À l'inverse, l'excitation optogénétique de ces neurones entraîne une hyposensibilité mécanique (Ferrini et al., 2020).

Des souris dont le gène du récepteur GABA<sub>B1</sub> est invalidé présentent une hypersensibilité mécanique et thermique au chaud. L'inhibition pré- et postsynaptique induite par le baclofène, un autre agoniste des récepteurs GABA<sub>B</sub>, est absente chez ces souris (Schuler et al., 2001).

L'activation de récepteurs GABA<sub>B</sub> présynaptiques par le baclofène entraîne une diminution de la fréquence des courants postsynaptiques inhibiteurs miniatures (CPSIm) enregistrés dans des neurones de la lamina II (Iyadomi et al., 2000). Ce rétrocontrôle GABAergique sur sa propre libération a également été observé dans des neurones en culture issus de la CDME de rats nouveau-nés. En condition physiologique de base, les récepteurs GABA<sub>B</sub> sont activés de façon tonique par le GABA ambiant dans la synapse lors d'activité à basse fréquence (Hugel & Schlichter, 2003).

De plus, le GABA a une plus grande affinité pour les récepteurs GABA<sub>B</sub> et agit préférentiellement sur ces récepteurs présynaptiques par rapport aux récepteurs GABA<sub>A</sub> postsynaptiques. Ainsi, lorsqu'une petite quantité de GABA est libérée, il est possible que celui-ci n'induit pas de CPSI dans le neurone postsynaptique (Chéry & De Koninck, 2000). L'activation des récepteurs GABA<sub>A</sub> dans la CDME ne pourrait se produire qu'à partir d'une stimulation seuil des interneurons GABAergiques, permettant d'atteindre une forte concentration de GABA synaptique. Le GABA pourrait ainsi diffuser et activer des récepteurs GABA<sub>A</sub> extrasynaptiques (*spill-over*).

Les neurones GABAergiques et glutamatergiques de la CDME superficielle répondent différemment à des stimulations périphériques, ce qui pourrait entraîner la modification du codage des messages nociceptifs selon la modalité et l'intensité de stimulation. En imagerie du calcium libre intracellulaire *in vivo* chez la souris, environ 50% des neurones glutamatergiques répondent à une stimulation mécanique non-nociceptive, tandis que 80% des neurones GABAergiques y répondent. Lorsque cette stimulation est nociceptive, 80% de chaque population de neurones sont impliqués, mais avec une dynamique de réponse différente. L'intensité de la réponse des neurones glutamatergiques augmente proportionnellement à la pression exercée, tandis que celle des neurones GABAergiques est exponentielle à partir d'un seuil de pression élevée. L'implication du maillon excitateur pourrait ainsi refléter le codage en fréquence des messages nociceptifs arrivant des fibres afférentes. Le maillon inhibiteur, au contraire, ne serait recruté que lors de fortes stimulations mécaniques nociceptives. De manière intéressante, environ 40% seulement des interneurons GABAergiques répondent de façon similaire à une stimulation thermique au chaud et/ou au froid, nociceptive ou non. À l'inverse, presque 90% des neurones glutamatergiques y répondent, avec une réponse calcique plus importante lors de stimulations à des températures extrêmes. Les interneurons inhibiteurs sont davantage contactés par des fibres afférentes à faible adaptation, contrairement aux interneurons excitateurs qui sont plus contactés par des fibres à forte adaptation, ce qui pourrait expliquer cette dernière observation (Lee et al., 2019). L'inhibition pourrait ne jouer qu'un faible rôle dans le frein des informations thermiques, sans distinction entre les informations nociceptives ou non (Sullivan & Sdrulla, 2022).

L'adénosine présente également un effet modulateur et antinociceptif par son action sur les récepteurs A1. La libération de glutamate sur les neurones de la lamina II, notamment par les fibres afférentes, est sous un contrôle inhibiteur tonique par l'activation de récepteurs A1 présynaptiques (Ackley & al., 2003 ; Tian et al., 2010). Des récepteurs A1 présynaptiques sont également activés de façon tonique par l'adénosine ambiante et provoquent la diminution de la libération de GABA. Ainsi, le GABA et l'adénosine induisent une

inhibition synergique et cumulative sur la libération de GABA par les neurones de la CDME (Hugel & Schlichter, 2003). Néanmoins, l'effet antinociceptif de l'adénosine est réduit lorsque l'activité des ectonucléotidases est altérée. Cet effet est absent chez des souris dont le gène codant pour les récepteurs A1 est invalidé (Street et al., 2011).

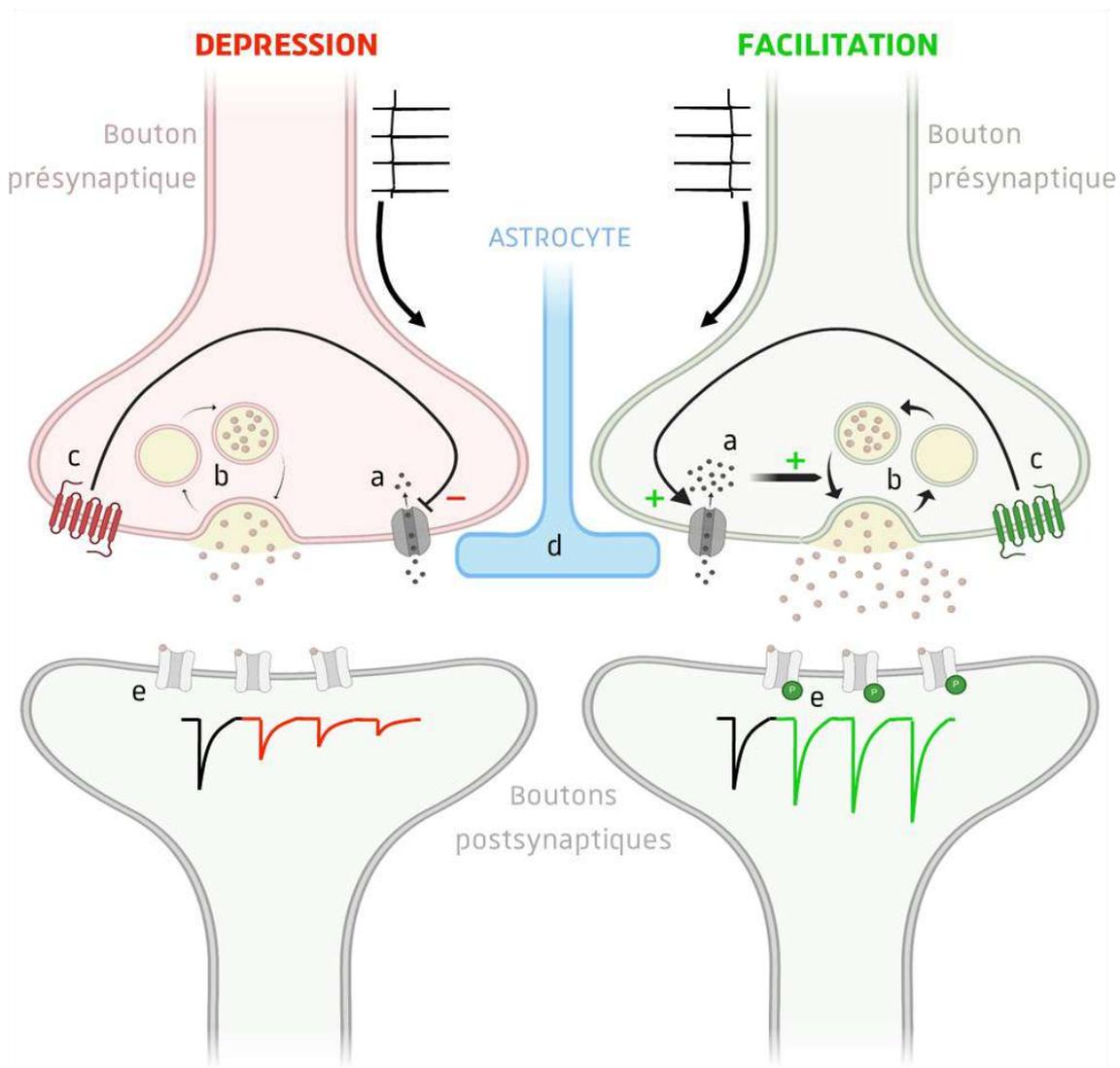
D'une manière générale, l'inhibition dans la CDME mène à la modification du codage des informations nociceptives et limite la transmission des messages sensoriels vers les centres supraspinaux. Il en résulte des effets antinociceptifs, pouvant éventuellement modifier l'intensité de la douleur.

La transmission synaptique inhibitrice est plastique. La balance entre l'inhibition et l'excitation peut être modifiée pendant une activité dans le réseau nociceptif spinal. Cette plasticité synaptique participe au traitement fin des messages nociceptifs, avant leur sortie de la CDME.

### **c. Plasticité synaptique à court-terme de l'inhibition**

Les modifications transitoires et réversibles de l'efficacité d'une transmission synaptique durant une brève activité neuronale, allant de la milliseconde à une dizaine de minutes, impliquent des mécanismes de plasticité à court-terme. Cette plasticité intervient dans le traitement des informations codées en fréquence de PA, dans le filtrage des messages nerveux et dans la modulation de leur gain. Elle est primordiale pour le codage et la transmission des informations sensorielles, au travers de l'activation ou l'inhibition de neurones des réseaux sensoriels et permettant la discrimination de l'information par rapport au bruit de fond (Anwar et al., 2017 ; Motanis et al., 2018).

La transmission synaptique est augmentée dans le cas d'une facilitation à court-terme et diminuée pendant une dépression à court-terme. Les mécanismes qui sous-tendent ces phénomènes sont essentiellement présynaptiques et dépendent notamment de la concentration intracellulaire de calcium libre et du renouvellement des différents *pools* de vésicules synaptiques (Figure 12 ; Regehr, 2012).



**Figure 12 :** principaux mécanismes de la plasticité à court-terme.

L'arrivée de PA dans une terminaison présynaptique engendre la libération de neurotransmetteurs. Ces derniers se lient aux récepteurs-canaux postsynaptiques permettant leur ouverture et un flux d'ions. Ce flux génère des courants postsynaptiques. Lorsque les PA sont rapprochés dans le temps, l'amplitude des courants peut être modifiée : ce phénomène est appelé plasticité synaptique à court-terme. Cette plasticité est activité-dépendante. Les mécanismes impliqués dans la plasticité à court-terme sont majoritairement présynaptiques, et entraînent une modification de la probabilité de libération.

**Dépression à court-terme :** l'amplitude des courants postsynaptiques diminue pendant l'activité. Cette diminution est principalement due à (a) un faible influx calcique limitant la libération vésiculaire, (b) un recyclage lent des vésicules synaptiques, (c) une inhibition métabotrope des acteurs de la libération vésiculaire et (d) une implication gliale, notamment via la libération de gliotransmetteurs inhibiteurs ou via la recapture rapide des neurotransmetteurs libérés dans la fente synaptique et (e) une modification post-traductionnelle des récepteurs postsynaptiques.

**Facilitation à court-terme :** l'amplitude des courants postsynaptiques augmente pendant l'activité. Cette augmentation est principalement due à (a) une augmentation de la concentration intracellulaire en calcium libre qui stimule la libération vésiculaire, (b) un recyclage rapide et un recrutement de nouvelles vésicules dans des réservoirs distincts, (c) une stimulation métabotrope des acteurs de la libération vésiculaire, (d) une implication gliale, notamment via la libération de gliotransmetteurs excitateurs ou via une baisse de recapture des neurotransmetteurs augmentant leur temps de séjour dans la fente synaptique et (e) une modification post-traductionnelle des récepteurs postsynaptiques.

L'amplitude des CPSIe entre neurones inhibiteurs de la lamina II, évoquée par des trains de stimulations électriques à 10 Hz, a généralement tendance à déprimer après le 1<sup>er</sup> CPSIe (Zhang & Schneider, 2011). Cette plasticité est également retrouvée lors de stimulations à d'autres fréquences, telles que 5 Hz ou 50 Hz (Cathenaut et al., 2022). Il a aussi été montré que la transmission synaptique GABAergique tend à être facilitée sur des neurones ayant un profil de décharge phasique, tandis qu'elle déprime sur des neurones ayant un profil de décharge tonique. Les cellules qui présentent un profil de décharge phasique sont principalement excitatrices, tandis que celles ayant un profil de décharge tonique sont majoritairement inhibitrices (voir Figure 3). Ainsi, l'inhibition est plus importante sur des neurones excitateurs que sur les neurones inhibiteurs au cours d'une activité à 5 Hz ou 50 Hz (Cathenaut et al., 2022 ; Zhang & Schneider, 2011). De plus, la transmission synaptique GABAergique d'un neurone de la lamina II sur un neurone de la lamina III est facilitée pendant un train de 10 stimulations à 10 Hz (Zhang & Schneider, 2011). Ces observations sont en adéquation avec un rôle de frein exercé par l'inhibition sur la transmission des messages nociceptifs. Elles sont également compatibles avec un rôle de partage des modalités sensorielles exercé par l'inhibition (Torsney & MacDermott, 2006), empêchant l'activation de réseaux nociceptifs par des informations non nociceptives.

La transmission synaptique inhibitrice dans la lamina II et sa plasticité sont sous le contrôle de récepteurs GABA<sub>B</sub> et A1 présynaptiques. L'implication de ces récepteurs est différente en fonction de la nature inhibitrice ou excitatrice du neurone postsynaptique, et leur activation diminue la probabilité de libération vésiculaire. La dépression GABA<sub>B</sub>-dépendante ne concerne que la transmission synaptique GABAergique sur les neurones postsynaptiques GABAergiques (Cathenaut et al., 2022). Les effets de l'activation du récepteur GABA<sub>B</sub> sur la probabilité de libération vésiculaire sont dépendants de la fréquence de stimulation du neurone présynaptique (Cathenaut et al., 2022 ; Orts-Del'Immagine & Pugh, 2018).

En outre, la dépolarisation d'un neurone GABAergique de la lamina II permet la genèse de PA à une fréquence de 70 Hz environ (Labrakakis et al., 2009). La fidélité de la transmission synaptique inhibitrice n'est pas identique en fonction de la nature du neurone postsynaptique : elle est d'environ 30% si le neurone est GABAergique et varie de 60 à 100% si le neurone est glutamatergique.

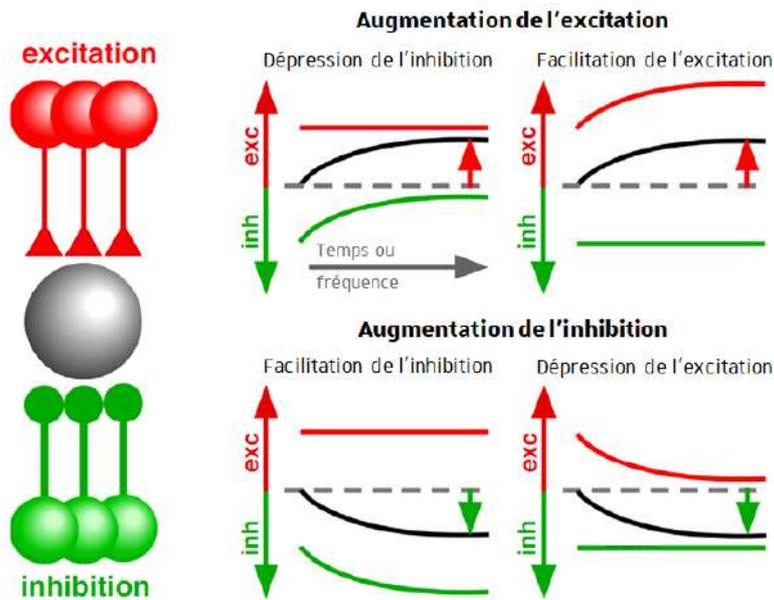
De façon intéressante, un échec de transmission apparaît généralement pour le 1<sup>er</sup> PA lors de l'enregistrement d'une paire de neurones inhibiteurs (Labrakakis et al., 2009 ; Lu & Perl, 2005 ; Zhang & Schneider, 2011). Une importante concentration de GABA dans la fente synaptique est probablement nécessaire pour évoquer ce 1<sup>er</sup> CPSI, comme démontré par Chéry et De Koninck (2000). Cependant, la première stimulation lors d'un train de 11 stimulations électriques répétées à 5 Hz ou 50 Hz d'un neurone GABAergique a quasiment toujours évoqué un CPSIe GABAergiques dans le neurone postsynaptique enregistré (Cathenaut et al., 2022).

Il existe tout de même des mécanismes de plasticité à court-terme impliquant des modulations postsynaptiques (voir Figure 12). Parmi eux, l'activation de récepteurs GABA<sub>A</sub> ou glycinergiques postsynaptiques, lors d'une activité à haute fréquence et/ou durant une durée relativement longue, peut provoquer une dépression de la transmission synaptique. Ce phénomène, spécifique aux synapses inhibitrices, dépend de la capacité d'extrusion des ions chlorures par les transporteurs KCC2 exprimés par le neurone postsynaptique. Si une accumulation de chlorure intracellulaire survient durant une activité, un équilibre des flux ioniques se met en place (voir Figure 10). Celui-ci engendre une diminution de l'inhibition soustractive, visualisée par une diminution de l'amplitude des CPSI. L'inhibition reste néanmoins présente, sous forme d'inhibition divisive (Branchereau et al., 2016 ; Raimondo et al., 2012).

La concentration intracellulaire de chlorure n'est pas affectée dans les neurones de la lamina II pendant une activité soutenue (25 stimulations électriques à 20 Hz à proximité du neurone enregistré), à la différence de celle des neurones de la lamina I. Dans ces derniers, la transmission synaptique GABAergique exprime une dépression à court-terme plus prononcée. Cette différence dépend de la distribution hétérogène de l'expression de KCC2 entre les neurones de ces deux laminae, chez des souris adultes en condition physiologique basale, KCC2 étant moins exprimé dans les neurones de la lamina I. Il en résulte une différence de traitement des informations nociceptives dans les réseaux neuronaux de la lamina I et de la lamina II (Ferrini et al., 2020).

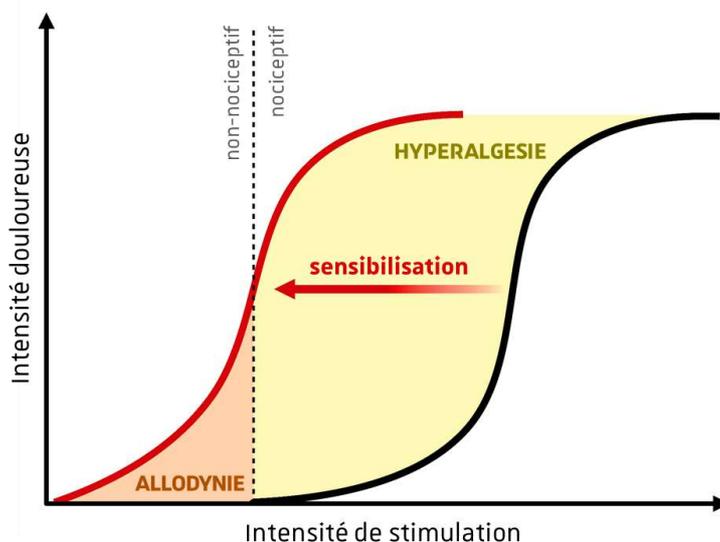
**Note :** *la transmission synaptique excitatrice dans la CDME est également modulée par des phénomènes de plasticité à court-terme. La transmission des fibres afférentes déprime lorsqu'elles sont stimulées électriquement par des trains de stimulations. L'ampleur de cette dépression croît avec l'augmentation de la fréquence de stimulation (voir le paragraphe II.1.b. ; Wan & Hu, 2003 ; Wan et al., 2006). La transmission synaptique glutamatergique déprime également entre deux interneurons de la CDME, à nouveau de façon fréquence-dépendante (Santos et al., 2009 ; Zhang & Schneider, 2011). Ainsi, la transmission synaptique excitatrice déprime fortement lors d'activités soutenues dans la CDME, ce qui pourrait mener à une forte baisse de la fidélité de transmission des informations nociceptives.*

Les fibres afférentes des nocicepteurs répondent donc à certaines modalités sensorielles et génèrent des PA dont la fréquence dépend de l'intensité de stimulation. Cette fréquence atteint initialement plusieurs dizaines de Hertz, mais l'adaptation des fibres nociceptives entraîne une chute de la fréquence de décharge pendant le reste de la stimulation. Remarquablement, des stimulations électriques intra-neurales, reprenant le *pattern* du codage des informations dans les fibres afférentes, provoquent une douleur chez des sujets humains. Le score de douleur augmente lorsque la fréquence des stimulations augmente (Lundberg et al., 1992). Il existe donc un lien de proportionnalité entre l'intensité de la stimulation nociceptive, le codage en fréquence de PA dans les fibres afférentes et l'intensité de la douleur.



**Figure 13 :** modulation de la balance excitation-inhibition par la plasticité à court-terme.

Les courbes noires correspondent à la sommation des composantes excitatrices, en rouge, et inhibitrices, en vert. Ainsi, seule l'inhibition soustractive est mise en évidence dans cette balance entre l'excitation et l'inhibition. D'une part, la dépression de l'inhibition ou la facilitation de l'excitation peut mener à une excitation plus importante du neurone cible, en gris, qui intègre les informations. D'autre part, la facilitation de l'inhibition ou la dépression de l'excitation peut conduire à une plus forte inhibition du neurone cible. La combinaison des différents phénomènes de plasticité et de la nature de la transmission synaptique contrôlerait donc le gain des messages nerveux générés par le neurone cible. De plus, si le neurone cible est inhibiteur, une dépression de l'inhibition de ce neurone peut mener à une diminution de la désinhibition. exc : excitation ; inh : inhibition. Adapté d'Anwar et al., 2017.



**Figure 14 :** schéma du développement théorique de l'allodynie et de l'hyperalgesie.

La courbe noire correspond à l'intensité de la douleur, induite par une stimulation nociceptive, en condition physiologique basale. A la suite d'une sensibilisation périphérique et/ou centrale, cette courbe se décale vers la gauche (courbe rouge). Dans cette nouvelle configuration, une stimulation non-nociceptive produit une douleur : c'est le phénomène d'allodynie. De plus, une stimulation nociceptive induit une douleur plus intense : il s'agit d'une hyperalgesie.

Les messages nociceptifs codés à haute fréquence sont filtrés avant leur entrée dans la CDME. Les neurones du réseau nociceptif spinal intègrent et traitent ces messages en modifiant leur codage, et donc potentiellement les informations qu'ils portent. Dans ce traitement, l'inhibition et sa modulation prennent une place essentielle (Figure 13). L'implication de l'ensemble de ces paramètres pourrait contribuer au développement d'une douleur plus ou moins forte, voire à l'absence de celle-ci, selon le contexte d'activité dans le réseau. Cependant, il est difficile d'évaluer les conséquences physiologiques du traitement spinal des informations nociceptives, notamment sur les réponses comportementales.

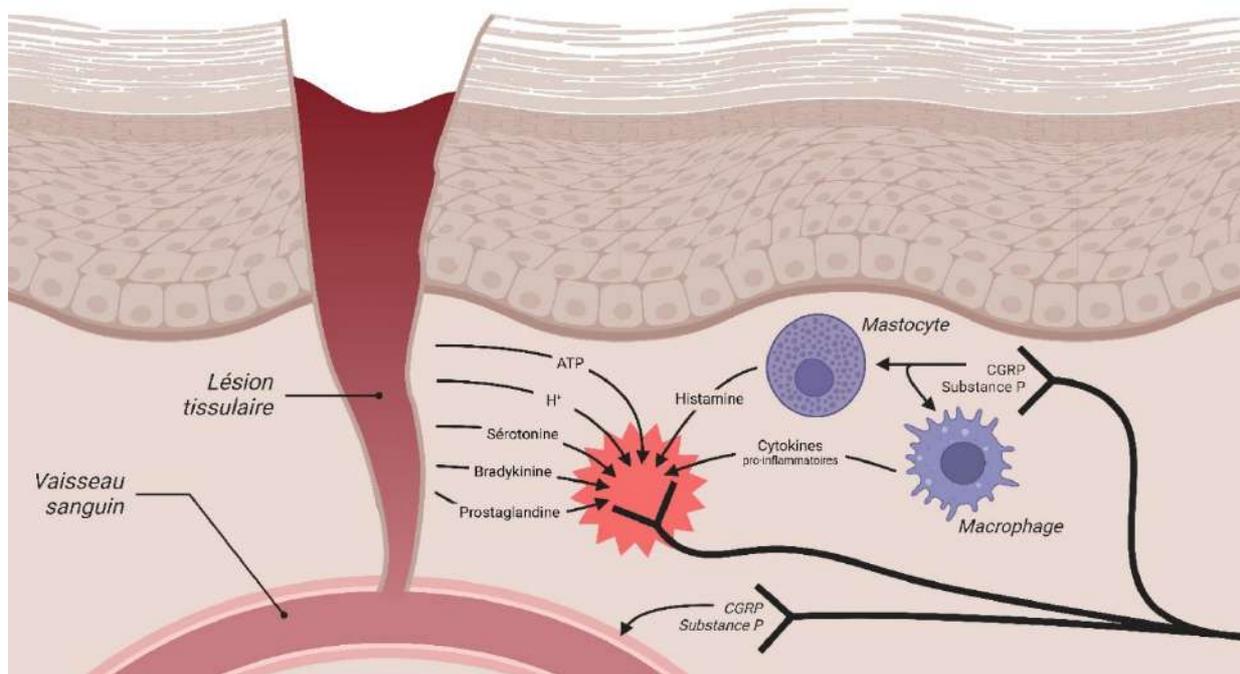
Certains états physiologiques ou pathologiques impliquent une modification du traitement des informations nociceptives, dont une sensibilisation centrale comprenant des phénomènes de plasticité synaptique à long-terme dans la CDME. Ces modifications sont parfois corrélées à des changements de seuils nociceptifs (Luo et al., 2014). Parmi elles, l'inflammation périphérique aiguë provoque une sensibilisation périphérique des nocicepteurs, et peut provoquer une sensibilisation centrale dans le réseau nociceptif spinal (Costigan et al., 2009 ; Woolf, 1983 ; Woolf & Costigan, 1999). Ces sensibilisations se traduisent par une amplification de la transmission des informations nociceptives et par le recrutement de neurones non-inclus dans le réseau nociceptif spinal en conditions physiologiques basales, notamment via l'augmentation de l'excitabilité des nocicepteurs et des neurones de la CDME. Il en résulte une hypersensibilité aux stimulations périphériques, prenant la forme d'allodynie ou d'hyperalgésie. L'allodynie est une douleur provoquée par l'application d'une stimulation non-nociceptive, tandis que l'hyperalgésie est une augmentation de l'intensité douloureuse pour une stimulation nociceptive donnée (Figure 14 ; Costigan et al., 2009 ; Sandkühler, 2009). Les caractéristiques des transmissions synaptiques excitatrices et inhibitrices dans le réseau nociceptif spinal sont modifiées en condition d'inflammation périphérique aiguë, ce qui entraîne un déséquilibre de la balance excitation-inhibition et une modulation du traitement des informations nociceptives.

### 3. Inflammation périphérique aiguë et modification de la balance excitation-inhibition spinale

L'inflammation est un ensemble de mécanismes de réactions par lesquels l'organisme se défend de diverses agressions et répare les tissus lésés. C'est un processus rapide, dynamique et réversible : l'inflammation aiguë est une réaction physiologique de défense de l'organisme. L'inflammation chronique (pathologique), dont la durée dépasse trois mois, correspond à un échec de la résolution de l'inflammation aiguë et est associée à de nombreuses pathologies. La douleur est l'un des symptômes de l'inflammation (Noack & Kolopp-Sarda, 2018).

**Note :** Il existe une multitude de modèles d'inflammation périphérique menant à une hyperalgésie et une allodynie mécanique et thermique chez le rongeur. Parmi ces modèles, l'injection sous-cutanée de divers médiateurs de l'inflammation mène à une hypersensibilité locale qui disparaît en quelques jours maximum. Les solutions utilisées engendrent la mise en place d'une inflammation périphérique aiguë d'intensités et de durées distinctes. Par exemple, l'injection de formaline est considérée comme un modèle d'inflammation à court-terme, de quelques heures, tandis que l'inflammation provoquée par l'injection d'adjuvant complet de Freund (CFA) ou de carraghénane perdure généralement quelques jours. Les modèles de douleurs inflammatoires chroniques ne seront pas évoqués dans ce manuscrit, mais peuvent par exemple être simulées par des injections répétées d'agents inflammatoires cités précédemment (Barrot, 2012 ; Sandkühler, 2009).

Une lésion des tissus périphériques entraîne une inflammation et augmente la sensibilité des nocicepteurs à des stimulations thermiques et mécaniques (Huck et al., 2022). Cette sensibilisation périphérique est causée par la libération de médiateurs chimiques dans l'environnement local à partir des terminaisons libres des nocicepteurs, des cellules immunitaires et des débris cellulaires. Cet ensemble de molécules prend le nom de « soupe inflammatoire », et contient principalement des cytokines pro-inflammatoires. Elle est également constituée d'une forte concentration de protons (acidification du milieu), de neurotransmetteurs excitateurs (ATP, sérotonine et histamine), de peptides (bradykinine et facteurs neurotrophiques) et de lipides (prostaglandine E2 ; Figure 15 ; Basbaum et al., 2009 ; Julius & Basbaum, 2001). La sensibilisation des nocicepteurs conduit à une augmentation de l'activité des fibres afférentes, dont les conséquences sont multiples dans le réseau nociceptif spinal de la CDME.



**Figure 15 :** principaux acteurs moléculaires et cellulaires de la « soupe inflammatoire ».

Une lésion tissulaire provoque une forte accumulation locale de molécules qui sensibilisent les terminaisons libres des nocicepteurs. L'activation des nocicepteurs induit également une libération locale de substance P et de peptide relié au gène de la calcitonine (CGRP). Ces deux peptides permettent, d'une part, la vasodilatation des capillaires à proximité de la lésion, favorisant la diapédèse des cellules immunitaires, et d'autre part, l'activation des mastocytes et des macrophages environnants. Ces cellules participent également à la sensibilisation des terminaisons nerveuses, en libérant notamment de l'histamine et des cytokines pro-inflammatoires. D'après Julius et Basbaum, 2001.

### a. Sensibilisation des fibres afférentes

Lors d'une inflammation périphérique chez le rat, la stimulation mécanique de la zone lésée entraîne une augmentation de la fréquence de décharge initiale des fibres A $\delta$  et C. L'adaptation des nocicepteurs fait cependant diminuer la fréquence de PA aux mêmes valeurs que celles enregistrées en condition contrôle. De manière intéressante, il n'y a pas de différence de fréquence de décharge des fibres afférentes entre la condition contrôle et inflammatoire lors d'une stimulation thermique au chaud. L'inflammation semble néanmoins modifier la phase initiale du codage en fréquence d'un message nociceptif mécanique (Andrew & Greenspan, 1999).

Les constituants de la « soupe inflammatoire » peuvent augmenter l'excitabilité des fibres afférentes. L'application d'une cytokine pro-inflammatoire, l'interleukine  $1\beta$  (IL- $1\beta$ ), sur des nocicepteurs, entraîne une augmentation de leur excitabilité (Binshtok et al., 2008). L'augmentation de la concentration locale de protons au niveau de la zone inflammée sensibilise également les nocicepteurs. L'acidification du milieu d'une préparation peau-nerf entraîne l'augmentation de l'excitabilité des fibres C, avec davantage de PA évoqués par des stimulations mécaniques. À l'inverse, aucune des 17 fibres afférentes à bas seuil enregistrées n'a présenté de phénomène de sensibilisation à l'acidification (Steen et al., 1992). Néanmoins, une injection intraplantaire unilatérale de CFA chez des rats mène à une hyperexcitabilité des fibres  $A\beta$  via une augmentation de l'expression de canaux sodiques voltage-dépendants  $Na_v1.8$  (Belkouch et al., 2014). Cette augmentation de l'excitabilité des fibres afférentes participe à la sensibilisation périphérique.

En outre, à la suite d'une inflammation périphérique, les fibres afférentes à haut seuil génèrent des PA spontanés, sans stimulation nociceptive. Cette activité spontanée et irrégulière peut atteindre une fréquence de 1-2 Hz dans les fibres C (Ikeda et al., 2006 ; Yang et al., 2014).

L'enregistrement de fibres  $A\delta$  et C du nerf sural *in vivo* chez des rats adultes a mis en évidence l'absence de décharge spontanée en condition contrôle. Deux jours après l'injection intraplantaire de CFA, 24% des fibres  $A\delta$  et C présentent une activité spontanée. La fréquence de cette activité oscille entre 0,3-10 Hz pour les fibres  $A\delta$  et entre 1-2 Hz pour les fibres C. La proportion des fibres C présentant des décharges spontanées reste identique sept jours après l'injection, mais redevient nulle deux semaines après celle-ci (Xiao & Bennett, 2007). Une petite proportion (5%) des fibres C nociceptives présente une activité spontanée en condition contrôle, lors d'enregistrements intracellulaires *in vivo* de nocicepteurs chez des rats jeunes. Cette proportion atteint 38% un jour après l'injection intraplantaire de CFA et 25% quatre jours après celle-ci. La fréquence de l'activité spontanée mesurée se trouve entre 0,15-0,59 Hz. Les auteurs de cette étude ont également estimé qu'environ 6000 nocicepteurs, contactant les neurones de la CDME des segments spinaux L4/L5, présentent une activité spontanée en condition inflammatoire. Il en résulterait, en lien avec la fréquence de décharge spontanée mesurée, une activité globale à 2500 Hz environ des fibres C dans la CDME des segments L4/L5 (Djoughri et al., 2006).

**Note :** des stimulations électriques répétées à basse fréquence (0,3-5 Hz) des fibres afférentes peuvent induire une augmentation progressive de la fréquence de PA générés par les neurones de la CDME. Il s'agit d'une plasticité à court-terme activité-dépendante, d'origine postsynaptique, des synapses des fibres non-myélinisées. Ce phénomène, nommé le « wind-up », a été caractérisé pour la première fois par l'enregistrement de PA d'un axone de neurone de projection de la CDME, évoqués par la stimulation électrique répétée, à basse fréquence, de fibres C (Mendell & Wall, 1965 ; Mendell, 1966). Le wind-up est principalement observé lors d'enregistrements de neurones de projection de la lamina V, mais est réduit pour les neurones de la CDME superficielle (Fossat et al., 2007 ; Seagrove et al., 2004). De ce fait, les acteurs moléculaires et l'impact de ce phénomène ne seront pas développés ici, mais peuvent être retrouvés dans la revue d'Eide (2000), hypothétisant par ailleurs le lien entre le wind-up et la douleur spontanée chez l'humain.

L'inflammation périphérique induit, via l'activité spontanée des fibres C, une potentialisation à long-terme (LTP) des synapses contactant les neurones de la CDME (Ikeda et al., 2006 ; Yang et al., 2014). En outre, la LTP des fibres C peut être entretenue par une contribution gliale. Des stimulations électriques à haute fréquence d'un nerf sciatique isolé *in vivo* chez des souris induisent une LTP des synapses des fibres C dépendante de l'activation de récepteurs N-méthyl-D-aspartate (NMDA) présynaptiques. Ces fibres libèrent une cytokine qui stimule les microglies de la CDME superficielle. Ces dernières produisent et libèrent du facteur neurotrophique issu du cerveau (BDNF). Le développement de cette LTP conduit à une hyperalgésie thermique au chaud jusqu'à 14 jours, et une allodynie mécanique dépassant 21 jours. L'ablation des microglies empêche l'induction de LTP par les stimulations électriques (Zhou et al., 2019).

De plus, le BDNF stimule le bourgeonnement de terminaisons de fibres C dans la lamina II. L'augmentation de la densité de ces terminaisons, qui perdure dans le temps, mène à une plus forte convergence de fibres excitatrices sur les neurones de la lamina II (Zhou et al., 2019).

**Note :** la plasticité synaptique à long-terme correspond à d'une augmentation persistante de la transmission synaptique ou d'une diminution persistante de celle-ci (dont la durée dépasse quelques dizaines de minutes). Ces phénomènes sont respectivement appelés potentialisation à long-terme (LTP) et dépression à long-terme (LTD). Les acteurs moléculaires mis en jeu dans ces plasticités sont majoritairement communs, et impliquent notamment des récepteurs NMDA ou métabotropiques du glutamate, la concentration en calcium intracellulaire et éventuellement la libération de messagers rétrogrades. Ce type de plasticité mène généralement à des changements d'expression de protéines par le neurone postsynaptique, contrairement à la plasticité à court-terme. Des cas de plasticité à long-terme, observés dans la CDME, semblent par ailleurs participer au développement de douleurs pathologiques (Luo et al., 2014).

Chez l'Homme, l'utilisation d'un protocole de stimulations électriques cutanées à faible fréquence (1000 stimulations à 1 Hz) diminue l'intensité de la douleur décrite par des patients sains, lors de stimulations mécaniques nociceptives de la même zone. À l'inverse, des stimulations électriques à haute fréquence (100 Hz pendant 1 seconde, répétées 5 fois toutes les 10 secondes) mènent à l'augmentation du score de douleur.

Cette augmentation est observable lorsque la stimulation nociceptive est réalisée sur la zone de la stimulation électrique (hyperalgésie primaire), mais également à proximité de cette zone (hyperalgésie secondaire), 3 heures après les stimulations électriques (Klein et al., 2004). L'hyperalgésie secondaire reflète une sensibilisation centrale, au sein du réseau nociceptif spinal.

Par ces différents phénomènes, l'activité dans le réseau nociceptif dans la CDME est augmentée. Il pourrait en résulter une déstabilisation de la balance excitation-inhibition au sein de ce réseau, modifiant le traitement des informations nociceptives et participant aux phénomènes d'allodynie et d'hyperalgésie.

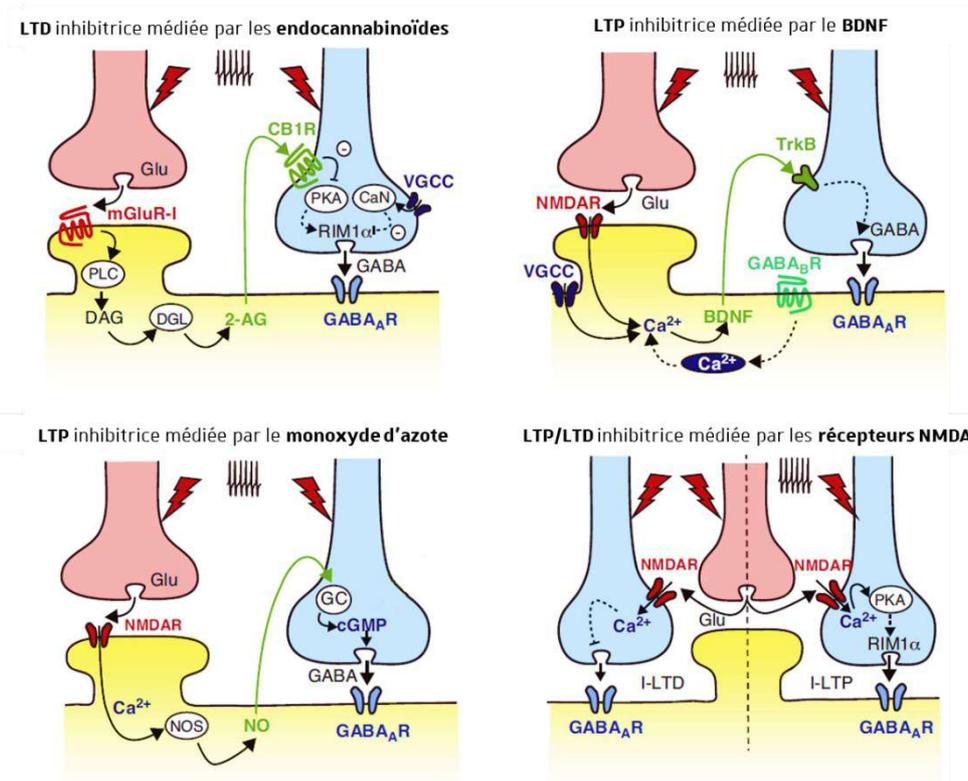
### **b. Conséquences centrales de l'inflammation périphérique aiguë sur l'inhibition**

**Note :** *la sensibilisation centrale se repère par une hypersensibilité des zones en dehors de la lésion. Dans la CDME, elle implique un ensemble de mécanismes moléculaires et cellulaires qui favorise la transmission des informations nociceptives : une augmentation de la signalisation excitatrice NDMA-dépendante, une désinhibition et une activation microgliale (Basbaum et al., 2009). L'inflammation périphérique peut induire une sensibilisation centrale. Nous nous intéresserons ici davantage à la modification de l'inhibition.*

La modification de la balance excitation-inhibition peut faire intervenir une modulation de la transmission synaptique inhibitrice dans la CDME. Cette section permet de récapituler les changements majeurs qui pourraient affecter le traitement des informations nociceptives.

- **Impact de l'activité des fibres afférentes sur l'inhibition spinale**

Des phénomènes de plasticité à long-terme de la transmission synaptique inhibitrice ont été observés dans le réseau nociceptif spinal. Celle-ci est généralement hétérosynaptique. Elle résulte de l'activité d'une synapse glutamatergique voisine, faisant intervenir l'activation de récepteurs NDMA ou métabotropiques du glutamate et la synthèse de messagers rétrogrades. Ces messagers peuvent agir au niveau de l'élément présynaptique de la synapse excitatrice activée, mais peuvent également potentialiser ou déprimer la transmission des synapses à proximité, dont les synapses inhibitrices (Figure 16). Contrairement à la plasticité des synapses excitatrices, une plasticité à long-terme des synapses inhibitrices ne peut virtuellement pas être induite par détection de coïncidence (Castillo et al., 2011 ; Kullmann et al., 2012).



**Figure 16 :** exemples de mécanismes de plasticité à long-terme de synapses GABAergiques.

La plasticité à long-terme des synapses inhibitrices est généralement hétérosynaptique, impliquant l'activation préalable d'une synapse excitatrice voisine et la libération de messagers rétrogrades. Les exemples proposés dans cette figure sont issus de travaux dans l'hippocampe, le cervelet et le néocortex, notamment. Adapté de Castillo et al., 2011.

**A :** l'activation des récepteurs mGluR-I conduit à la production de diacylglycérol (DAG) par la phospholipase C (PLC) dans le neurone postsynaptique. La diacylglycérol lipase (DGL) convertit le DAG en 2-arachidonylglycérol (2-AG). Lorsque ce dernier est libéré, il peut activer les récepteurs cannabinoïdes de type 1 (CB1R) de la terminaison GABAergique. L'activation de CB1R réduit l'activité de la protéine kinase A (PKA). L'arrivée de PA dans la terminaison GABAergique induit l'augmentation de la concentration du calcium libre intracellulaire, via l'ouverture de canaux calciques voltage-dépendants (VGCC), ce qui augmente l'activité de la calcineurine (CaN). Ces deux phénomènes abaissent le niveau de phosphorylation d'un substrat non identifié, impliqué dans l'exocytose des vésicules synaptiques, et dépendant de la protéine régulatrice de l'exocytose à la membrane de la synapse (RIM1α).

**B :** une LTP inhibitrice peut être médiée par le BDNF. Elle est initiée par une augmentation du calcium intracellulaire due à l'ouverture des récepteurs NMDA et des VGCC, ou à la libération de calcium des réserves intracellulaires. L'activation postsynaptique de récepteurs GABA<sub>B</sub> pourrait participer à la libération de calcium des réserves intracellulaires via un mécanisme inconnu. Le BDNF libéré active des récepteurs tyrosine-kinase B (TrkB) exprimés à la surface des terminaisons GABAergiques, menant à la potentialisation de la libération de GABA.

**C :** une LTP inhibitrice peut être médiée par l'oxyde nitrique (NO). L'augmentation du calcium intracellulaire dans la cellule postsynaptique, via l'ouverture de récepteurs NMDA, permet la synthèse de NO grâce à la monoxyde d'azote synthétase (NOS). En diffusant à travers les membranes, le NO peut stimuler la guanylate cyclase (GC) de l'élément présynaptique GABAergique, augmentant le niveau de guanosine monophosphate cyclique (cGMP) et la libération de GABA.

**D :** le glutamate (Glu) libéré par une synapse excitatrice voisine peut également activer directement les récepteurs NMDA présynaptiques sur les terminaisons GABAergiques, sans l'intermédiaire de messagers rétrogrades. En fonction de la synapse, l'augmentation du calcium intracellulaire peut déprimer (I-LTD) la libération de GABA par des mécanismes non-caractérisés, ou potentialiser (I-LTP) la libération de GABA via l'activation de la PKA et dépendamment de RIM1α.

Dans la CDME superficielle, des récepteurs NMDA sont exprimés par les neurones GABAergiques (Lu et al., 2005). L'activation de récepteurs NMDA exprimés par des neurones GABAergiques de la lamina II entraîne une LTP de la transmission synaptique glycinergique sur ces neurones (Kloc et al., 2019). La transmission synaptique GABAergique n'a pas été examinée dans cette étude, mais la majorité des neurones inhibiteurs de la CDME superficielle co-libère du GABA et de la glycine (Inquimbert et al., 2007). Une plasticité similaire sur la transmission synaptique GABAergique pourrait ainsi être envisagée. Une LTP de la transmission synaptique GABAergique sur des neurones GABAergiques est par ailleurs observée en culture primaire d'hippocampe. Elle est induite par l'activation de récepteurs NMDA postsynaptiques qui entraîne l'augmentation de l'expression de récepteur GABA<sub>A</sub> à la surface du neurone GABAergique postsynaptique (Marsden et al., 2007).

De plus, la stimulation de fibres afférentes contactant directement des neurones de la lamina I, par un protocole de stimulation électrique à haute fréquence, mène à la mise en place d'une LTP GABAergique sur ces neurones. De façon intéressante, cette LTP inhibitrice hétérosynaptique ne dépend pas de l'activation de récepteurs NMDA. La stimulation à haute fréquence des fibres afférentes provoque l'activation de récepteurs mGluR-I exprimés par le neurone enregistré dans la lamina I. Cette activation stimule la synthèse de monoxyde d'azote dans ce neurone. Cette molécule gazeuse agit comme un messager rétrograde sur des synapses GABAergiques contactant le neurone enregistré. Il en résulte une potentialisation de la libération de GABA (Fenselau et al., 2011). Cette LTP de la transmission synaptique GABAergique pourrait contrebalancer l'éventuelle LTP des fibres afférentes, tel un mécanisme de compensation.

- **Modulation de la transmission synaptique inhibitrice par les cytokines pro-inflammatoires**

En dehors de l'impact de l'activité des fibres afférentes sur l'inhibition, les acteurs de l'inflammation peuvent également y contribuer directement, ou indirectement via une implication gliale dans la CDME. Certaines cytokines pro-inflammatoires, dont l'IL-1 $\beta$  et le facteur de nécrose tumorale  $\alpha$  (TNF $\alpha$ ), ont la capacité de traverser la barrière hémato-encéphalique, uniquement depuis la périphérie vers le système nerveux central chez la souris (Banks et al., 1991 ; Gutierrez et al., 1993).

L'activation de récepteurs de l'IL-1 $\beta$  exprimés par des neurones GABAergiques de la lamina II entraîne une LTP de la transmission synaptique glycinergique sur ces neurones. Cette LTP dépendante de l'IL-1 $\beta$  n'est pas induite chez des souris ayant reçu une injection intraplantaire de formaline, ce qui signifie qu'elle se met en place à la suite de l'inflammation (Chirila et al., 2014). La transmission synaptique GABAergique est

quant à elle réduite sur des neurones de la lamina II via l'activation de récepteurs de l'IL-1 $\beta$  pré- et postsynaptiques (Yan et al., 2015). La modulation des deux transmissions inhibitrices majoritaires dans le réseau nociceptif spinal par l'IL-1 $\beta$ , bien que distincte, implique l'activation de microglies. Néanmoins, l'éventuelle plasticité à long-terme de la transmission synaptique GABAergique dépendante de l'IL-1 $\beta$  n'a pas été étudiée, les enregistrements ne dépassant pas 10 minutes.

L'activation de récepteurs du TNF $\alpha$  exprimés par des neurones GABAergiques de la lamina II, ayant un profil de décharge toniques uniquement, entraîne une diminution de leur excitabilité (Zhang & Dougherty, 2011).

- **Perturbation de la balance excitation-inhibition spinale**

Une inflammation périphérique induite par le CFA modifie la balance excitation-inhibition sur les neurones excitateurs de la lamina III qui sont désinhibés, donnant plus de poids à l'excitation. La désinhibition n'est pas causée par une diminution de la densité de synapses inhibitrices contactant les interneurons excitateurs (Takazawa et al., 2017). Par ailleurs, ce type d'inflammation diminue également le seuil de genèse de PA des neurones des laminae I et II, présentant un profil de décharge phasique uniquement (Kopach et al., 2023). Ces neurones sont généralement considérés comme excitateurs (voir le paragraphe I.2.). Une inflammation périphérique induite par le CFA engendre aussi une diminution de l'expression de KCC2 dans la CDME (Zhang et al., 2008). L'inhibition de KCC2 dans la CDME superficielle provoque une augmentation de la surface des champs récepteurs des terminaisons libres cutanées et une augmentation de l'activité spontanée des nocicepteurs (Lee et al., 2019). Ainsi, si la capacité d'extrusion du chlorure des neurones du réseau nociceptif spinal est réellement affectée en condition d'inflammation périphérique, il pourrait en découler une perte du frein inhibiteur sur la transmission des informations nociceptives.

Parmi les circuits neuronaux du réseau nociceptif spinal impliqués dans l'allodynie mécanique, celui stimulé lors d'une inflammation périphérique mettrait en jeu des neurones glutamatergiques exprimant le transporteur vésiculaire du glutamate vGluT3. Ces neurones, situés dans la lamina III et contactés par des fibres afférentes à bas seuil, projettent vers les neurones excitateurs positifs à la calrétinine de la lamina II. Ces derniers sont désinhibés en condition inflammatoire chez des souris jeunes, ce qui permet le passage d'informations non-nociceptives vers les voies de sortie du réseau nociceptif spinal (Peirs et al., 2015).

L'inflammation périphérique aiguë peut donc entraîner des modifications du traitement des messages nociceptifs par des phénomènes de sensibilisation périphérique et centrale, ainsi qu'une restructuration du réseau nociceptif spinal. Les conséquences physiologiques de la modulation des transmissions synaptiques inhibitrices ne sont cependant pas claires, en agissant d'une part comme une compensation de l'activité excitatrice (antinociception) ou d'autre part, comme un amplificateur de la transmission nociceptive, via une augmentation de l'inhibition sur des interneurons GABAergiques (pronociception).

La majorité des études portant sur les phénomènes de sensibilisation centrale et périphérique en condition d'inflammation périphérique aiguë n'a été faite que chez des mâles.

Une stimulation électrique répétée des fibres C entraîne un ralentissement progressif de la propagation des PA générés. Pourtant, une injection intraplantaire unilatérale de CFA provoque un ralentissement plus important, mais uniquement lorsque les enregistrements sont réalisés sur des tranches de moelle épinière provenant de rattes : il en résulte une plus grande sommation des courants excitateurs dans les neurones de la CDME, augmentant l'excitabilité de ces derniers (Dickie et al., 2017). Il pourrait donc y avoir une transmission facilitée des informations nociceptives dans la CDME et vers les centres supraspinaux impliqués dans la douleur chez les femelles.

De plus, l'augmentation de genèse de PA par les neurones de projection polymodaux de la lamina V corrèle avec une augmentation de la concentration de formaline, injectée en sous-cutanée dans une patte arrière, mais uniquement chez des rattes. L'absence d'augmentation chez les mâles semble provenir de l'activation de contrôles descendants inhibiteurs (You et al., 2006).

Ces observations montrent qu'il existe des différences liées au sexe du traitement des informations nociceptives dans la CDME en condition d'inflammation périphérique aiguë. Il paraît alors important de développer les mécanismes distincts entre mâles et femelles dans le traitement des messages nociceptifs par le réseau nociceptif spinal, en condition contrôle ou d'inflammation périphérique. Parmi les molécules d'intérêt, les stéroïdes pourraient être des modulateurs de la sensibilité nociceptive.

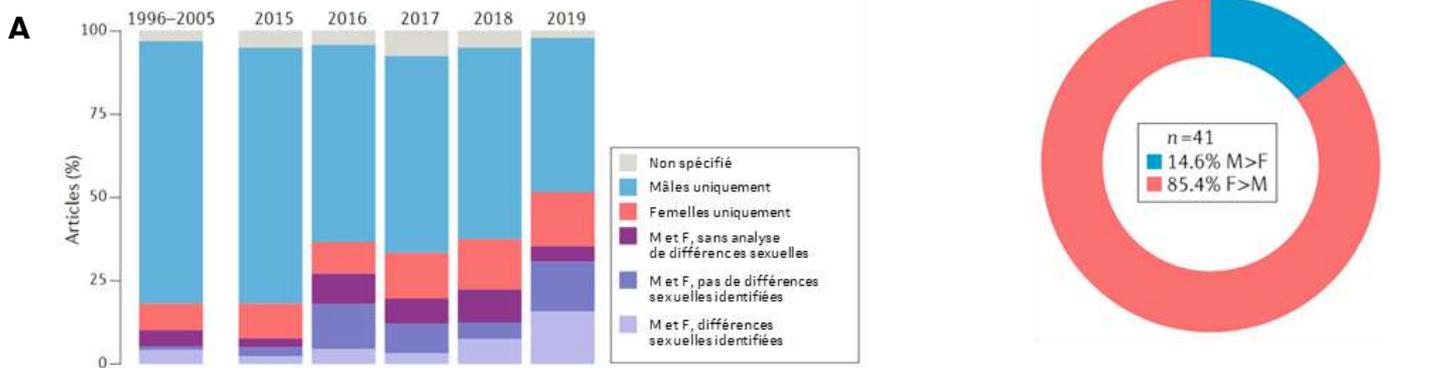
### III. Modulation sexe-dépendante du traitement des informations nociceptives

Au sein d'une même espèce, la différence de sexe pourrait être considérée comme l'une des plus grandes sources de différence homéostatiques entre les individus. La différence sexuelle implique le maintien de paramètres physiologiques à des niveaux distincts entre mâles et femelles, notamment pour l'adaptation à la gestation chez les femelles. Cette différence homéostatique pourrait mener à des réponses physiologiques différentes occasionnées par des stimulations nociceptives identiques.

Effectivement, les femelles semblent généralement plus sensibles face à des stimulations nociceptives que les mâles. Pour expliquer cette différence, de nombreuses études se sont intéressées aux actions pronociceptives et antinociceptives des stéroïdes sexuels, libérés par les gonades, dont la testostérone, l'estradiol et la progestérone. Les métabolites de la progestérone peuvent également moduler certaines transmissions synaptiques inhibitrices et excitatrices, ce qui pourrait mener à une modification de la balance excitation-inhibition dans le réseau neuronal étudié. Ces molécules pourraient ainsi modifier le traitement des informations nociceptives dans le réseau nociceptif spinal. De plus, des stéroïdes sont directement synthétisés dans le système nerveux central, appelés alors neurostéroïdes. Parmi eux, il est possible de retrouver les molécules citées précédemment.

Les équilibres internes peuvent être modifiés par des perturbations physiologiques ou pathologiques. Parmi elles, l'inflammation modifie les équilibres homéostatiques en faisant intervenir des mécanismes partiellement distincts entre mâles et femelles. Par ailleurs, l'inflammation périphérique aiguë entraîne une augmentation de la synthèse de neurostéroïdes dans la CDME (Bereiter et al., 2019 ; Poisbeau et al., 2005).

Ainsi, cette section expose tout d'abord les connaissances actuelles sur la nociception en fonction du sexe en condition physiologique de base. La modulation du traitement des informations nociceptives par les stéroïdes, notamment l'estradiol, la progestérone et les métabolites de la progestérone, est ensuite présentée. Des détails sur l'action de ces molécules en condition d'inflammation périphérique aiguë, où l'action des stéroïdes sexuels circulants pourrait se combiner avec celle des neurostéroïdes, sont donnés. Cette section se termine par un aperçu de la chronicisation de l'inflammation, dont les mécanismes sous-jacents pourraient être distincts en fonction du sexe.



**B**

Espèce et souche	Modalité(s) de stimulation	Test(s) nociceptif(s)	Mesures de seuil (g) ou latence (s)	Différences sexuelles	Référence
Souris C57Bl6/J	Mécanique	Von Frey manuel Note : application du filament sur le champ récepteur du nerf sural.	M : 1,25 g   F : 1,15 g	Non testé	Gilbert et al., 2023
Souris C57Bl6/J	Mécanique	Von Frey manuel Note : application du filament sur le champ récepteur du nerf sural.	M : 1,25 g   F : 1 g M : 1,5 s   F : 3 s	Non testé	Millecamps et al., 2023
	Thermique au froid	Test de l'acétone	Note : les valeurs indiquent le temps cumulé de comportements de levage, de léchage ou de tremblement pendant 1 min.	Non testé	
Souris C57Bl6/J	Mécanique	Von Frey manuel	M = 1,8 g   F = 1,8 g	Non significatif M = F	Charron et al., 2023
	Thermique au chaud	Plaque chaude (48°C)	M : 34 s   F : 37 s	Non significatif M = F	
Souris FCG	Thermique au chaud	Plaque chaude (52,5°C)	M : 24,5 s   F : 20 s	Non testé	Gioiosa et al., 2008
Rat Sprague-Dawley	Mécanique	Von Frey manuel	M : 23 g   F : 21 g	Non significatif M = F	Mapplebeck et al., 2018
Rat Sprague-Dawley	Mécanique	Von Frey manuel	M : 14 g   F : 10,5 g	Non testé	Dedek et al., 2022
Rat F344	Mécanique	Analgésie-mètre	M : 108 g   F : 79g	Significatif F > M	Barrett et al., 2002
Rat Sprague-Dawley	Mécanique	Von Frey électronique	M = 67,5 g   F = 64 g	Non testé	Lei et al., 2011
	Thermique au chaud	Test de Hargreaves	M = 11 s   F = 10,5 s	Non testé	
Rat Sprague-Dawley	Mécanique	Von Frey manuel	M : 3,9 g   F : 3,9 g	Non testé	Dickie et al., 2017
	Thermique au chaud	Test de Hargreaves	M : 14 s   F : 17,5 s	Non testé	
Rat Sprague-Dawley	Thermique au chaud	Test de Hargreaves	M : 9 s   F : 9 s	Non significatif M = F	LaPrairie & Murphy, 2007

**Figure 17** : résumé des différences sexuelles de nociception chez les rongeurs.

**A** : à gauche, récapitulatif de la proportion d'articles publiés dans le journal *Pain* entre 1996 et 2019, mentionnant ou non d'expérimentations sur rats ou souris mâles (M) et/ou femelles (F), avec des précisions sur d'éventuelles différences sexuelles. Notez l'augmentation progressive de l'utilisation de rongeurs des deux sexes dans les études. À droite, répartition des articles, publiés au dernier trimestre de 2019, dont les analyses ont permis d'identifier des différences sexuelles. M>F : les mâles sont plus sensibles que les femelles lors de stimulations nociceptives. F>M : les femelles sont plus sensibles que les mâles. Adapté de Mogil, 2020.

**B** : tableau non exhaustif récapitulant des données issues de tests comportementaux entre mâles et femelles, en condition physiologique basale, provenant d'articles cités dans ce manuscrit. Notez le nombre d'études dans lesquelles une analyse d'éventuelles différences sexuelles basales n'est pas réalisée, ainsi que la grande variabilité des valeurs de seuil ou de latence obtenues au travers des divers tests comportementaux. Dans certaines études, l'utilisation ultérieure d'un modèle de neuropathie nécessite l'application des filaments de von Frey sur une zone précise de la patte testée.

## 1. Nociception et sexe en condition physiologique de base

Les études primordiales sur la nociception utilisant des modèles animaux ont essentiellement porté sur des mâles. Les femelles étaient évitées à cause de leur cycle hormonal, de la charge d'ajouter une condition expérimentale supplémentaire et de l'incohérence présumée des différences liées au sexe. Il en a résulté une longue période d'ignorance de ces différences et du fonctionnement du système nociceptif chez la femelle. Pourtant, les femmes ont tendance à avoir un seuil et une tolérance à la douleur plus bas que celui des hommes, mais une meilleure capacité à discriminer différents niveaux d'intensité douloureuse. De plus, les hormones sexuelles femelles ont des effets mixtes sur la nociception selon la région du système nociceptif étudiée, tandis que la testostérone, principale hormone sexuelle mâle, semble généralement avoir un effet antinociceptif (Mogil & Bailey, 2010 ; Nasser & Afify, 2019).

Depuis que la nociception a été davantage étudiée chez les rongeurs femelles, 85% des études analysées par Jeffrey Mogil (2020) rapportent des différences liées au sexe lors de stimulations nociceptives, où les femelles ont une sensibilité nociceptive plus élevée que celle des mâles, sans distinction de la modalité concernée (Figure 17). De plus, pour une dose identique, les femelles sont moins sensibles aux analgésiques que les mâles dans 77% des études analysées.

**Note :** *l'influence du sexe sur l'analgésie induite par des molécules antalgiques est très bien documentée, et concerne notamment les opiacés, dont la morphine. Les femelles nécessitent une dose plus forte de morphine pour atteindre un effet analgésiant similaire à celui des mâles. Le métabolisme de la morphine diffère entre mâles et femelles dans diverses régions du système nociceptif. Un métabolite pronociceptif de la morphine, la morphine-3-glucuronide, est retrouvé en plus grande quantité chez les femelles dans ces régions et pourrait expliquer la plus faible efficacité de la morphine chez les femelles (Barrett et al., 2002 ; Gabel et al., 2023).*

Les femmes rapportent généralement plus d'événements douloureux que les hommes pendant une période donnée. Néanmoins, l'étude de la douleur chez l'humain est rendue difficile en raison du contexte psychosocial qui entre en jeu pour chaque individu (Bartley & Fillingim, 2013).

### **a. Nociception, douleur et sexe chez l'humain**

Diverses études et méta-analyses, compilant les résultats de plusieurs dizaines à plus d'une centaine de travaux, s'étendent sur les différences de seuil et de tolérance à la douleur entre hommes et femmes sains. Les femmes présentent en général un seuil et une tolérance inférieurs à ceux des hommes pour des stimulations nociceptives mécaniques, thermiques au chaud et électriques. Pour des stimulations chimiques ou thermiques au froid, les données sont similaires entre les deux sexes, ou ne permettent pas de conclure quant à une éventuelle différence (Klatzkin et al., 2010 ; Racine et al., 2012a ; Riley et al., 1998 ; Wise et al., 2002).

De plus, les femmes rapportent généralement des douleurs plus intenses que les hommes dans diverses pathologies, incluant des maladies musculosquelettiques et des infections respiratoires (Ruau et al., 2012). Malheureusement, les douleurs rapportées par un patient sont généralement biaisées par des contraintes psychosociales et par l'état émotionnel au moment de l'évaluation (Racine et al., 2012b). Par exemple, les hommes pourraient estimer être plus endurants face à la douleur, donc la dissimuler, tandis que les femmes pourraient plus facilement consentir à déclarer une douleur. Ces estimations sont généralement cohérentes avec les résultats expérimentaux lorsque les sujets doivent faire face à une situation douloureuse (Wise et al., 2002). D'autre part, dans une étude similaire, bien que les seuils et la tolérance varient selon le sexe pour des douleurs mécaniques et thermiques au chaud, l'évaluation verbale de l'intensité de la douleur et le caractère désagréable de celle-ci ne diffèrent pas (Klatzkin et al., 2010). Cela pourrait suggérer que, pour une même intensité de douleur, les femmes détecteraient et intègreraient des stimulations nociceptives de moindre intensité que les hommes. Néanmoins, les hommes pourraient aussi masquer leur douleur et minimiser une douleur intense induite par de fortes stimulations nociceptives.

De manière intéressante, la tolérance à la douleur dépend également du degré d'identification des femmes et des hommes à leur sexe biologique. Les hommes s'identifiant fortement masculins se considèrent plus tolérants face à une douleur que les femmes s'identifiant fortement féminines. Il n'y a pas de différence d'estimation entre les hommes s'identifiant faiblement masculins et les femmes se caractérisant faiblement féminines. Dans les faits, les hommes s'identifiant fortement masculins tolèrent des stimulations nociceptives électriques trois fois plus importantes que les femmes qui s'identifient fortement féminines. Il n'y a pas de différence de tolérance chez les personnes se caractérisant faiblement masculins ou féminins selon leur sexe respectif (Pool et al., 2007).

Les éléments évoqués précédemment empêchent une évaluation exacte du seuil d'apparition de la douleur et de la tolérance face à celle-ci. D'autre part, les liens entre les mécanismes moléculaires et cellulaires impliqués dans les différences de nociception liées au sexe ne sont pas encore élucidés à l'heure actuelle. L'utilisation de modèles animaux, pour lesquels les tests nociceptifs sont reproductibles, rigoureux et normés, aide à appréhender ce lien, bien que la douleur soit beaucoup plus difficile à évaluer.

## **b. Nociception et sexe chez les rongeurs**

Les premières études qui se sont intéressées aux seuils nociceptifs chez des rongeurs mâles et femelles en condition physiologique de base (quasi exclusivement chez des rats) ont mis en évidence une grande hétérogénéité des résultats (voir Figure 17). Cette variabilité dépendrait de nombreux paramètres expérimentaux, dont la modalité testée. Ainsi, des rattes ont un seuil nociceptif mécanique plus bas que celui des rats mâles lors de pressions avec un analgésie-mètre (test de Rendall-Selitto). À l'inverse, aucune différence sexuelle n'est observée lorsque la latence de réflexe nociceptif est examinée avec le test de la plaque chaude (Barrett et al., 2002 ; Bradshaw et al., 2000). De plus, les contrôles descendants sérotoninergiques pourraient avoir des rôles différents entre rats mâles et femelles : la sérotonine faciliterait la transmission nociceptive spinale chez les femelles lors de faibles stimulations nociceptives musculaires, tandis qu'elle l'inhiberait chez les mâles pour une stimulation nociceptive forte (Lei et al., 2011). Néanmoins, la stimulation optogénétique de fibres sérotoninergiques spinales, qui contactent préférentiellement des interneurons GABAergiques de la CDME, induit une analgésie mécanique et thermique au chaud de manière sexe-indépendante chez la souris (Aby et al., 2022).

L'utilisation de modèles murins a permis de déterminer des acteurs moléculaires qui pourraient être impliqués dans les différences sexuelles comportementales, notamment par approches transgéniques. Par exemple, des souris femelles, dont une copie du gène de la GAD67 a été invalidée, ont des réponses comportementales plus fréquentes lors de stimuli nociceptifs par rapport aux mâles du même génotype. Cette constatation corrèle avec une quantité plus faible, par rapport aux mâles, de GABA dans les terminaisons GABAergiques de la lamina II chez les femelles. De ce fait, une éventuelle inhibition de la transcription de la GAD67 pourrait affecter davantage les femelles que les mâles (Charron et al., 2023). Avec la généralisation de l'utilisation de rongeurs des deux sexes dans l'étude du système nociceptif, les seuils nociceptifs de diverses souches de rats et de souris ont pu être étudiés. Les différences de ces seuils en fonction du sexe tendent à dépendre du fond génétique, mettant en évidence une grande variabilité

intraspécifique. Néanmoins, les femelles présentent généralement une sensibilité accrue aux stimulations nociceptives par rapport à celle des mâles (Mogil et al., 2000). De plus, de manière intéressante, les différences liées au sexe observées semblent être portées par les chromosomes sexuels chez des souris ayant subi une gonadectomie. Des souris mâles et femelles avec un génotype XX (dont le gène *SRY*, déclenchant le développement des testicules, est situé sur un autosome chez le mâle XX) ont une latence de réponse plus courte à des stimulations nociceptives thermiques au chaud, comparée à celle de souris mâles et femelles XY (dont le gène *SRY* est inactivé chez les femelles XY). De ce fait, posséder les chromosomes XX semble être prédictif d'une hypersensibilité thermique au chaud (Gioiosa et al., 2008).

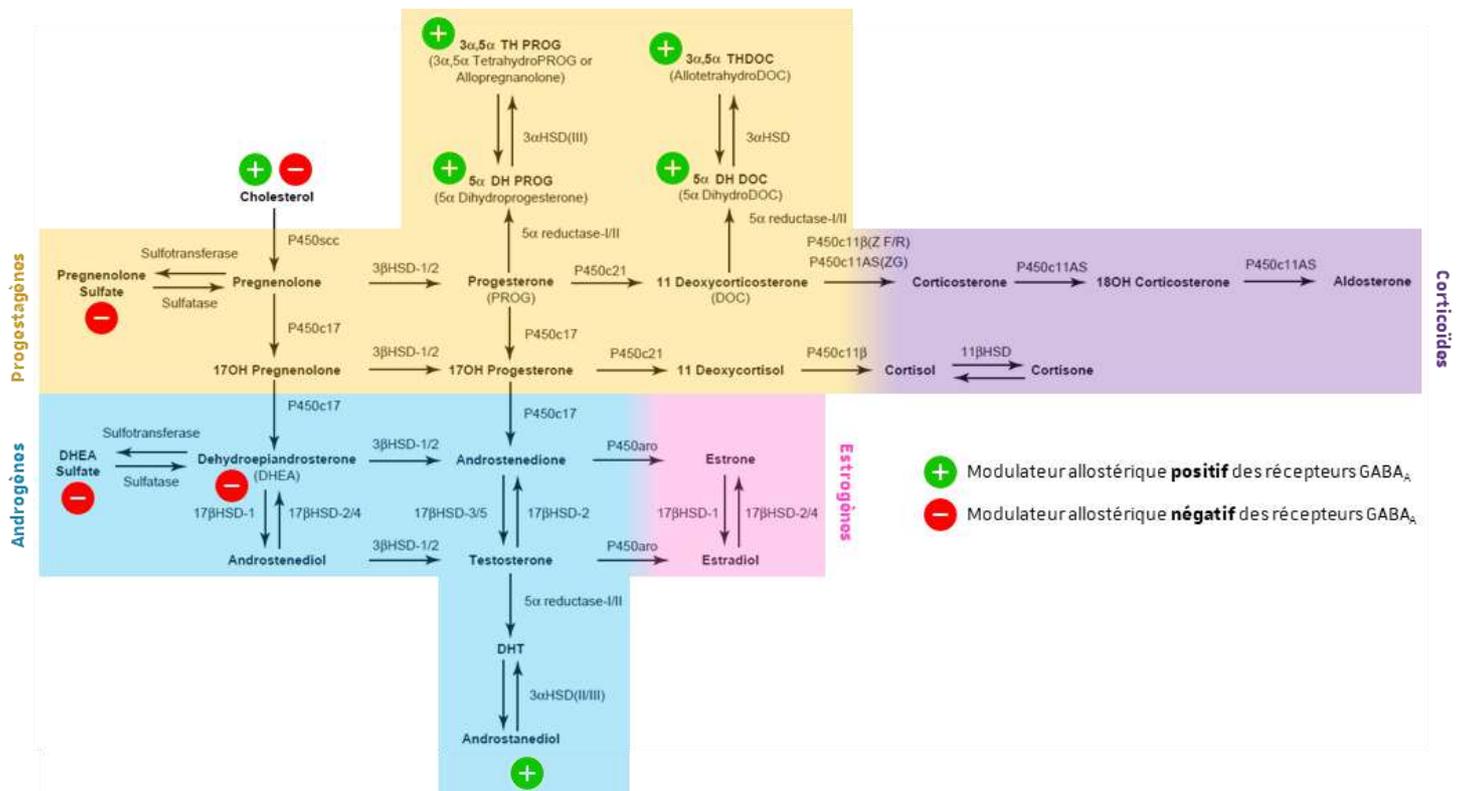
Cette observation indique que des différences de seuils de sensibilité peuvent survenir indépendamment de la synthèse de stéroïdes sexuels. Bien que les concentrations de divers stéroïdes retrouvés dans le système nerveux central varient indépendamment des cycles sexuels, elles restent néanmoins différentes entre mâles et femelles (Corpéchet et al., 1993 ; 1997). La modulation des transmissions synaptiques par les stéroïdes pourrait ainsi modifier le traitement spinal des informations nociceptives de manière sexe-dépendante.

## **2. Stéroïdes et traitement des informations nociceptives**

L'activité stéroïdogénique dans le système nerveux central est aujourd'hui bien décrite chez les Mammifères. Les études portant sur la stéroïdogénèse (Figure 18) dans le cerveau ont mis en évidence une expression différentielle des enzymes des voies de synthèse entre mâles et femelles. Des interactions entre neurostéroïdes et stéroïdes circulants ont été largement décrites, et leurs implications dans diverses conditions physiopathologiques ont été démontrées (Giatti et al., 2020 ; Mellon & Griffin, 2002).

### **a. Les neurostéroïdes dans la corne dorsale de la moelle épinière**

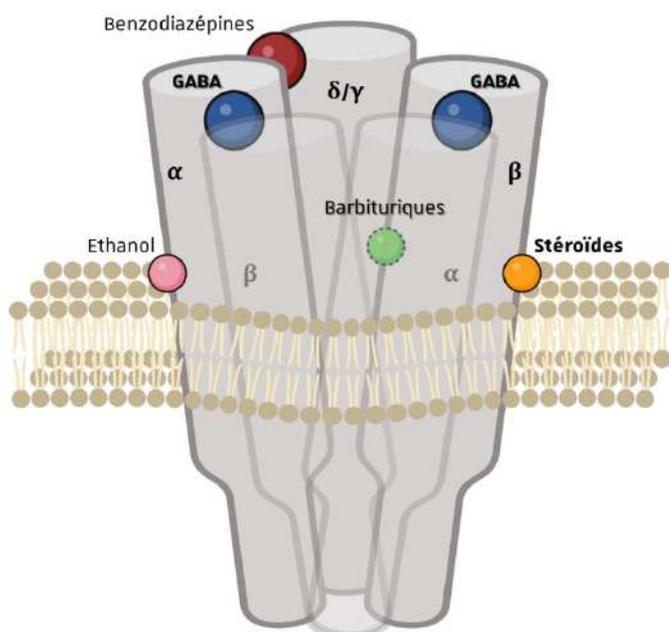
La CDME contient des neurones et des cellules gliales qui expriment les enzymes nécessaires à la synthèse et au métabolisme des neurostéroïdes. L'activité de ces enzymes a été démontrée par dosage de neurostéroïdes néosynthétisés localement après incubation de cholestérol ou de prégnénolone radiomarqués dans des tranches de moelle épinière (Mensah-Nyagan et al., 2008, Poisbeau et al., 2005).



**Figure 18 :** stéroïdogénèse et famille de stéroïdes.

Le cholestérol est le précurseur des hormones stéroïdiennes. Les voies de synthèse des stéroïdes mettent en jeu diverses enzymes, dont l'enzyme de clivage de la chaîne latérale du cholestérol (P450scc) et d'autres desmolases, des hydroxylases (cytochrome P450 ; P450c), des hydroxystéroïde déshydrogénases (HSD), des réductases ou l'aromatase (P450aro). Les hormones stéroïdiennes sexuelles regroupent l'ensemble des progestagènes, des estrogènes et des androgènes. Notez que des métabolites modulent directement la transmission synaptique GABAergique. Adapté de Mellon et Griffin, 2002.

**Figure 19 :** principaux sites de liaisons et ligands des récepteurs GABA<sub>A</sub>.



La fixation de deux molécules de GABA, à l'interface des sous-unités  $\alpha/\beta$ , provoque l'ouverture du canal. Les antagonistes compétitifs du récepteur, tels que la bicuculline, se fixent sur le site de liaison du GABA. Il existe également de nombreux ligands agissant sur des sites de modulation allostériques du récepteur. Ainsi, les stéroïdes neuroactifs, qui modulent rapidement la transmission GABAergique, se lient sur un site de liaison situé sur la partie transmembranaire de la sous-unité  $\beta$ . Les benzodiazépines se fixent uniquement sur des récepteurs comprenant la sous-unité  $\gamma$ , à l'interface des sous-unités  $\alpha/\gamma$ . Les barbituriques et l'éthanol peuvent se fixer sur d'autres sites de liaison allostériques. Il existe des antagonistes non compétitifs, tels que la picrotoxine, qui bloquent le pore du canal (non représenté).

**Note :** la synthèse de testostérone n'est pas avérée dans la moelle épinière. De ce fait, nous nous focaliserons largement sur la progestérone et ses dérivés, ainsi que l'estradiol.

Peu de neurones expriment l'aromatase (enzyme de synthèse de l'estradiol), mais ces derniers, majoritairement inhibiteurs, se retrouvent dans les laminae I et V. L'expression des récepteurs des estrogènes, dont les récepteurs génomiques ER $\alpha$  et ER $\beta$  ainsi que le récepteur aux estrogènes non-génomique couplé aux protéines G (GPR30), est très répandue dans la CDME. Il existe une variation de l'expression des ER proportionnelle à la concentration d'estradiol sérique durant le cycle œstral chez la ratte (Takanami et al., 2010 ; Tran et al., 2017 ; Williams et al., 1997). De plus, la concentration d'estradiol dans le noyau spinal du trijumeau diminue d'environ 45% chez des rattes ovariectomisées. Ainsi, la concentration totale d'estradiol dans ce noyau semble dépendre, à part quasi égale, d'estradiol provenant de la périphérie et d'estradiol synthétisé localement par l'aromatase des neurones locaux (Bereiter et al., 2019). Les récepteurs de la progestérone sont exprimés par des motoneurones de la lamina IX et des cellules gliales de la substance blanche. Dans la moelle épinière, la quantité d'ARNm codant ce récepteur n'est pas modifiée par l'exposition à la progestérone ou à l'estradiol (Labombarda et al., 2003).

La progestérone exerce principalement un effet génomique via ses récepteurs : il ne s'agit donc pas d'un stéroïde neuroactif, modifiant rapidement les caractéristiques de certaines neurotransmissions. Les métabolites de la progestérone ont néanmoins cette propriété, en modulant notamment la transmission synaptique GABAergique.

## b. Stéroïdes et inhibition

**Note :** l'action paracrine des neurostéroïdes entraîne des modifications locales de l'activité des réseaux neuronaux. Cette section se focalise davantage sur la modulation de la transmission synaptique GABAergique. La revue de Mellon et Griffin (2002) mentionne la modulation stéroïdienne d'autres types de transmissions synaptiques.

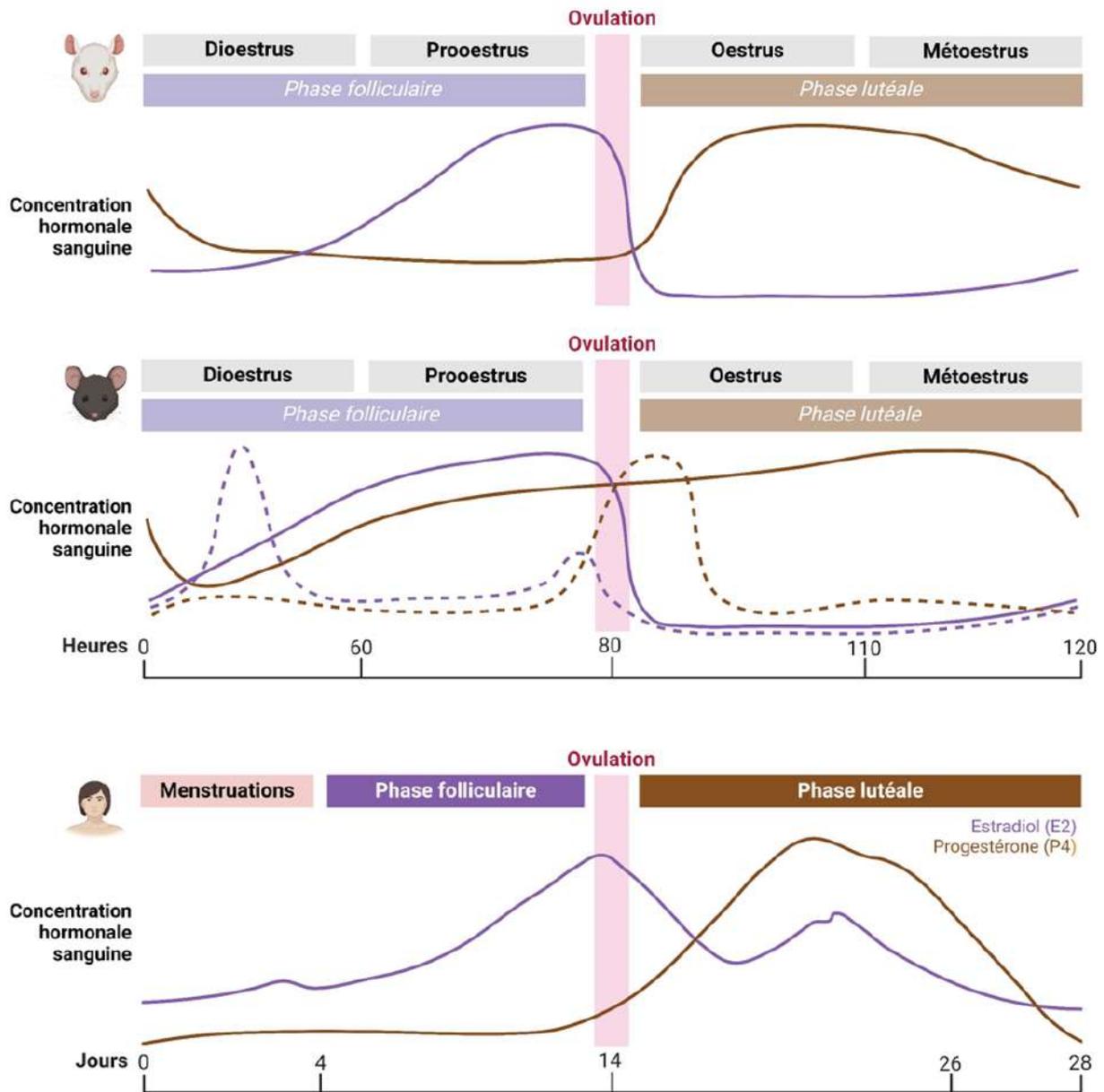
Certains métabolites de la progestérone agissent en tant que modulateurs allostériques des récepteurs GABA $_A$ . Les récepteurs GABA $_A$  comprenant les sous-unités  $\alpha\beta\delta$  semblent les plus sensibles à ces neurostéroïdes. Leur site de liaison aux récepteurs est localisé sur les sous-unités  $\beta$  (Figure 19). L'application en bain d'allopregnanolone (ALLO), par exemple, induit une augmentation de l'amplitude et de la cinétique de désactivation (*decay time*) des courants synaptiques GABAergiques (Belelli & Lambert, 2005).

Des travaux effectués dans mon équipe d'accueil ont montré que les métabolites de la progestérone synthétisés dans la CDME modulent la transmission synaptique GABAergique de manière tonique. Le blocage du métabolisme de la progestérone par incubation de tranches de moelle épinière avec du finastéride, un inhibiteur de la 5 $\alpha$ -réductase responsable de la synthèse d'ALLO et de tétrahydrodéoxycorticostérone (THDOC), réduit la cinétique de désactivation des CPSIm GABAergiques dans les neurones de la lamina II. À l'inverse, une injection préalable sous-cutanée de progestérone et l'application sur tranches de moelle épinière d'ALLO ou de THDOC entraînent l'augmentation de la durée des CPSIm GABAergiques enregistrés dans les neurones de la CDME. Aucun effet n'a été observé sur la transmission synaptique glycinergique dans la CDME (Inquimbert et al., 2007 ; Poisbeau et al., 2005). L'augmentation de la cinétique de désactivation des courants synaptiques GABAergiques par l'ALLO, et donc du THDOC qui partage les mêmes propriétés, nécessiterait la phosphorylation des récepteurs GABA<sub>A</sub> (Fancsik et al., 2000).

**Note :** *l'application de progestérone sur des tranches de moelle épinière augmente l'affinité des récepteurs GABA<sub>A</sub> dans la lamina II pour les benzodiazépines. Ce phénomène est empêché par l'application d'estradiol (Schwartz-Giblin et al., 1988). Les benzodiazépines sont d'autres modulateurs allostériques positifs (exogènes) des récepteurs GABA<sub>A</sub> (voir Figure 19), bien décrits dans la littérature (Olsen, 2018). Ainsi, il existerait un jeu de coopération et de compétition entre différents modulateurs allostériques des récepteurs GABA<sub>A</sub>.*

L'estradiol ne module pas directement sur la transmission synaptique GABAergique. L'action génomique des ER permet néanmoins une modification de l'expression d'acteurs moléculaires participant à cette transmission. Ainsi, l'implantation sous-cutanée d'une pompe à estradiol chez des ratte ovarioectomisées, générant un cycle œstral artificiel, a permis de mettre en évidence une variation de l'expression de la sous-unité  $\alpha 6$  de récepteurs GABA<sub>A</sub> dans le noyau spinal du trijumeau, selon la concentration d'estradiol en périphérie. L'expression de cette sous-unité corrèle avec une forte concentration plasmatique d'estradiol (Puri et al., 2011). Les différentes compositions en sous-unités des récepteurs GABA<sub>A</sub> leur confèrent des propriétés électrophysiologiques et pharmacologiques distinctes (Levitan et al., 1988).

L'estradiol a, d'une part, un effet pronociceptif lorsqu'elle est injectée dans le système nerveux central, mais d'autre part, un effet antinociceptif lorsqu'elle est injectée en périphérie (Craft, 2007). Chez des caillies japonaises mâles castrés, l'injection intrathécale chronique d'estradiol induit une hyperalgésie thermique au chaud. Cependant, cette hyperalgésie se développe également 20 minutes après une injection intrapéritonéale d'estradiol. Chez des mâles non castrés, l'inhibition de l'aromatase dans la moelle épinière induit une analgésie, qui n'excède cependant pas 10 minutes (Evrard & Balthazart, 2004). Ainsi chez le mâle, la testostérone produite par les gonades mâles est transformée en estradiol dans la moelle épinière (voir Figure 18), permettant une régulation rapide de la sensibilité thermique.



**Figure 20 :** comparaison des cycles reproducteurs murins (rat et souris) au cycle menstruel de la femme. Le cycle ovarien des rats (haut) et des souris (milieu) se présente sous la forme d'un cycle œstral, sans menstruation. La durée d'un cycle est d'environ 4-5 jours. Dans ce cycle, l'équivalent de la phase folliculaire correspond à l'ensemble diœstrus – proœstrus, tandis que la phase lutéale s'apparente aux stades œstrus – métœstrus. L'évolution des concentrations d'œstradiol et de progestérone sanguines est représentée en unité arbitraire (d'après Nilsson et al., 2015). De façon intéressante, la concentration sanguine moyenne d'œstradiol est relativement basse chez la souris C57Bl/6 (2-3 pg.mL<sup>-1</sup>), tandis que les concentrations moyennes atteignent plusieurs dizaines de pg.mL<sup>-1</sup> chez la ratte et la femme. Chez cette même souche de souris, Wall et ses collaborateurs (2023) ont mis en évidence des pics distincts d'œstradiol et de progestérone durant le cycle œstral (courbes en pointillés), dont un pic inattendu d'œstradiol à 60 pg.mL<sup>-1</sup> durant le diœstrus. Les différences de concentrations relevées entre les deux articles mentionnés pour la création de cette figure pourraient résider dans les horaires de prélèvements sanguins et/ou dans la méthode de purification et de dosage. Notez qu'au vu des caractéristiques distinctes du cycle œstral et de cycle menstruel, il peut être complexe de faire un parallèle entre les études hormonales réalisées chez l'Homme et les rongeurs.

La majorité des études récentes indique qu'il n'y a pas de changement des seuils nociceptifs en fonction du cycle œstral chez les rongeurs. De même, l'intensité douloureuse n'est pas modifiée en fonction du cycle menstruel chez des femmes saines (De Tommaso, 2011 ; Iacovides et al., 2015 ; Klatzkin et al., 2010). De plus, chez des souris femelles C57Bl/6J, aucune différence de sensibilité mécanique et thermique au chaud n'a été relevée entre les stades du cycle œstral (Meziane et al., 2007 ; Zhao et al., 2021). Les variations endogènes de concentration plasmatique d'hormones sexuelles chez la population féminine (Figure 20) ne sembleraient donc pas affecter la nociception et la douleur, du moins hors conditions pathologiques.

**Note :**  *parmi les autres hormones de reproduction principalement retrouvées chez les femelles / femmes en âge de reproduction, la prolactine, synthétisée de manière cyclique par les cellules lactotropes de l'hypophyse antérieure, semble pouvoir moduler l'activité du système nociceptif. Une description du rôle émergent de cette hormone peptidique sur la nociception est proposée par Chen et ses collaborateurs (2020).*

La concentration physiologique d'ALLO dans le plasma de rattes oscille entre 2 et 10 ng.mL<sup>-1</sup>, en corrélation avec la variation de concentration plasmatique de progestérone. Il existe cependant une quantité non négligeable d'ALLO retrouvée dans le SNC de rats des deux sexes, même en cas d'ablation de la glande surrénale et des ovaires, qui sont d'importants lieux de synthèse de stéroïdes sexuels circulants (Belelli & Lambert, 2005).

De manière intéressante, chez les rattes, la variation de concentration cérébrale de progestérone et de ses métabolites (sauf la prégnénolone sulfate) ne corrèle pas à la variation de concentration plasmatique de progestérone durant le cycle œstral. La régulation des neurostéroïdes cérébraux est indépendante du cycle reproducteur : cette régulation semble plutôt suivre un rythme circadien. De plus, les métabolites de la progestérone sont retrouvés en plus grande concentration dans le tissu nerveux cérébral que dans le plasma (Corpéchet et al., 1993 ; 1997). Néanmoins, des stéroïdes sexuels circulants sont retrouvés en concentration différente entre mâles et femelles, notamment parce que les glandes stéroïdogènes, et les principales molécules qu'elles synthétisent, se distinguent selon les appareils reproducteurs.

Des neurostéroïdes dans des structures impliquées dans le traitement des informations nociceptives sont par ailleurs retrouvés en condition d'inflammation périphérique aiguë (Bereiter et al., 2019 ; Poisbeau et al., 2005). La synergie de ces stéroïdes locaux avec les stéroïdes sexuels circulants pourrait mener à une modification, dépendante du sexe, du traitement des informations nociceptives. Cette interaction n'a été que très peu étudiée.

### **c. Action des stéroïdes en condition d'inflammation périphérique aiguë**

En condition d'inflammation périphérique aiguë, les différences liées au sexe ont tendance à être amplifiées et un rôle des stéroïdes sexuels est mieux documenté qu'en condition physiologique basale. Chez des rats mâles, les neurostéroïdes, dont la production dans la CDME est stimulée par l'injection intraplantaire de carraghénane, modifient la cinétique de déactivation des courants synaptiques GABAergiques. L'inhibition de la production de ces stéroïdes permet de mettre en évidence leur contribution dans un effet analgésique et un rétablissement plus rapide des seuils nociceptifs témoins (Poisbeau et al., 2005).

Une inflammation périphérique induite par une injection intraplantaire unilatérale de CFA produit une hyperalgésie thermique au chaud à 24 heures qui est plus prononcée chez des ratte, mais uniquement en phase de proœstrus. Ceci peut suggérer un effet pronociceptif d'estradiol lors de ce stade du cycle œstral (voir Figure 20 ; Bradshaw et al., 2000). Un implant sous-cutané de progestérone chez des ratte ovariectomisées permet, par ailleurs, de diminuer l'hyperalgésie thermique au chaud induite par une injection sous-cutanée de CFA en périphérie (Ren et al., 2000).

Une étude plus récente montre qu'une injection intraplantaire unilatérale de CFA provoque une allodynie mécanique avec des valeurs de seuil de sensibilité mécanique identiques entre rats mâles et femelles. Cependant, les mécanismes moléculaires qui permettent le développement de cette allodynie diffèrent entre mâles et femelles. Chez les mâles, l'inflammation provoque une diminution d'expression de KCC2, dépendante de la libération de BDNF, dans les neurones de la lamina I, alors que le mécanisme n'a pas été élucidé chez les femelles. Les acteurs moléculaires qui seraient responsables de l'allodynie chez les mâles mènent cependant à une allodynie chez des femelles ovariectomisées (Dedek et al., 2022).

Ainsi, les stéroïdes, synthétisés dans le système nerveux central ou circulants, joueraient un rôle non négligeable dans le traitement des informations nociceptives. Une dualité de fonctionnement du système nociceptif spinal entre mâles et femelles en condition d'inflammation périphérique aiguë pourrait également apparaître, indépendamment de l'action des stéroïdes sexuels, par des mécanismes distincts de sensibilisation. Bien que très peu d'études mettent en évidence des mécanismes sexe-dépendants dans la modulation du traitement des informations nociceptives en condition d'inflammation aiguë, n'impliquant pas directement les stéroïdes sexuels, la chronicisation de l'inflammation semble impliquer des acteurs moléculaires et cellulaires sexe-dépendants.

#### d. Différences sexuelles : de l'inflammation aiguë vers la chronicité

Les sensibilisations provoquées par des réactions inflammatoires en périphérie peuvent modifier les caractéristiques fonctionnelles du système nociceptif. Des rats qui ont subi une injection intraplantaire unilatérale de carraghénane 12 heures après leur naissance deviennent hyposensibles à des stimulations thermiques à l'âge adulte, et cette hyposensibilité est plus forte chez les femelles que chez les mâles. Cependant, les femelles développent une plus forte hyperalgésie lors d'une ré-inflammation à l'âge adulte (LaPrairie & Murphy, 2007). Une inflammation précoce chez les femelles pourrait donc les prédisposer à des réactions douloureuses plus intenses à l'âge adulte.

D'autre part, l'échec de la résolution de l'inflammation périphérique aiguë peut mener à une inflammation chronique, considérée comme pathologique, avec une composante douloureuse si elle atteint les nerfs ou terminaisons périphériques (Cairns et al., 2015). Cela pourrait être le cas pour des troubles ostéoarticulaires, des maladies inflammatoires de l'intestin ou d'une névralgie post-herpétique consécutive à un zona. Néanmoins, l'inflammation chronique peut aussi être la conséquence de lésions nerveuses : l'ensemble des pathologies est regroupé sous le terme de neuropathie.

**Note :** *la neuropathie est connue pour le développement d'une sensibilisation périphérique et centrale qui mène à la modification du traitement des informations nociceptives. Parmi les phénomènes sous-jacents à la sensibilisation centrale, l'altération de la balance excitation-inhibition causée par une diminution de l'efficacité de l'inhibition, elle-même liée à la diminution d'expression de KCC2 dans la CDME, semble grandement affecter la nociception (Todd, 2015).*

Les médiateurs moléculaires et cellulaires liés à l'inflammation chronique en condition neuropathique diffèrent entre mâles et femelles, mais mènent tous à la diminution des seuils nociceptifs. Les acteurs moléculaires pronociceptifs semblent dépendre de l'activation de lymphocytes T chez les femelles, tandis que l'activation microgliale paraît prédominante chez les mâles (Ghazisaeidi et al., 2023). Une étude récente a montré que, dans un contexte de douleurs chroniques neuropathiques (modèle de lésions nerveuses, *spared-nerve injury*, SNI), les souris femelles retrouvent leur seuil basal de sensibilité mécanique entre 6 à 9 mois post-chirurgie. Ce phénomène n'est pas observé chez les mâles, dont l'allodynie mécanique persiste pendant les 30 mois post-chirurgie de l'étude (Millecamps et al., 2023).

La prévalence des douleurs chroniques est significativement supérieure chez les femmes. Aujourd'hui, il reste à déterminer l'origine de cette prévalence, et à décrire les mécanismes pro- et antinociceptifs spécifiques pour chaque sexe afin de proposer une prise en charge personnalisée de la douleur chez un patient masculin ou féminin (Bouhassira et al., 2008 ; Greenspan et al., 2007).

En prenant en considération l'ensemble des notions abordées dans cette introduction, les objectifs de mes travaux de thèse sont **1)** de caractériser la plasticité de la transmission synaptique GABAergique lors de stimulations électriques répétées dans la lamina II en fonction du sexe de souris en condition physiologique de base, **2)** de mettre en évidence une modulation sexe-spécifique de la transmission synaptique GABAergique lors d'un état d'inflammation périphérique aiguë, **3)** de visualiser, en simulant des entrées nociceptives excitatrices sur les interneurons de la lamina II, l'impact de l'intégration et de l'inhibition GABAergique sur le ré-encodage des informations et **4)** de corrélérer les résultats électrophysiologiques obtenus aux seuils de sensibilité mécanique et thermique au chaud des souris. Ce projet s'inscrit dans la recherche des mécanismes physiologiques qui sous-tendent les différences de réponses à la douleur entre hommes et femmes.

## **ARTICLE 1**

Les principaux résultats de mes travaux de thèse sont regroupés dans cet article. Les résultats préliminaires des procédures de double-stimulation sont présentés dans la section « Compléments des résultats ». Des précisions sur le matériel et les méthodes utilisés pour l'ensemble des procédures sont données à la suite de cet article, dans la section « Compléments des matériels et méthodes ».

# Different inhibitory-disinhibitory balance in the spinal nociceptive system in male and female mice during peripheral inflammation

Robin Kuster<sup>1</sup>, Lou Cathenaut<sup>1</sup>, Quentin Leboulleux<sup>1</sup>, Mélanie Kremer<sup>1</sup>, Chantal Fitterer<sup>1</sup>, Perrine Inquimbert<sup>1</sup>, Rémy Schlichter<sup>1</sup>, Sylvain Hugel<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Centre National de la Recherche Scientifique, Université de Strasbourg, Institut des Neurosciences Cellulaires et Intégratives, 67000 Strasbourg, France.

## **Abstract**

The dorsal horn of the spinal cord processes nociceptive information from the periphery before forwarding it to the brain where it can eventually lead to the perception of pain. This processing involves GABAergic synapses with lamina II neurons displaying distinct frequency-dependent short-term plasticities depending on the inhibitory or excitatory nature of the postsynaptic interneuron contacted. The aim of this study was to examine whether the short-term plasticities at these connections differed in male and female mice and under conditions of peripheral inflammation (PI). In control mice expressing eGFP under the control of the GAD65 promoter, we demonstrated that LII GABAergic connections onto neurons expressing eGFP (eGFP+) and onto neurons not expressing eGFP (eGFP-) weakly differed under basal physiological control conditions. In a model of PI induced by bilateral intraplantar injection of carrageenan, we demonstrated that STP of GABAergic connections onto eGFP- and eGFP+ neurons were differently modulated, leading to a change in their relative contribution. This differential modulation during PI was different in males and females, and changes in females depending on the phase of the estrous cycle. Dynamic-clamp experiments with models of excitatory and inhibitory inputs suggested that the changes in STP observed in PI conditions could have major impacts in the excitation/inhibition balance at low frequency of activity, and more limited impacts for high frequency activity. Our data support the hypothesis that excitation/inhibition imbalance in the lamina II during PI involves at least in part differential changes in the short-term plasticities at inhibitory and "disinhibitory" synapses and that male/female differences in the short-term plasticity at these connections could contribute to sex differences in the sensitivity to noxious stimuli.

## 1. Introduction

The dorsal horn (DH) of the spinal cord processes nociceptive information from the periphery before forwarding it to the brain where it can eventually lead to the perception of pain. In lamina II of the DH, networks of excitatory and inhibitory interneurons integrate messages conveyed by C and A $\delta$  primary afferent fibers. Messages from these sensory fibers apprise DH networks of the intensity of sensory stimuli under the form of a frequency-based code of action potential firing (Adrian, 1920; Adrian & Zotterman, 1926; Campero, Serra, & Ochoa, 1996; Torebjork & Hallin, 1974). The decoding of this frequency-encoded information involve synapses displaying frequency-dependent short-term plasticities (STP) (Buonomano, 2000; Cathenaut, Schlichter, & Hugel, 2023). GABAergic synapses displaying distinct STP depending on the excitatory or inhibitory nature of the postsynaptic neuron have recently been described in lamina II of the DH (Cathenaut et al., 2022). This target-specific plasticity is expected to allow a tuning of the balance between inhibition and disinhibition while processing frequency coded-information from primary afferents (Cathenaut et al., 2023).

Under conditions of peripheral inflammation (PI), both sensory fibers and spinal nociceptive system undergo a series of changes that are respectively termed peripheral and central sensitization (Woolf, 1983; Woolf & Costigan, 1999). Peripheral sensitization includes an increased excitability of primary afferent nociceptive fibers (Neumann, Doubell, Leslie, & Woolf, 1996; Stanfa, Sullivan, & Dickenson, 1992). Central sensitization include, in the DH, a reduced inhibition (Harvey et al., 2004; Muller, Heinke, & Sandkuhler, 2003; Reinold et al., 2005; H. Zhang, Nei, & Dougherty, 2010; W. Zhang, Liu, & Xu, 2008) and/or mechanisms of disinhibition where inhibitory controls with inhibitory neurons are potentiated (Chirila et al., 2014; Kloc, Pradier, Chirila, & Kauer, 2019). Interestingly, in parallel, antinociceptive mechanisms can also be engaged under conditions of PI at inhibitory synapses (Poisbeau et al., 2005; Schlichter et al., 2006). Due to these pro- and antinociceptive mechanisms induced by PI, the balance between excitation and inhibition is altered in the spinal nociceptive system, contributing to changes in sensory thresholds. Interestingly, sex differences have been observed in the sensitivity of rodents following the induction of PI, suggesting that the excitation/inhibition balance might be differently tuned in males and females subjected to PI condition (Chow, Chen, Wu, Chang, & Huang, 2016). However, no information is available on the impact of PI on STP expressed by GABAergic connections nor possible male/female differences in STP under conditions of PI. The objective of the present study was therefore to determine the impact of PI on the frequency-selective GABAergic connections expected to contribute to the balance between inhibition and disinhibition in the DH and to examine whether these impacts differed in a sex-dependent manner.

We assessed the impact of PI induced by carrageenan on the frequency-selective GABAergic connections recently described in the lamina II (LII) of the DH (Cathenaut et al., 2022) using mice expressing enhanced green fluorescent protein (eGFP) under the control of the GAD65 promoter (Cui et al., 2011). To this end, we applied trains of stimulations at low or high frequency to a presynaptic GABAergic neuron connected with eGFP- and eGFP+ neurons and examined the impact these protocols during trains.

In control mice expressing eGFP under the control of the GAD65 promoter, we demonstrated that LII GABAergic connections onto eGFP- neurons displayed similar STP in neurons from males and females at both low (5 Hz) and high (50 Hz) frequencies. Interestingly, GABAergic connections onto eGFP+ neurons from males and females had similar STPs at high frequency but depressed more at low frequency in females at proestrus, estrus, metestrus (PEM) phases of the estrous cycle only, at phases during which significantly lower thresholds for mechanical sensitivity were recorded.

Whereas in control conditions males and females at the PEM phase of their estrous cycle exhibited distinct thresholds for mechanical sensitivity, these thresholds were similar in a model of PI. Contrasting with this lack of male/female difference in mechanical thresholds, our data indicated that STP of GABAergic connections was modified by PI in a sex and estrous cycle dependent manner. In connections onto eGFP- neurons, PI increased eIPSCs amplitudes and summation at high frequency in males only, whereas it reduced depression at low frequency in females only at PEM phases of the estrous cycle. In connections onto eGFP+ neurons, PI strongly increased amplitudes and summation at high frequency and reduced depression at low frequency in both males and females. Dynamic clamp experiments with models of excitatory and inhibitory inputs suggested that the changes in STP observed in PI conditions can have major impacts in the excitation/inhibition balance at low frequency of activity, and only limited impacts for high frequency activity.

Our results indicate that plasticities at LII GABAergic connections onto eGFP- and eGFP+ neurons differed weakly between males and females in control conditions, but were strongly modified in sex and estrous cycle dependent manners in conditions of peripheral inflammation. In conditions of PI, eIPSCs recorded from females were facilitated during low frequency stimulation, whereas eIPSCs recorded from males were facilitated during high frequency stimulation except at connections onto eGFP+ neurons which also facilitated during trains at low frequency. These changes in short term plasticity during PI shifted the balance between inhibition and disinhibition towards more disinhibition as it would be expected for a gain control mechanism.

## **2. Methods**

### **Animals**

For most experiments, we used heterozygous C57BL/6 BAC transgenic mice eGFP under the control of the GAD65 promoter obtained from Ferenc Erdelyi and Gabor Szabo (Institute of Experimental Medicine, Budapest) (Cui et al., 2011). In these mice, ~80% of LII eGFP+ neurons are GABA-immunopositive and ~60% of GABA-immunopositive neurons are eGFP+ (Cui et al., 2011). These mice were interbred at the local animal facility, the Chronobiotron (agreement number: E6721838). For some behavioral experiments, we used C57BL/6 mice purchased from Charles River Laboratory (Ecully, France). All mice used were 6 to 12 weeks old. The animals were housed at room temperature (22–25°C) with a 12 h light/dark cycle with free access to food and water. All procedures used were in accordance with laws for laboratory animal welfare and approved by the local ethical committee of the University of Strasbourg (CREMEAS; agreement number: APAFIS#8138-2016121008385362 v3 and APAFIS #40247-2023010721563735 v5).

### **Model of peripheral inflammation: carrageenan-induced paw inflammation**

A bilateral injection (10 µl) of  $\lambda$ -carrageenan (3% in NaCl 0.9%, Sigma) was performed in the plantar surface of the hind paws 24h prior to the slicing procedure. Carrageenan injections were performed under light isoflurane anesthesia (3%).

### **Determination of the phase of estrous cycle by vaginal cytology**

Vaginal smears of female mice were always realized after behavioral testing. Briefly, vaginal lavages were made with saline solution (NaCl 0.9%) and cells in the samples were stained with 0.1% crystal violet. The cytology of the wet smears was checked under a light microscope to determine the percentage of nucleated cells, non-nucleated cornified cells, or small round leukocytes, as previously described (McLean, Valenzuela, Fai, & Bennett, 2012). Proestrus smears contained only nucleated and cornified cells, estrous smears contained exclusively cornified cells, metestrus smears contained large numbers of leukocytes in clumps or dispersed in smeary mucous with nucleated epithelial cells and some cornified cells, whereas during diestrus, although leukocytes were the predominant type of cells, they were less abundant in the smears than during metestrus and they were accompanied by few epithelial nucleated and cornified cells.

### **Behavioral assessment**

A series of behavioral experiments were conducted on mice in order to evaluate nociceptive behavior. All behavioral tests were done between 11:00 AM and 3:00 PM. Animals were transferred to the experimental room 30 min before each experimental test.

#### **Von Frey test**

The mechanical threshold of hind paw withdrawal was evaluated using von Frey hairs (Aniphy Vivo-Tech, Salon-de-Provence, France). Mice were placed in clear Plexiglas® boxes (7 x 9 x 7 cm) on an elevated mesh screen. After a habituation time of around 10 minutes the filaments were applied to the plantar surface of each hind paw in a series of ascending forces (0.16 to 4 grams). Each filament was applied five times per paw, being applied until it just bent, and the threshold was defined as three or more withdrawals observed out of the 5 trials. The mean of sensitivity of the two hind paws was calculated (Barrot, 2012).

#### **Hot plate test**

The latency for hindpaw withdrawal in response to hot thermal stimulation was determined using hot plate (Ugo Basile, Gemonio, Italy). Mice were habituated on the plate at room temperature one day before the test. Mice were placed on the plate at 48 °C. The latency to first hindlimb reaction and to jump as well as the coping reactions (flicking, licking and jumping) were recorded (Barrot, 2012). The experimental cut-off to prevent damage to the skin was set at 25 s.

### **Slicing procedure**

Adult transgenic mice were anaesthetized with urethane (1.9 g.kg<sup>-1</sup>). Under deep anesthesia, intracardiac perfusion was performed with oxygenated ice-cold (~4°C) sucrose artificial cerebrospinal fluid (sACSF) bubbled with carbogen (95% O<sub>2</sub>, 5% CO<sub>2</sub>) containing (in mM): 248 sucrose, 26 NaHCO<sub>3</sub>, 11 glucose, 2 KCl, 2 CaCl<sub>2</sub>, 1.3 MgSO<sub>4</sub>, 1.25 KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 2.5 kynurenic acid. The lumbar part (L3-L5) of the spinal cord was removed by laminectomy and 400 µm thick transverse slices were cut with a vibrating microtome (Leica, VT1200S). Slices were kept until recording at room temperature (~25°C) in oxygenated ACSF containing in mM: 126 NaCl, 2.5 KCl, 2 CaCl<sub>2</sub>, 2 MgCl<sub>2</sub>, 26 NaHCO<sub>3</sub>, 1.25 NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 10 glucose.

## **Patch-clamp recordings**

After recovery (~1 h), slices were transferred to the recording chamber, maintained at  $32 \pm 1^\circ\text{C}$  and continuously perfused by oxygenated ACSF at 3–4 ml/min. In order to isolate GABAergic IPSCs, glycinergic and glutamatergic ionotropic transmissions were blocked by adding in ACSF  $1 \mu\text{M}$  strychnine and  $10 \mu\text{M}$  6-cyano-7-nitroquinoxaline-2,3-dione (CNQX) respectively. Whole-cell patch recordings were made from inhibitory (eGFP+) and putative excitatory (eGFP-) LII neurons. Recording and extracellular stimulation electrodes ( $4\text{--}7 \text{ M}\Omega$ ) were pulled from borosilicate glass capillaries (1.2 mm inner diameter, 1.69 mm outer diameter, Warner Instruments, Harvard Apparatus) using a P1000 electrode puller (Sutter Instruments). Recording electrodes were filled with, in mM: 140 KCl, 2 MgCl, 10 HEPES, 2 MgATP; pH 7.3. Junction potentials were not corrected. Whole-cell patch clamp recordings (in current-clamp and voltage-clamp recording modes) were made using a Multiclamp 700A amplifier (Molecular Devices). Signals were low-pass filtered at 5 kHz, sampled at 20 kHz, digitized using a BNC-2110 data acquisition card (National Instruments) and acquired with the Strathclyde electrophysiology software (WinWCP, John Dempster, University of Strathclyde, Glasgow, UK).

This work is based on recordings from 466 neurons (248 from males, 218 from females). Among the 119 recordings from males under basal physiological conditions, 74 were used in a previous study (Cathenaut et al. 2022) and reanalyzed in the present work.

## **Experimental design**

Neurons were recorded in the voltage-clamp mode at a holding potential of  $-60 \text{ mV}$ . Monosynaptic IPSCs were evoked by local extracellular electrical stimulation. This stimulation was performed by applying current steps ( $0.25 \text{ ms}$ ;  $0.10\text{--}0.40 \text{ mA}$ ) via a patch-pipette filled with ACSF. This stimulation electrode was placed at a distance of  $20\text{--}150 \mu\text{m}$  from the cell body of the recorded neuron. For each recorded neuron, the lowest amplitude of stimulation evoking inhibitory postsynaptic currents was determined. This amplitude was increased by  $0.05 \text{ mA}$  to evoke inhibitory postsynaptic currents (eIPSCs) at every stimulation. Synaptic contacts were identified as monosynaptic unitary connections when the following criteria were satisfied: (1) all-or-none appearance of eIPSCs, (2) absence of increase in eIPSC amplitude when minimal stimulation amplitude was increased by  $0.05 \text{ mA}$ , (3) disappearance of eIPSCs when stimulation polarity was inverted, and (4) constant latency of the eIPSCs.

Trains applied at 5 Hz were repeated every 20 s whereas trains applied at 50 Hz were applied every 60 s.

### **Data quantification and analysis**

eIPSCs were analyzed offline using Clampfit 10. Synaptic inhibitory transmission was quantified by measuring the amplitude of individual eIPSCs. The amplitude immediately before stimulation was subtracted from the peak amplitude of each eIPSC to take into account baseline changes due to eIPSCs summation. In addition, for stimulations at 50 Hz the amplitude immediately before the train was subtracted from the peak of all eIPSCs to account for their summation.

Unless otherwise stated, stimulation protocols were applied ten times in each neuron and the within-cell average across trials was calculated by averaging eIPSCs amplitudes from these ten repetitions. Amplitudes of eIPSCs of the same rank in the train were averaged. These within-cell average across ten trials were used for statistical analysis. Results are expressed as mean  $\pm$  SEM.

### **Dynamic-clamp experiments with models of excitatory and inhibitory inputs**

To assess the inhibitory effects of different STPs at GABAergic synapses, we examined their impact on the spiking of the postsynaptic neuron they involved. To this end, we simulated trains of excitatory postsynaptic potentials (EPSPs) by injection at 5 Hz or 50 Hz average EPSC traces previously evoked in lamina II neurons by electrical stimulation of the dorsal root (Cathenaut et al., 2022). To take into account the depression of these eEPSCs amplitudes during trains of stimulations, we used the data from Wan et al. (2006) showing a decrease in amplitude of 35%, 43% and 52% for the 1st, 2nd and subsequent synaptic currents in a 5 Hz train, respectively. As the decrease in eEPSCs amplitudes seems proportional to the stimulation frequency, an extrapolation was performed for stimulations at 50 Hz, with a decrease in amplitudes of 58%, 76% and 86% for the 1st, 2nd and subsequent eEPSCs, respectively. Since lamina II neurons are subjected to a convergence of excitatory connections from primary afferents, the eEPSCs injected were up scaled four or ten times (EPSPx4 and EPSPx10, respectively (Grudt & Perl, 2002; Lu & Perl, 2003)). These trains of eEPSCs were injected alone or superimposed with average outward eIPSCs from the recordings described in the previous section. For 5 Hz protocols in control condition, average eIPSCs were calculated after pooling data from control males and females since these only displayed weak differences. For 5 Hz protocols in PI conditions, we used data from PI males, and separated data obtained from neurons recorded from PI females in FE2-dominated phases from those recorded from PI females in FP4-dominated phases. For protocols at 50 Hz, we only used three categories of eIPSCs: male and female control, PI females, PI males. All these simulated eEPSPs and eIPSPs were injected in control animals, and data from eGFP- and eGFP+ neurons were injected in the corresponding type of neuron.

In addition, the amplitudes of the eIPSCs were reduced by 70.3% to simulate a physiological driving force based on  $E_{GABA}$  measured in LII neurons (Ferrini et al., 2020). To simulate a feed forward inhibition, superimposition of eEPSCs and sIPSCs was performed with a lag of 2.3 ms, corresponding to the average synaptic delay in lamina II described in Lu & Perl, 2003.

The membrane potential was maintained between -55 and -60 mV, corresponding to the membrane potential recorded by (Grudt & Perl, 2002), in the presence of bicuculline (10  $\mu$ m) to block any spontaneous GABAergic activity. For these recordings, we excluded neurons not displaying either a tonic or an initial bursting action potential discharge profile, since these discharge profiles were the most frequent in our recording conditions (Cathenaut et al., 2022). A total of 47 neurons were recorded, including 22 from male and 25 from female mice, without differences in electrophysiological characteristics (data not shown). These neurons were pooled, in order to compare eGFP- (22 neurons) and eGFP+ (25 neurons) neurons.

### **Statistics**

Data were analyzed with GraphPad Prism, version 8.0.2 for Windows (GraphPad Software, Boston, Massachusetts USA, [www.graphpad.com](http://www.graphpad.com)). Statistical analysis of electrophysiological data were performed using averaged eIPSCs amplitudes (i.e. within-cell average across trials) of each neuron. These were calculated for each neuron by averaging amplitudes of eIPSCs of the same rank (11 ranks for trains of 11 stimulations).

Non-linear regression analysis (Motulsky & Christopoulos, 2003) was used to analyze changes in eIPSCs amplitudes during stimulation train protocols. Individual data of all neurons were always used for curve fitting and average values were used for illustration. This analysis was performed using averaged eIPSCs amplitudes of each neurons see (Cathenaut et al., 2021). Amplitudes of eIPSCs as a function of their respective rank in the train were fitted using the equation 2.

$$\text{Equation 2. } Y=A1+A2^{*}(1-EXP(-X/A3))$$

where A1 corresponded to Y value of the 1<sup>st</sup> eIPSCs of the train, A2 corresponded to the change in amplitude for the curve asymptote, A3 corresponded to the constant of the exponential function.

A1 and A2 are in pA for fits of raw eIPSCs amplitudes and are dimensionless for fits of normalized eIPSCs amplitudes. A3 unit is the rank of stimulation in the train.

To define whether STP was expressed during trains of stimulations, i.e. whether significant changes in amplitude occurred during the train, fits with Equation 2 were compared with linear fits with slope values forced to 0. When fits with Equation 2 provided statistically significant improvements with respect to the linear fit with slope value forced to 0, the connections were considered as displaying a significant STP during the corresponding protocol (Motulsky & Christopoulos, 2003).

To compare two different conditions (e.g. eGFP- vs. eGFP+, or 5 Hz vs. 50 Hz, or control conditions vs. conditions of PI, or male vs. female) data from each conditions were fitted with Equation 2, either individually (sum of two functions) or pooled (one single function).

The fits were performed with all parameters set as free, as well as with all possible combinations of A1, A2 and A3 parameters shared between the two conditions. When the sum of two individual fits provided statistically significant improvements with respect to the fit of pooled data, the two conditions were considered as having distinct effects (Motulsky & Christopoulos, 2003). Fits of pooled data are illustrated when the two conditions were not different whereas individual fits are illustrated when the two conditions were significantly different. For illustration purpose, these fits are illustrated together with the averages of "cross-trial averages".

In the result section, p-value of model comparisons are given as well as the corresponding number of neurons (n). The significance level used for all analysis was set at 0.05. The goodness-of-fit was also compared by calculating for Akaike Information Criterion (AIC), and the corresponding sample-size bias-corrected values (AICc) (Spiess & Neumeyer, 2010). A model was considered as better if model comparison p-value was < 0.05 and if the model provided a reduction in AICc. In most cases, the p-value and changes in AICc were consistent. In the few cases where the p-value and changes in AICc were not consistent, the inconsistency was mentioned and data were considered as not significantly different. Details of all models (A1, A2, A3, parameters shared between conditions for the best model, degree of freedom, Residual sum of squares, AICc) as well as details of model comparison (F, P, differences in AICc) are given in Supplementary Tables 3-5, 7-9 and 11-12.

Thresholds of mechanical and thermal sensitivity were analyzed using a 3 or a 2 factor ANOVA. Pairwise comparisons with Sidak's multiple comparisons test followed ANOVAs when ANOVA achieved statistical significance in one factor. Impacts of estrous cycle on the thresholds were analyzed with Wilcoxon test when data were paired or Mann-Whitney test when data were not paired.

### **Consolidation of dataset**

To improve the statistical power for the analysis of data from females, we first consolidated our eIPSCs amplitudes dataset made of the four phases of the estrous cycle in the two most supported partition categories. To this end, we tested all the combinations of data fusion from proestrus, estrus, metestrus and diestrus to compare only the two most supported groupings.

The best partition was determined as the one resulting in the lowest AICc.

### 3. Results

#### 3.1. Effects of PI on mechanical and thermal sensitivity in male and female mice.

We assessed the mechanical and thermal sensitivity of male and female GAD-65 mice before and 24 hours after induction of PI. These measures indicated a significant effect of sex, PI and their interaction for the mechanical sensitivity ( $df = 1$ ,  $F_{(1,11)} = 8.12$ ,  $P_{\text{sex}} = 0.0158$ ;  $df = 1$ ,  $F_{(1,11)} = 153.3$ ,  $P_{\text{PI}} < 0,0001$ ;  $df = 1$ ,  $F_{(1,11)} = 58.63$ ,  $P_{\text{sex}\cdot\text{PI}} < 0,0001$ , 6 males, 7 females, Repeated measures two-way ANOVA, Figure 1A) and a significant effect of PI but not of sex for thermal sensitivity ( $df = 1$ ,  $F_{(1,11)} = 0.0002$ ,  $P_{\text{sex}} = 0.9878$ ;  $df = 1$ ,  $F_{(1,11)} = 107.5$ ,  $P_{\text{PI}} < 0,0001$ ;  $df = 1$ ,  $F_{(1,11)} = 1.196$ ,  $P_{\text{sex}\cdot\text{PI}} = 0.2974$ , 6 males, 7 females, Repeated measures two-way ANOVA, Figure 1B).

The mechanical threshold in basal physiological conditions (i.e. before induction of peripheral inflammation) was significantly different when measured in males and females. The threshold were of  $2.89\pm 0.11$  g in males and  $1.80\pm 0.14$  g in females (post-hoc Sidak test,  $P < 0,0001$ ). Twenty-four hours after induction of PI, these thresholds reached a similar value of  $1.32\pm 0.10$  g in males and  $1.43\pm 0.16$  g in females (post-hoc Sidak test,  $P = 0.8063$ ), corresponding to a significant decrease with respect to basal thresholds for both sexes (post-hoc Sidak test,  $P_{\text{males}} < 0,0001$ ;  $P_{\text{females}} = 0.0103$ ).

The basal mechanical thresholds and male/female differences measured in GAD-65 mice were similar to those measured in C57BL/6 mice ( $df = 1$ ,  $F_{(1,29)} = 4.156$ ,  $P_{\text{strain}} = 0.0507$ , 16 males, 17 females, Three-way ANOVA, Figure S1A), confirming that male/female differences were not restricted to the GAD-65 mice strain. These data indicated that female mice of the tested strains displayed a lower mechanical threshold with respect to males in control conditions, and that these thresholds were reduced to similar values in males and females 24 h after induction of PI.

#### 3.2. Effects of PI on short-term synaptic plasticity at GABAergic connections in lamina II

We examined the short-term synaptic plasticity expressed by GABAergic connections during their repeated stimulation in control condition, corresponding to basal physiological condition, and 24 h after induction of PI. For these experiments, 207 neurons were recorded in control conditions, 97 from males (49 eGFP- and 48 eGFP+) and 110 from females (60 eGFP- and 50 eGFP+); and 212 neurons were recorded after induction of PI, 129 from males (67 eGFP- and 62 eGFP+) and 83 from females (40 eGFP- and 43 eGFP+). On average, 2 to 3 neurons were recorded per mouse (2.3). In these neurons, we applied trains of 11 stimulations at 5 Hz or 50 Hz. These trains were repeated 10 times at intervals of 20 s for stimulations at 5 Hz and at intervals of 60 s for stimulations at 50 Hz. For each neuron, amplitudes of eIPSCs of the same rank in all 10 trains were averaged. During 50 Hz trains, the eIPSCs had not fully returned to baseline at the onset of the following stimulation, resulting in their summation (Figure 2A). Therefore, for stimulations at 50 Hz, we measured the summated eIPSC amplitude from the basal holding current of each train.

### 3.2.1. Effects of PI on short-term plasticity at connections on eGFP- neurons

#### Effects in neurons from males

In control conditions, the average amplitude of the first eIPSCs of the train was not significantly different for stimulations at 5 and 50 Hz ( $-59.86 \pm 4.70$  pA at 5 Hz,  $-56.48 \pm 9.15$  pA at 50 Hz, Mann-Whitney test,  $P = 0.4183$ ). During stimulations at 5 Hz, amplitudes of eIPSCs did not differ between control and PI conditions ( $P_{\text{control vs PI}} = 0.0934$ , inconsistency between AICc and P-value, Table 3, Figure 2B). Taken individually, amplitudes of eIPSCs did not significantly decrease in control condition, whereas there was a decrease in PI condition ( $P_{\text{control}} = 0.0842$ ,  $P_{\text{PI}} = 0.0005$ ).

Contrasting with these data, the summated eIPSCs amplitudes significantly increased during the train ( $P_{\text{control}} < 0.0001$ ,  $P_{\text{PI}} < 0.0001$ ) and reached 98.6% or 98.7% of the asymptotic value at the end of the 50 Hz train, in control or in PI condition, respectively. This suggests that only limited further summation was possible with longer lasting trains.

Interestingly, in condition of PI, the initial amplitude and the asymptotic value of the summated eIPSCs were significantly larger than in control condition, corresponding to an initial increase of 30.6%, but the evolution of the amplitudes vs time were similar ( $P_{\text{control vs PI}} = 0.0012$ ; Table 3, Figure 2B). This increase in summated amplitude occurred during the first stimulations of the trains at 50 Hz (Figure S2A).

This indicated that in eGFP- neurons recorded from males, PI had no effect on eIPSCs at 5 Hz but significantly increased summated eIPSCs at 50 Hz.

#### Effects in neurons from females

In control conditions, the average amplitude of the first eIPSCs of the train was not significantly different for stimulations at 5 and 50 Hz ( $-63.78 \pm 3.92$  pA at 5 Hz,  $-65.49 \pm 5.80$  pA at 50 Hz, Mann-Whitney test,  $P = 0.7123$ ). During stimulations at 5 Hz, amplitudes of eIPSCs decreased significantly in both conditions, indicating that short-term plasticity was expressed during the 5 Hz train ( $P_{\text{control}} = 0.0066$ ,  $P_{\text{PI}} = 0.0268$ ). Moreover, the evolution of eIPSCs during 5 Hz trains was different in condition of PI with respect to control conditions ( $P = 0.0012$ , Table 3, Figure 2C), these amplitudes reaching larger values at the end of the train (asymptotic values). By contrast, the summated eIPSCs amplitudes remained similar in control and PI conditions, with the same significant increase during the train, reaching 98.0% of the asymptotic value at the end of the 50 Hz train ( $P_{\text{control vs PI}} = 0.7312$ , Table 3, Figure 2C), suggesting that only limited further summation was possible with longer lasting trains.

This indicated that in eGFP- neurons recorded from females, PI induced an increase the GABAergic transmission and its short-term plasticity at 5 Hz, but revealed no significant effect during trains at 50 Hz.

### **3.2.2. Effects of PI on short-term plasticity at connection on eGFP+ neurons**

#### **Effects in neurons from males**

The evolution of eIPSCs during 5 Hz trains was different in condition of PI with respect to control conditions ( $P < 0.0001$ , Table 3, Figure 2D), with larger average amplitude of the first eIPSCs and asymptotic value. This increase in amplitude by 17% occurred during the first stimulations of the first out of the ten trains applied at 5 Hz.

For both control and PI conditions, the summated eIPSCs amplitudes significantly increased during the train, reaching and 99.7% or 99.7% of the asymptotic value at the end of the 50 Hz train for both conditions, suggesting that maximal summation was reached with a few eIPSCs. Interestingly, in condition of PI, the initial amplitude and the asymptotic value of the summated eIPSCs were significantly larger than in control condition, corresponding to an increase by 34.5%, but the evolution of the amplitudes were similar ( $P < 0.0001$ ; Table 3, Figure 2D). This increase in summated amplitude occurred during the first stimulations of the first out of the ten trains applied at 50 Hz (Figure S2B).

This indicated that in eGFP+ neurons recorded from males, PI strongly increased the average amplitudes of eIPSCs during trains at 5 Hz and significantly increased summated eIPSCs at 50 Hz. Interestingly, the difference of eIPSCs amplitudes between connections onto eGFP- and eGFP+ neurons was significantly smaller in conditions of PI with respect to the control condition, indicating a change in the balance between these two types of inhibitory connection toward inhibition of eGFP+ neurons at 5 and 50 Hz ( $P_{5\text{ Hz}} < 0.0001$ ,  $P_{50\text{ Hz}} < 0.0001$ ; Table 3, Figure 2F).

#### **Effects in neurons from females**

The evolution of eIPSCs during 5 Hz trains was different in condition of PI with respect to control conditions ( $P < 0.0001$ , Table 3, Figure 2E), with larger average amplitude of the first eIPSCs and asymptotic value. This increase in amplitude occurred during the first stimulations of the first out of the ten trains applied at 5 Hz.

The evolution of the summated eIPSCs amplitudes during 50 Hz trains remained similar in control and PI conditions, with the same moderate significant increase during the train, reaching 99.1% of the asymptotic value at the end of the 50 Hz train ( $P_{\text{control vs PI}} = 0.4641$ ; Table 3, Figure 2E), suggesting that maximal summation was reached with a few eIPSCs.

This indicated that in eGFP+ neurons recorded from females, PI induced a modification of the GABAergic transmission and its short-term plasticity at 5 Hz, but revealed no significant effect during trains at 50 Hz.

Interestingly, the difference of eIPSCs amplitudes between connections onto eGFP<sup>-</sup> and eGFP<sup>+</sup> neurons was significantly smaller in conditions of PI with respect to the control condition, indicating a change in the balance between these two types of inhibitory connection toward inhibition of eGFP<sup>+</sup> neurons ( $P_{5\text{ Hz}} = 0.0005$ ,  $P_{50\text{ Hz}} = 0.0319$ ; Table 3, Figure 2G).

### **3.2.3. Male/female differences on GABAergic connections on eGFP<sup>-</sup> and eGFP<sup>+</sup> neurons in control and PI conditions.**

#### **GABAergic connections on eGFP<sup>-</sup> neurons**

In control conditions, our experiments revealed no male/female differences in the transmission and short-term plasticity of GABAergic connections on eGFP<sup>-</sup> neurons ( $P_{5\text{ Hz}} = 0.4860$ ,  $P_{50\text{ Hz summed}} = 0.4024$ , Table 4, Figure S3A).

By contrast, the evolution of average eIPSCs amplitudes in eGFP<sup>-</sup> neurons during 5 Hz trains remained unchanged by PI when recorded from males whereas it was significantly different when recorded from females (see Figure 2B-C). The asymptotic value of eIPSCs amplitudes was significantly larger when recorded in females in condition of PI ( $P = 0.0273$ , Table 4, Figure S3B).

The evolution of summated eIPSCs amplitudes in eGFP<sup>-</sup> neurons during 50 Hz trains remained unchanged by PI when recorded from females, whereas it was significantly different when recorded from males (see Figure 2B-C). The asymptotic value of the summated eIPSCs amplitudes was significantly larger when recorded in males in condition of PI ( $P = 0.0160$ , Table 4, Figure S3B).

These data indicate that PI changed the short-term plasticity at GABAergic connections on eGFP<sup>-</sup> neurons in a sex and frequency specific manner, with an increased inhibition at low frequency for females and an increased inhibition at high frequency for males.

#### **GABAergic connections on eGFP<sup>+</sup> neurons**

In control conditions, eIPSCs evoked in eGFP<sup>+</sup> neurons at 5 Hz had a similar initial amplitude and decreased with the same time constant during the train, but reached significantly larger asymptotic values in neurons recorded from males with respect to those recorded from females ( $P_{\text{asymptote}} = 0.0186$ , Table 4, Figure S3C). This weak difference corresponded to 3.3 pA at the end of the train. By contrast, our experiments revealed no male/female difference in the short-term plasticity of GABAergic connections on eGFP<sup>+</sup> neurons during 50 Hz trains ( $P_{50\text{ Hz summed}} = 0.1976$ , Table 4, Figure S3C).

The effect of PI on average eIPSCs amplitudes in eGFP+ neurons during 5 Hz trains was similar when neurons were recorded from males or females ( $P_{5\text{HzPI}} = 0.7450$ , Table 4, Figure S3D). By contrast, during trains at 50 Hz in condition of PI, the summated eIPSCs initial amplitudes and asymptotic values only changed in males, and were different in males and females ( $P_{\text{PI}} = 0.0034$ , Table 4, Figure S3D).

These data indicate that PI changed the short-term plasticity at GABAergic connections in a sex and frequency specific manner, with an increased inhibition at low frequency for both males and females and an increased inhibition at high frequency for males only.

### **3.2.4. Differences in amplitudes and evolution of eIPSCs during trains of stimulation in eGFP- and eGFP+ neurons**

#### **Differences in control conditions**

Initial eIPSCs amplitudes and asymptotic values during 5 Hz trains in control conditions were significantly different in eGFP- or eGFP+ neurons. In addition, the evolution of amplitudes of eIPSCs during 5 Hz trains was also significantly different in eGFP- or eGFP+ neurons, but only in females ( $P_{\sigma_{\text{eGFP-}} \text{ vs } \sigma_{\text{eGFP+}}} < 0.0001$ ,  $P_{\varphi_{\text{eGFP-}} \text{ vs } \varphi_{\text{eGFP+}}} < 0.0001$ , Table 5, Figure S4A-C). The initial amplitude was of  $-63.8 \pm 3.9$  pA in eGFP- neurons and  $-47.7 \pm 2.8$  pA in eGFP+ neurons in females, whereas it was of  $-59.9 \pm 4.7$  in eGFP- neurons and  $-52.8 \pm 4.4$  pA in eGFP+ neurons in males. This difference was not resolved in our previous work on males with lower number of recorded neurons (Cathenaut et al., 2022).

Initial summated eIPSCs amplitudes and the time constant of their increase during trains at 50 Hz in conditions of PI were not significantly different in eGFP- or eGFP+ neurons, but the asymptotic value was significantly larger in eGFP- neurons with respect to eGFP+ neurons, corresponding respectively to  $-141.3 \pm 15.9$  pA and  $-113.1 \pm 12.6$  pA at the end of the train in males, and to  $-149.7 \pm 24.1$  pA and  $-121.6 \pm 18.7$  pA in females ( $P_{\sigma_{\text{eGFP-}} \text{ vs } \sigma_{\text{eGFP+}}} < 0.0001$ ,  $P_{\varphi_{\text{eGFP-}} \text{ vs } \varphi_{\text{eGFP+}}} = 0.0095$ , Table 5, Figure S4A-C).

As previously described (Cathenaut et al., 2022), these data confirmed that GABAergic connections onto eGFP- and eGFP+ neurons displayed different characteristics of short-term plasticity under low and high frequency activity, and these differences were similar in neurons recorded from males or females.

### **Differences in conditions of PI**

Asymptotic values during 5 Hz trains in conditions of PI were significantly different when evoked in eGFP- and eGFP+ neurons in both males and females ( $P_{\sigma} < 0.0001$ ,  $P_{\varphi} < 0.0001$ ; Tables 5; Figure S4B-D). In recordings from males, the asymptote were  $-50.8 \pm 3.7$  pA in eGFP- neurons and  $-39.3 \pm 2.63$  pA in eGFP+ neurons. In recordings from females, the asymptotes were of  $-56.5 \pm 4.2$  pA in eGFP- neurons, and of  $-36.4 \pm 2.7$  pA in eGFP+ neurons.

Similarly, in conditions of PI, the asymptotic values of summated eIPSCs amplitudes evoked during trains at 50 Hz were significantly different when evoked in eGFP- and eGFP+ neurons in both males and females ( $P_{\sigma} = 0.0204$ ,  $P_{\varphi} = 0.0177$ , Table 5, Figure S4B-D). The difference in asymptotic values obtained in eGFP- and eGFP+ neurons were of 16.8 pA for neurons recorded from males and 20.0 pA for neurons recorded from females. The evolution of the summated eIPSCs amplitudes had similar time constant in eGFP- and eGFP+ neurons recorded from males and females.

These data indicated that in control conditions, connections onto eGFP- and eGFP+ neurons displayed different characteristics of short-term plasticity at both low and high frequency of activity, and these differences were retained but with reduced amplitude difference in conditions of PI.

### **3.3. Simulation of the impact of inhibition using dynamic current-clamp**

To assess the inhibitory effects of different STPs at GABAergic synapses, we examined their impact on the spiking of the postsynaptic neuron they involved. To this end, we performed dynamic-clamp experiments simulating trains of excitatory postsynaptic potentials (EPSPs) in isolation or superimposed with trains of inhibitory postsynaptic potentials.

During trains of simulated EPSPs alone, the probability of EPSPx10 triggering an action potential was similar in eGFP- or eGFP+ neurons, and corresponded to 97.9% at the beginning of the train and decreased to 58.3% at the end of the train ( $P = 0.3820$ , Table 7, Figure 3A). By contrast, the probability of EPSPx4 triggering an action potential was significantly different in eGFP- and eGFP+ neurons, reaching respectively 1.5% and 26.1% at the end of the train whereas it started at the same initial value of 59.6% ( $P < 0.0001$ , Table 7, Figure 3B).

This indicated that in absence of inhibition, eGFP- and eGFP+ neurons display similar probability of spiking when multiple excitatory inputs are activated at low frequency in a synchronous manner but eGFP- neurons did not followed low frequency excitatory inputs when these involved a limited convergence/synchrony.

Simulation of control IPSPs together with these simulations of excitatory inputs at 5 Hz moderately but significantly reduced the probability of EPSPx10 triggering an action potential in eGFP+ neurons, but strongly inhibited the ability of eGFP- neurons to trigger action potentials which reached 19.3% at the end of the train ( $P_{\text{eGFP}^-} < 0.0001$ ,  $P_{\text{eGFP}^+} = 0.0074$ , Table 8, Figure 4A1-B1).

The ability of EPSPx10 to trigger action potentials in eGFP- neurons was also strongly inhibited when eIPSCs traces recorded in eGFP- neurons in conditions of PI from both males and females were used to simulate inhibition at 5 Hz ( $P_{\text{Males PI}} < 0.0001$ ,  $P_{\text{FE2 PI}} < 0.0001$ ,  $P_{\text{FP4 PI}} < 0.0001$ , Table 8, Figure 4A), but the impact of inhibition was stronger with eIPSCs recorded from females in FE2-dominated phases of the cycle ( $P_{\text{Control vs FE2}} = 0.0165$ , Table 8, data not shown).

The ability of EPSPx10 to trigger action potentials in eGFP+ neurons was differently impacted by the simulated inhibition from PI condition at 5 Hz, depending on the type of eIPSCs used. Despite larger eIPSCs amplitudes in males in PI conditions, injection of their traces had no inhibitory effect at 5 Hz, whereas injection of eIPSCs from females strongly reduced the probability of eGFP+ neurons to trigger action potentials ( $P_{\text{Males PI}} = 0.4491$ ,  $P_{\text{FE2 PI}} < 0.0001$ ,  $P_{\text{FP4 PI}} < 0.0001$ , Table 8, Figure 4B).

Interestingly, during simulations of synchronous EPSPx10 and IPSPs at 50 Hz, all conditions of inhibition tested produced the same effect on the number of action potentials triggered in eGFP- and eGFP+ neurons ( $df = 1$ ,  $F_{(1,96)} = 0.428$ ,  $P = 0.5145$ , Two-way ANOVA, Figure 4C).

These dynamic-clamp experiments indicated that the changes in STP observed in PI conditions had major impacts on the efficacy of inhibition, particularly at low frequency of activity in eGFP- neurons, and only limited impacts in eGFP+ neurons and for high frequency activity.

### **3.4. Effect of estrous cycle in the STP expressed at low frequency in control and PI conditions**

We next examined a possible link between the estrous cycle and the short-term plasticity expressed by GABAergic connections with lamina II neurons. To this end, we classified the recordings after the phase of the estrous cycle of the female mice used to prepare the acute slices.

This distribution of neurons recorded from females resulted in a reduced sample size in the four phase categories corresponding to proestrus ( $n_{\text{Control eGFP}^-} = 11$ ,  $n_{\text{Control eGFP}^+} = 5$ ,  $n_{\text{PI eGFP}^-} = 4$ ,  $n_{\text{PI eGFP}^+} = 6$ ), estrus ( $n_{\text{Control eGFP}^-} = 11$ ,  $n_{\text{Control eGFP}^+} = 12$ ,  $n_{\text{PI eGFP}^-} = 10$ ,  $n_{\text{PI eGFP}^+} = 11$ ), metestrus ( $n_{\text{Control eGFP}^-} = 8$ ,  $n_{\text{Control eGFP}^+} = 7$ ,  $n_{\text{PI eGFP}^-} = 10$ ,  $n_{\text{PI eGFP}^+} = 13$ ) and diestrus ( $n_{\text{Control eGFP}^-} = 18$ ,  $n_{\text{Control eGFP}^+} = 13$ ,  $n_{\text{PI eGFP}^-} = 14$ ,  $n_{\text{PI eGFP}^+} = 13$ ).

We therefore only analyzed data for stimulations at 5 Hz since some recordings were halted before applying stimulations at 50 Hz, leading to a poor sampling for this latter frequency.

To improve the statistical power of our analysis, we first consolidated our eIPSCs amplitudes dataset made of the four phases of the estrous cycle in the two most supported partition categories (see methods). The partition resulting in the better models corresponded to grouping of data from proestrus, estrus, metestrus (PEM) in one category and diestrus (D) alone in the second category, for both eGFP<sup>-</sup> and eGFP<sup>+</sup> neurons in control conditions (see Table 9). We next compared the evolution of eIPSCs amplitudes of the two categories of the partition (D vs. PEM). In control conditions, our data revealed no differences between D and PEM in GABAergic connections on eGFP<sup>-</sup> neurons ( $P_{\text{eGFP}^-} = 0.0847$ , inconsistency between AICc and P-value, Table 11, Figure 5A). By contrast, in control conditions, the evolution of eIPSCs amplitudes in D and PEM categories were significantly different when recorded in eGFP<sup>+</sup> neurons, with a significantly larger initial amplitude and asymptote for the D category ( $P < 0.0001$ , Table 11, Figure 5C). This indicated that the male/female difference observed in eGFP<sup>+</sup> neurons during 5 Hz trains was due to reduced amplitudes of eIPSCs in PEM categories ( $P_{\text{Males vs. PEM}} < 0.0001$ ,  $P_{\text{Males vs. D}} = 0.6477$ , Table 11, Figure 5C).

In conditions of PI, our data from eGFP<sup>-</sup> neurons revealed a different evolution of eIPSCs amplitudes between D and PEM categories, with a larger asymptotic value ( $P = 0.0022$ , Table 11, Figure 5B). This indicated that the male/female difference observed during 5 Hz trains was due to increased amplitudes of eIPSCs in PEM category ( $P_{\text{Males vs. PEM}} = 0.0006$ ,  $P_{\text{Males vs. D}} = 0.55$ , Table 11, Figure 5B). In eGFP<sup>+</sup> neurons, PI condition resulted in a significant difference in eIPSCs between D and PEM categories, with an increased amplitude of the first eIPSC and of the asymptotic value in PEM categories ( $P < 0.0001$ , Table 11, Figure 5D). Interestingly, the amplitudes of eIPSCs were only significantly increased in PEM category in condition of PI, with respect to those recorded in control condition (see Table 8, Figure S6). These data indicated that in PEM category, amplitudes of disinhibitory connections were reduced in control conditions, suggesting that the inhibition/disinhibition balance might have been in favor of inhibition during PEM. By contrast, in condition of PI, inhibition/disinhibition balance might have been in favor of disinhibition during PEM.

### **3.5. Effect of the estrous cycle in the mechanical sensitivity of females in control and PI conditions.**

Since our electrophysiological data suggested inhibition/disinhibition differences as a function of the D/PEM phases categories, we examined whether female mechanical and thermal sensitivity also differed according to these categories. For these analysis, we pooled data from GAD65 and C57BL/6 mice since these revealed no difference linked to the strain ( $df = 1$ ,  $F_{(1,29)} = 4.156$ ,  $P_{\text{strain}} = 0.0507$ , Three-way ANOVA, see Figure S1A). The mechanical sensitivity of females in the control condition was assessed for 10 days before PI induction, as was their cycle phase after each assessment. This allowed performing pairwise comparisons of the mechanical sensitivity as a function of the D/PEM phase categories for every female. These data revealed a significantly lower threshold for females in the PEM category with respect to the D category

( $P = 0.0059$ , Wilcoxon test, Figure 5E). In contrast, thermal sensitivity to heat did not significantly differ in GAD-65 mice ( $P = 0.4375$ , Wilcoxon test, Figure S6E).

Since the phase of the cycle was also assessed after induction of PI, we performed pairwise comparisons of mechanical sensitivity thresholds under PI, with the thresholds measured at the corresponding cycle phase category in control conditions. For both D and PEM phase categories, PI significantly reduced the mechanical thresholds ( $P_D = 0.0352$ ,  $P_{PEM} = 0.0156$ , Wilcoxon test, Figure 5G-H). Comparison of the mechanical sensitivity in PI conditions revealed no differences for both D and PEM phase categories, but this assessment that was performed only once per female 24 h after induction of PI, precluding paired analysis ( $P = 0.6012$ , Mann-Whitney test, Figure 5F).

These data may suggest that the decreased eIPSCs amplitudes in the disinhibitory connection in control conditions during PEM phases might represent a gain control mechanism limiting the excitatory/inhibitory imbalance toward excitation during these phases of the cycle. The similar mechanical thresholds in PI conditions at D and PEM phase categories suggests that opposing changes in eIPSC amplitudes in inhibitory and disinhibitory connections between D and PEM compensate for each other.

#### **4. Discussion**

The nociceptive messages conveyed to the DH by primary afferents incorporate information of stimuli intensity encrypted under the form of a frequency code. Evidence indicate that this information is decoded in the DH by synapses displaying frequency-selective properties owing to their STP properties (Cathenaut et al., 2023; Santos et al., 2009). Moreover, the tuning between inhibition and disinhibition can involve different STPs of inhibitory connections as a function of the excitatory/inhibitory nature of the postsynaptic neuron involved (Cathenaut et al., 2022).

In control mice expressing eGFP under the control of the GAD65 promoter, we demonstrated that LII GABAergic connections onto putative excitatory (eGFP-) neurons and onto putative inhibitory neurons (eGFP+) weakly differed under basal physiological control conditions. In a model of PI, we demonstrated that STP of GABAergic connections onto putative excitatory and putative inhibitory neurons were differently modulated, leading to a change in their relative contribution. This differential modulation during PI was different in males and females, and changes in females depended on the phase of the estrous cycle. Dynamic-clamp experiments with models of excitatory and inhibitory inputs suggested that the changes in STP observed in PI conditions can have major impacts in the excitation/inhibition balance at low frequency of activity, and more limited impacts for high frequency activity.

We used transgenic mice expressing eGFP under the control of the GAD65 promoter in which ~80% of LII eGFP+ neurons were shown to be GABA-immunopositive and ~60% of GABA-immunopositive neurons express eGFP (Cui et al., 2011). Therefore, eGFP+ neurons mainly represent GABAergic neurons, and eGFP- neurons excitatory neurons, although the correspondence is not perfect. In this discussion, we accordingly refer to these neurons as putative inhibitory and putative excitatory, respectively. Importantly, in laminae I-III from mice, the neurons expressing *c-fos* after peripheral treatment with capsaicin were shown to be mostly excitatory but a significant proportion were GAD-65 and not GAD-67 positive, indicating the selective recruitment of GAD-65 expressing inhibitory neurons in conditions of peripheral inflammation (Nowak et al., 2011).

#### **4.1. Thermal and mechanical sensitivity in male and female mice**

Our data revealed no significant difference in thermal sensitivity between males and females GAD65-eGFP, in both basal and PI conditions. Whereas some works also reported similar basal thermal heat sensitivity for males and females (Charron et al., 2024; Tsao, Wu, Su, Edwards, & Huang, 2023), others detected significantly lower basal thresholds for females, including in a recent publication compiling data from >4000 animals (Zumbusch, McEachern, Morgan, Nickner, & Mogil, 2024). Importantly, significant male/female difference in thermal sensitivity has usually been resolved using the plantar test and not the hot plate. Our data obtained with a hot plate temperature set at 48°C are consistent with experiments conducted in C57BL/6 mice with hot plate temperatures set at various temperatures ranging from 48° to 55°C where male/female differences were not detected (Charron et al., 2024). Our data indicated that female GAD65-eGFP mice displayed a lower mechanical threshold with respect to males in control conditions, and these thresholds reached a similar low level in males and females 24 h after induction of PI. We observed a similar male/female difference in basal conditions in C57BL/6 mice. This indicated that the male/female difference we observed was neither restricted to one batch of mice nor only to GAD65-eGFP mice. Although male/female differences in basal mechanical thresholds have been described in rats by applying calibrated pressure (Barrett, Smith, & Picker, 2002), the male/female difference we observed was only rarely reported in mice (Joshi, Williamson, Moosa, & Kapur, 2023; Tsao et al., 2023). The ability to resolve such difference seem to depend on many experimental parameters, including the gender of the experimenter among other (Zumbusch et al., 2024).

#### **4.2. Mechanical sensitivity in female mice as a function of estrous cycle**

Our data from females also revealed different basal mechanical sensitivity thresholds depending on the stage/phase of the estrous cycle, with weakly but significantly lower thresholds during phases PEM with respect to phase D displaying higher thresholds. Similar differences in basal mechanical sensitivity with higher thresholds in D with respect to E phase have been described in C57BL/6 mice as well as in rats (Joshi et al., 2023). Nevertheless, differences in sensitivity during estrous cycles seems to strongly depend on the species of rodent and the strain of mice (Meziane, Ouagazzal, Aubert, Wietrzych, & Krezel, 2007). Previous works conducted on C57BL/6 mice did not detect male/female differences and cycle phases differences in mechanical sensitivity, even when females underwent the daily procedure of vaginal lavage as did females in our experiments (Meziane et al., 2007; Zhao et al., 2021). This suggests that the daily vaginal lavage procedure is not linked to the detection of male/female and cycle phases differences in mechanical sensitivity. In addition, we detected no significant difference in female mechanical thresholds when comparing the first day of measurement (before any vaginal lavage) and subsequent days, indicating that the vaginal lavage procedure and the repetition of behavioral tests were not involved in the observed male/female difference (data not shown).

In our experiments, we detected a cycle-dependent difference in basal mechanical sensitivity by comparing the two classes of phases D and PEM. We used these two classes of phases that resulted from the most supported partition of our electrophysiological data in two groups based on phases of the estrous cycle. Our data would be consistent with a previous work suggesting an acute antinociceptive effect of circulating progesterone in basal physiological D phase and a slower and long lasting pronociceptive effect corresponding to a low level of progesterone in basal physiological E phase (Joshi et al., 2023). However, very different timing and duration of estrogens and progesterone peaks have been described in the literature (Nilsson et al., 2015; Wall et al., 2023). It is therefore difficult to speculate on the involvement of estrogens and progesterone in the differences we observed in the mechanical sensitivity of C57BL/6 and GAD65-eGFP mice as a function of their estrous cycle.

#### **4.3. Short-term plasticity at LII GABAergic connections in male and female mice and effect of estrous cycle in control conditions**

The STP expressed by LII GABAergic connections at both low and high frequency was similar in males and females except for connections onto putative inhibitory neurons at low frequency which depressed more in females than in males. At low frequency, connections with putative excitatory neurons showed very limited depression whereas connection with putative inhibitory neurons depressed. This depression was shifted to lower amplitudes in females during the PEM phase category of the cycle with respect to males.

Differences in the properties of primary afferents have been proposed to be involved in differences of sensitivity between males and females. For example, the resting membrane potential of female C-fibers was found to be closer to the action potential threshold than that of male C-fibers (Hendrich et al., 2012), and that the decrease in C-fiber conduction velocity during repeated stimulation is greater in females than in males (Dickie, McCormick, Lukito, Wilson, & Torsney, 2017). Interestingly, inhibitory neurons in the LII were shown to receive direct connections from inhibitory interneurons that would represent elements of disinhibitory networks recruited by A $\delta$  and C fibers but also by A $\beta$  fibers (Liu et al., 2021; Takazawa & MacDermott, 2010). Should inhibitory connections onto putative excitatory neurons and inhibitory connections onto putative inhibitory neurons have respectively an inhibitory and a disinhibitory action on the transmission of nociceptive information, the difference in STP they express would represent a gain control mechanism tuning the balance between inhibition and disinhibition. Under balanced, i.e. basal physiological conditions, trains of activity revealed a progressing difference between eIPSCs amplitudes at inhibitory and disinhibitory connections, amplitudes at the former connection becoming larger with respect to the latter.

The depression shifted to lower amplitudes at disinhibitory connections in females in PEM phase category would then be consistent with a gain control mechanism rebalancing partially an increase in sensitivity induced by other processes, such as the sex or estrous phase dependent increase in primary afferent excitability.

#### **4.4. Sex dependent changes in synaptic inhibition and short-term plasticity under conditions of PI**

Our results indicated that in conditions of PI, average amplitudes of eIPSCs during repeated trains of activity were increased with respect to eIPSCs of the same rank in trains of stimulation recorded from control animals. Interestingly, the stimulation frequency at which the increase took place depended on the sex and the putative inhibitory/excitatory nature of the postsynaptic neuron contacted. In males, at high frequency, the amplitude increased for both type of connection whereas it only increased for connections onto putative inhibitory neurons at low frequency. In females, PI had no effect on amplitudes at high frequency, but increased amplitudes at low frequency for both type of connection.

Importantly, lamina II neurons are under the control of primary afferents that respond to adequate stimuli with a burst of action potentials adapting more or less rapidly. The frequency of the initial burst correlated with the intensity of stimulation for both A $\delta$  and C fibers, as did the frequency of the late, adapting phase for C but not A $\delta$  fibers (Adrian, 1920; Adrian & Zotterman, 1926; Campero et al., 1996; Handwerker, Anton, & Reeh, 1987; Torebjork & Hallin, 1974). Interestingly, our simulation experiments suggested a particularly strong impact of inhibition at low frequency of activity, which would correspond either to the activity at

low intensity of sensory stimulation, or to the activity during the late adapting phase of primary afferent. The low frequency of activity may also correspond to the low frequency afferent barrage occurring in conditions of PI (Ikeda et al., 2006; Yang et al., 2014).

Peripheral inflammation has been shown to have a major impact on primary afferent fibers, changing their excitability through alteration of sodium, calcium and potassium currents (Basbaum, Bautista, Scherrer, & Julius, 2009; Biet, Dansereau, Sarret, & Dumaine, 2021; Picard et al., 2023; Pitcher & Henry, 2002), leading to a low frequency afferent barrage (Ikeda et al., 2006; Yang et al., 2014), converting silent connections from C fibers into functional ones (Torsney, 2011), reducing the activity-dependent slowing of C fibers conduction velocity to a similar value in males and females (Dickie et al., 2017) and increasing GABA mediated depolarization (Zhu, Lu, & Gold, 2012). Owing to these changes, C and A $\delta$  primary afferent inputs to neurons of superficial laminae of the dorsal horn are therefore expected to increase in the conditions of PI. We have not examined the impact of such changes in our work that focused on DH neurons. In addition to these effects of PI on primary afferents, changes in the dorsal horn reveal indirect inputs from A $\beta$  fibers in lamina I-II neurons (Basbaum et al., 2009; Peirs et al., 2021; Takazawa & MacDermott, 2010). Adding to these changes in the characteristics of inputs from primary afferents, PI induces changes within dorsal horn networks. These changes have been examined on spontaneous synaptic currents recorded in DH neurons. These indicated that frequency and/or amplitude of spontaneous inhibitory synaptic currents decreased when recorded in putative excitatory neurons in conditions of PI (Kopach, Krotov, Belan, & Voitenko, 2015; Takazawa et al., 2017) whereas these increased for connections onto putative inhibitory neurons (Kopach et al., 2015). Since opposite results have been obtained for excitatory synaptic transmission, these changes were interpreted as an excitation/inhibition imbalance in LII under conditions of PI (Kopach et al., 2015). These data were based on spontaneous synaptic currents, impeding the identification of networks elements and mechanisms from which this imbalance resulted. Importantly, changes in chloride extrusion capacity expected to occur in conditions of PI (Nomura, Sakai, Nagano, Umino, & Suzuki, 2006; W. Zhang et al., 2008) and which differ in males and females (Dedek et al., 2022) would only amplify this imbalance toward increased disinhibition. Our data showing differential changes in the short-term plasticity at inhibitory and disinhibitory synapses is in agreement with the hypothesis that PI induced an excitation/inhibition imbalance in the lamina II.

## **5. Conclusion**

Our work examined the effect of repeated stimulations of GABAergic connections at low and high frequency, corresponding respectively to the activity at low and high intensity of sensory stimulation under basal physiological conditions and conditions of PI. The average amplitudes of eIPSCs during repeated trains of activity were increased with respect to eIPSCs of the same rank in trains of stimulation recorded from control animals. This increase in eIPSCs amplitudes during trains of stimulation was observed in putative excitatory and putative inhibitory neurons either at low frequency and/or at high frequency.

Interestingly, the stimulation frequency at which the increase took place depended on the sex and the putative inhibitory/excitatory nature of the postsynaptic neuron contacted. In males, at high frequency, the amplitude increased for both type of connection whereas it only increased for connections onto putative inhibitory neurons at low frequency. In females, PI had no effect on amplitudes at high frequency, but increased amplitudes at low frequency for both type of connection.

This indicated that changes in putative inhibition and disinhibition induced by PI were different in males and females. Nevertheless, for both male and female and both low and high frequency, the difference of eIPSCs amplitudes between connections onto putative excitatory and putative inhibitory neurons was significantly smaller in conditions of PI. Since this difference epitomizes an inhibitory/disinhibitory balance, this reduction indicated an imbalance towards disinhibition of these synapses in PI condition which would be consistent with changes in sensitivity thresholds. Moreover, the changes in STP observed in PI conditions had major impacts in the ability of inhibition to prevent the spiking of the postsynaptic neuron at low frequency of activity, suggesting a reduced filtering of information from low intensity of sensory stimulation. All this data indicate that the excitation/inhibition imbalance in the lamina II in PI conditions involve at least in part differential changes in the short-term plasticity at inhibitory and disinhibitory synapses.

## **Acknowledgements**

We thank Catherine Moreau for excellent technical assistance. This work was supported by Centre National de la Recherche Scientifique, Université de Strasbourg, and the French National Research agency (ANR) contract ANR-17-EURE-0022. RK and LC were supported by EURIDOL Graduate School of Pain, Neuropole Strasbourg, and LC by Société Française d'Etude et de Traitement de la Douleur (SFETD).

## References

- Adrian, E. D. (1920). The recovery process of excitable tissues: Part I. *J Physiol*, *54*(1-2), 1-31. doi:10.1113/jphysiol.1920.sp001905
- Adrian, E. D., & Zotterman, Y. (1926). The impulses produced by sensory nerve endings: Part 3. Impulses set up by Touch and Pressure. *J Physiol*, *61*(4), 465-483. doi:10.1113/jphysiol.1926.sp002308
- Barrett, A. C., Smith, E. S., & Picker, M. J. (2002). Sex-related differences in mechanical nociception and antinociception produced by mu- and kappa-opioid receptor agonists in rats. *Eur J Pharmacol*, *452*(2), 163-173. doi:10.1016/s0014-2999(02)02274-4
- Barrot, M. (2012). Tests and models of nociception and pain in rodents. *Neuroscience*, *211*, 39-50. doi:10.1016/j.neuroscience.2011.12.041
- Basbaum, A. I., Bautista, D. M., Scherrer, G., & Julius, D. (2009). Cellular and molecular mechanisms of pain. *Cell*, *139*(2), 267-284. doi:10.1016/j.cell.2009.09.028
- Biet, M., Dansereau, M. A., Sarret, P., & Dumaine, R. (2021). The neuronal potassium current I(A) is a potential target for pain during chronic inflammation. *Physiol Rep*, *9*(16), e14975. doi:10.14814/phy2.14975
- Buonomano, D. V. (2000). Decoding temporal information: A model based on short-term synaptic plasticity. *J Neurosci*, *20*(3), 1129-1141.
- Campero, M., Serra, J., & Ochoa, J. L. (1996). C-polymodal nociceptors activated by noxious low temperature in human skin. *J Physiol*, *497* ( Pt 2), 565-572. doi:10.1113/jphysiol.1996.sp021789
- Cathenaut, L., Leonardon, B., Kuster, R., Inquimbert, P., Schlichter, R., & Hugel, S. (2021). Inhibitory interneurons with differential plasticities at their connections tune excitatory/inhibitory balance in the spinal nociceptive system. *Pain*. doi:10.1097/j.pain.0000000000002460
- Cathenaut, L., Leonardon, B., Kuster, R., Inquimbert, P., Schlichter, R., & Hugel, S. (2022). Inhibitory interneurons with differential plasticities at their connections tune excitatory-inhibitory balance in the spinal nociceptive system. *Pain*, *163*(5), e675-e688. doi:10.1097/j.pain.0000000000002460
- Cathenaut, L., Schlichter, R., & Hugel, S. (2023). Short-term plasticity in the spinal nociceptive system. *Pain*, *164*(11), 2411-2424. doi:10.1097/j.pain.0000000000002999
- Charron, A., Pepino, L., Malapert, P., Debrauwer, V., Castets, F., Salio, C., & Moqrich, A. (2024). Sex-related exacerbation of injury-induced mechanical hypersensitivity in GAD67 haplodeficient mice. *Pain*, *165*(1), 192-201. doi:10.1097/j.pain.0000000000003012
- Chirila, A. M., Brown, T. E., Bishop, R. A., Bellono, N. W., Pucci, F. G., & Kauer, J. A. (2014). Long-term potentiation of glycinergic synapses triggered by interleukin 1beta. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *111*(22), 8263-8268. doi:10.1073/pnas.1401013111
- Chow, L. H., Chen, Y. H., Wu, W. C., Chang, E. P., & Huang, E. Y. (2016). Sex Difference in Oxytocin-Induced Anti-Hyperalgesia at the Spinal Level in Rats with Intraplantar Carrageenan-Induced Inflammation. *PLoS One*, *11*(9), e0162218. doi:10.1371/journal.pone.0162218
- Cui, L., Kim, Y. R., Kim, H. Y., Lee, S. C., Shin, H. S., Szabo, G., . . . Kim, S. J. (2011). Modulation of synaptic transmission from primary afferents to spinal substantia gelatinosa neurons by group III mGluRs in GAD65-EGFP transgenic mice. *J Neurophysiol*, *105*(3), 1102-1111. doi:10.1152/jn.00108.2010
- Dedek, A., Xu, J., Lorenzo, L. E., Godin, A. G., Kandedgedara, C. M., Glavina, G., . . . Hildebrand, M. E. (2022). Sexual dimorphism in a neuronal mechanism of spinal hyperexcitability across rodent and human models of pathological pain. *Brain*, *145*(3), 1124-1138. doi:10.1093/brain/awab408
- Dickie, A. C., McCormick, B., Lukito, V., Wilson, K. L., & Torsney, C. (2017). Inflammatory Pain Reduces C Fiber Activity-Dependent Slowing in a Sex-Dependent Manner, Amplifying Nociceptive Input to the Spinal Cord. *J Neurosci*, *37*(27), 6488-6502. doi:10.1523/JNEUROSCI.3816-16.2017

- Ferrini, F., Perez-Sanchez, J., Ferland, S., Lorenzo, L. E., Godin, A. G., Plasencia-Fernandez, I., . . . De Koninck, Y. (2020). Differential chloride homeostasis in the spinal dorsal horn locally shapes synaptic metaplasticity and modality-specific sensitization. *Nat Commun*, *11*(1), 3935. doi:10.1038/s41467-020-17824-y
- Grudt, T. J., & Perl, E. R. (2002). Correlations between neuronal morphology and electrophysiological features in the rodent superficial dorsal horn. *J Physiol*, *540*(Pt 1), 189-207. doi:10.1113/jphysiol.2001.012890
- Handwerker, H. O., Anton, F., & Reeh, P. W. (1987). Discharge patterns of afferent cutaneous nerve fibers from the rat's tail during prolonged noxious mechanical stimulation. *Exp Brain Res*, *65*(3), 493-504. doi:10.1007/BF00235972
- Harvey, R. J., Depner, U. B., Wassle, H., Ahmadi, S., Heindl, C., Reinold, H., . . . Muller, U. (2004). GlyR alpha3: an essential target for spinal PGE2-mediated inflammatory pain sensitization. *Science*, *304*(5672), 884-887. doi:10.1126/science.1094925
- Hendrich, J., Alvarez, P., Joseph, E. K., Ferrari, L. F., Chen, X., & Levine, J. D. (2012). In vivo and in vitro comparison of female and male nociceptors. *J Pain*, *13*(12), 1224-1231. doi:10.1016/j.jpain.2012.09.009
- Ikeda, H., Stark, J., Fischer, H., Wagner, M., Drdla, R., Jager, T., & Sandkuhler, J. (2006). Synaptic amplifier of inflammatory pain in the spinal dorsal horn. *Science*, *312*(5780), 1659-1662. doi:10.1126/science.1127233
- Joshi, S., Williamson, J., Moosa, S., & Kapur, J. (2023). Progesterone receptor activation regulates sensory sensitivity. *bioRxiv*. doi:10.1101/2023.08.04.552037
- Kloc, M. L., Pradier, B., Chirila, A. M., & Kauer, J. A. (2019). NMDA receptor activation induces long-term potentiation of glycine synapses. *PLoS One*, *14*(9), e0222066. doi:10.1371/journal.pone.0222066
- Kopach, O., Krotov, V., Belan, P., & Voitenko, N. (2015). Inflammatory-induced changes in synaptic drive and postsynaptic AMPARs in lamina II dorsal horn neurons are cell-type specific. *Pain*, *156*(3), 428-438. doi:10.1097/01.j.pain.0000460318.65734.00
- Liu, P., Zhang, X., He, X., Jiang, Z., Wang, Q., & Lu, Y. (2021). Spinal GABAergic neurons are under feed-forward inhibitory control driven by Delta and C fibers in Gad2 td-Tomato mice. *Mol Pain*, *17*, 1744806921992620. doi:10.1177/1744806921992620
- Lu, Y., & Perl, E. R. (2003). A specific inhibitory pathway between substantia gelatinosa neurons receiving direct C-fiber input. *J Neurosci*, *23*(25), 8752-8758.
- McLean, A. C., Valenzuela, N., Fai, S., & Bennett, S. A. (2012). Performing vaginal lavage, crystal violet staining, and vaginal cytological evaluation for mouse estrous cycle staging identification. *J Vis Exp*(67), e4389. doi:10.3791/4389
- Meziane, H., Ouagazzal, A. M., Aubert, L., Wietrzyk, M., & Krezel, W. (2007). Estrous cycle effects on behavior of C57BL/6J and BALB/cByJ female mice: implications for phenotyping strategies. *Genes Brain Behav*, *6*(2), 192-200. doi:10.1111/j.1601-183X.2006.00249.x
- Motulsky, H. J., & Christopoulos, A. (2003). *Fitting Models to Biological Data Using Linear and Nonlinear Regression*. San Diego: GraphPad Software Inc.
- Muller, F., Heinke, B., & Sandkuhler, J. (2003). Reduction of glycine receptor-mediated miniature inhibitory postsynaptic currents in rat spinal lamina I neurons after peripheral inflammation. *Neuroscience*, *122*(3), 799-805. doi:10.1016/j.neuroscience.2003.07.009
- Neumann, S., Doubell, T. P., Leslie, T., & Woolf, C. J. (1996). Inflammatory pain hypersensitivity mediated by phenotypic switch in myelinated primary sensory neurons. *Nature*, *384*(6607), 360-364. doi:10.1038/384360a0
- Nilsson, M. E., Vandenput, L., Tivesten, A., Norlen, A. K., Lagerquist, M. K., Windahl, S. H., . . . Ohlsson, C. (2015). Measurement of a Comprehensive Sex Steroid Profile in Rodent Serum by High-Sensitive Gas Chromatography-Tandem Mass Spectrometry. *Endocrinology*, *156*(7), 2492-2502. doi:10.1210/en.2014-1890

- Nomura, H., Sakai, A., Nagano, M., Umino, M., & Suzuki, H. (2006). Expression changes of cation chloride cotransporters in the rat spinal cord following intraplantar formalin. *Neurosci Res*, *56*(4), 435-440. doi:10.1016/j.neures.2006.08.012
- Nowak, A., Mathieson, H. R., Chapman, R. J., Janzso, G., Yanagawa, Y., Obata, K., . . . King, A. E. (2011). Kv3.1b and Kv3.3 channel subunit expression in murine spinal dorsal horn GABAergic interneurons. *J Chem Neuroanat*, *42*(1), 30-38. doi:10.1016/j.jchemneu.2011.02.003
- Peirs, C., Williams, S. G., Zhao, X., Arokiaraj, C. M., Ferreira, D. W., Noh, M. C., . . . Seal, R. P. (2021). Mechanical Allodynia Circuitry in the Dorsal Horn Is Defined by the Nature of the Injury. *Neuron*, *109*(1), 73-90 e77. doi:10.1016/j.neuron.2020.10.027
- Picard, E., Kerckhove, N., Francois, A., Boudieu, L., Billard, E., Carvalho, F. A., . . . Mallet, C. (2023). Role of T CD4(+) cells, macrophages, C-low threshold mechanoreceptors and spinal Ca(v) 3.2 channels in inflammation and related pain-like symptoms in murine inflammatory models. *Br J Pharmacol*, *180*(4), 385-400. doi:10.1111/bph.15956
- Pitcher, G. M., & Henry, J. L. (2002). Second phase of formalin-induced excitation of spinal dorsal horn neurons in spinalized rats is reversed by sciatic nerve block. *Eur J Neurosci*, *15*(9), 1509-1515. doi:10.1046/j.1460-9568.2002.01984.x
- Poisbeau, P., Patte-Mensah, C., Keller, A. F., Barrot, M., Breton, J. D., Luis-Delgado, O. E., . . . Schlichter, R. (2005). Inflammatory pain upregulates spinal inhibition via endogenous neurosteroid production. *J Neurosci*, *25*(50), 11768-11776. doi:10.1523/JNEUROSCI.3841-05.2005
- Reinold, H., Ahmadi, S., Depner, U. B., Layh, B., Heindl, C., Hamza, M., . . . Zeilhofer, H. U. (2005). Spinal inflammatory hyperalgesia is mediated by prostaglandin E receptors of the EP2 subtype. *J Clin Invest*, *115*(3), 673-679. doi:10.1172/JCI23618
- Santos, S. F., Luz, L. L., Szucs, P., Lima, D., Derkach, V. A., & Safronov, B. V. (2009). Transmission efficacy and plasticity in glutamatergic synapses formed by excitatory interneurons of the substantia gelatinosa in the rat spinal cord. *PLoS One*, *4*(11), e8047. doi:10.1371/journal.pone.0008047
- Schlichter, R., Keller, A. F., De Roo, M., Breton, J. D., Inquimbert, P., & Poisbeau, P. (2006). Fast nongenomic effects of steroids on synaptic transmission and role of endogenous neurosteroids in spinal pain pathways. *J Mol Neurosci*, *28*(1), 33-51. doi:10.1385/jmn:28:1:33
- Spiess, A. N., & Neumeyer, N. (2010). An evaluation of R2 as an inadequate measure for nonlinear models in pharmacological and biochemical research: a Monte Carlo approach. *BMC Pharmacol*, *10*, 6. doi:10.1186/1471-2210-10-6
- Stanfa, L. C., Sullivan, A. F., & Dickenson, A. H. (1992). Alterations in neuronal excitability and the potency of spinal mu, delta and kappa opioids after carrageenan-induced inflammation. *Pain*, *50*(3), 345-354. doi:10.1016/0304-3959(92)90040-I
- Takazawa, T., Choudhury, P., Tong, C. K., Conway, C. M., Scherrer, G., Flood, P. D., . . . MacDermott, A. B. (2017). Inhibition Mediated by Glycinergic and GABAergic Receptors on Excitatory Neurons in Mouse Superficial Dorsal Horn Is Location-Specific but Modified by Inflammation. *J Neurosci*, *37*(9), 2336-2348. doi:10.1523/JNEUROSCI.2354-16.2017
- Takazawa, T., & MacDermott, A. B. (2010). Synaptic pathways and inhibitory gates in the spinal cord dorsal horn. *Ann N Y Acad Sci*, *1198*, 153-158. doi:10.1111/j.1749-6632.2010.05501.x
- Torebjork, H. E., & Hallin, R. G. (1974). Responses in human A and C fibres to repeated electrical intradermal stimulation. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, *37*(6), 653-664. doi:10.1136/jnnp.37.6.653
- Torsney, C. (2011). Inflammatory pain unmasks heterosynaptic facilitation in lamina I neurokinin 1 receptor-expressing neurons in rat spinal cord. *J Neurosci*, *31*(13), 5158-5168. doi:10.1523/JNEUROSCI.6241-10.2011
- Tsao, C. H., Wu, K. Y., Su, N. C., Edwards, A., & Huang, G. J. (2023). The influence of sex difference on behavior and adult hippocampal neurogenesis in C57BL/6 mice. *Sci Rep*, *13*(1), 17297. doi:10.1038/s41598-023-44360-8
- Wall, E. G., Desai, R., Khant Aung, Z., Yeo, S. H., Grattan, D. R., Handelsman, D. J., & Herbison, A. E. (2023). Unexpected Plasma Gonadal Steroid and Prolactin Levels Across the Mouse Estrous Cycle. *Endocrinology*, *164*(6). doi:10.1210/endocr/bqad070

- Wan, Y. H., Jian, Z., Wang, W. T., Xu, H., Hu, S. J., & Ju, G. (2006). Short-term plasticity at primary afferent synapse in rat spinal dorsal horn and its biological function. *Neurosignals*, *15*(2), 74-90. doi:10.1159/000094657
- Woolf, C. J. (1983). Evidence for a central component of post-injury pain hypersensitivity. *Nature*, *306*(5944), 686-688. doi:10.1038/306686a0
- Woolf, C. J., & Costigan, M. (1999). Transcriptional and posttranslational plasticity and the generation of inflammatory pain. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *96*(14), 7723-7730. doi:10.1073/pnas.96.14.7723
- Yang, F., Guo, J., Sun, W. L., Liu, F. Y., Cai, J., Xing, G. G., & Wan, Y. (2014). The induction of long-term potentiation in spinal dorsal horn after peripheral nociceptive stimulation and contribution of spinal TRPV1 in rats. *Neuroscience*, *269*, 59-66. doi:10.1016/j.neuroscience.2014.03.037
- Zhang, H., Nei, H., & Dougherty, P. M. (2010). A p38 mitogen-activated protein kinase-dependent mechanism of disinhibition in spinal synaptic transmission induced by tumor necrosis factor- $\alpha$ . *J Neurosci*, *30*(38), 12844-12855. doi:10.1523/JNEUROSCI.2437-10.2010
- Zhang, W., Liu, L. Y., & Xu, T. L. (2008). Reduced potassium-chloride co-transporter expression in spinal cord dorsal horn neurons contributes to inflammatory pain hypersensitivity in rats. *Neuroscience*, *152*(2), 502-510. doi:10.1016/j.neuroscience.2007.12.037
- Zhao, W., Li, Q., Ma, Y., Wang, Z., Fan, B., Zhai, X., . . . Zhang, H. (2021). Behaviors Related to Psychiatric Disorders and Pain Perception in C57BL/6J Mice During Different Phases of Estrous Cycle. *Front Neurosci*, *15*, 650793. doi:10.3389/fnins.2021.650793
- Zhu, Y., Lu, S. G., & Gold, M. S. (2012). Persistent inflammation increases GABA-induced depolarization of rat cutaneous dorsal root ganglion neurons in vitro. *Neuroscience*, *220*, 330-340. doi:10.1016/j.neuroscience.2012.06.025
- Zumbusch, A. S., McEachern, E. L. F., Morgan, O. B., Nickner, E., & Mogil, J. S. (2024). Normative Preclinical Algesiometry Data on the von Frey and Radiant Heat Paw-Withdrawal Tests: An Analysis of Data from More Than 8,000 Mice Over 20 Years. *J Pain*. doi:10.1016/j.jpain.2024.01.333

## Figure Legends

### Figure 1. Effects of PI on mechanical and thermal sensitivity in male and female mice

Mechanical and hot thermal sensitivity were evaluated in male and female GAD65-eGFP mice in control condition and 24 h after induction of peripheral inflammation by bilateral injection of carrageenan in hindpaws.

A. Thresholds for mechanical sensitivity were evaluated using von Frey filaments. B. The latency for hindpaw withdrawal in response to hot thermal stimulation was determined using hot plate with a temperature set at 48°C. The number in the histogram bars corresponded to the number of mice assessed. Data are represented as mean $\pm$ SEM. \* $p < 0.05$ ; \*\*\* $p < 0.0001$ . Details of the corresponding statistical analysis are given in Table 1.

Figure 1

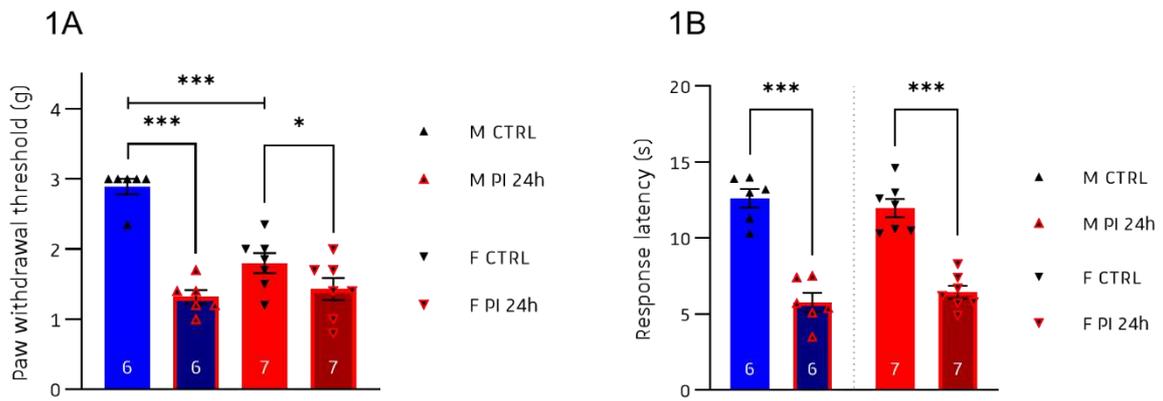
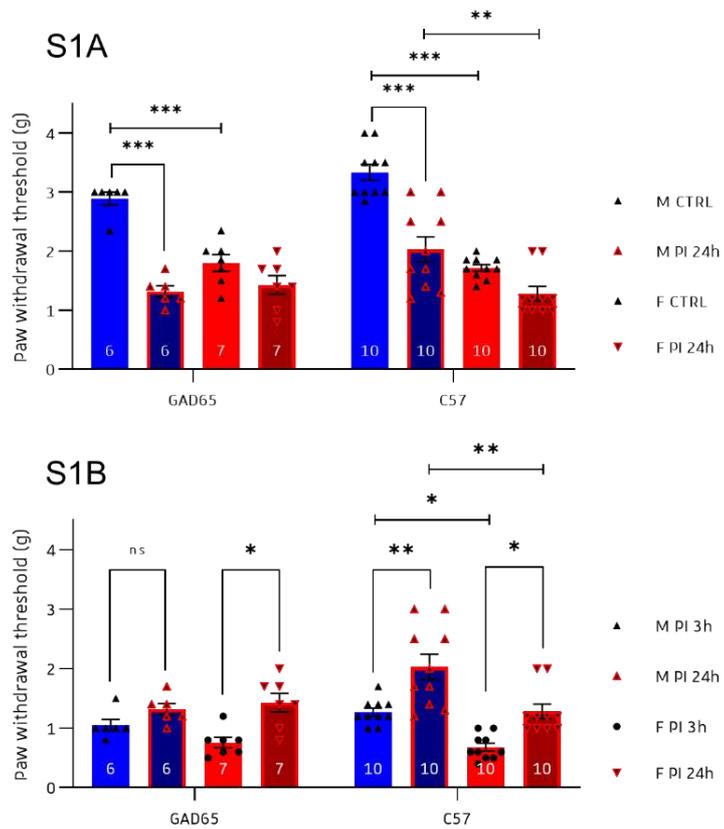


Figure S1



### **Figure S1. Effects of PI on mechanical sensitivity in male and female GAD65-eGFP and C57BL/6 mice**

Mechanical sensitivity was evaluated in GAD65-eGFP and C57BL/6 male and female mice in control condition and 3 h and 24 h after induction of peripheral inflammation by bilateral injection of carrageenan in hindpaws. For comparison purpose, data from control condition and after 24 h in condition of PI are illustrated in **S1A** and data after 3 h and 24 h in condition of PI are illustrated in **S1B**. Note that data from GAD65-eGFP mice in control condition and 24 h after induction of PI are also illustrated Figure 1. Data are represented as mean±SEM. ns,  $p \geq 0.05$ ; \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.001$ ; \*\*\* $p < 0.0001$ . Details of the corresponding statistical analysis are given Table 2.

### **Figure 2. Short-term plasticity of GABAergic connections onto eGFP- and eGFP+ neurons from males and females: comparison of control and PI conditions.**

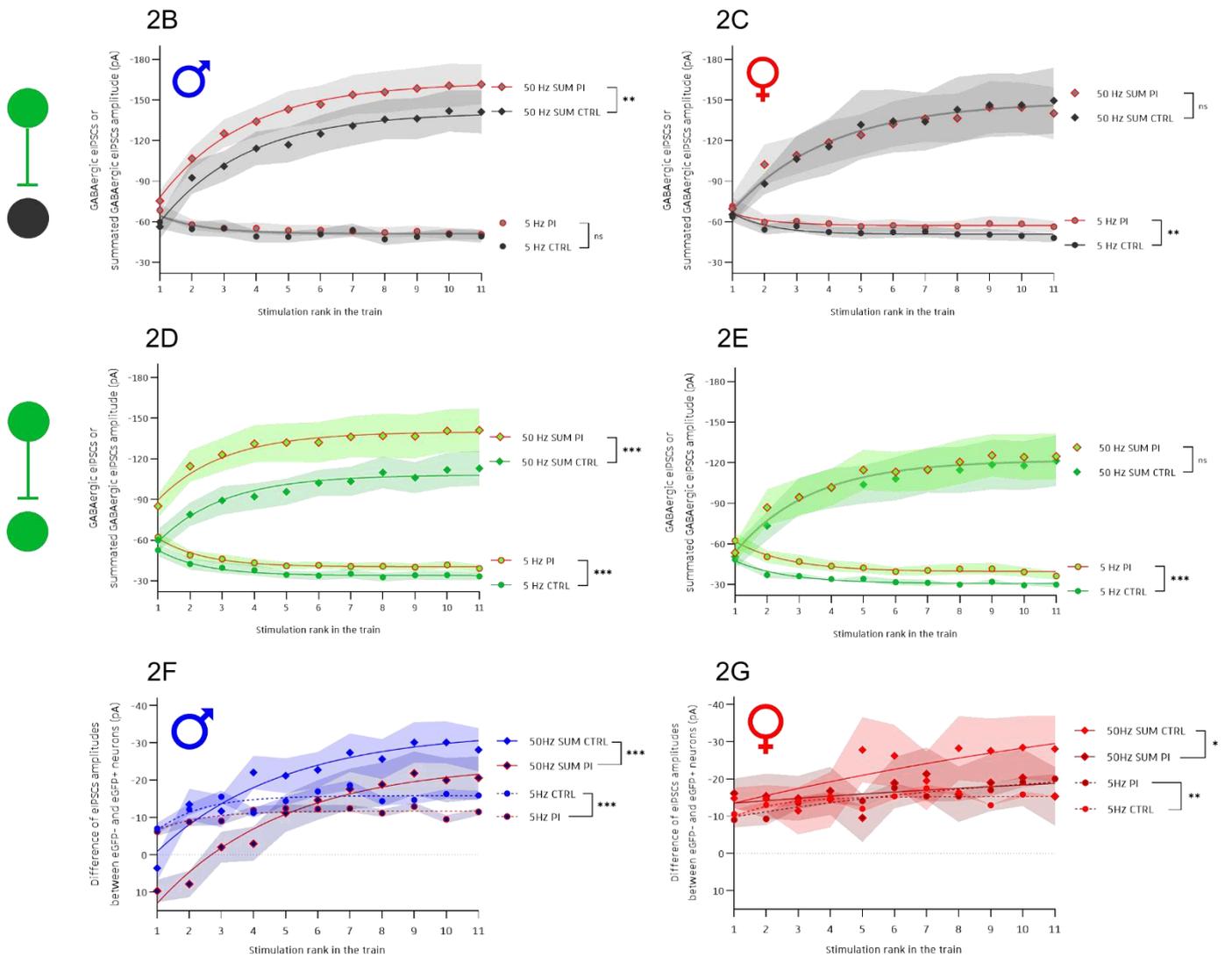
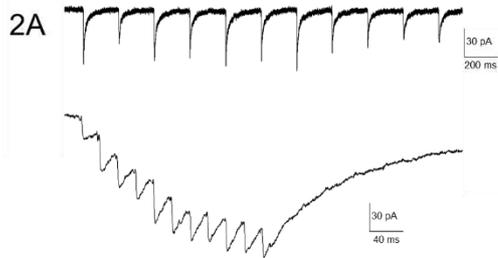
**A.** Representative average current trace recorded during stimulation of a presynaptic GABAergic neuron at 5 Hz (top) and 50 Hz (bottom). **B.** Average amplitudes of GABAergic eIPSCs recorded in eGFP- neurons from male mice during trains at 5 Hz and 50 Hz. **C.** Average amplitudes of GABAergic eIPSCs recorded in eGFP- neurons from female mice during trains at 5 Hz and 50 Hz. **D.** Average amplitudes of GABAergic eIPSCs recorded in eGFP+ neurons from male mice during trains at 5 Hz and 50 Hz. **E.** Average amplitudes of GABAergic eIPSCs recorded in eGFP+ neurons from female mice. **F,G,** Difference of average amplitudes of eIPSCs of the same rank recorded in eGFP- and eGFP+ neurons. The difference was made for all conditions of frequency, control vs. PI conditions, and in neurons from males (**F**) and females (**G**).

For stimulations at 50 Hz, average summated eIPSCs amplitudes are represented, corresponding to eIPSCs measured from the basal current level before the first eIPSC.

Results of nonlinear regressions used to compare conditions are given as ns,  $p \geq 0.05$ ; \*\* $p < 0.001$ ; \*\*\* $p < 0.0001$ . When comparison revealed a significant difference, two exponential fits were illustrated, when comparisons revealed no difference, one single exponential curve fitting all data was illustrated.  $n = 207$  and  $n = 79$  neurons in control conditions at 5 and 50 Hz respectively and  $n = 212$  and  $n = 82$  neurons in PI conditions at 5 and 50 Hz respectively. Details of regressions and the corresponding analysis are given in Table 3.

CTRL, basal physiological conditions: eGFP-, enhanced green fluorescent protein negative; eGFP+, enhanced green fluorescent protein positive; eIPSC, evoked inhibitory postsynaptic current, PI peripheral inflammation.

Figure 2



**Figure S2. Rapid increase of eIPSCs amplitudes during the first train at 50 Hz in PI conditions in males.**

Average eIPSCs recorded during the first train of stimulation (PI train 1) and the 9 subsequent trains (PI trains 2-10) are illustrated together with the average eIPSCs amplitudes recorded in control conditions (here eIPSCs amplitudes and not summated amplitudes are plotted). **A.** data from eGFP<sup>-</sup> neurons. **B.** data from eGFP<sup>+</sup> neurons. Note that during the first eIPSC of the first train of stimulations at 50 Hz had a similar amplitude as recorded in control condition whereas amplitudes of the subsequent eIPSCs increased (PI trains 2-10). This increase accounted for the increase of average summated eIPSCs amplitudes during trains at 50 Hz in neurons from males in conditions of PI (Figure 2B and 2D).

**Figure S3. Short-term plasticity of GABAergic connections onto eGFP<sup>-</sup> and eGFP<sup>+</sup> neurons in control and PI conditions: comparisons of neurons from males and females.**

These are the same data as in Figure 2B-E differently organized.

**A.** Average amplitudes of GABAergic eIPSCs recorded in eGFP<sup>-</sup> neurons during trains at 5 Hz and 50 Hz in control conditions. **B.** Average amplitudes of GABAergic eIPSCs recorded in eGFP<sup>-</sup> neurons during trains at 5 Hz and 50 Hz in PI conditions. **C.** Average amplitudes of GABAergic eIPSCs recorded in eGFP<sup>+</sup> neurons during trains at 5 Hz and 50 Hz in control conditions. **D.** Average amplitudes of GABAergic eIPSCs recorded in eGFP<sup>+</sup> neurons during trains at 5 Hz and 50 Hz in PI conditions.

For stimulations at 50 Hz, average summated eIPSCs amplitudes are represented, corresponding to eIPSCs measured from the basal current level before the first eIPSC.

Results of nonlinear regressions used to compare conditions are given as ns,  $p \geq 0.05$ ; \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.001$ . When comparison revealed a significant difference, two exponential fits were illustrated, when comparisons revealed no difference, one single exponential curve fitting all data was illustrated.  $n = 207$  and  $n = 79$  neurons in control conditions at 5 and 50 Hz respectively and  $n = 212$  and  $n = 82$  neurons in PI conditions at 5 and 50 Hz respectively. Details of regressions and the corresponding analysis are given in Table 4.

CTRL, basal physiological conditions; eGFP<sup>-</sup>, enhanced green fluorescent protein negative; eGFP<sup>+</sup>, enhanced green fluorescent protein positive; eIPSC, evoked inhibitory postsynaptic current; F, female; M, male; PI peripheral inflammation, SUM, summated amplitudes.

Figure S2

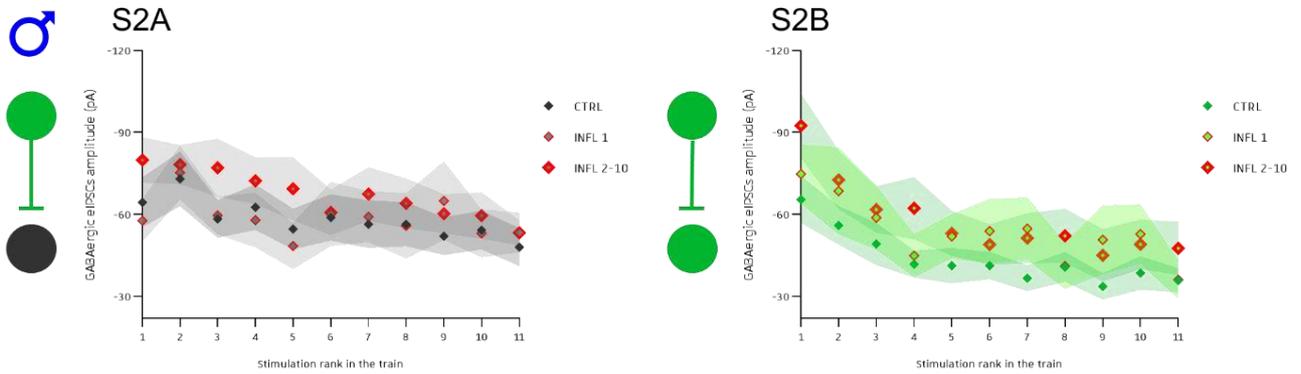
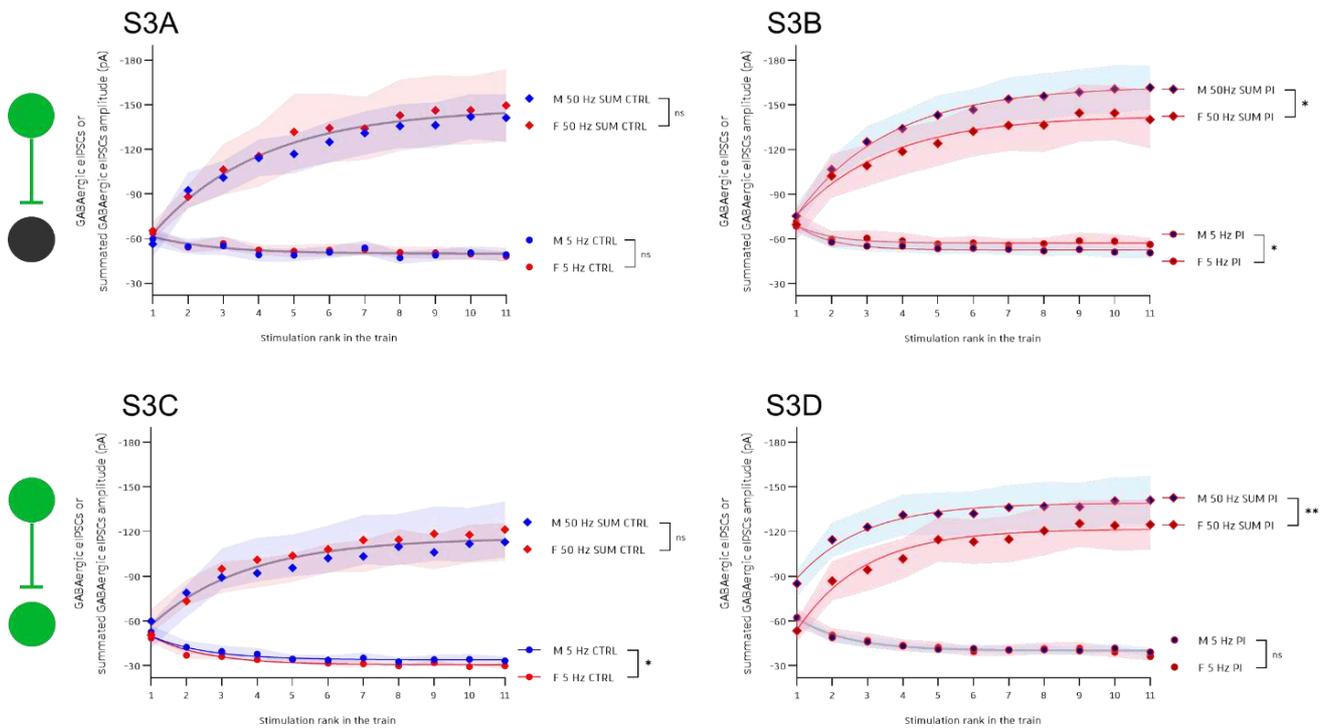


Figure S3



**Figure S4. Short-term plasticity of GABAergic connections in control and PI conditions in neurons recorded from male and female mice: comparisons of connections onto eGFP- and eGFP+ neurons.**

These are the same data as in Figure 2B-E differently organized.

**A.** Average amplitudes of GABAergic eIPSCs recorded in neurons from male mice in control conditions during trains at 5 Hz and 50 Hz. **B.** Average amplitudes of GABAergic eIPSCs recorded in neurons from male mice in conditions of PI during trains at 5 Hz and 50 Hz. **C.** Average amplitudes of GABAergic eIPSCs recorded in neurons from female mice in control conditions during trains at 5 Hz and 50 Hz. **D.** Average amplitudes of GABAergic eIPSCs recorded in neurons from female mice in conditions of PI during trains at 5 Hz and 50 Hz.

For stimulations at 50 Hz, average summated eIPSCs amplitudes are represented, corresponding to eIPSCs measured from the basal current level before the first eIPSC.

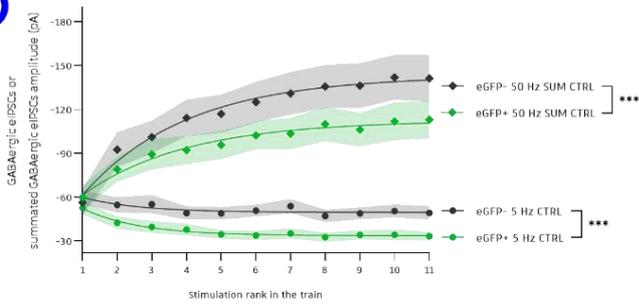
Results of nonlinear regressions used to compare conditions are given as ns,  $p \geq 0.05$ ; \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.001$ ; \*\*\* $p < 0.0001$ . When comparison revealed a significant difference, two exponential fits were illustrated, when comparisons revealed no difference, one single exponential curve fitting all data was illustrated.  $n = 207$  and  $n = 79$  neurons in control conditions at 5 and 50 Hz respectively and  $n = 212$  and  $n = 82$  neurons in PI conditions at 5 and 50 Hz respectively. Details of regressions and the corresponding analysis are given in Table 5.

CTRL, basal physiological conditions; eGFP-, enhanced green fluorescent protein negative; eGFP+, enhanced green fluorescent protein positive; eIPSC, evoked inhibitory postsynaptic current; F, female; M, male; PI peripheral inflammation, SUM, summated amplitudes.

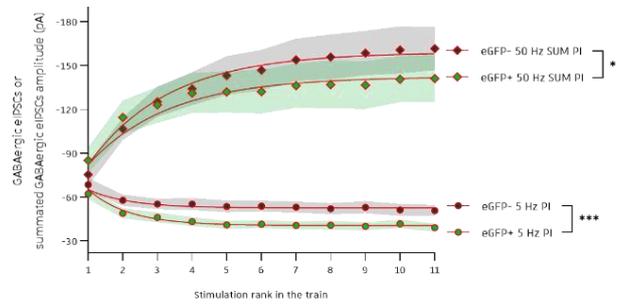
Figure S4



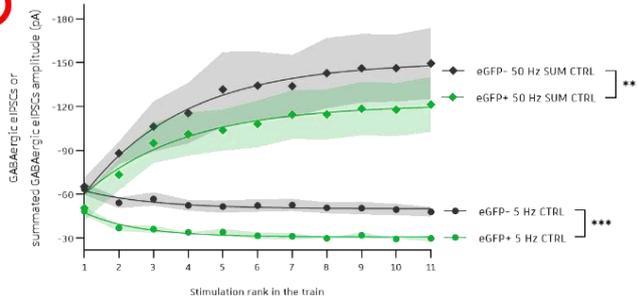
S4A



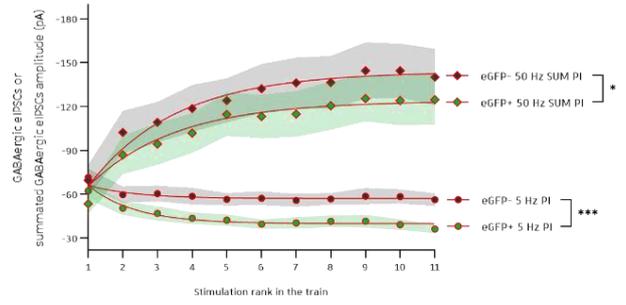
S4B



S4C



S4D



### Figure S5. Action potential thresholds and firing pattern in eGFP- and eGFP+ neurons.

**A, B.** During current-clamp experiments where current steps of increasing amplitude were injected in the recorded neuron, the membrane potential during the last step below action potential firing and the first step above action potential firing was measured. **A.** These potentials were significantly different when recorded in eGFP- and eGFP+ neurons ( $n = 22$  and  $n = 25$  respectively, Repeated measures two-way ANOVA,  $P = 0.0479$ , Table 6) indicating that the threshold for action potential firing was more depolarized in eGFP- neurons with respect to eGFP+ neurons. **B.** These potentials were significantly different when recorded in neurons firing action potentials of tonic or initial bursting patterns ( $n = 18$  and  $n = 29$  respectively, Repeated measures two-way ANOVA,  $P = 0.0003$ , Table 6) indicating that the threshold for action potential firing was more depolarized in neurons with initial bursting pattern with respect to neurons with tonic pattern.

**C.** Proportion of eGFP- and eGFP+ neurons exhibiting tonic or initial bursting pattern (Fisher's exact test,  $P = 0.007$ ). See (Cathenaut et al., 2022) for firing pattern illustrations.

AP, action potential; eGFP-, enhanced green fluorescent protein negative; eGFP+, enhanced green fluorescent protein positive; IB, initial bursting; To, tonic.

### Figure 3. Probability of spiking during 5 Hz trains of simulated EPSPs in eGFP- and eGFP+ neurons.

Probability of spiking in eGFP- and eGFP+ neurons during trains of EPSPs simulated by dynamic-clamp injections EPSCs traces at 5 Hz. The amplitudes of EPSCs traces injected corresponded to 10 times the average amplitude of individual monosynaptic eEPSCs (EPSC X10, **A.**) or 4 times the average amplitude of individual monosynaptic eEPSCs (EPSC X4, **B.**). With EPSC X10, the probability of action potential firing was similar in eGFP- and eGFP+ neurons, reaching 60% at the end of the train. With EPSC X4 the action potential firing probability dropped rapidly, reaching 0% in eGFP- neurons after 4 EPSPs whereas it stabilized at 30% in eGFP+ neurons.

Results of nonlinear regressions used to compare conditions are given as ns,  $p \geq 0.05$ ; \*\*\* $p < 0.0001$ . When comparison revealed a significant difference, two exponential fits were illustrated, when comparisons revealed no difference, one single exponential curve fitting all data was illustrated.  $n = 22$  eGFP- and  $n = 25$  eGFP+ neurons. Details of regressions and the corresponding analysis are given in Table 7.

AP, action potential; eGFP-, enhanced green fluorescent protein negative; eGFP+, enhanced green fluorescent protein positive; EPSC, excitatory postsynaptic current; EPSP, excitatory postsynaptic potential.

Figure S5A

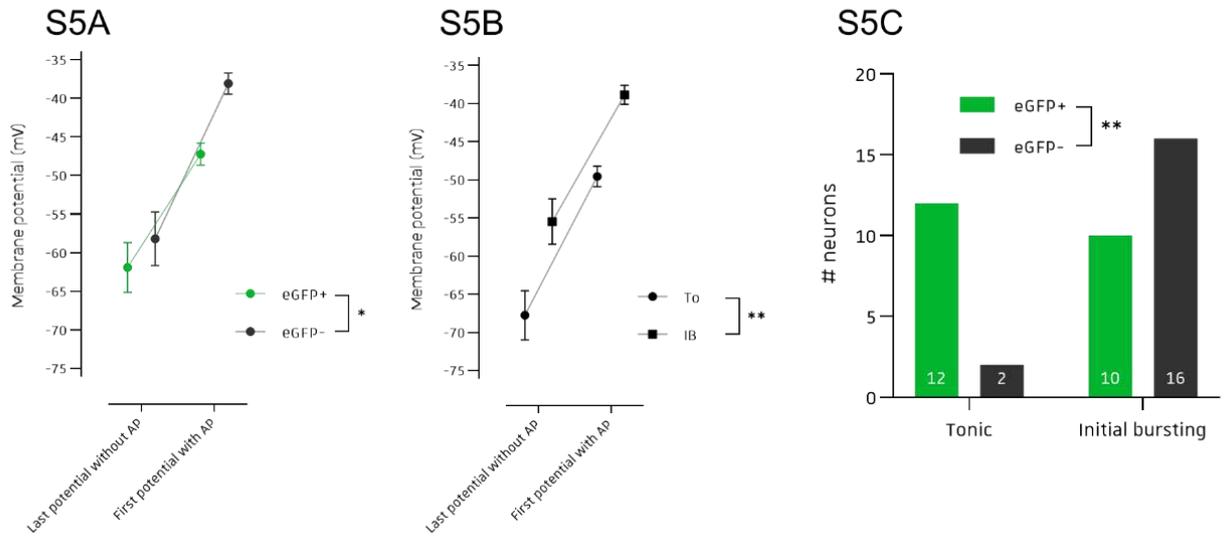
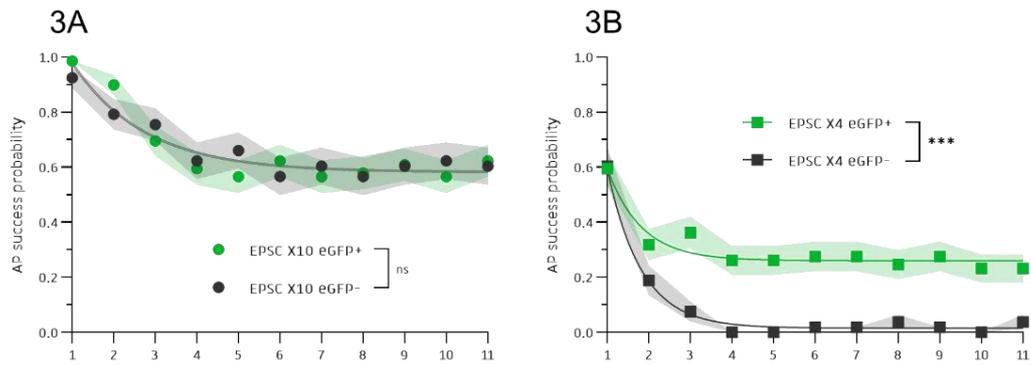


Figure 3



**Figure 4. Effect of simulated IPSPs on action potential firing evoked by simulated EPSPs.**

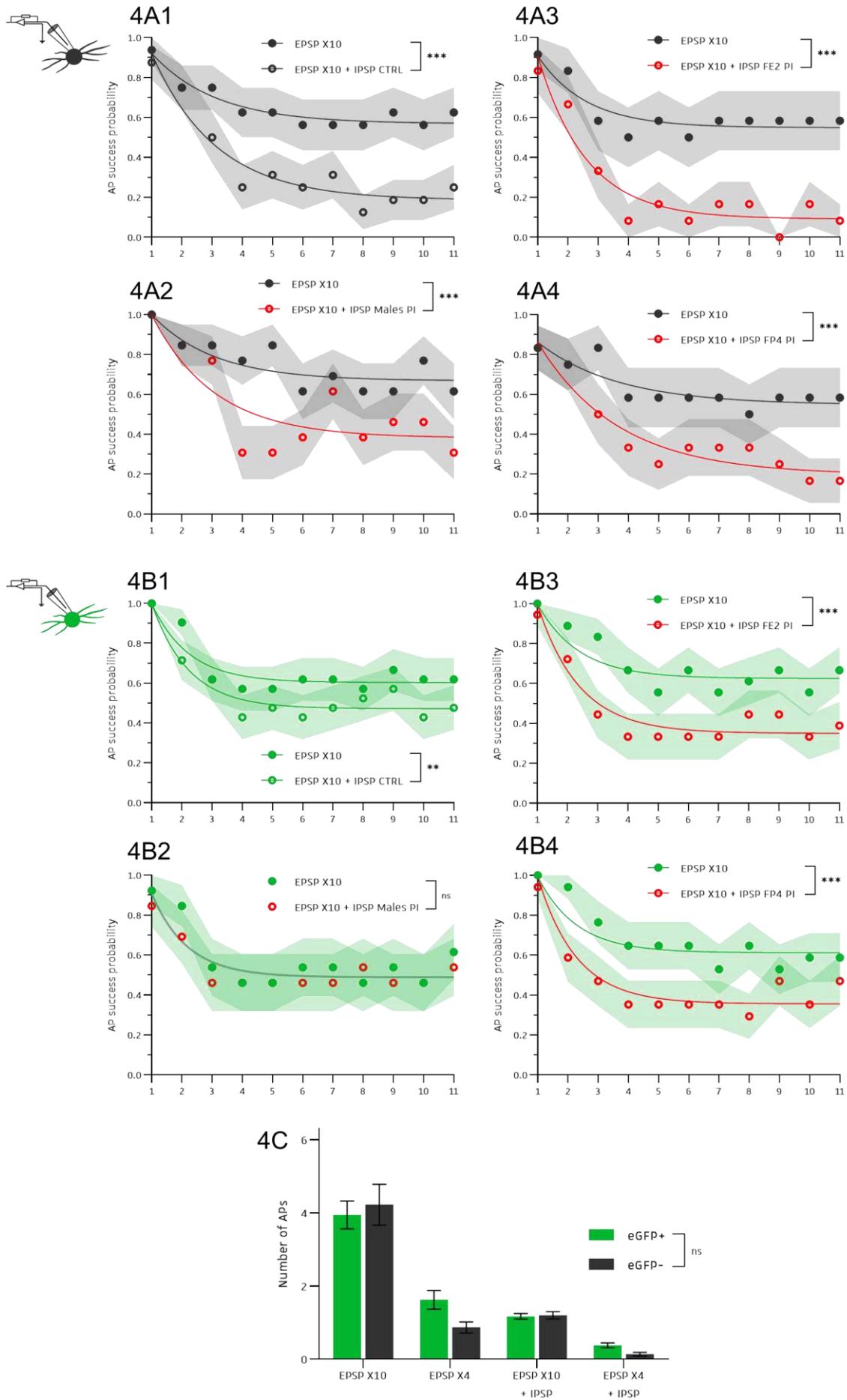
EPSPs and IPSPs were simulated by injecting current traces from eEPSCs and eIPSCs we recorded in previous experiments. The EPSCs traces injected were up scaled to correspond to 10 times or 4 times the average amplitude of individual monosynaptic eEPSCs (EPSC X10 and EPSC X4, respectively). In all conditions, the effect of simulated EPSPs alone or together with simulated IPSPs are illustrated.

**A, B.** Effect of postsynaptic potentials simulated at a frequency of 5 Hz illustrated as the probability of action potential firing for each of the 11 EPSPs of the train. The IPSCs traces injected corresponded to eIPSCs recorded in control conditions (**A1, B1**) or in conditions of PI (**A2-A4, B2-B4**) from males (**A2, B2**), from females in FE2-dominated phases of the estrous cycle (**A3, B3**) or from females in FP4-dominated phases of the estrous cycle (**A4, B4**). Injection of eIPSCs recorded from eGFP- and eGFP+ neurons were performed in the corresponding neurons (in **A** for eGFP- and **B** for eGFP+). Note that simulating IPSPs together with EPSPs reduced the probability of action potential firing, except in eGFP+ neurons injected with IPSCs recorded from males in PI condition, and had only a limited effect in eGFP+ neurons injected with IPSCs recorded in control conditions. Results of nonlinear regressions used to compare conditions are given as ns,  $p \geq 0.05$ ; \*\*\* $p < 0.0001$ . When comparison revealed a significant difference, two exponential fits were illustrated, when comparisons revealed no difference, one single exponential curve fitting all data was illustrated.  $n = 22$  eGFP- and  $n = 25$  eGFP+ neurons. Details of regressions and the corresponding analysis are given in Table 8.

**C,** Effect of postsynaptic potentials simulated at 50 Hz on the average number of action potentials fired during the train. The number of action potentials per train was larger with EPSP X10 than with EPSP X4 and was significantly reduced by adding IPSPs, with no significant difference between eGFP- and eGFP+ neurons ( $n = 22$  and  $n = 25$  respectively, Two-way ANOVA,  $P = 0.5145$ , Table 8).

AP, action potential; eGFP-, enhanced green fluorescent protein negative; eGFP+, enhanced green fluorescent protein positive; EPSC, excitatory postsynaptic current; EPSP, excitatory postsynaptic potential.

Figure 4



**Figure S6. Effect of simulated IPSPs on action potential firing evoked by simulated EPSP X4 at 5 Hz.**

EPSPs and IPSPs were simulated by injecting current traces from eEPSCs and eIPSCs we recorded in previous experiments. The EPSCs traces injected were up scaled to correspond to 4 times the average amplitude of individual monosynaptic eEPSCs (EPSC X4). In all conditions, the effect of simulated EPSPs alone or together with simulated IPSPs are illustrated.

**A, B.** Effect of postsynaptic potentials simulated at a frequency of 5 Hz illustrated as the probability of action potential firing for each of the 11 EPSPs of the train. The IPSCs traces injected corresponded to eIPSCs recorded in control conditions (**A1, B1**) or in conditions of PI (**A2-A4, B2-B4**) from males (**A2, B2**), from females in FE2-dominated phases of the estrous cycle (**A3, B3**) or from females in FP4-dominated phases of the estrous cycle (**A4, B4**). Injection of eIPSCs recorded from eGFP- and eGFP+ neurons were performed in the corresponding neurons (in **A** for eGFP- and **B** for eGFP+).

Note that simulating IPSPs together with EPSP X4 strongly reduced the probability of action potential firing in all conditions. Results of nonlinear regressions used to compare conditions are given as ns,  $p \geq 0.05$ ; \*\*\* $p < 0.0001$ . When comparison revealed a significant difference, two exponential fits were illustrated, when comparisons revealed no difference, one single exponential curve fitting all data was illustrated.  $n = 22$  eGFP- and  $n = 25$  eGFP+ neurons. Details of regressions and the corresponding analysis are given in Table 9.

AP, action potential; eGFP-, enhanced green fluorescent protein negative; eGFP+, enhanced green fluorescent protein positive; EPSC, excitatory postsynaptic current; EPSP, excitatory postsynaptic potential.

**Figure S7. Action potential firing evoked by simulated EPSPs and inhibition of firing by simulated IPSPs at 50 Hz: simulation with eIPSCs recorded from males and females in conditions of PI.**

Effect of postsynaptic potentials simulated at 50 Hz on the average number of action potentials fired during the train. The number of action potentials per train was larger with EPSP X10 than with EPSP X4 and was significantly reduced by adding IPSPs, with no significant difference between eGFP- and eGFP+ neurons ( $n = 22$  and  $n = 25$ , respectively). The effect of eIPSCs traces recorded in neurons from males or from females was not statistically different ( $n = 20$  and  $n = 27$  respectively). See Table 10 for statistical results. AP, action potential; eGFP-, enhanced green fluorescent protein negative; eGFP+, enhanced green fluorescent protein positive; EPSC, excitatory postsynaptic current; EPSP, excitatory postsynaptic potential.

Figure S6

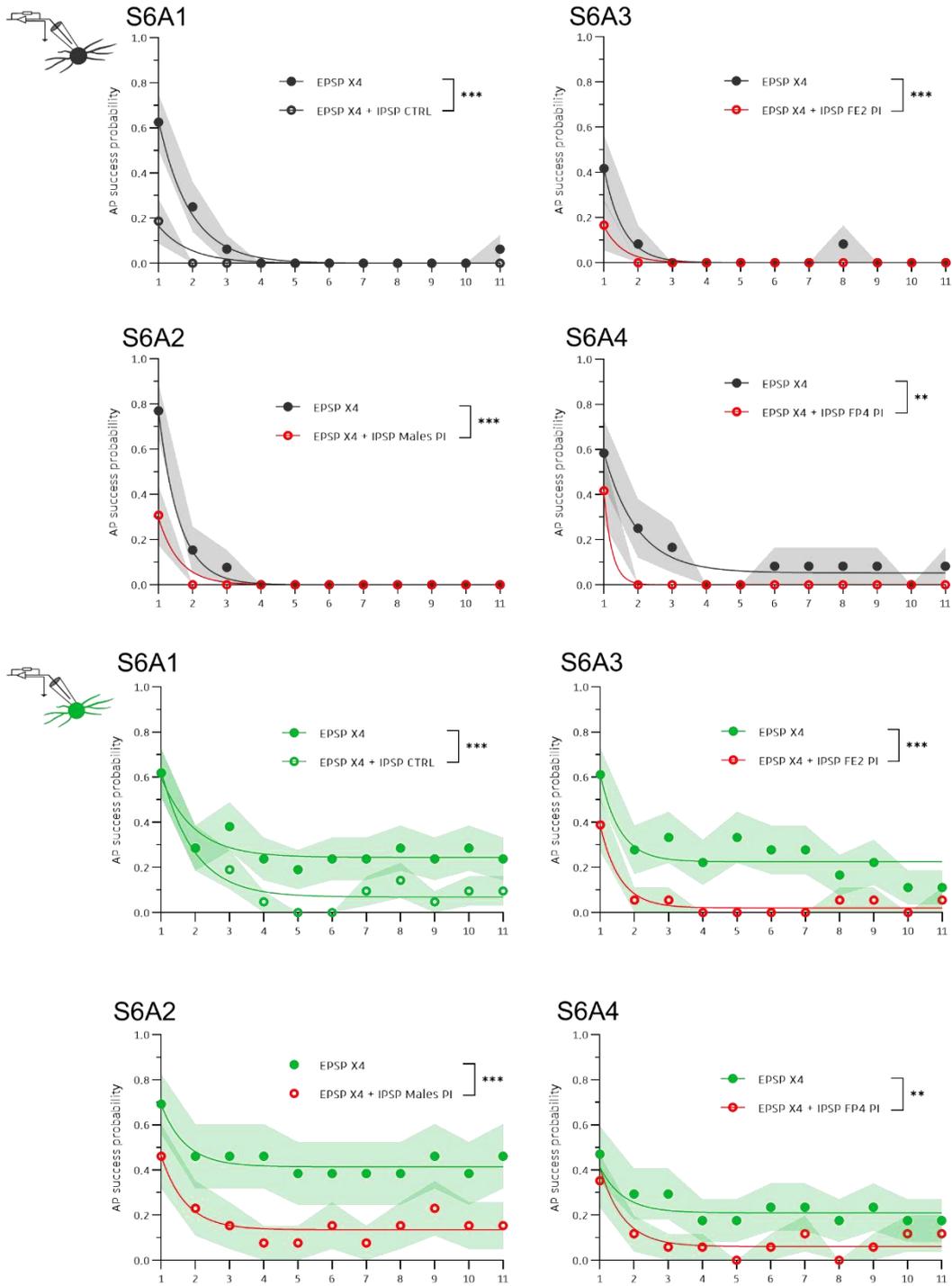
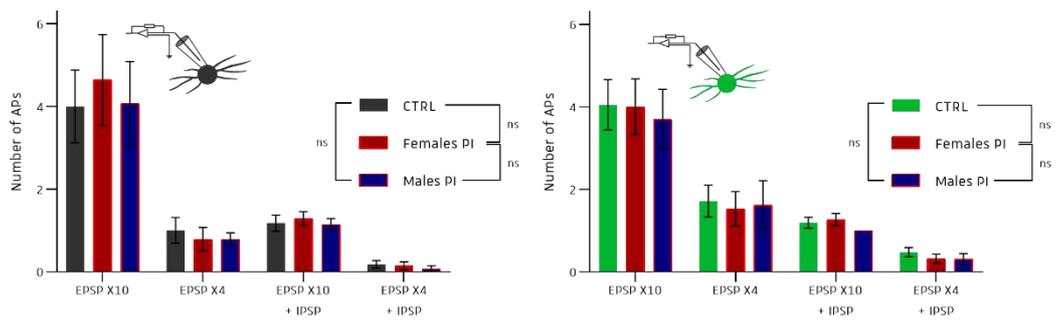


Figure S7



**Figure 5. Variations of short-term plasticity of GABAergic connections during trains at 5 Hz and mechanical thresholds in control and PI conditions as a function of female estrous cycle.**

**A-D.** Amplitudes of eIPSCs during trains at 5 Hz recorded in neurons from females and illustrated Figure S3 are partitioned in two categories after the phase of the estrous cycle of the females at the day experiment. The partition corresponded to grouping of data from proestrus, estrus, metestrus (PEM) in one category and diestrus (D) alone in the second category. Data from males are also illustrated for comparison purpose.

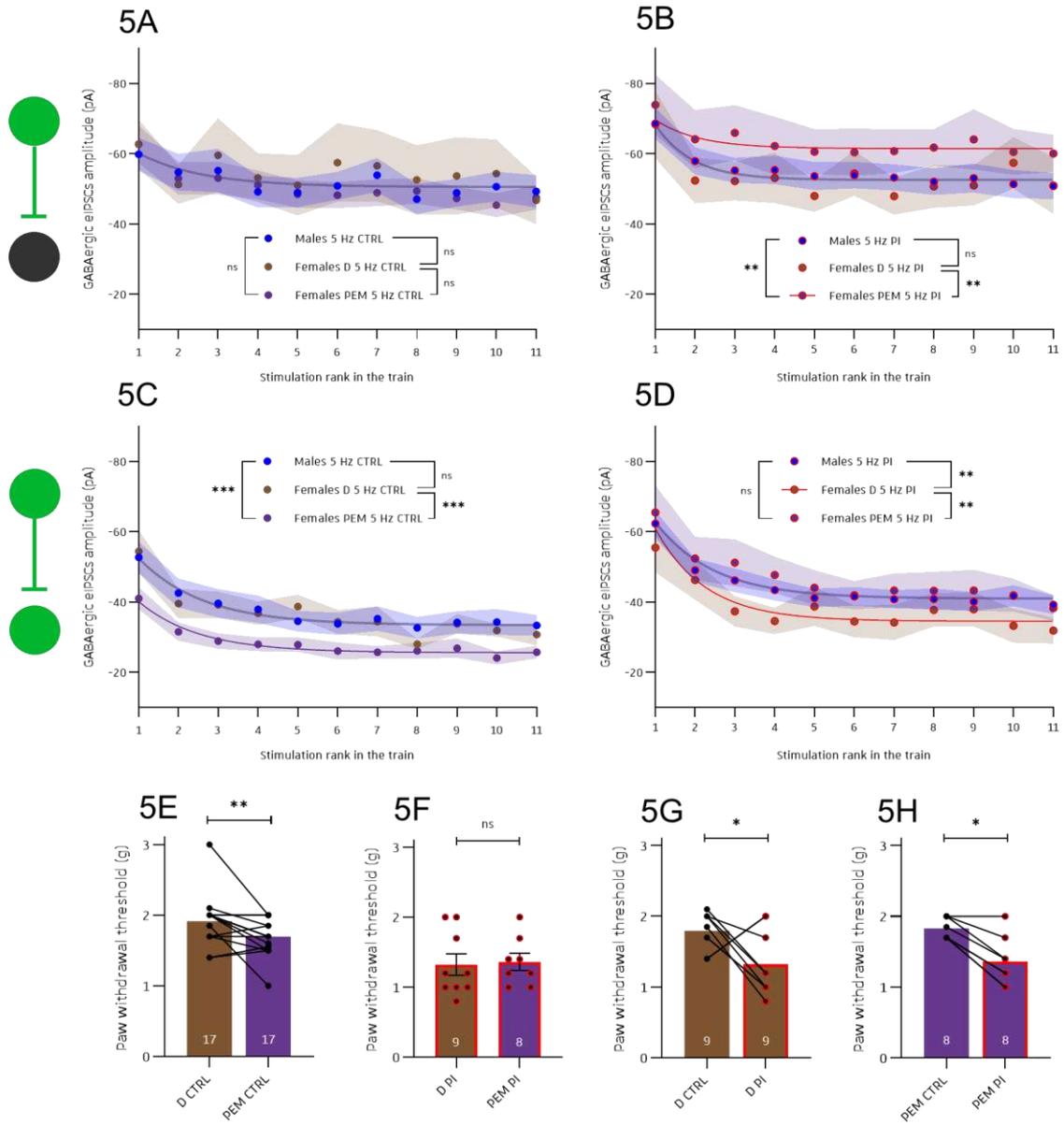
**A.** Average amplitudes of GABAergic eIPSCs recorded in eGFP<sup>-</sup> neurons in control conditions. **B.** same as in **A.** in PI conditions. **C.** Average amplitudes of GABAergic eIPSCs recorded in eGFP<sup>+</sup> neurons in control conditions. **D.** same as in C in conditions of PI.

Results of statistical analysis nonlinear regressions used to compare conditions are given as ns,  $p \geq 0.05$ ; \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.001$ ; \*\*\* $p < 0.0001$ . When comparison revealed a significant difference, two exponential fits were illustrated, when comparisons revealed no difference, one single exponential curve fitting all data was illustrated. In control conditions,  $n_{eGFP^-} = 49$ ,  $n_{eGFP^+} = 48$  in males,  $n_{eGFP^-} = 30$ ,  $n_{eGFP^+} = 24$  in PEM females, and  $n_{eGFP^-} = 18$ ,  $n_{eGFP^+} = 13$  in D females. In conditions of PI,  $n_{eGFP^-} = 67$ ,  $n_{eGFP^+} = 62$  in males,  $n_{eGFP^-} = 24$ ,  $n_{eGFP^+} = 30$  in PEM females, and  $n_{eGFP^-} = 14$ ,  $n_{eGFP^+} = 13$  in D females. Details of regressions and the corresponding analysis are given in Table 11.

**E-H** Mechanical sensitivity evaluated in female mice in control condition (**E**) and 24 h after induction of peripheral inflammation (**F**) by bilateral injection of carrageenan in hindpaws. Thresholds were also compared during control and PI conditions at the same phase category of the cycle, corresponding to D (**G**) and PEM (**H**). Data from GAD65-eGFP ( $n = 7$ ) and C57BL/6 mice ( $n = 10$ ) were pooled for this analysis. Pairwise comparisons from the same mice were used for panels **E**, **G**, **H** respectively whereas unpaired comparisons were used for panel **F** since thresholds in condition of PI have only been tested once per animal. Data are represented as mean $\pm$ SEM and results of statistical analysis are given as ns,  $p \geq 0.05$ ; \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.001$ ; \*\*\* $p < 0.0001$ . Pairwise comparisons were used for panels **E**, **G**, **H** whereas unpaired comparisons were used for panel **F**.

CTRL, basal physiological conditions: eGFP<sup>-</sup>, enhanced green fluorescent protein negative; eGFP<sup>+</sup>, enhanced green fluorescent protein positive; eIPSC, evoked inhibitory postsynaptic current; F, female; M, male; PI peripheral inflammation.

Figure 5



**Figure S8. Variations of short-term plasticity of GABAergic connections during trains at 5 Hz as a function of female estrous cycle: comparisons of control and PI conditions.**

These are the same data as in Figure 5A-D differently organized for comparison purpose. Amplitudes of eIPSCs during trains at 5 Hz recorded in neurons from females and illustrated figure S3 are partitioned in two categories after the phase of the estrous cycle of the females at the day experiment. The partition corresponded to grouping of data from proestrus, estrus, metestrus (PEM) in one category and diestrus (D) alone in the second category.

**A-B.** recordings from eGFP<sup>-</sup> neurons in phase category D (A) and in phase category PEM (B).

**C-D.** recordings from eGFP<sup>+</sup> neurons in phase category D (C) and in phase category PEM (D).

Results of nonlinear regressions used to compare conditions are given as ns,  $p \geq 0.05$ ; \*\*\* $p < 0.0001$ . When comparison revealed a significant difference, two exponential fits were illustrated, when comparisons revealed no difference, one single exponential curve fitting all data was illustrated. In control conditions,  $n_{\text{eGFP}^-} = 30$ ,  $n_{\text{eGFP}^+} = 24$  in PEM females, and  $n_{\text{eGFP}^-} = 18$ ,  $n_{\text{eGFP}^+} = 13$  in D females. In conditions of PI,  $n_{\text{eGFP}^-} = 24$ ,  $n_{\text{eGFP}^+} = 30$  in PEM females, and  $n_{\text{eGFP}^-} = 14$ ,  $n_{\text{eGFP}^+} = 13$  in D females. Details of regressions and the corresponding analysis are given in Table 12.

CTRL, basal physiological conditions: eGFP<sup>-</sup>, enhanced green fluorescent protein negative; eGFP<sup>+</sup>, enhanced green fluorescent protein positive; eIPSC, evoked inhibitory postsynaptic current; F, female; M, male; PI peripheral inflammation.

**Figure S9. Thermal sensitivity in female mice as a function of estrous cycle phase category**

Hot thermal sensitivity was evaluated in female mice in control condition by grouping data from proestrus, estrus, metestrus (PEM) in one category and diestrus (D) alone in the second category. The latency for hindpaw withdrawal in response to hot thermal stimulation was determined using hot plate with a temperature set at 48°C. The latency was not significantly different when mice were in PEM or in D categories ( $p = 0.4375$ , Wilcoxon test).

The number in the histogram bars corresponded to the number of GAD65-eGFP mice assessed. Data are represented as mean. ns,  $p \geq 0.05$ .

Figure S8

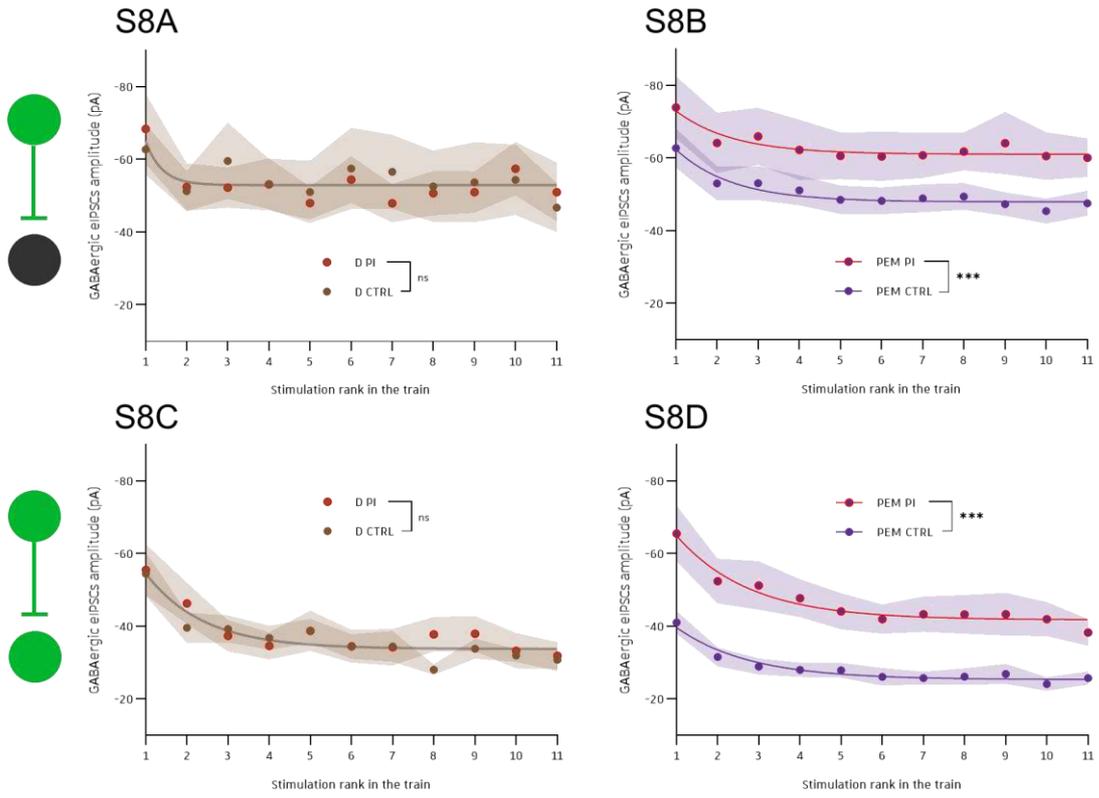
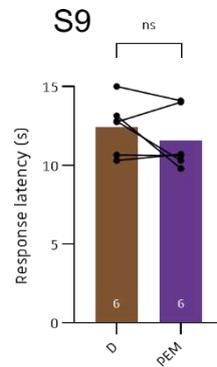


Figure S9



**Table 1** (related to Figure 1)

**Mechanical sensitivity**

Source of Variation	% of total variation	P value	P value summary	Significant?
Interaction	19,48	<0,0001	****	Yes
Sex	12,91	0,0158	*	Yes
Experimental Condition	50,94	<0,0001	****	Yes

ANOVA table	SS	DF	MS	F (DFn, DFd)	P value
Interaction	2,34	1	2,34	F (1, 11) = 58,63	P<0,0001
Sex	1,551	1	1,551	F (1, 11) = 8,120	P=0,0158
Experimental Condition	6,12	1	6,12	F (1, 11) = 153,3	P<0,0001
Residual	0,438	11	0,03991		

Sidak's multiple comparisons test	Predicted (LS) mean diff,	95,00% CI of diff,	Significant?	Summary	Adjusted P Value
<b>CTRL - PI 24h</b>					
Males	1,575	1,277 to 1,873	Yes	****	<0,0001
Females	0,3714	0,09529 to 0,6476	Yes	*	0,0103

Test details	Predicted (LS) mean 1	Predicted (LS) mean 2	Predicted (LS) mean diff,	SE of diff,	N1	N2	t	DF
<b>CTRL - PI 24h</b>								
Males	2,892	1,317	1,575	0,1153	6	6	13,66	11
Females	1,8	1,429	0,3714	0,1068	7	7	3,478	11

**Thermal sensitivity**

Source of Variation	% of total variation	P value	P value summary	Significant?
Interaction	0,939	0,2974	ns	No
Sex	0,0001527	0,9878	ns	No
Experimental Condition	84,41	<0,0001	****	Yes

ANOVA table	SS	DF	MS	F (DFn, DFd)	P value
Interaction	2,76	1	2,76	F (1, 11) = 1,196	P=0,2974
Sex	0,0004487	1	0,0004487	F (1, 11) = 0,0002437	P=0,9878
Experimental Condition	248,1	1	248,1	F (1, 11) = 107,5	P<0,0001
Residual	25,38	11	2,307		

Sidak's multiple comparisons test	Predicted (LS) mean diff,	95,00% CI of diff,	Significant?	Summary	Adjusted P Value
<b>CTRL - PI 24h</b>					
M	6,85	4,582 to 9,118	Yes	****	<0,0001
F	5,543	3,443 to 7,642	Yes	****	<0,0001

Test details	Predicted (LS) mean 1	Predicted (LS) mean 2	Predicted (LS) mean diff,	SE of diff,	N1	N2	t	DF
<b>CTRL - PI 24h</b>								
M	12,62	5,767	6,85	0,8769	6	6	7,812	11
F	11,97	6,429	5,543	0,8119	7	7	6,827	11

**Table 2** (related to Figure S1)

**GAD65<sup>+/+</sup> vs GAD65<sup>-/-</sup> vs ctrl**

Source of Variation	% of total variation	P value	P value summary	Significant?
Strain	1.91	0.001	ns	Yes
Sex	2.56	<0.0001	***	Yes
Experimental Condition	31.52	<0.0001	***	Yes
Strain x Sex	4.12	0.046	**	Yes
Strain x Experimental Condition	0.2917	0.246	ns	No
Sex x Experimental Condition	0.351	<0.0001	***	Yes
Strain x Sex x Experimental Condition	0.283	0.967	ns	No

ANOVA table	SS	df	MS	F (Df1, Df2)	P value
Strain	0.832	1	0.832	F (1, 29) = 4.16	P=0.001
Sex	1.11	1	1.11	F (1, 29) = 5.13	P<0.001
Experimental Condition	13.36	1	13.36	F (1, 29) = 60.25	P<0.001
Strain x Sex	1.817	1	1.817	F (1, 29) = 8.327	P=0.006
Strain x Experimental Condition	0.2917	1	0.2917	F (1, 29) = 1.339	P=0.256
Sex x Experimental Condition	4.29	1	4.29	F (1, 29) = 20.22	P<0.001
Strain x Sex x Experimental Condition	0.1922	1	0.1922	F (1, 29) = 0.901	P=0.337
Residual	4.198	29	0.145		

**GAD65<sup>+/+</sup> vs GAD65<sup>-/-</sup> vs ctrl**

Source of Variation	% of total variation	P value	P value summary	Significant?
Strain	2.81	0.076	ns	No
Sex	11.96	0.005	**	Yes
Experimental Condition	26.17	<0.0001	***	Yes
Strain x Sex	4.87	0.003	**	Yes
Strain x Experimental Condition	0.851	0.208	ns	No
Sex x Experimental Condition	0.769	0.015	**	Yes
Strain x Sex x Experimental Condition	1.81	0.021	**	Yes

ANOVA table	SS	df	MS	F (Df1, Df2)	P value
Strain	0.814	1	0.814	F (1, 29) = 3.57	P=0.076
Sex	2.27	1	2.27	F (1, 29) = 10.37	P=0.003
Experimental Condition	18.33	1	18.33	F (1, 29) = 87.71	P<0.001
Strain x Sex	1.938	1	1.938	F (1, 29) = 8.029	P=0.007
Strain x Experimental Condition	0.767	1	0.767	F (1, 29) = 3.171	P=0.083
Sex x Experimental Condition	0.5859	1	0.5859	F (1, 29) = 2.427	P=0.123
Strain x Sex x Experimental Condition	0.313	1	0.313	F (1, 29) = 1.277	P=0.262
Residual	3.96	29	0.137		

Tukey's multiple comparisons test	Predicted (LS) mean diff.	95.00% CI of diff.	Significant?	Summary	Adjusted P Value
GAD65 <sup>+/+</sup> vs GAD65 <sup>-/-</sup> P12h	1.025	0.8284 to 1.221	Yes	***	<0.001
GAD65 <sup>+/+</sup> vs GAD65 <sup>-/-</sup> P24h	1.002	0.7955 to 1.403	Yes	***	0.003
GAD65 <sup>+/+</sup> vs GAD65 <sup>-/-</sup> P48h	1.463	1.180 to 1.90	Yes	***	<0.001
GAD65 <sup>+/+</sup> vs CSF P12h	0.4423	1.18 to 0.2916	No	ns	0.449
GAD65 <sup>+/+</sup> vs CSF P24h	0.9077	0.587 to 1.527	Yes	**	0.001
GAD65 <sup>+/+</sup> vs CSF P48h	1.177	0.907 to 1.652	Yes	***	<0.001
GAD65 <sup>+/+</sup> vs CSF P12h	1.02	0.5967 to 1.242	Yes	***	<0.001
GAD65 <sup>+/+</sup> vs CSF P24h	0.4423	1.23 to 0.2486	No	ns	0.449
GAD65 <sup>+/+</sup> vs CSF P48h	0.7179	0.436 to 0.912	Yes	**	0.003
GAD65 <sup>-/-</sup> vs GAD65 <sup>+/+</sup> P12h	-0.1119	-0.305 to -0.1183	Yes	***	<0.001
GAD65 <sup>-/-</sup> vs GAD65 <sup>+/+</sup> P24h	-2.916	-2.653 to -3.183	Yes	***	<0.001
GAD65 <sup>-/-</sup> vs GAD65 <sup>+/+</sup> P48h	-4.7123	-4.385 to -5.041	Yes	***	<0.001
GAD65 <sup>-/-</sup> vs CSF P12h	-0.7865	-1.077 to -0.2955	Yes	**	0.003
GAD65 <sup>-/-</sup> vs CSF P24h	0.2081	0.882 to 0.1718	No	ns	0.929
GAD65 <sup>-/-</sup> vs CSF P48h	0.3714	-0.291 to 1.038	No	ns	0.402
GAD65 <sup>-/-</sup> vs CSF P12h	-1.337	-1.755 to -0.899	Yes	***	<0.001
GAD65 <sup>-/-</sup> vs CSF P24h	-0.23	-0.811 to 0.341	No	ns	0.581
GAD65 <sup>-/-</sup> vs CSF P48h	0.985	-0.651 to 0.221	No	ns	0.969
GAD65 <sup>-/-</sup> vs CSF P12h	0.02	-0.141 to 0.184	No	ns	0.209
GAD65 <sup>-/-</sup> vs CSF P24h	-0.385	1.016 to 1.017	Yes	***	<0.001
GAD65 <sup>-/-</sup> vs CSF P48h	-0.094	-1.281 to 0.028	No	ns	0.605
GAD65 <sup>-/-</sup> vs CSF P12h	-0.384	-0.905 to 0.137	No	ns	0.664
GAD65 <sup>-/-</sup> vs CSF P24h	-0.1468	-0.488 to 0.207	No	ns	0.969
GAD65 <sup>-/-</sup> vs CSF P48h	1.305	0.787 to 1.829	Yes	***	<0.001
CSF P12h vs CSF P24h	1.02	0.68 to 1.245	Yes	***	<0.001
CSF P24h vs CSF P48h	2.655	1.409 to 3.540	Yes	***	<0.001
CSF P12h vs CSF P48h	0.316	-0.268 to 0.896	No	ns	0.603
CSF P24h vs CSF P48h	0.19	0.1955 to 1.235	Yes	**	0.008
CSF P12h vs CSF P24h	0.336	-0.182 to 0.850	No	ns	0.213

Tukey's multiple comparisons test	Predicted (LS) mean diff.	95.00% CI of diff.	Significant?	Summary	Adjusted P Value
GAD65 <sup>+/+</sup> vs GAD65 <sup>-/-</sup> P12h	-0.267	-0.568 to 0.045	No	ns	0.516
GAD65 <sup>+/+</sup> vs GAD65 <sup>-/-</sup> P24h	0.263	-0.036 to 0.573	No	ns	0.692
GAD65 <sup>+/+</sup> vs GAD65 <sup>-/-</sup> P48h	-0.789	-1.029 to -0.289	No	ns	0.472
GAD65 <sup>+/+</sup> vs CSF P12h	-0.27	-0.639 to 0.103	No	ns	0.849
GAD65 <sup>+/+</sup> vs CSF P24h	0.68	1.01 to 0.357	Yes	**	0.005
GAD65 <sup>+/+</sup> vs CSF P48h	0.27	-0.236 to 0.630	No	ns	0.581
GAD65 <sup>-/-</sup> vs CSF P12h	-0.23	-0.443 to 0.030	No	ns	0.595
GAD65 <sup>-/-</sup> vs CSF P24h	0.005	0.176 to 0.239	No	ns	0.958
GAD65 <sup>-/-</sup> vs CSF P48h	0.119	0.174 to 0.068	No	ns	0.958
GAD65 <sup>-/-</sup> vs CSF P12h	0.087	-0.554 to 0.657	No	ns	<0.001
GAD65 <sup>-/-</sup> vs CSF P24h	-0.713	-1.155 to -0.393	Yes	**	0.012
GAD65 <sup>-/-</sup> vs CSF P48h	0.837	0.402 to 1.28	Yes	**	0.006
GAD65 <sup>-/-</sup> vs CSF P12h	0.087	-0.784 to 0.607	No	ns	<0.001
GAD65 <sup>-/-</sup> vs CSF P24h	-0.274	-1.28 to -0.039	Yes	**	0.004
GAD65 <sup>-/-</sup> vs CSF P48h	-0.536	-1.03 to -0.279	No	ns	0.158
GAD65 <sup>-/-</sup> vs CSF P12h	-1.273	-1.88 to -0.658	Yes	***	<0.001
GAD65 <sup>-/-</sup> vs CSF P24h	0.0714	-0.629 to 0.862	No	ns	0.959
GAD65 <sup>-/-</sup> vs CSF P48h	0.029	1.158 to 0.078	No	ns	0.124
GAD65 <sup>-/-</sup> vs CSF P12h	0.106	0.455 to 0.758	No	ns	0.369
GAD65 <sup>-/-</sup> vs CSF P24h	-0.094	-1.16 to -0.029	Yes	**	0.001
GAD65 <sup>-/-</sup> vs CSF P48h	0.789	0.155 to 1.35	Yes	**	0.029
GAD65 <sup>-/-</sup> vs CSF P12h	0.469	0.483 to 0.456	No	ns	0.968
GAD65 <sup>-/-</sup> vs CSF P24h	0.76	1.201 to 0.749	Yes	**	0.018
GAD65 <sup>-/-</sup> vs CSF P48h	1.02	0.629 to 1.41	Yes	**	0.018
CSF P12h vs CSF P24h	-0.31	-0.549 to -0.073	No	ns	<0.001
CSF P24h vs CSF P48h	1.33	0.891 to 1.88	Yes	***	<0.001
CSF P12h vs CSF P48h	0.79	0.291 to 1.29	Yes	**	0.001
CSF P24h vs CSF P48h	0.6	-1.141 to 0.082	No	ns	0.076

Test details	Predicted (LS) mean 1	Predicted (LS) mean 2	Predicted (LS) mean diff.	SE of diff.	NI	NO
GAD65 <sup>+/+</sup> vs GAD65 <sup>-/-</sup> P12h	2.802	1.217	1.585	0.1254	8	8
GAD65 <sup>+/+</sup> vs GAD65 <sup>-/-</sup> P24h	2.802	1.8	1.002	0.2313	6	7
GAD65 <sup>+/+</sup> vs GAD65 <sup>-/-</sup> P48h	2.802	1.426	1.405	0.2313	6	7
GAD65 <sup>+/+</sup> vs CSF P12h	2.802	3.539	-0.737	0.1192	4	10
GAD65 <sup>+/+</sup> vs CSF P24h	2.802	3.23	-0.428	0.2142	6	10
GAD65 <sup>+/+</sup> vs CSF P48h	2.802	1.716	1.077	0.1147	6	10
GAD65 <sup>-/-</sup> vs CSF P12h	2.802	1.28	1.522	0.1142	6	10
GAD65 <sup>-/-</sup> vs CSF P24h	1.917	1.8	0.117	0.2313	6	7
GAD65 <sup>-/-</sup> vs CSF P48h	1.917	1.426	0.491	0.2313	6	7
GAD65 <sup>-/-</sup> vs CSF P12h	1.917	2.228	-0.311	0.1142	6	10
GAD65 <sup>-/-</sup> vs CSF P24h	1.917	3.23	-1.313	0.1142	6	10
GAD65 <sup>-/-</sup> vs CSF P48h	1.917	1.716	0.201	0.2313	6	10
GAD65 <sup>-/-</sup> vs CSF P12h	1.917	1.28	0.637	0.1142	6	10
GAD65 <sup>-/-</sup> vs CSF P24h	1.8	1.426	0.374	0.2313	7	7
GAD65 <sup>-/-</sup> vs CSF P48h	1.8	3.539	-1.739	0.2313	7	10
GAD65 <sup>-/-</sup> vs CSF P12h	1.8	3.23	-1.43	0.2313	7	10
GAD65 <sup>-/-</sup> vs CSF P24h	1.8	1.716	0.086	0.2313	7	10
GAD65 <sup>-/-</sup> vs CSF P48h	1.8	1.28	0.52	0.2313	7	10
GAD65 <sup>-/-</sup> vs CSF P12h	1.429	3.23	-1.801	0.2313	7	10
GAD65 <sup>-/-</sup> vs CSF P24h	1.429	1.28	0.149	0.2313	7	10
GAD65 <sup>-/-</sup> vs CSF P48h	1.429	3.539	-2.11	0.2313	7	10
CSF P12h vs CSF P24h	3.336	3.23	0.106	0.2313	10	10
CSF P24h vs CSF P48h	3.336	1.716	1.62	0.2313	10	10
CSF P12h vs CSF P48h	3.336	1.28	2.056	0.2313	10	10
CSF P24h vs CSF P48h	3.23	1.716	1.514	0.2313	10	10
CSF P12h vs CSF P24h	3.23	1.28	1.95	0.2313	10	10
CSF P24h vs CSF P48h	1.716	1.28	0.438	0.2313	10	10

Test details	Predicted (LS) mean 1	Predicted (LS) mean 2	Predicted (LS) mean diff.	SE of diff.	NI	NO	df
GAD65 <sup>+/+</sup> vs GAD65 <sup>-/-</sup> P12h	1.03	1.217	-0.187	0.234	8	8	1182
GAD65 <sup>+/+</sup> vs GAD65 <sup>-/-</sup> P24h	0.253	0.2571	-0.004	0.231	6	7	1512
GAD65 <sup>+/+</sup> vs GAD65 <sup>-/-</sup> P48h	1.429	-0.366	1.795	0.231	6	7	2549
GAD65 <sup>+/+</sup> vs CSF P12h	1.03	3.194	-2.164	0.194	4	10	1388
GAD65 <sup>+/+</sup> vs CSF P24h	1.03	2.92	-1.89	0.194	6	10	7199
GAD65 <sup>+/+</sup> vs CSF P48h	1.03	1.716	-0.686	0.194	6	10	2486
GAD65 <sup>-/-</sup> vs CSF P12h	1.03	1.28	0.25	0.194	6	10	1469
GAD65 <sup>-/-</sup> vs CSF P24h	1.03	3.23	-2.2	0.194	6	10	7187
GAD65 <sup>-/-</sup> vs CSF P48h	1.03	1.426	-0.393	0.231	6	7	0.243
GAD65 <sup>-/-</sup> vs CSF P12h	1.03	2.228	-1.198	0.194	6	10	0.248
GAD65 <sup>-/-</sup> vs CSF P24h	1.03	3.23	-2.2	0.194	6	10	0.174
GAD65 <sup>-/-</sup> vs CSF P48h	1.03	1.716	-0.686	0.231	6	10	0.018
GAD65 <sup>-/-</sup> vs CSF P12h	1.03	1.28	0.25	0.194	6	10	0.959
GAD65 <sup>-/-</sup> vs CSF P24h	0.2571	1.429	-1.172	0.231	7	7	4.782
GAD65 <sup>-/-</sup> vs CSF P48h	0.2571	3.539	-3.282	0.231	7	10	2.896
GAD65 <sup>-/-</sup> vs CSF P12h	0.2571	3.23	-2.973	0.231	7	10	0.863
GAD65 <sup>-/-</sup> vs CSF P24h	0.2571	1.716	-1.459	0.231	7	10	0.411
GAD65 <sup>-/-</sup> vs CSF P48h	0.2571	1.28	0.964	0.231	7	10	0.693
GAD65 <sup>-/-</sup> vs CSF P12h	0.2571	2.228	-1.971	0.194	6	10	0.018
GAD65 <sup>-/-</sup> vs CSF P24h	0.2571	3.23	-2.973	0.194	6	10	0.018
GAD65 <sup>-/-</sup> vs CSF P48h	0.2571	1.716	-1.459	0.231	6	10	0.018
GAD65 <sup>-/-</sup> vs CSF P12h	0.2571	1.28	0.964	0.194			

**Table 3** (related to Figure 2)

Fig. 2B 5 Hz		N Neurons	Y0	Plateau	K	HalfLife	Tau	Span	Degrees of Freedom	R squared	Sum of Squares	AICc
Null hypothesis	Y0 same for all data sets	49	-49.31	-51.1	0.8329	1.036	1.58	-8.202	1232	0.02934	3.9467	8891
Alternative hypothesis	Y0 different for each data set	5 Hz CTRL	67	-47.88	-51.1	0.8329	1.036	1.58	-8.202	0.01972	73307	8891
P value	<b>0.0054</b>	5 Hz PI	110	-48.59	-51.32	0.7268	0.9538	1.376	-13.28	0.01511	128957	8832
Difference in AICc	<b>0.0833</b>	Shared										
Conclusion (alpha = 0.05)	Do not reject null hypothesis											
Preferred model	Y0 same for all data sets											
F (DFA, DFD)	2.018 (1, 1227)											
Constraints	K & Plateau are shared											
Fig. 2B 50 Hz SUM		N Neurons	Y0	Plateau	K	HalfLife	Tau	Span	Degrees of Freedom	R squared	Sum of Squares	AICc
Null hypothesis	2 parameters same for all data sets	50 Hz SUM CTRL	22	-58.89	-141.1	0.3693	1.877	2.708	81.41	0.135	92758	4818
Alternative hypothesis	2 parameters different for each data set	60 Hz SUM PI	30	77.85	-163.1	0.3693	1.877	2.708	85.15	0.1192	16123.9	4818
P value	<b>0.0912</b>	Shared	52	-32.08	-153.0	0.3698	1.88	2.712	120.0	0.1216	2001347	4826
Difference in AICc	<b>0.055</b>											
Conclusion (alpha = 0.05)	Reject null hypothesis											
Preferred model	2 parameters different for each data set											
F (DFA, DFD)	6.836 (2, 507)											
Constraints	K is shared											
Fig. 2C 5 Hz		N Neurons	Y0	Plateau	K	HalfLife	Tau	Span	Degrees of Freedom	R squared	Sum of Squares	AICc
Null hypothesis	Plateau same for all data sets	5 Hz CTRL	40	-48.29	-50.88	0.8329	0.8424	1.215	-15.44	0.04488	31934	7917
Alternative hypothesis	Plateau different for each data set	5 Hz PI	80	-48.29	-57.34	0.8329	0.8424	1.215	-8.948	0.01572	49678	7917
P value	<b>0.0021</b>	Shared	100	-66.3	-53.46	0.8271	0.838	1.269	-12.85	0.01512	102622	7524
Difference in AICc	<b>7.467</b>											
Conclusion (alpha = 0.05)	Reject null hypothesis											
Preferred model	Plateau different for each data set											
F (DFA, DFD)	9.491 (1, 1036)											
Constraints	Y0 & K are shared											
Fig. 2C 50 Hz SUM		N Neurons	Y0	Plateau	K	HalfLife	Tau	Span	Degrees of Freedom	R squared	Sum of Squares	AICc
Null hypothesis	Y0 same for all data sets	50 Hz SUM CTRL	24	65.76	-149	0.3313	2.092	3.018	83.22	0.06355	259975	3803
Alternative hypothesis	Y0 different for each data set	50 Hz SUM PI	16	-72.49	-189	0.3313	2.092	3.018	76.49	0.1005	172515	3803
P value	<b>0.7312</b>	Shared	40	-48.61	-149.2	0.3276	2.116	3.053	80.61	0.07596	328302	3833
Difference in AICc	<b>-1.937</b>											
Conclusion (alpha = 0.05)	Do not reject null hypothesis											
Preferred model	Y0 same for all data sets											
F (DFA, DFD)	0.1101 (1, 436)											
Constraints	K & Plateau are shared											
Fig. 2D 5 Hz		N Neurons	Y0	Plateau	K	HalfLife	Tau	Span	Degrees of Freedom	R squared	Sum of Squares	AICc
Null hypothesis	2 parameters same for all data sets	5 Hz CTRL	40	-47.88	-30.73	0.7166	0.9672	1.395	-19.81	0.05032	33655	7848
Alternative hypothesis	2 parameters different for each data set	5 Hz PI	62	-61.72	-40.51	0.7166	0.9672	1.395	-21.21	0.07027	33655	7848
P value	<b>&lt;0.0001</b>	Shared	110	-57.81	-32.69	0.7119	0.9706	1.405	-20.15	0.05691	69037	7873
Difference in AICc	<b>21.4</b>											
Conclusion (alpha = 0.05)	Reject null hypothesis											
Preferred model	2 parameters different for each data set											
F (DFA, DFD)	12.88 (2, 1265)											
Constraints	K is shared											
Fig. 2D 50 Hz SUM		N Neurons	Y0	Plateau	K	HalfLife	Tau	Span	Degrees of Freedom	R squared	Sum of Squares	AICc
Null hypothesis	2 parameters same for all data sets	50 Hz SUM CTRL	18	-80.77	-108.3	0.4865	1.425	2.056	49.58	0.1853	33659	3671
Alternative hypothesis	2 parameters different for each data set	60 Hz SUM PI	23	-89.64	-140.1	0.4865	1.425	2.056	50.44	0.04932	112802	3671
P value	<b>&lt;0.0001</b>	Shared	41	-76.12	-126.2	0.4849	1.429	2.062	50.05	0.05883	101574	3693
Difference in AICc	<b>27.86</b>											
Conclusion (alpha = 0.05)	Reject null hypothesis											
Preferred model	2 parameters different for each data set											
F (DFA, DFD)	16.38 (2, 436)											
Constraints	K is shared											
Fig. 2E 5 Hz		N Neurons	Y0	Plateau	K	HalfLife	Tau	Span	Degrees of Freedom	R squared	Sum of Squares	AICc
Null hypothesis	2 parameters same for all data sets	5 Hz CTRL	50	-47.88	-30.73	0.8066	1.143	1.649	-19.78	0.1006	33822	8281
Alternative hypothesis	2 parameters different for each data set	5 Hz PI	43	-42.13	-39.89	0.8066	1.143	1.649	-22.44	0.0694	33521	8281
P value	<b>&lt;0.0001</b>	Shared	90	-64.32	-34.92	0.8109	1.135	1.637	-18.4	0.08873	40182	8305
Difference in AICc	<b>60.61</b>											
Conclusion (alpha = 0.05)	Reject null hypothesis											
Preferred model	2 parameters different for each data set											
F (DFA, DFD)	20.45 (1, 1079)											
Constraints	K is shared											
Fig. 2E 50 Hz SUM		N Neurons	Y0	Plateau	K	HalfLife	Tau	Span	Degrees of Freedom	R squared	Sum of Squares	AICc
Null hypothesis	Plateau same for all data sets	50 Hz SUM CTRL	15	-53.69	-119.3	0.4234	1.637	2.362	65.64	0.1138	54943	2475
Alternative hypothesis	Plateau different for each data set	60 Hz SUM PI	13	-53.68	-125.1	0.4234	1.637	2.362	71.41	0.1387	30951	2475
P value	<b>0.6641</b>	Shared	28	53.73	-122.1	0.4218	1.643	2.371	66.32	0.1245	92019	2473
Difference in AICc	<b>-1.623</b>											
Conclusion (alpha = 0.05)	Do not reject null hypothesis											
Preferred model	Plateau same for all data sets											
F (DFA, DFD)	0.5375 (1, 304)											
Constraints	Y0 & K are shared											
Fig. 2F 4 Hz		N Neurons	Y0	Plateau	K	HalfLife	Tau	Span	Degrees of Freedom	R squared	Sum of Squares	AICc
Null hypothesis	Plateau same for all data sets	5 Hz CTRL	97	-8.516	-15.97	0.7219	0.9802	1.385	8.298	0.03808	17624	12451
Alternative hypothesis	Plateau different for each data set	5 Hz PI	170	-8.578	-17.76	0.7219	0.9802	1.385	5.185	0.02103	12511	12451
P value	<b>&lt;0.0001</b>	Shared	226	-6.915	-13.55	0.658	0.9531	1.433	6.537	0.0271	378459	12501
Difference in AICc	<b>80.33</b>											
Conclusion (alpha = 0.05)	Reject null hypothesis											
Preferred model	Plateau different for each data set											
F (DFA, DFD)	52.41 (1, 2482)											
Constraints	Y0 & K are shared											
Fig. 2F 40 Hz SUM		N Neurons	Y0	Plateau	K	HalfLife	Tau	Span	Degrees of Freedom	R squared	Sum of Squares	AICc
Null hypothesis	2 parameters same for all data sets	50 Hz SUM CTRL	40	0.8849	-33.21	0.2524	2.747	3.963	32.33	0.08449	49576	7221
Alternative hypothesis	2 parameters different for each data set	60 Hz SUM PI	53	13.04	-24.63	0.2524	2.747	3.963	37.67	0.08179	79515	7221
P value	<b>&lt;0.0001</b>	Shared	90	7.168	-28.03	0.2581	2.686	3.878	35.22	0.0805	125640	7221
Difference in AICc	<b>29.79</b>											
Conclusion (alpha = 0.05)	Reject null hypothesis											
Preferred model	2 parameters different for each data set											
F (DFA, DFD)	12.51 (2, 1018)											
Constraints	K is shared											
Fig. 2G 5 Hz		N Neurons	Y0	Plateau	K	HalfLife	Tau	Span	Degrees of Freedom	R squared	Sum of Squares	AICc
Null hypothesis	2 parameters same for all data sets	5 Hz CTRL	95	-0.805	-15.29	0.725	0.9561	1.279	5.488	0.02903	70163	8419
Alternative hypothesis	2 parameters different for each data set	5 Hz PI	83	-0.805	-24.53	0.1008	6.83	0.925	14.73	0.05204	18839	8419
P value	<b>0.0088</b>	Shared	178	0.915	-17.31	0.2854	2.429	3.694	7.396	0.03688	24067	8427
Difference in AICc	<b>11.14</b>											
Conclusion (alpha = 0.05)	Reject null hypothesis											
Preferred model	2 parameters different for each data set											
F (DFA, DFD)	7.592 (2, 1053)											
Constraints	Y0 is shared											
Fig. 2G 50 Hz SUM		N Neurons	Y0	Plateau	K	HalfLife	Tau	Span	Degrees of Freedom	R squared	Sum of Squares	AICc
Null hypothesis	Plateau same for all data sets	50 Hz SUM CTRL	30	-13.52	-51.7	0.05445	12.73	18.36	38.18	0.01365	32049	6819
Alternative hypothesis	Plateau different for each data set	60 Hz SUM PI	29	-13.52	-26.09	0.05445	12.73	18.36	12.57	0.00611	40840	6819
P value	<b>0.0319</b>	Shared	68	-13.36	-35.53	0.07274	0.929	13.75	22.17	0.007242	134307	6813
Difference in AICc	<b>2.80</b>											
Conclusion (alpha = 0.05)	Reject null hypothesis											
Preferred model	Plateau different for each data set											
F (DFA, DFD)	4.029 (1, 744)											
Constraints	Y0 & K are shared											

**Table 4** (related to Figure S3)

<b>Fig. S3A 5 Hz</b>													
Null hypothesis	K same for all data sets	<b>M CTRL 5 Hz</b>	N Neurons	Y0	Plateau	K	Half Life	Tau	Span	Degrees of Freedom	R squared	Sum of Squares	AICc
Alternative hypothesis	K different for each data set	<b>F CTRL 5 Hz</b>	49	-61.22	-49.73	0.666	1.04	1.5	-11.5	1196	0.009015	548882	<b>8235</b>
P value	<b>0.486</b>	<b>Shared</b>	69	-61.22	-49.73	0.387	1.793	2.69	-11.5		0.01501	862885	
Difference in AICc	<b>-1.53</b>		109	-61.39	-49.99	0.542	1.279	1.85	-11.4	1196	0.01218	1142931	8233
Conclusion (alpha = 0.05)	Do not reject null hypothesis												
Preferred model	<b>K same for all data sets</b>												
F (DFn, DFd)	0.4857 (1, 1195)												
Constraints	<b>Y0 &amp; Plateau are shared</b>												
<b>Fig. S3A 50 Hz SUM</b>													
Null hypothesis	Plateau same for all data sets	<b>M CTRL 50 Hz SUM</b>	N Neurons	Y0	Plateau	K	Half Life	Tau	Span	Degrees of Freedom	R squared	Sum of Squares	AICc
Alternative hypothesis	Plateau different for each data set	<b>F CTRL 50 Hz SUM</b>	22	-63.28	-143.4	0.323	2.144	3.09	80.2	502	0.135	927815	<b>4485</b>
P value	<b>0.4024</b>	<b>Shared</b>	24	-63.28	-151.8	0.323	2.144	3.09	88.6		0.06371	2579548	
Difference in AICc	<b>-1.333</b>		46	-63.28	-147.8	0.323	2.145	3.09	84.6	503	0.08357	3512270	4484
Conclusion (alpha = 0.05)	Do not reject null hypothesis												
Preferred model	<b>Plateau same for all data sets</b>												
F (DFn, DFd)	0.7024 (1, 502)												
Constraints	<b>Y0 &amp; K are shared</b>												
<b>Fig. S3B 5 Hz</b>													
Null hypothesis	Plateau same for all data sets	<b>M PI 5 Hz</b>	N Neurons	Y0	Plateau	K	Half Life	Tau	Span	Degrees of Freedom	R squared	Sum of Squares	AICc
Alternative hypothesis	Plateau different for each data set	<b>F PI 5 Hz</b>	87	-69.42	-52.75	1.001	0.6924	1	-16.7	1173	0.02953	739007	<b>8113</b>
P value	<b>0.0273</b>	<b>Shared</b>	40	-69.42	-57.36	1.001	0.6924	1	-12.1		0.01903	416657	
Difference in AICc	<b>2.871</b>		107	-69.45	-54.49	1.016	0.6826	0.98	-15	1174	0.01887	1154449	8116
Conclusion (alpha = 0.05)	Reject null hypothesis												
Preferred model	<b>Plateau different for each data set</b>												
F (DFn, DFd)	4.882 (1, 1173)												
Constraints	<b>Y0 &amp; K are shared</b>												
<b>Fig. S3B 50 Hz SUM</b>													
Null hypothesis	Plateau same for all data sets	<b>M PI 50 Hz SUM</b>	N Neurons	Y0	Plateau	K	Half Life	Tau	Span	Degrees of Freedom	R squared	Sum of Squares	AICc
Alternative hypothesis	Plateau different for each data set	<b>F PI 50 Hz SUM</b>	30	-75.66	-162.6	0.384	1.804	2.6	87	502	0.1161	1612418	<b>4277</b>
P value	<b>0.016</b>	<b>Shared</b>	48	-75.66	-142.9	0.384	1.804	2.6	67.3		0.1011	712009	
Difference in AICc	<b>3.814</b>		88	-75.82	-156	0.38	1.824	2.63	80.2	503	0.1113	2351473	4281
Conclusion (alpha = 0.05)	Reject null hypothesis												
Preferred model	<b>Plateau different for each data set</b>												
F (DFn, DFd)	5.841 (1, 502)												
Constraints	<b>Y0 &amp; K are shared</b>												
<b>Fig. S3C 5 Hz</b>													
Null hypothesis	Plateau same for all data sets	<b>M CTRL 5 Hz</b>	N Neurons	Y0	Plateau	K	Half Life	Tau	Span	Degrees of Freedom	R squared	Sum of Squares	AICc
Alternative hypothesis	Plateau different for each data set	<b>F CTRL 5 Hz</b>	48	-50.13	-34.07	0.65	1.087	1.54	-16.1	1074	0.04931	305884	<b>6476</b>
P value	<b>0.0168</b>	<b>Shared</b>	50	-50.13	-30.72	0.65	1.087	1.54	-19.4		0.09802	124337	
Difference in AICc	<b>3.549</b>		98	-50.06	-32.31	0.635	1.093	1.58	-17.8	1075	0.0948	436467	6480
Conclusion (alpha = 0.05)	Reject null hypothesis												
Preferred model	<b>Plateau different for each data set</b>												
F (DFn, DFd)	5.955 (1, 1074)												
Constraints	<b>Y0 &amp; K are shared</b>												
<b>Fig. S3C 50 Hz SUM</b>													
Null hypothesis	Plateau same for all data sets	<b>M CTRL 50 Hz SUM</b>	N Neurons	Y0	Plateau	K	Half Life	Tau	Span	Degrees of Freedom	R squared	Sum of Squares	AICc
Alternative hypothesis	Plateau different for each data set	<b>F CTRL 50 Hz SUM</b>	19	-57.32	-111.9	0.369	1.877	2.71	54.6	359	0.1094	375814	<b>2858</b>
P value	<b>0.1976</b>	<b>Shared</b>	15	-57.32	-120.9	0.369	1.877	2.71	63.6		0.113	550127	
Difference in AICc	<b>-0.3754</b>		33	-57.3	-116	0.37	1.873	2.7	58.7	360	0.1083	930039	2867
Conclusion (alpha = 0.05)	Do not reject null hypothesis												
Preferred model	<b>Plateau same for all data sets</b>												
F (DFn, DFd)	1.686 (1, 359)												
Constraints	<b>Y0 &amp; K are shared</b>												
<b>Fig. S3D 5 Hz</b>													
Null hypothesis	K same for all data sets	<b>M PI 5 Hz</b>	N Neurons	Y0	Plateau	K	Half Life	Tau	Span	Degrees of Freedom	R squared	Sum of Squares	AICc
Alternative hypothesis	K different for each data set	<b>F PI 5 Hz</b>	62	-62.05	-40.3	0.736	0.9423	1.36	-21.8	1151	0.07022	396626	<b>7391</b>
P value	<b>0.745</b>	<b>Shared</b>	43	-62.05	-40.3	0.649	1.068	1.54	-21.8		0.08016	331608	
Difference in AICc	<b>-1.911</b>		105	-62.02	-40.29	0.695	0.9978	1.44	-21.7	1152	0.08531	688297	7389
Conclusion (alpha = 0.05)	Do not reject null hypothesis												
Preferred model	<b>K same for all data sets</b>												
F (DFn, DFd)	0.1088 (1, 1151)												
Constraints	<b>Y0 &amp; Plateau are shared</b>												
<b>Fig. S3D 50 Hz SUM</b>													
Null hypothesis	2 parameters same for all data sets	<b>M PI 50 Hz SUM</b>	N Neurons	Y0	Plateau	K	Half Life	Tau	Span	Degrees of Freedom	R squared	Sum of Squares	AICc
Alternative hypothesis	2 parameters different for each data set	<b>F PI 50 Hz SUM</b>	23	-68.7	-139.4	0.529	1.309	1.89	50.7	391	0.04963	1138294	<b>3274</b>
P value	<b>0.0034</b>	<b>Shared</b>	13	-63.01	-121.9	0.529	1.309	1.89	68		0.1302	389884	
Difference in AICc	<b>7.37</b>		36	-75.78	-132.8	0.547	1.266	1.83	57	390	0.07011	1512201	3282
Conclusion (alpha = 0.05)	Reject null hypothesis												
Preferred model	<b>2 parameters different for each data set</b>												
F (DFn, DFd)	5.753 (2, 391)												
Constraints	<b>K is shared</b>												



**Table 6** (related to Figure S5)

**eGFP- vs eGFP+**

Source of Variation	% of total variation	P value	P value summary	Significant?	
Interaction		0,7807	0,1347 ns	No	
AP Threshold		32,17 <0,0001	****	Yes	
Cell Type		4,412	0,0479 *	Yes	
ANOVA table	SS	DF	MS	F (DFn, DFd)	P value
Interaction		171,7	1	171,7 F (1, 45) = 2,321	P=0,1347
AP Threshold		7077	1	7077 F (1, 45) = 95,62	P<0,0001
Cell Type		970,6	1	970,6 F (1, 45) = 4,136	P=0,0479
Residual		3330	45	74,01	

**Tonic vs. Initial bursting**

Source of Variation	% of total variation	P value	P value summary	Significant?	
Interaction		0,06452	0,6708 ns	No	
AP Threshold		30,58 <0,0001	****	Yes	
Firing pattern		13,32	0,0003 ***	Yes	
ANOVA table	SS	DF	MS	F (DFn, DFd)	P value
Interaction		14,19	1	14,19 F (1, 45) = 0,1831	P=0,6708
AP Threshold		6728	1	6728 F (1, 45) = 86,80	P<0,0001
Firing pattern		2930	1	2930 F (1, 45) = 15,33	P=0,0003
Residual		3488	45	77,51	

**Table 7** (related to Figure 3)

Fig. 3A			Protocols	Y0	Plateau	K	Half Life	Tau	Span	Degrees of Freedom	R squared	Sum of Squares	AICc
Null hypothesis	Y0 same for all data sets	eGFP+	69	1	0.583	0.5812	1.193	1.721	0.417	1336	0.07691	156.3	2095
Alternative hypothesis	Y0 different for each data set	eGFP-	53	0.945	0.583	0.582	1.161	1.718	0.382		0.04728	123.6	
P value	0.382	Shared	122	0.979	0.5822	0.5736	1.208	1.743	0.397	1336	0.06352	280.1	2093
Difference in AICc	-1.248												
Conclusion (alpha = 0.05)	Do not reject null hypothesis												
Preferred model	Y0 same for all data sets												
F (DFn, DFd)	0.7848 (1, 1338)												
Constraints	Plateau & K are shared												

Fig. 3B			Protocols	Y0	Plateau	K	Half Life	Tau	Span	Degrees of Freedom	R squared	Sum of Squares	AICc
Null hypothesis	Plateau same for all data sets	eGFP+	69	0.506	0.2606	1.225	0.6607	0.816	0.335	1336	0.0423	153.5	2095
Alternative hypothesis	Plateau different for each data set	eGFP-	53	0.596	0.0154	1.225	0.5657	0.816	0.38		0.3477	31.43	
P value	<0.0001	Shared	122	0.565	0.154	1.223	0.6667	0.818	0.441	1336	0.06711	201.6	2093
Difference in AICc	113.9												
Conclusion (alpha = 0.05)	Reject null hypothesis												
Preferred model	Plateau different for each data set												
F (DFn, DFd)	120.7 (1, 1338)												
Constraints	Y0 & K are shared												



**Table 9** (related to Figure S6)

Fig	Null hypothesis	Alternative hypothesis	P value	Difference in AICc	Conclusion (alpha = 0.05)	Preferred model	F (DFn, DFd)	Constraints	N Neurons	Y0	Plateau	K	Half Life	Tau	Span	Degrees of Freedom	R squared	Sum of Squares	AICc	
Fig S6A1	Null hypothesis	Y0 same for all data sets							16	0.535	0	1.084	0.6392	0.932	0.635	349	0.4004	6,722	1159	
	Alternative hypothesis	Y0 different for each data set							16	0.166	0	1.084	0.6392	0.932	0.166		0.1516	2,582		
	P value		<0.0001						32	0.407	0	1.225	0.5661	0.817	0.407	360	0.268	13,19	1205	
	Difference in AICc			54.86																
	Conclusion (alpha = 0.05)				Reject null hypothesis															
	Preferred model					Y0 different for each data set														
	F (DFn, DFd)						61.24 (1, 349)													
Constraints							Plateau & K are shared													
Fig S6A2	Null hypothesis	Y0 same for all data sets							13	0.772	0	1.65	0.4201	0.696	0.772	283	0.5808	4,865	974	
	Alternative hypothesis	Y0 different for each data set							13	0.296	0	1.65	0.4201	0.696	0.296		0.2781	2,815		
	P value		<0.0001						26	0.538	0	1.849	0.3749	0.541	0.538	284	0.4192	0.287	1023	
	Difference in AICc			48.99																
	Conclusion (alpha = 0.05)				Reject null hypothesis															
	Preferred model					Y0 different for each data set														
	F (DFn, DFd)						55.30 (1, 283)													
Constraints							Plateau & K are shared													
Fig S6A3	Null hypothesis	Y0 same for all data sets							12	0.419	0	1.809	0.3893	0.553	0.419	261	0.2702	4,838	955	
	Alternative hypothesis	Y0 different for each data set							12	0.162	0	1.809	0.3893	0.553	0.162		0.1483	1,878		
	P value		<0.0001						24	0.262 = 0.000	0.000	1.984	0.3483	0.534 = 0.29	262	0.2043	0.917	989		
	Difference in AICc			13.84																
	Conclusion (alpha = 0.05)				Reject null hypothesis															
	Preferred model					Y0 different for each data set														
	F (DFn, DFd)						16.20 (1, 261)													
Constraints							Plateau & K are shared													
Fig S6A4	Null hypothesis	One curve for all data sets							12	0.587	0.0532	1.026	0.676	0.975	0.534	258	0.2137	11.85	806	
	Alternative hypothesis	Different curve for each data set							12	0.417	1E-05	4.145	0.1672	0.241	0.417		0.3936	2,917		
	P value		0.0031						24	0.499	0.0283	1.503	0.4613	0.666	0.471	261	0.2382	15.38	807	
	Difference in AICc			7.861																
	Conclusion (alpha = 0.05)				Reject null hypothesis															
	Preferred model					Different curve for each data set														
	F (DFn, DFd)						4.733 (3, 258)													
Constraints							No constraints													
Fig S6B1	Null hypothesis	2 parameters same for all data sets							21	0.999	0.2447	1.047	0.6621	0.955	0.335	457	0.9508	45.94	855	
	Alternative hypothesis	2 parameters different for each data set							21	0.829	0.0887	1.047	0.6621	0.955	0.561		0.2105	22.89		
	P value		<0.0001						42	0.916	0.1978	1.063	0.6401	0.924	0.456	459	0.1023	71.35	870	
	Difference in AICc			15.16																
	Conclusion (alpha = 0.05)				Reject null hypothesis															
	Preferred model					2 parameters different for each data set														
	F (DFn, DFd)						9.725 (2, 457)													
Constraints							K is shared													
Fig S6B2	Null hypothesis	2 parameters same for all data sets							13	0.69	0.4144	1.409	0.4918	0.71	0.275	281	0.02519	34.47	442	
	Alternative hypothesis	2 parameters different for each data set							13	0.464	0.1353	1.409	0.4918	0.71	0.329		0.0616	19.35		
	P value		<0.0001						26	0.577	0.2749	1.409	0.4918	0.71	0.302	283	0.03466	56.16	4626	
	Difference in AICc			22.87																
	Conclusion (alpha = 0.05)				Reject null hypothesis															
	Preferred model					2 parameters different for each data set														
	F (DFn, DFd)						13.83 (2, 281)													
Constraints							K is shared													
Fig S6B3	Null hypothesis	2 parameters same for all data sets							18	0.812	0.2252	1.751	0.3998	0.571	0.386	391	0.06218	36.4	813	
	Alternative hypothesis	2 parameters different for each data set							18	0.385	0.0206	1.751	0.3998	0.571	0.364		0.19	9.131		
	P value		<0.0001						36	0.488	0.123	1.768	0.3921	0.566	0.375	393	0.08377	48.78	844	
	Difference in AICc			31.22																
	Conclusion (alpha = 0.05)				Reject null hypothesis															
	Preferred model					2 parameters different for each data set														
	F (DFn, DFd)						16.24 (2, 391)													
Constraints							K is shared													
Fig S6B4	Null hypothesis	Plateau same for all data sets							17	0.414	0.2105	1.48	0.4684	0.676	0.204	370	0.03662	33.12	744	
	Alternative hypothesis	Plateau different for each data set							17	0.414	0.0808	1.48	0.4684	0.676	0.554		0.07392	16.08		
	P value		0.0002						34	0.412	0.1338	1.265	0.5354	0.772	0.278	371	0.04558	80	756	
	Difference in AICc			11.62																
	Conclusion (alpha = 0.05)				Reject null hypothesis															
	Preferred model					Plateau different for each data set														
	F (DFn, DFd)						13.78 (1, 370)													
Constraints							Y0 & K are shared													

**Table 10** (related to Figure S7)

eGFP+

Source of Variation	% of total variation	P value	P value summary	Significant?	
Interaction		0,2886	0,9822 ns	No	
Current Type		38,92 <0,0001	****	Yes	
Protocol		0,09877	0,9259 ns	No	
ANOVA table	SS	DF	MS	F (DFn, DFd)	P value
Interaction		3,252	6	0,542 F (6, 126) = 0,1788	P=0,9822
Current Type		438,7	3	146,2 F (3, 126) = 48,25	P<0,0001
Protocol		1,113	2	0,5566 F (2, 42) = 0,07712	P=0,9259
Residual		381,9	126	3,031	

eGFP+

Source of Variation	% of total variation	P value	P value summary	Significant?	
Interaction		0,1048	0,9962 ns	No	
Current Type		36,25 <0,0001	****	Yes	
Protocol		0,136	0,9087 ns	No	
ANOVA table	SS	DF	MS	F (DFn, DFd)	P value
Interaction		1,024	6	0,1706 F (6, 150) = 0,1004	P=0,9962
Current Type		354	3	118 F (3, 150) = 69,45	P<0,0001
Protocol		1,328	2	0,6639 F (2, 50) = 0,09594	P=0,9087
Residual		254,9	150	1,699	



**Table 12** (related to Figure S8)

Fig. S8A			N Neurons	Y0	Plateau	K	Half Life	Tau	Span	Degrees of Freedom	R squared	Sum of Squares	AICc
Null hypothesis	Y0 same for all data sets	<b>D 5 Hz CTRL</b>	18	-62,7	-52,90	2,551	0,2717	0,362	-9,74	318	0,004604	273154	2453
Alternative hypothesis	Y0 different for each data set	<b>D 5 Hz PI</b>	14	-98,4	-52,90	2,551	0,2717	0,362	-15,4		0,03487	90130	
P value	<b>0,6294</b>	<b>Shared</b>	32	-65,16	-52,95	2,551	0,2717	0,362	-12,2	319	0,0118	36355	2151
Difference in AICc	<b>-1,815</b>												
Conclusion (alpha = 0.05)	Do not reject null hypothesis												
Preferred model	Y0 same for all data sets												
F (DFn, DFd)	0,2402 (1, 348)												
Constraints	<b>K &amp; Plateau are shared</b>												
Fig. S8B			N Neurons	Y0	Plateau	K	Half Life	Tau	Span	Degrees of Freedom	R squared	Sum of Squares	AICc
Null hypothesis	2 parameters same for all data sets	<b>PEM 5 Hz CTRL</b>	30	-62,42	-47,90	0,7269	0,8539	1,376	-14,5	589	0,03776	154328	2989
Alternative hypothesis	2 parameters different for each data set	<b>PEM 5 Hz PI</b>	21	-73,05	-61,06	0,7269	0,8536	1,376	-12		0,01963	309936	
P value	<b>&lt;0,0001</b>	<b>Shared</b>	54	-67,19	-53,51	0,7418	0,8344	1,348	-13,4	591	0,01872	487674	2934
Difference in AICc	<b>25,39</b>												
Conclusion (alpha = 0.05)	Reject null hypothesis												
Preferred model	2 parameters different for each data set												
F (DFn, DFd)	14,98 (2, 588)												
Constraints	<b>K is shared</b>												
Fig. S8C			N Neurons	Y0	Plateau	K	Half Life	Tau	Span	Degrees of Freedom	R squared	Sum of Squares	AICc
Null hypothesis	Plateau same for all data sets	<b>D 5 Hz CTRL</b>	13	-54,55	-32,83	0,7105	0,8756	1,407	-21,7	282	0,1923	22143	1562
Alternative hypothesis	Plateau different for each data set	<b>D 5 Hz PI</b>	13	-54,55	-34,78	0,7105	0,8756	1,407	-19,8		0,114	42429	
P value	<b>0,3494</b>	<b>Shared</b>	26	-54,57	-33,8	0,7131	0,872	1,402	-20,8	283	0,1428	65070	1590
Difference in AICc	<b>-1,182</b>												
Conclusion (alpha = 0.05)	Do not reject null hypothesis												
Preferred model	Plateau same for all data sets												
F (DFn, DFd)	0,6786 (1, 282)												
Constraints	<b>Y0 &amp; K are shared</b>												
Fig. S8D			N Neurons	Y0	Plateau	K	Half Life	Tau	Span	Degrees of Freedom	R squared	Sum of Squares	AICc
Null hypothesis	2 parameters same for all data sets	<b>PEM 5 Hz CTRL</b>	24	-39,72	-25,37	0,5639	1,229	1,773	-14,4	589	0,1367	31203	3735
Alternative hypothesis	2 parameters different for each data set	<b>PEM 5 Hz PI</b>	30	-64,96	-41,79	0,5639	1,229	1,773	-23,2		0,05371	282132	
P value	<b>&lt;0,0001</b>	<b>Shared</b>	54	-53,93	-34,62	0,5608	1,173	1,963	-19,3	591	0,05188	363348	3819
Difference in AICc	<b>83,89</b>												
Conclusion (alpha = 0.05)	Reject null hypothesis												
Preferred model	2 parameters different for each data set												
F (DFn, DFd)	47,01 (2, 588)												
Constraints	<b>K is shared</b>												

**Table 13**

eGFP+	dAICc
<b>D vs. PEM</b>	<b>42,75</b>
E vs. DPM	1,699
P vs. EMD	-3,967
M vs. DPE	6,566
MD vs. PE	7,039
ME vs. DP	23,88
MP vs. DE	10,42

eGFP-	dAICc
<b>D vs. PEM</b>	<b>0,9603</b>
E vs. DPM	-4,545
P vs. EMD	-4,956
M vs. DPE	-2,121
MD vs. PE	-5,859
ME vs. DP	-0,1568
MP vs. DE	-4,496



## Compléments des matériels et méthodes

Les matériels et méthodes utilisés sont décrits dans l'Article 1. Cette section de compléments permet de préciser et d'illustrer certaines procédures et analyses qui ne sont pas développées dans les méthodes de l'Article 1. De plus, ce complément de méthodes présente le protocole et l'analyse d'une expérience de double-stimulation dans la lamina IIe et III qui est présentée en annexe des résultats.

- **Détermination du stade du cycle œstral**

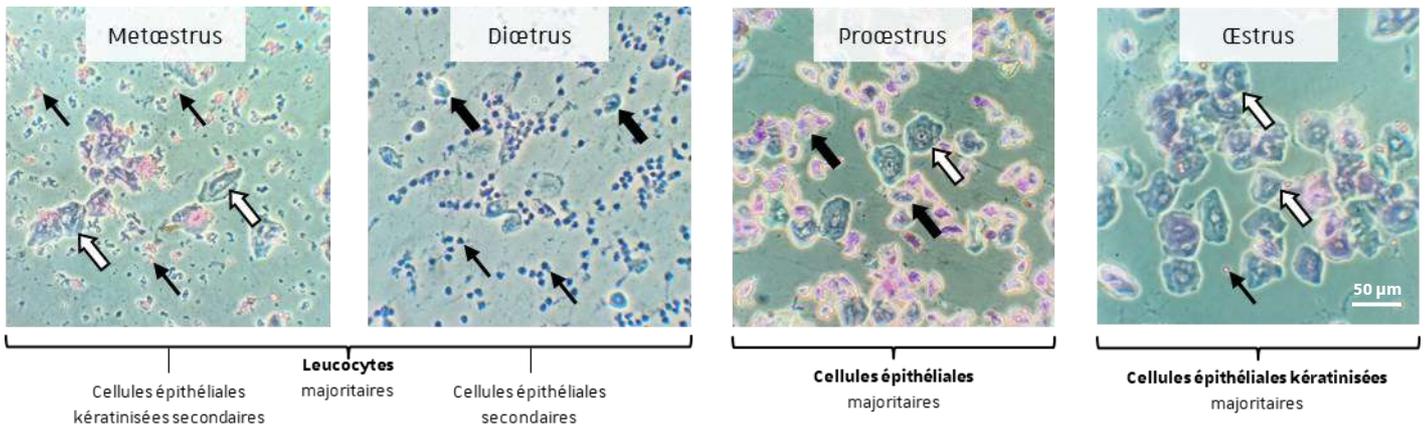
La durée du cycle œstral chez les souris femelles se stabilise 6 semaines après la naissance (Ajayi & Akhigbe, 2020). Ainsi, les souris transgéniques GAD65-eGFP et C57Bl/6J n'ont été utilisées qu'à partir de cet âge, et les femelles ne présentant pas de cycle stable sur 10 jours (répétition tous les 4-5 jours, voir Figure 20) ont été retirées des analyses comportementales (5 sur 22). La reconnaissance des cellules présentes dans les prélèvements vaginaux a permis de définir les phases du cycle œstral chez les souris femelles. La répartition des différentes cellules et la correspondance avec ces phases sont répertoriées en Figure 21.

- **Critères fixés pour inclure des enregistrements dans nos analyses**

Des critères d'inclusion/exclusion de cellules enregistrées en courant ou potentiel imposé ont été fixés afin de garantir la qualité et la représentativité de nos résultats. Pour tout type d'enregistrement, les cellules doivent présenter une résistance de série inférieure à 25 M $\Omega$ , avec une tolérance de variation de  $\pm$  20%. Celle-ci est vérifiée en début et en fin de protocole. Les enregistrements des CPSIe sont acceptés si :

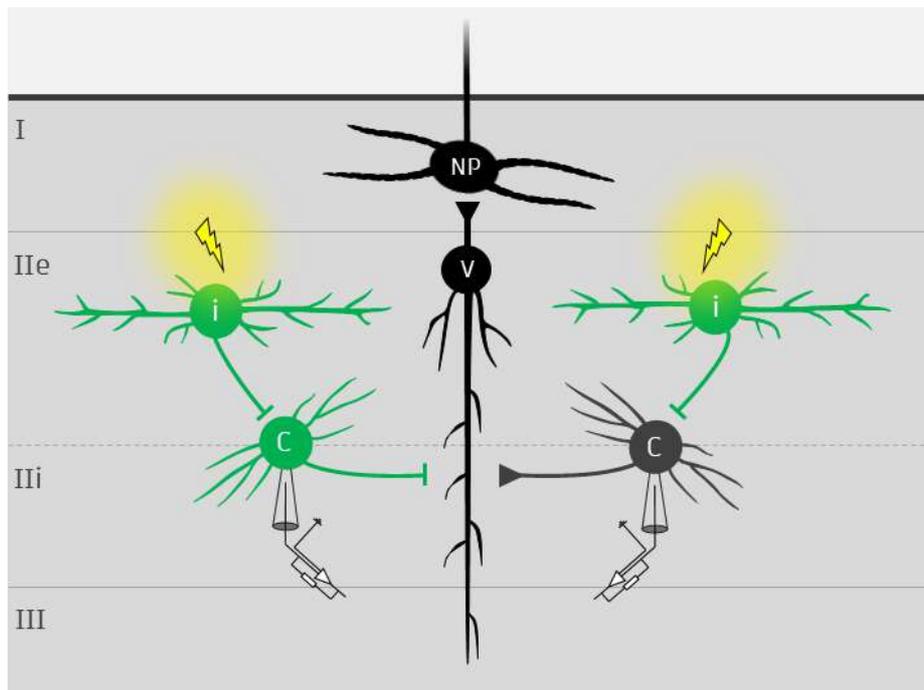
- 5 trains de stimulations minimums sont analysables parmi les 10 des protocoles des stimulations électriques de 5 Hz ou 50 Hz. Un train est exclu si un échec survient à la première stimulation.
- l'injection de courant pour maintenir la cellule à -60 mV ne dépasse pas  $\pm$  100 pA, avec une tolérance de variation de  $\pm$  20 pA durant toute la durée d'un protocole (environ 14 minutes).
- ils ne présentent pas de PA, ou uniquement de manière exceptionnelle (stimulation trop proche du neurone enregistré), et seulement si le pic des CPSIe n'est pas confondu avec ces derniers.

D'après les travaux de Zheng, Lu et Perl (2003, 2005 et 2010), les connexions inhibitrices dont l'enregistrement est le plus probable dans la lamina II sont les connexions des cellules en îlots vers les cellules centrales (voir Figure 4). En suivant les descriptions de positionnement des cellules en îlot et des cellules dans la lamina II (voir Figure 3A), l'électrode de stimulation était préférentiellement placée dans la lamina IIe, tandis que les neurones enregistrés se trouvaient majoritairement au centre de la lamina II (Figure 22).



**Figure 21 :** cellules prélevées lors de lavages vaginaux et correspondance avec les phases du cycle œstral.

Le lavage vaginal permet d'exfolier les cellules de l'épithélium du vagin. Dans les échantillons, la proportion de leucocytes (flèches noires fines), de cellules épithéliales non kératinisées (flèches noires épaisses) et de cellules épithéliales kératinisées (flèches blanches épaisses) varie selon le stade du cycle œstral chez la souris.



**Figure 22 :** schéma des deux connexions inhibitrices théoriquement étudiées.

L'électrode de stimulation est placée dans la lamina IIe, permettant de stimuler des neurones GABAergiques dont la transmission synaptique est isolée par l'application en bain d'antagonistes bloquant les transmissions glutamatergiques et glycinergiques. Le neurone postsynaptique enregistré est soit eGFP+ (vert, circuit de gauche), considéré comme GABAergique, soit eGFP- (gris, circuit de droite), considéré comme non GABAergique. Les circuits étudiés sont respectivement un circuit désinhibiteur et un circuit inhibiteur. i : cellule en îlot ; c : cellule centrale ; v : cellule verticale ; NP : neurone de projection.

- **Simulation et balance excitation-inhibition des neurones de lamina II**

Les CPSEe enregistrés dans les neurones de la lamina II ont été évoqués à partir d'une stimulation minimale des fibres C. L'amplitude de ces CPSEe a été multipliée par un facteur 4 ou 10 pour atteindre des valeurs proches de celles mesurées dans certaines études, à la suite d'une stimulation de 100  $\mu$ s à environ 1 mA des racines dorsales de la moelle épinière, lieu d'arrivée des fibres afférentes (Cui et al., 2011 ; Grudt & Perl, 2002 ; Lu & Perl, 2003 ; Yasaka et al., 2007). Les CPSEe ainsi modifiés permettent de mimer l'excitation simultanée d'un neurone de la lamina II sur lequel convergeraient plusieurs terminaisons de fibres C.

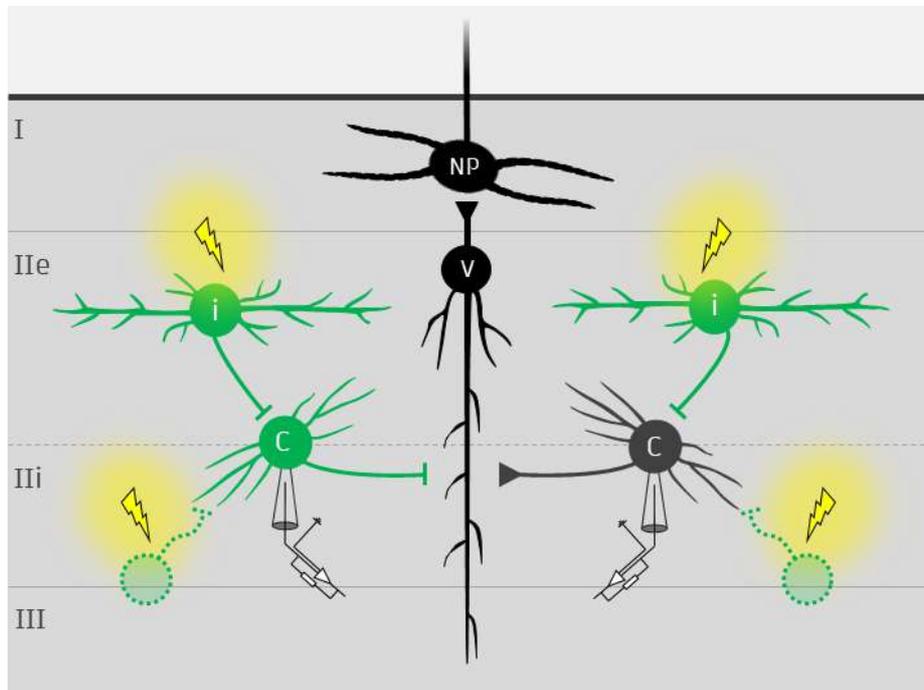
Lors d'expériences de *clamp* dynamique durant lesquelles l'activation d'entrées excitatrices est simulée à 5 Hz, les potentiels postsynaptiques excitateurs évoqués (PPSEe) sont assez isolés pour permettre une analyse individuelle de probabilité de genèse de PA. Dans la grande majorité des cas (45 sur 47 neurones), un seul PA est évoqué par PPSEe. La sommation temporelle des PPSEe lors de simulations à 50 Hz n'a pas permis ce type d'analyse par PPSEe. Ainsi, le nombre de PA évoqué(s) par l'ensemble du train de PPSEe à 50 Hz a été déterminé.

- **Double-stimulation**

Afin de vérifier les caractéristiques des CPSIe GABAergiques en fonction du placement de l'électrode de stimulation dans la lamina II, des enregistrements en potentiel imposé ont été réalisés en utilisant deux électrodes de stimulation. L'une était positionnée en lamina IIe, tandis que l'autre était placée en lamina IIi (Figure 23). Ces dernières permettaient l'application de protocoles de stimulations à 5 Hz de manière alternative, toutes les 20 secondes, revenant à stimuler la cellule enregistrée toutes les 10 secondes. La recherche de connexions inhibitrices avec la cellule enregistrée suit la même méthode expliquée dans l'Article 1. Les différences entre les amplitudes des CPSIe évoqués par les stimulations en lamina IIi et celles des CPSIe évoqués par les stimulations en lamina IIe sont représentées dans la section « Compléments des résultats : double-stimulation », en distinguant les enregistrements des neurones eGFP- et eGFP+.

À partir des données correspondant à ces différences, deux types de régressions linéaires sont ajustées : l'une dont l'ordonnée à l'origine et la pente sont laissées libres ( $y = ax + b$ ), l'autre étant une droite horizontale de formule  $y = 0$ . Si le premier modèle est statistiquement meilleur, alors les amplitudes des CPSIe sont significativement différentes en fonction de la zone de stimulation. Si le second modèle est préféré, les amplitudes ne sont pas significativement différentes.

Cette expérimentation se fonde sur les enregistrements de 6 neurones eGFP- et 5 neurones eGFP+, réalisés sur des tranches aiguës de moelle épinière provenant de souris transgéniques GAD65-eGFP mâles et femelles âgées de 8 à 12 semaines, en condition contrôle.



**Figure 23** : schéma des connexions inhibitrices étudiées en double-stimulation établi d'après la littérature.

Une électrode de stimulation est placée dans la lamina IIe (voir Figure 22) et une autre est placée en lamina IIIi. La stimulatrice positionnée en lamina IIIi pourrait recruter une fibre GABAergique différente de celles précédemment étudiées. La transmission synaptique GABAergique est isolée par l'application d'antagonistes des transmissions synaptiques glutamatergiques et glycinergiques. À nouveau, le neurone postsynaptique enregistré peut être eGFP+ (vert, circuit de gauche), considéré comme GABAergique, ou eGFP- (gris, circuit de droite), considéré comme non GABAergique. i : cellule en îlot ; c : cellule centrale ; v : cellule verticale ; NP : neurone de projection.

- **Analyse des enregistrements électrophysiologiques**

Les protocoles de stimulations à 5 Hz et à 50 Hz ont chacun été appliqués 10 fois dans chaque neurone. Le calcul de la moyenne des amplitudes des CPSIe pour chaque rang de stimulation, à partir des 10 trains de stimulation pour chaque condition de fréquence, a permis d'obtenir une trace moyenne de CPSIe à 5 Hz et une autre à 50 Hz par cellule. Les analyses statistiques ont été réalisées sur ces traces moyennées.

Une analyse de régression non linéaire a été utilisée pour évaluer l'évolution des amplitudes des CPSIe au cours des protocoles de trains de stimulation. Les modèles mathématiques utilisés sont présents dans l'Article 1. Pour comparer deux conditions (par exemple, eGFP- versus eGFP+), les données des cellules appartenant au premier puis au deuxième groupe sont compilées.

Un premier test consiste à mettre en évidence une homogénéité ou une hétérogénéité des jeux de données. Pour se faire, deux hypothèses sont testées :

- H0 : une seule courbe s'adapte à tout le jeu de données.
- H1 : deux courbes sont nécessaires pour décrire l'ensemble des deux jeux de données.

Pour l'hypothèse H1 à deux courbes, plusieurs modèles sont examinés dans lesquels les paramètres des deux courbes sont indépendants, ou dans lesquels un ou deux paramètres sont partagés. Ces paramètres sont : l'amplitude initiale, le temps définissant l'évolution de l'amplitude des courants et le plateau. Le meilleur modèle à deux courbes correspond à celui dont le critère d'information d'Akaike corrigé (AICc) est minimal. Si dans ce modèle, certains paramètres des courbes de régression sont partagés, alors ils sont considérés comme non significativement différents entre les deux conditions. L'hypothèse H1 est réfutée lorsque  $P > 0,05$  (avec  $\alpha = 5\%$ ), même si le coefficient d'Akaike est supérieur à 0. Les jeux de données sont alors homogènes, et il n'y a donc pas de différences significatives entre les deux conditions testées. Ce test est également effectué pour comparer les probabilités de genèse de PA lorsque des potentiels postsynaptiques sont simulés par *clamp* dynamique (protocole détaillé dans les méthodes de l'Article 1).

Un deuxième test permet de vérifier l'expression d'une plasticité à court-terme par la connexion inhibitrice étudiée. Afin d'y parvenir, deux hypothèses sont testées :

- H0 : une droite de pente nulle décrit l'évolution de l'amplitude des CPSIe du jeu de données.
- H1 : une régression non linéaire décrit l'évolution de l'amplitude des CPSIe du jeu de données.

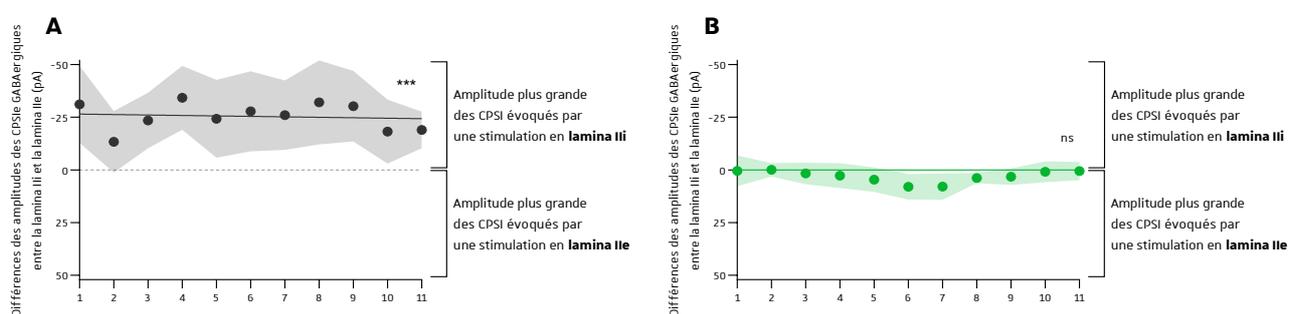
Si l'hypothèse H0 est acceptée ( $P > 0,05$ ), alors les amplitudes des CPSIe n'évoluent pas de manière significative au cours du train et la synapse n'exprime pas de plasticité à court-terme dans ces conditions. Dans le cas contraire, une plasticité à court-terme est mise en évidence, et est alors caractérisée en tant que facilitation ou dépression au cours du train de stimulations.

## Compléments des résultats : stimulations alternées dans la lamina II

L'amplitude des CPSIe GABAergiques enregistrés dans les neurones eGFP<sup>-</sup> est significativement plus grande lorsque les stimulations électriques sont effectuées dans la lamina Ili ( $P < 0,0001$ , Figure 24A). De plus, la pente de la droite ajustée aux données n'est pas significativement différente d'une droite de pente nulle ( $P = 0,8811$ ), indiquant que l'évolution de l'amplitude des CPSIe au cours des stimulations est identique, quelque que soit la position des électrodes de stimulation dans la lamina II. À l'inverse, l'amplitude des CPSIe GABAergiques enregistrés dans les neurones eGFP<sup>+</sup> ne diffère pas significativement en fonction de la zone stimulée ( $P = 0,1239$ , Figure 24B). Les connexions GABAergiques sur les neurones eGFP<sup>+</sup> de la lamina expriment une dépression à court-terme (Cathenaut et al., 2022 ; voir Article 1). La pente nulle de la droite ajustée au jeu de données indique l'absence de différence significative de plasticité à court-terme en fonction du placement des électrodes de stimulation.

L'intensité de stimulation permettant d'évoquer des CPSIe lorsque la stimulation est appliquée dans la lamina Iie ou la lamina Ili n'est pas significativement différente ( $P = 0.8809$ , test de Wilcoxon, 11 paires), avec une moyenne globale de  $0,35 \pm 0,02$  mA.

Ces résultats indiquent qu'il existerait différents types de connexions GABAergiques sur les neurones eGFP<sup>-</sup>, possiblement excitateurs, de la lamina II. De manière intéressante, certains neurones de la lamina Ili sont contactés par des fibres afférentes à bas seuil (Salio et al., 2020). Il est possible que l'activation des neurones de la lamina II profonde puisse induire une inhibition importante des neurones excitateurs du réseau nociceptif de la lamina II, empêchant l'activation de ce réseau en cas de stimulations non-nociceptives. Néanmoins, une consolidation de ces résultats est nécessaire car les amplitudes des CPSIe GABAergiques enregistrés dans les neurones eGFP<sup>-</sup> présentent une grande dispersion.



**Figure 24 :** différences de CPSI GABAergiques évoqués par une double-stimulation dans la lamina II.

**A :** différences entre les amplitudes des CPSIe enregistrés dans les neurones eGFP<sup>-</sup> au cours d'un train de 11 stimulations. Notez la grande variabilité des données, provenant de l'hétérogénéité des réponses obtenues dans ces neurones. **B :** différences entre les amplitudes des CPSIe enregistrés dans les neurones eGFP<sup>+</sup> au cours d'un train de 11 stimulations. \*\*\* $p < 0,0001$  ; ns :  $P > 0,05$ .



## DISCUSSION

L'objectif général de ces travaux de thèse était d'étudier la modulation sexe-dépendante de la transmission synaptique GABAergique dans la lamina II. Les objectifs spécifiques étaient 1) de caractériser la plasticité de la transmission synaptique GABAergique lors de stimulations électriques répétées dans la lamina II en fonction du sexe des souris en condition physiologique de base, 2) de mettre en évidence une modulation sexe-spécifique de la transmission synaptique GABAergique lors d'un état d'inflammation périphérique aiguë, 3) de visualiser, en simulant des entrées nociceptives excitatrices sur les interneurons de la lamina II, l'impact de l'intégration et de l'inhibition GABAergique sur le ré-encodage des informations et 4) de corrélérer les résultats électrophysiologiques obtenus aux seuils de sensibilité mécanique et thermique au chaud des souris.

Ces questions ont été abordées en réalisant des enregistrements électrophysiologiques de neurones de la lamina II dans des tranches aiguës de moelle épinière de souris adultes (6-12 semaines). Nous avons utilisé des souris transgéniques GAD65-eGFP pour enregistrer des neurones supposément inhibiteurs (eGFP+) ou supposément excitateurs (eGFP-). Dans ces neurones, des courants postsynaptiques GABAergiques ont été évoqués par des stimulations électriques extracellulaires locales. Les stimulations ont été réalisées à basse fréquence (5 Hz) ou à haute fréquence (50 Hz). Pour déterminer si les plasticités de ces connexions étaient affectées en conditions douloureuses, nous avons procédé à des enregistrements similaires dans des neurones provenant de souris chez lesquelles une inflammation périphérique aiguë a été induite la veille par injection intraplantaire de carraghénane. Nous avons également réalisé des tests comportementaux sur des souris GAD65-eGFP et C57Bl/6J afin d'évaluer leurs seuils de sensibilité thermique au chaud et mécanique. Les résultats obtenus au cours de cette thèse indiquent que **1)** les connexions GABAergiques entre les neurones de la lamina II expriment une plasticité à court-terme qui diffèrent selon la nature du neurone postsynaptique (excitateur ou inhibiteur), mais dont les propriétés sont identiques chez des mâles et des femelles en condition physiologique de base, **2)** la transmission synaptique GABAergique est modulée différemment entre mâles et femelles en situation inflammatoire, **3)** les neurones excitateurs et inhibiteurs de la lamina II présentent des caractéristiques d'excitabilité différentes en situation contrôle et que l'inhibition soustractive empêche la genèse de PA des neurones excitateurs de façon plus importante, ainsi que **4)** la modulation de l'inhibition lors de diverses conditions physiologiques, mais aussi lors du cycle œstral chez les femelles, pourrait corrélérer avec des modifications des seuils de sensibilité mécanique.

Cette discussion complète celle de l'Article 1. Elle exposera tout d'abord les justifications et limites de nos choix expérimentaux. Elle abordera ensuite l'interprétation des résultats comportementaux en insistant notamment sur les différences entre mâles et femelles en condition physiologique basale. Nous suggérerons ensuite de possibles impacts de la modulation du traitement des informations nociceptives dans la lamina II sur les réponses comportementales observées. Enfin, nous nous intéresserons aux différents états fonctionnels des synapses GABAergiques étudiées, ainsi que les potentiels acteurs moléculaires et cellulaires impliqués.

## **1. Modèle et choix expérimentaux**

### **Souris transgéniques GAD65-eGFP**

Pour nos expérimentations, des souris transgéniques GAD65-eGFP hétérozygotes ont été utilisées. Cette lignée a été construite par Ferenc Erdelyi and Gabor Szabo (*Institute of Experimental Medicine, Budapest*), et ses caractéristiques ont été décrites dans l'article de Cui et ses collaborateurs (2011). Dans ce modèle, seuls 60% des neurones GABAergiques semblent eGFP+ (Cui et al., 2011). Cette proportion est confirmée par une étude plus récente qui a utilisé un modèle murin inductible GAD65-tdTomato (Liu et al., 2021). Ainsi, une proportion non négligeable de neurones eGFP- enregistrés pourrait être GABAergiques. Dans la lamina II, 60% des neurones GABAergiques expriment davantage la GAD67 que la GAD65, ce qui pourrait expliquer qu'une grande proportion des neurones GABAergiques soient eGFP- (Mackie et al., 2003). L'utilisation de souris transgéniques, dont les cellules exprimant le facteur de transcription *paired box 2 (Pax2)* sont identifiables, permettrait d'étudier la population globale des neurones GABAergiques de la lamina II, car *Pax2* semble exprimé dans 100% des neurones GABAergiques (Larsson, 2017).

L'insertion du gène GAD65-eGFP a eu lieu dans la séquence codante de la GAD65. Un seul allèle de la GAD65 est donc fonctionnel dans les souris hétérozygotes. Une diminution de l'expression de cette enzyme pourrait se répercuter sur la synthèse de GABA, et donc sur l'efficacité de la transmission synaptique GABAergique. Cependant, aucune différence d'amplitude et de fréquence des CPSIm GABAergiques enregistrés dans les neurones de la lamina II n'a été détectée entre des souris C57Bl/6J et les souris GAD65-eGFP (Leonardon et al., 2022). Ainsi, la transmission synaptique GABAergique dans la CDME ne semble pas être modifiée dans notre modèle.

D'autre part, la survie des individus hétérozygotes dont l'un des allèles de la GAD65 est invalidé et leur propension à développer des épilepsies ne diffèrent pas des souris sauvages, ce qui suggère que l'inhibition n'est pas altérée de manière majeure et/ou que des compensations sont engagées (Asada et al., 1996 ; Kash et al., 1997 ; Stork et al., 2000). De façon intéressante, l'expression de la GAD67 n'est pas augmentée lors d'une perte de fonction d'une copie de la GAD65 (Asada et al., 1996). Chez ces mêmes souris hétérozygotes, la quantité de GABA est diminuée dans l'amygdale et l'hypothalamus à 2-3 mois, âge auquel nos souris sont utilisées. Toutefois, aucune diminution de quantité de GABA n'a été observée dans le cortex pariétal, et aucun dosage n'a été effectué dans la moelle épinière (Stork et al., 2000).

De plus, nous n'avons relevé aucune différence significative de sensibilité mécanique en situation physiologique de base entre les souris GAD65-eGFP et C57Bl/6J. Néanmoins, la P-valeur de ces analyses statistiques était de 0.0507, suggérant une tendance. Il faut souligner que des différences significatives de seuils de sensibilité mécanique ont été décrites selon le génotype des souris (Mogil et al., 2010). De même, aucune différence n'est relevée entre des souris sauvages et des souris chez lesquelles une copie de la GAD67 a été invalidée : ces souris présentent une sensibilité mécanique similaire à celle des souris sauvages. Ainsi, la littérature et nos résultats suggèrent que la perte de fonction d'une copie de la GAD65, ou d'une copie de la GAD67, n'entraîne pas de baisse des seuils de sensibilité en conditions physiologiques de base.

De ce fait, plusieurs éléments électrophysiologiques et comportementaux suggèrent que l'inhibition spinale n'est pas modifiée dans notre modèle de souris. Malgré cela, une absence de différence en condition physiologique de base entre les souris sauvages et celles chez lesquelles une copie d'une des GAD a été invalidée, ne préjuge pas d'une absence de différence en conditions douloureuses physiologiques ou pathologiques. D'une part, la mise en place d'une neuropathie entraîne une diminution durable de 40% de neurones marqués pour la GAD65 dans la CDME du côté ipsilatéral à la lésion nerveuse, tandis que le niveau d'expression de la GAD67 ne varie que très peu (Moore et al., 2002). En revanche, 20 à 30% des neurones eGFP+ des laminae I à III co-expriment le facteur de transcription *c-fos* à la suite d'une injection sous-cutanée de capsaïcine dans les pattes arrière, tandis que seuls 4-5% des neurones GAD67-GFP expriment également *c-fos* (Nowak et al., 2011). Cela met en évidence que les neurones qui expriment la GAD65 participent préférentiellement aux processus de sensibilisation induite par une inflammation périphérique aiguë.

Ce modèle est donc intéressant pour étudier les réseaux activés en situation inflammatoire, bien qu'il comporte des limites liées au fait qu'une partie des neurones eGFP- sont GABAergiques, et qu'il faudra substituer ce modèle pour poursuivre des études similaires sur des modèles de douleurs neuropathiques.

## **Localisation des neurones et connexions étudiées**

D'après les travaux de Lu et Perl (2003), la probabilité de trouver une connexion inhibitrice en enregistrant une paire de neurones au hasard dans la lamina II ne serait que de 11%. Dans nos conditions, l'électrode de stimulation était placée dans la lamina IIe, sans forcément être localisée à proximité d'un corps cellulaire eGFP+ (voir Figure 23). Bien que les cellules en îlot semblent être préférentiellement positionnées dans cette zone (Davies et al., 2023 ; Dougherty & Chen, 2016 ; Lu & Perl, 2003), il est probable que les stimulations aient pu recruter d'autres types de neurones GABAergiques. Ainsi, des enregistrements de cellules verticales avec stimulation de cellules centrales inhibitrices, ou de cellules en îlot avec stimulation de cellules centrales inhibitrices, par exemple, pourraient avoir été pris en compte dans nos analyses. Néanmoins, les résultats de l'équipe de Perl suggèrent que l'enregistrement de ces connexions, bien que théoriquement possible, soit assez improbable (Lu & Perl, 2003 ; Zheng et al., 2010).

D'autre part, les enregistrements de neurones eGFP- lors de stimulation alternées en lamina III et lamina IIe ont permis de mettre en évidence des connexions GABAergiques présentant des caractéristiques différentes, selon la zone de stimulation dans la lamina II. Le placement de l'électrode de stimulation dans la lamina II pourrait donc être critique pour stimuler une population plus homogène de neurones GABAergiques. Il n'est cependant pas exclu que les différences d'amplitude observées proviennent de caractéristiques postsynaptiques distinctes, et qu'un même neurone GABAergique présynaptique, dont l'arborisation dendritique pourrait être large, soit stimulé. Enfin, nous ne pouvons pas exclure que des terminaisons de neurones GABAergiques des contrôles descendants de la douleur puissent également être stimulées (Antal et al., 1996 ; Hossaini et al., 2012 ; Kato et al., 2006).

## **Protocoles de stimulations**

Lors de nos enregistrements électrophysiologiques, nous avons évoqué des CPSs GABAergiques par des stimulations électriques extracellulaires locales. Les fréquences de stimulation sélectionnées pour nos protocoles, de 5 Hz ou 50 Hz, peuvent s'apparenter aux fréquences de décharge de PA enregistrés dans un neurone de la CDME à la suite d'une stimulation nociceptive, respectivement de faible ou forte intensité (Christensen & Perl, 1970). D'autre part, un message nociceptif dans les fibres afférentes primaires peut être divisé en deux phases : une phase initiale de décharge à haute fréquence, suivie d'une phase de plateau qui résulte de l'adaptation des nocicepteurs et dont la fréquence de décharge ne dépasse généralement

pas 5 Hz (voir le paragraphe II. 1. b.). Ainsi, les plasticités que nous avons étudiées séparément lors de stimulations à 5 Hz et 50 Hz pourraient se retrouver combinées lors de l'arrivée d'un message nociceptif : la phase à 50 Hz correspond au pic et celle à 5 Hz correspond au plateau. L'utilisation d'un protocole de stimulations à 50 Hz, directement suivi d'un protocole à 5 Hz, pourrait être envisagée pour étudier le fonctionnement des synapses GABAergiques pendant une activité qui correspondrait à l'arrivée de messages nociceptifs dans la CDME. Enfin, le *pattern* réel de PA évoqués dans une fibre C par une stimulation nociceptive, pourrait être utilisé comme protocole de stimulation.

### ***Patch-clamp* dynamique et injections de courants**

Le rôle de l'inhibition sur la probabilité de genèse de PA n'est observable que si elle a lieu de manière simultanée à une excitation. Nous avons ainsi effectué des expériences de *patch-clamp* dynamique afin d'examiner la probabilité de genèse de PA de neurones eGFP<sup>-</sup> et eGFP<sup>+</sup> de la lamina II par l'injection de courants excitateurs et inhibiteurs dans le neurone enregistré.

- **Simulation de l'excitation**

Les courants excitateurs proviennent d'une moyenne de CPSE évoqués à partir d'une stimulation minimale des fibres C et enregistrés dans les neurones de la lamina II. Les amplitudes de ces courants ont été ajustées pour correspondre aux valeurs d'amplitudes généralement retrouvées lors de stimulations des fibres afférentes (Cui et al., 2011 ; Grudt & Perl, 2002 ; Lu & Perl, 2003 ; Yasaka et al., 2007), ce qui permettrait de mimer l'excitation synchronisée d'un neurone de la lamina II sur lequel convergeraient plusieurs terminaisons de fibres C. De plus, l'évolution de l'amplitude des courants a été corrigée en considérant la plasticité à court-terme des synapses de fibres A $\delta$  sur les neurones des laminae III-V mise en évidence par Wan et ses collaborateurs (2006). Bien qu'elle ne corresponde probablement pas à la plasticité à court-terme des synapses des fibres C sur les neurones de la lamina II, cette approche nous a permis d'avoir une première estimation de l'excitation nécessaire pour générer des PA dans les neurones enregistrés. Pour le moment, aucune étude ne s'est intéressée à la plasticité à court-terme de cette synapse.

- **Simulation de l'inhibition**

Les courants inhibiteurs proviennent des CPSI GABAergiques évoqués par des stimulations électriques extracellulaires locales dans la lamina II, en situation contrôle et d'inflammation périphérique aiguë. L'analyse de l'évolution de ces courants entre les conditions contrôle vs. inflammatoire, mâles vs. femelles et eGFP- vs. eGFP+, nous a permis de créer 7 protocoles de courants à injecter pour chaque type de neurone enregistré (eGFP- ou eGFP+) :

- CPSI Contrôle Mâles-Femelles 5 Hz.
- CPSI Inflammatoire Mâles 5 Hz.
- CPSI Inflammatoire Femelle E2 5 Hz.
- CPSI Inflammatoire Femelle P4 5 Hz.
- CPSI Contrôle Mâles-Femelles 50 Hz.
- CPSI Inflammatoire Mâles 50 Hz.
- CPSI Inflammatoire Femelles 50 Hz.

Cette façon de procéder nous a permis de garder les caractéristiques propres de la transmission synaptique GABAergique pour chacune des conditions. Les CPSI évoqués par des stimulations à 5 Hz enregistrés dans les neurones eGFP+, en condition contrôle chez les mâles et les femelles, ont été regroupés malgré une faible différence significative de leur amplitude. Cette différence peut être expliquée par les variations d'amplitudes des CSPIe en fonction du cycle œstral chez les femelles (voir Figures S3C et 5C de l'Article 1). Pour l'injection de courants enregistrés en situation inflammatoire, les catégories « Femelles E2 » et « Femelles P4 » ont été établies d'après les phases du cycle chez la souris durant lesquelles l'œstradiol et la progestérone, respectivement, sont à leur pic de concentration dans la circulation sanguine (Nilsson et al., 2015). Ces catégories ne correspondent pas aux deux catégories (D vs. PEM) définies par la suite à partir de l'analyse des amplitudes des CSPIe que nous avons enregistrés durant les quatre phases du cycle œstral. À l'avenir, les injections de CSPIe enregistrés durant la phase D et les phases PEM seront donc à envisager, en complément de dosages sanguins et de tissus nerveux qui permettraient d'estimer les concentrations d'œstradiol et de progestérone.

Dans nos conditions, les enregistrements des CSPIe GABAergiques ont été réalisés en mode potentiel imposé à -60 mV avec un potentiel d'équilibre des ions chlorure à 0 mV. Ainsi, nous avons dû ajuster les amplitudes des CPSI injectés en prenant en compte la force efficace physiologique du chlorure (Ferrini et al., 2020). De même, dans nos conditions d'enregistrements, la concentration intracellulaire des ions chlorures était

supérieure à leur concentration extracellulaire : le gradient des ions chlorures est donc inversé par rapport au gradient physiologique chez des souris adultes (Cordero-Erausquin et al., 2005 ; Ferrini et al., 2020). Néanmoins, les caractéristiques des CPSIe GABAergiques ne semblent pas différentes si les courants sont entrants ou sortants (Takazawa et al., 2017). Cependant, l'amplitude des CPSIe GABAergiques dépend de la gestion du gradient du chlorure par KCC2 lorsque la concentration intracellulaire de chlorure est inférieure à celle extracellulaire (voir Figure 10 et le paragraphe II. 2. c.). L'expression de ce transporteur est diminuée en condition d'inflammation périphérique aiguë, ce qui peut potentiellement mener à une baisse de capacité d'extrusion des ions chlorures, et donc à une dépression des amplitudes des CPSI GABAergiques (Dedek et al., 2020 ; Raimondo et al., 2012 ; Zhang et al., 2008).

Ainsi, nos expériences de simulation permettent d'évaluer l'impact de la plasticité de l'inhibition que nous avons étudiée, mais sans prendre en compte les possibles changements du potentiel d'équilibre des ions chlorures durant les activités soutenues ou en condition inflammatoire, ni la contribution du *shunt* membranaire (inhibition divisive) dans l'efficacité de l'inhibition.

Notre approche se limite à voir l'impact des changements de plasticité à court-terme des connexions GABAergiques. Celle-ci était néanmoins importante pour comprendre les effets de ces modifications. Par la suite, nous pourrions réaliser cette approche en condition d'inflammation périphérique aiguë, afin de prendre notamment en compte les changements d'excitabilité des neurones de la lamina II.

## **2. Sensibilité mécanique et thermique au chaud entre mâles et femelles**

### **Condition physiologique de base**

De nombreux travaux ont mis en évidence que les femelles présentaient des seuils nociceptifs plus bas que les mâles (voir Figure 17A). Pour déterminer si nos souris présentaient également des seuils distincts, nous avons mesuré leur seuil de sensibilité mécanique avec le test de von Frey et leur seuil de sensibilité thermique au chaud avec le test de la plaque chaude à 48°C. Nous avons pu mettre en évidence une différence marquante de sensibilité mécanique entre souris mâles et femelles en condition physiologique de base, mais aucune différence de sensibilité thermique nociceptive (voir Figure 1 de l'Article 1).

Nos résultats rejoignent ceux d'une étude publiée récemment, dans laquelle la sensibilité mécanique diffère entre mâles et femelles, mais pas la nociception thermique au chaud testée à l'aide d'une plaque chaude à 55°C (Tsao et al., 2023).

La différence de mesure de sensibilité mécanique observée pourrait spéculativement résulter de différences de poids entre les souris mâles et femelles. Le test de von Frey consistant à appliquer des filaments de diamètre croissant sous les pattes arrière, nous pouvons donc penser que plus un animal présente une masse importante, plus un filament épais doit être utilisé pour induire un retrait de la patte. Le poids des mâles GAD65-eGFP à 10 semaines est significativement supérieur au poids des femelles (6 mâles, 9 femelles ; poids moyen des mâles =  $24,7 \pm 0,4$  g, poids moyen des femelles =  $19,9 \pm 0,2$  g ; test de Mann-Whitney,  $P = 0,0004$  ; données non montrées). Cependant, une étude longitudinale sur plusieurs mois montre que la variation de poids en fonction de l'âge n'influe pas sur les seuils de sensibilité mécanique (Millecamps et al., 2023). Ceci suggère que les différences de poids n'ont pas d'influence sur les mesures de seuils de sensibilité mécanique.

Un autre paramètre pourrait affecter les seuils de sensibilité mécanique. En effet, les terminaisons libres des nocicepteurs dans le derme sont retrouvées en plus grande densité chez les souris femelles (Bigliardi-Qi et al., 2007), mais également chez les femmes (Collongues et al., 2018 ; Goransson et al., 2004 ; Selim et al., 2010). Cette différence de densité a été observée sur des prélèvements de peau provenant du genou ou de la hanche. Il n'existe aucune donnée concernant l'innervation cutanée des pattes postérieures entre mâles et femelles. De plus, si la différence de densité de terminaisons libres de nocicepteurs cutanés peut affecter la sensibilité mécanique, alors la sensibilité thermique pourrait également dépendre de ce paramètre et différer entre mâles et femelles, ce que nous n'avons pas observé.

En outre, il y a une influence de la zone sur laquelle le filament de von Fret est appliqué. Effectivement, la zone application des filaments sous les pattes peut différer selon le modèle de douleur utilisé dans l'étude. Par exemple, dans le modèle neuropathique de SNI, le filament est appliqué sur la zone innervée par le nerf sural (côté latéral des pattes), seul nerf laissé intact. Les seuils de sensibilité mécanique sont généralement plus bas lorsque les filaments sont appliqués sur cette zone, mais aucune différence entre mâles et femelles en condition physiologique de base n'est constatée (Gilbert et al., 2023 ; Millecamps et al., 2023). Dans notre cas, les filaments étaient appliqués sur la zone centrale de la patte, entre les coussinets.

Bien que de nombreuses études montrent des différences de sensibilité mécanique liées au sexe, celles-ci pourraient dépendre de la manipulation des souris par le testeur. Au sein du laboratoire de Jeffrey Mogil, les résultats au test de von Frey effectués sur 8000 souris en 20 ans ont été compilés, en prenant en compte le sexe et la qualification des testeurs. Les différences entre mâles et femelles observées dans ce laboratoire semblent notamment provenir du sexe de l'expérimentateur (Zumbusch et al., 2024). Les hommes ont tendance à générer davantage de stress chez les souris, induisant un effet analgésiant (Sorge et al., 2014). Néanmoins, cette analgésie liée au stress est davantage visible chez les femelles, ce qui ne permet pas d'expliquer la différence de sensibilité mécanique que nous observons dans nos conditions.

Nos données ne semblent donc pas provenir d'un biais expérimental lié à des différences de poids, tandis que les différences dans la littérature relatives aux différences entre mâles et femelles seraient fortement dépendantes des conditions expérimentales.

### **Condition d'inflammation périphérique aiguë**

Les seuils de sensibilité mécanique ou thermique au chaud, mesurés en condition contrôle, sont abaissés en situation d'inflammation périphérique aiguë, correspondant au développement d'une allodynie mécanique et d'une hyperalgésie thermique au chaud. Les valeurs absolues de ces seuils ne diffèrent pas entre mâles et femelles, 24 heures après une injection intraplantaire bilatérale de carraghénane (voir Figure 1 de l'Article 1). Néanmoins, à 24 heures, la résolution de l'hypersensibilité mécanique semble plus avancée chez les femelles que chez les mâles. Le seuil de sensibilité mécanique en situation inflammatoire atteint 46% du seuil contrôle chez les mâles, tandis qu'il est de 78% du seuil contrôle chez les femelles. Cette différence pourrait impliquer une mise en place plus rapide de mécanismes compensatoires chez les femelles que les mâles, en réponse aux phénomènes de sensibilisation. Il est possible que nos résultats électrophysiologiques correspondent au moins partiellement à ce type de mécanisme.

### **3. Implication des connexions inhibitrices dans le contrôle du gain des informations nociceptives**

#### **Hypothèses sur le rôle pro- ou antinociceptif des connexions étudiées**

Nous avons étudié deux types de connexions dans la lamina II : un neurone GABAergique contactant un neurone supposément glutamatergique et un neurone GABAergique contactant un neurone supposément GABAergique. Parmi les connexions connues de la lamina II, il n'y a pas de chaînes de plus de deux neurones inhibiteurs (voir le paragraphe I. 2. ; Lu & Perl, 2003, 2005 ; Peirs & Seal, 2016). Ainsi, un circuit d'inhibition antérograde correspond probablement à une inhibition de la transmission de l'information nociceptive, tandis qu'un circuit désinhibiteur correspond probablement à une désinhibition de cette transmission (voir Figure 2). Ces deux circuits sont respectivement considérés comme antinociceptif, l'inhibition d'un neurone excitateur permettant de freiner la transmission d'informations nociceptives, et pronociceptif, l'inhibition d'un neurone inhibiteur induisant une levée d'inhibition sur une cellule excitatrice. Nous supposons que le circuit antinociceptif correspondrait aux connexions cellules en îlot > cellules centrales excitatrices > cellules verticales, tandis que le circuit pronociceptif correspondrait aux connexions cellules en îlot > cellules centrales inhibitrices > cellules verticales (voir Figure 4). Ainsi, l'élaboration du message sortant de la lamina II par les cellules verticales est contrôlée par l'excitation et l'inhibition exercées par les terminaisons des fibres afférentes et les cellules centrales, elles-mêmes sous contrôle inhibiteur des cellules en îlot (Davies et al., 2023 ; Lu & Perl, 2003 ; Peirs & Seal, 2016 ; Zeilhofer et al., 2012).

En condition d'inflammation périphérique aiguë, la transmission synaptique GABAergique est modulée de manière sexe-dépendante. Par conséquent, la contribution de la voie pronociceptive et de la voie antinociceptive dans le traitement des informations nociceptives semble être modifiée (voir Figures 2F-G de l'Article 1). Alors que l'activation de la voie antinociceptive domine en condition physiologique de base, la situation d'inflammation périphérique s'accompagne d'un rééquilibrage de la contribution des voies pro- et antinociceptives, par une augmentation de l'implication de la voie pronociceptive (voir Figures 2D-E de l'Article 1). De façon intéressante, bien que ce phénomène soit observé chez les mâles et les femelles, la différence entre la situation contrôle et la situation inflammatoire est beaucoup moins prononcée chez les femelles.

Ces résultats semblent cohérents avec un retour plus rapide des seuils de sensibilité mécanique aux niveaux qui étaient observés avant l'injection de carraghénane chez les femelles par rapport aux mâles (voir Figure 1A de l'Article). Dans cette hypothèse, les mécanismes de compensation, limitant l'implication de la voie pronociceptive dans le traitement des informations nociceptives, seraient effectivement mis en place plus rapidement chez les femelles. Dans la lamina II, le retour à une situation contrôle pourrait correspondre à la disparition de l'allodynie mécanique. Cette hypothèse pourrait être testée en enregistrant des paires de neurones de la lamina II à différents temps après l'injection intraplantaire de carraghénane.

### **Balance excitation-inhibition dans la lamina II**

L'une des manifestations d'un contrôle de gain dans le traitement des informations nociceptives pourrait consister en des changements de la contribution globale de l'excitation et de l'inhibition dans le réseau nociceptif spinal. La balance excitation-inhibition façonne la représentation de la stimulation (modalité, durée et intensité), la propagation des informations et joue un rôle important dans le ré-encodage de ces informations (voir le paragraphe II. ; Zhou & Yu, 2018). Les procédures de *patch-clamp* dynamique nous ont permis d'enregistrer les PA générés par des cellules GABAergiques ou non GABAergiques, et d'appréhender ainsi l'état de la balance excitation-inhibition dans le réseau de la lamina II.

Lors d'injections des 11 CPSE de facteur X10 à une fréquence de 5 Hz, la probabilité de genèse de PA diminue en fonction du rang de stimulation, sans distinction entre neurones eGFP- et eGFP+ (voir Figure 3A de l'Article 1). Cette probabilité atteint 60% à partir du 4<sup>ème</sup> PPSEe, probablement en lien avec le fait que les CPSE que nous avons injectés modélisent une dépression. La transmission semble donc rester relativement fidèle lors d'une forte excitation à basse fréquence des neurones de la lamina II, c'est-à-dire avec une faible probabilité de perte d'information, impliquant un traitement limité des informations sans changement majeur de codage. En revanche, lors de l'injection des CPSE de facteur X4 à une fréquence de 5 Hz, la probabilité de genèse de PA est fortement diminuée, voire quasiment nulle dans les neurones eGFP- à partir du 4<sup>ème</sup> PPSEe (voir Figure 3B de l'Article 1). Dans ce cas, une convergence et/ou une synchronisation limitée d'entrées excitatrices à basse fréquence favoriseraient la stimulation de neurones inhibiteurs.

Lors d'injections des 11 CPSE à 50 Hz, les PPSEe, respectivement de facteur X4 et X10, permettent de n'évoquer que 1 à 4 PA (voir Figure 4C de l'Article 1). Ainsi, lors d'excitation à haute fréquence, la transmission serait peu fidèle, impliquant un important traitement et/ou une perte majeure des informations. Ce phénomène est observé dans des neurones excitateurs et inhibiteurs, il n'y aurait donc qu'un faible impact sur la balance excitation-inhibition dans le réseau nociceptif spinal.

Lorsque des CPSI sont injectés simultanément aux CPSE, la probabilité de genèse de PA est considérablement diminuée (voir Figure 4 de l'Article 1). À basse fréquence, l'inhibition est plus importante sur les neurones eGFP- que les neurones eGFP+ à partir du 2<sup>ème</sup> potentiel postsynaptique. À haute fréquence, bien qu'elle diminue la probabilité de genèse de PA, l'inhibition ne modifie pas la balance excitation-inhibition car elle a un effet similaire sur les neurones eGFP- et eGFP+. Toutefois, alors que la transmission était déjà très peu fidèle lors d'une excitation seule à haute fréquence, l'inhibition réduit fortement la transmission des messages dans la lamina II. Ce filtre permettrait un ré-encodage des informations.

Dans nos expériences, nous avons utilisé deux modèles d'activité excitatrice par l'injection de CPSE X4 ou X10. Ces modèles ne traduisent pas la subtilité des différences de sommation temporelle ou spatiale ayant probablement lieu physiologiquement. Ainsi, nos résultats ne doivent être considérés que comme des possibilités de fonctionnement de ces connexions et en aucun cas comme le seul fonctionnement possible.

Par ailleurs, les différences de cinétique des CPSIe (non montrées) suggèrent que l'inhibition pourrait s'exercer à des sites distincts sur le neurone cible en fonction de sa nature excitatrice ou inhibitrice. La répartition relative des synapses inhibitrices sur les neurones GABAergiques ou non de la lamina II pourrait être déterminée grâce à la méthode de Santos et ses collaborateurs (2009). Utilisée pour déterminer le positionnement relatif des synapses excitatrices sur les neurones excitateurs de la lamina II, l'approche propose que la cinétique d'activation (*rise time*) des CPSE corrèle avec le placement de la synapse étudiée par rapport au corps cellulaire : plus cette cinétique est lente, plus la synapse serait distale. Ces paramètres ne sont pas directement testés dans notre simulation, mais pourraient correspondre à une différence majeure dans le traitement des informations.

D'autre part, la probabilité de genèse de PA provient essentiellement de l'excitabilité des neurones dans la lamina II. Dans notre cas, les neurones eGFP- ont en moyenne un seuil de déclenchement de PA supérieur à celui des neurones eGFP+ (voir Figure S5A de l'Article 1). Ainsi, les neurones eGFP+ ont une probabilité plus importante de générer des PA pendant une faible excitation (voir Figure 3B de l'Article 1). L'injection

intraplantaire unilatérale de CFA entraîne une diminution des seuils de déclenchement de PA mais uniquement dans les cellules présentant un profil de décharge phasique (Kopach et al., 2023). Ces cellules sont considérées comme excitatrices (voir Figure 3). Une augmentation de l'excitabilité des neurones excitateurs, en condition d'inflammation périphérique aiguë, pourrait alors faciliter la transmission des informations nociceptives et modifier le traitement du message nociceptif sortant de la lamina II. N'ayant travaillé que sur des souris contrôles pour cette procédure de *patch-clamp* dynamique, ce phénomène n'a pas été étudié. Il serait néanmoins intéressant de réaliser la même procédure expérimentale en condition d'inflammation périphérique aiguë, afin de voir si l'augmentation de l'inhibition n'est pas contrebalancée par une augmentation de l'excitabilité des neurones supposément excitateurs de la lamina II.

L'activation des neurones excitateurs en condition physiologique de base semble donc nécessiter la convergence et/ou la synchronisation d'entrées excitatrices, alors que les neurones inhibiteurs peuvent être recrutés par une faible excitation. Le réseau nociceptif spinal ne semble être activé qu'en cas de réception de messages nociceptifs dont la fréquence de PA doit excéder 2 Hz dans les fibres afférentes (Andrew & Greenspan, 1999). Cela implique l'existence d'un seuil de fréquence de PA. La synchronisation de ces PA, grâce à la convergence des terminaisons de fibres afférentes, permettrait l'activation des neurones excitateurs, et donc le passage du message nociceptif à travers le contrôle de gain constitué par les réseaux que j'ai étudiés. Nos observations semblent compatibles avec cette notion de seuil minimal d'excitation du réseau. De plus, lorsque la fréquence d'entrées excitatrices augmente, les neurones inhibiteurs et excitateurs semblent recrutés de manière similaire. Ceci suggère qu'il existe un seuil d'excitation à partir duquel la différence d'inhibition aux deux types de connexions est surmontée.

L'inhibition dans la lamina II module le niveau de ces seuils, et la modification de la transmission synaptique inhibitrice pourrait affecter le traitement des informations nociceptives. Ces modifications pourraient s'illustrer par des phénomènes d'hypo- ou d'hypersensibilité, tels que nous avons pu les observer en condition d'inflammation périphérique aiguë, ou en fonction du cycle œstral chez les femelles.

Nous devons tout de même préciser que toutes ces interprétations sont fondées à partir de cohérences entre résultats comportementaux et électrophysiologiques. Même si ces interprétations sont compatibles avec les données, il sera nécessaire de trouver un lien causal entre les modulations du traitement spinal des informations nociceptives, et les réponses comportementales.

## **Modulation du traitement des informations nociceptives durant le cycle œstral**

Les souris présentent des états de fécondité et d'infécondité qui se succèdent sous la forme d'un cycle de chaleurs : le cycle œstral. Le cycle œstral des femelles est composé de quatre phases durant lesquelles les concentrations sanguines d'œstradiol et de progestérone, notamment, fluctuent (voir Figure 20). En fonction de la concentration de ces hormones et de leurs effets, il est possible de s'attendre à des états physiologiques différents selon le stade du cycle œstral.

Dans notre cas, nous avons d'abord séparé l'ensemble des données comportementales et électrophysiologiques des femelles, en suivant le meilleur modèle de répartition à partir d'une analyse de l'évolution des amplitudes des CPSi lors de stimulations à 5 Hz. Le meilleur fractionnement correspond au regroupement des données obtenues en proœstrus, œstrus et métœstrus (PEM) dans une catégorie et en diœstrus (D) dans la seconde catégorie, pour les neurones eGFP<sup>-</sup> et eGFP<sup>+</sup>.

- **Sensibilité mécanique et thermique au chaud chez les femelles en situation contrôle**

En séparant les données comportementales de l'ensemble des souris femelles (GAD65-eGFP et C57Bl/6J), selon qu'elles soient en phases D ou PEM au moment du test, nous avons pu mettre en évidence une différence de seuil de sensibilité mécanique (voir Figure 5E de l'Article 1). Les femelles présentent un seuil inférieur en phases PEM. À l'inverse, aucune différence de sensibilité thermique au chaud n'est observée en fonction des phases chez les femelles GAD65-eGFP (voir Figure S9 de l'Article 1). Ainsi, les hormones sexuelles, dont les variations de concentration prennent place durant le cycle œstral, pourraient influencer sur le traitement spinal des messages issus de stimulations nociceptives mécaniques, mais non thermiques au chaud.

Les études qui se sont intéressées aux seuils de sensibilité mécanique et thermique au chaud durant le cycle œstral de femelles C57Bl/6J n'ont jamais relevé de différences de ces seuils (Meziane et al., 2007 ; Zhao et al., 2021). Une étude très récente de Joshi et ses collaborateurs (2024) a cependant mis en évidence une forte différence de seuil de sensibilité mécanique à l'aide du test de von Frey chez ces souris, entre les phases de diœstrus et d'œstrus. Néanmoins, l'interprétation de cette observation doit être faite avec prudence, car les lavages vaginaux ont été réalisés avant les tests comportementaux. Le stress induit par la manipulation des animaux aurait pu biaiser les résultats obtenus dans cette étude (Sorge et al., 2014). Dans notre cas, les lavages vaginaux ont systématiquement été effectués après les tests comportementaux et les animaux sont testés 10 minutes après avoir été déposés dans les chambres en plexiglas. Avec ces précautions, l'impact du stress sur les seuils de sensibilité a été limité dans nos conditions.

D'autre part, les variations de réponses comportementales chez les souris résulteraient plutôt de variations inter-individuelles que de variations hormonales (Levy et al., 2023). Bien que l'impact de la variabilité inter-individuelle n'ait pas été vérifié dans le cadre de notre étude, celle-ci aurait effectivement pu contribuer aux différences comportementales observées.

Ainsi, d'après nos résultats, les variations de concentration de stéroïdes sexuels circulants pourraient participer au contrôle du gain des informations issues de stimulations mécaniques, mais pas thermiques au chaud. La contribution de ces stéroïdes sur le traitement des informations nociceptives pourrait avoir lieu dans la CDME.

- **Modulation du traitement des informations nociceptives en condition physiologique de base**

En situation contrôle, les amplitudes des CPSIe GABAergiques enregistrés dans les neurones eGFP+ sont diminuées en phases PEM lors de stimulation à basse fréquence (voir Figures 5C de l'Article 1). Les cellules centrales inhibitrices seraient moins inhibées en condition PEM, ce qui supposerait une plus forte inhibition des cellules verticales (voir Figure 4) et donc une diminution de la transmission d'informations nociceptives. Néanmoins, ces résultats sont en contradiction avec la différence de seuil de sensibilité mécanique observée entre les phases D et PEM.

Nous pouvons supposer que la modulation de la transmission synaptique GABAergique pourrait être compensée par une modulation de la transmission synaptique excitatrice dans le réseau nociceptif spinal au cours du cycle œstral. En effet, les métabolites sulfatés de la progestérone et de la testostérone (voir Figure 18) sont des modulateurs allostériques inhibiteurs des récepteurs NMDA et  $\alpha$ -amino-3-hydroxy-5-méthylisoxazol-4-propionate (AMPA ; Sedláček et al., 2008). De manière intéressante, parmi tous les métabolites de la progestérone, la variation de concentration cérébrale de prégnénolone sulfate semble être la seule à corrélérer à sa variation de concentration plasmatique (Corpéchet et al., 1997). En diœstrus, l'excitation serait réduite par une forte concentration des stéroïdes sulfatés provenant de la dégradation de la progestérone circulante, dont le pic de concentration a lieu quelques heures auparavant (voir Figure 20). Néanmoins, les stéroïdes sulfatés sont également des modulateurs allostériques inhibiteurs des récepteurs GABA<sub>A</sub> (voir Figure 18) : leur présence dans la CDME modulerait donc les transmissions synaptiques excitatrices, mais aussi inhibitrices.

Il semble ainsi difficile de lier nos observations à l'action d'un stéroïde en particulier, d'autant plus que de nombreuses incohérences existent quant aux concentrations sanguines et tissulaires de ces hormones pendant le cycle des femelles. Pour le moment, chaque étude travaillant sur modèle murin a mis en évidence des variations distinctes de concentrations sanguines d'estradiol et de progestérone, et aucun consensus clair ne semble exister (Bertolin & Murphy, 2014 ; Corpéchet et al., 1997 ; Joshi et al., 2024 ; Nilsson et al., 2015 ; Wall et al., 2023 ; Walmer et al., 1992). Ces distinctions proviennent sûrement d'aspects méthodologiques : les prélèvements sanguins ne sont pas réalisés aux mêmes horaires et les méthodes de quantification des hormones diffèrent selon les études. Malgré cela, une forte concentration de progestérone est généralement mesurée durant les deux jours suivant l'ovulation. De plus, un pic de concentration d'estradiol dans le sang peut être observé très peu de temps avant l'ovulation (voir Figure 20). Étant donnée la très faible concentration d'estradiol circulant chez les souris C57Bl/6 (Joshi et al., 2024 ; Nilsson et al., 2015), un rôle de ce stéroïde dans la modulation du traitement des informations nociceptives paraît peu probable.

Toutefois, l'heure à laquelle nos souris en phase de diœstrus sont utilisées pour les procédures comportementales, ou mises à mort en vue des expérimentations électrophysiologiques, correspond au moment durant lequel un important pic de concentration d'estradiol circulant aurait lieu (Wall et al., 2023). Un tel pic de  $60 \text{ pg.mL}^{-1}$  d'estradiol est resté insoupçonné jusqu'à sa découverte par l'équipe de Wall et ses collaborateurs (2023) chez des souris femelles C57Bl/6. L'estradiol ne module pas directement la transmission synaptique GABAergique, mais peut entraîner des modifications d'expression des sous-unités des récepteurs  $\text{GABA}_A$  via son action génomique (Noriega et al., 2010). Les changements d'amplitudes des CPSs GABAergiques entre les phases PEM et D en situation contrôle pourraient donc être causés par une expression variable de différents récepteurs  $\text{GABA}_A$  par les neurones GABAergiques.

Compte tenu des données contradictoires concernant les variations de concentration d'hormones sexuelles circulantes durant le cycle œstral chez la souris, il est pour nous difficile de supposer un effet dû à une concentration particulière d'estradiol, de progestérone et/ou des métabolites de la progestérone dans les différences électrophysiologiques et comportementales observées. Cependant, les différences de transmission synaptique inhibitrice dans la lamina II que nous avons mise en évidence en fonction du cycle œstral suggèrent que des stéroïdes circulants puissent agir sur le traitement des informations nociceptives. Des dosages de stéroïdes à partir de prélèvements sanguins et de moelle épinière au moment de l'utilisation de nos souris pourraient permettre d'identifier le ou les stéroïdes les plus probablement impliqués, sans pour autant apporter un lien causal.

- **Contribution des neurostéroïdes en situation inflammatoire**

L'effectif de femelles GAD65-eGFP était trop faible pour déterminer une éventuelle différence de seuil de sensibilité thermique au chaud en fonction des catégories de phases proposées. Toutefois, une hyperalgésie thermique au chaud plus prononcée a été observée chez des rattes en phase de proœstrus, 24 heures après une injection intraplantaire unilatérale de CFA (Bradshaw et al., 2000). Ainsi, un éventuel effet des hormones circulantes sur le traitement des informations nociceptives pourrait avoir lieu dans nos conditions, mais une augmentation de notre échantillon de souris est nécessaire.

Le seuil de sensibilité mécanique des femelles est quant à lui diminué 24 heures après l'injection intraplantaire bilatérale de carraghénane, par rapport à la condition physiologique de base. Aucune différence de seuil n'est en revanche observée entre les phases D et PEM (voir Figures 5F-G-H de l'Article 1). Cette absence de différence pourrait provenir d'une modification du traitement des informations nociceptives dans la lamina II.

En effet, en situation inflammatoire, les amplitudes des CPSIe GABAergiques sont augmentées sur les neurones eGFP<sup>-</sup> et eGFP<sup>+</sup>, mais uniquement durant les phases PEM (voir Figure S8 de l'Article 1). Cette augmentation a donc lieu au sein des voies pro- et antinociceptives : la balance entre ces deux voies ne serait donc pas modifiée entre une condition physiologique de base et une situation inflammatoire, et n'explique pas l'absence de différence de seuil entre les phases D et PEM en situation inflammatoire. Ainsi, un mécanisme de compensation inconnu, qui équilibrerait la sensibilité mécanique en situation inflammatoire, pourrait se mettre en place. D'autre part, le test de von Frey pourrait ne pas être la méthode idéale pour discriminer une possible différence de seuils de sensibilité mécanique en fonction du cycle œstral sur un faible échantillon. L'utilisation de pinces calibrées, permettant des mesures de seuils plus précises, pourrait être envisagée, bien que ce test ne soit généralement pas facilement applicable sur modèles murins.

Par ailleurs, il est intéressant de noter que l'augmentation des amplitudes des CPSIe GABAergiques n'est observable qu'en phases PEM. La modulation de la transmission synaptique GABAergique dans la lamina II est donc dépendante de la phase du cycle œstral. L'étude de Nilsson et ses collaborateurs (2015) a mis en évidence que la concentration circulante de progestérone est élevée chez des femelles C57Bl/6J durant les phases PEM. La dégradation de la progestérone en métabolites neuroactifs, dont l'ALLO et le THDOC (voir Figure 18), qui agissent en tant que modulateurs allostériques positifs des récepteurs GABA<sub>A</sub>, pourrait expliquer cette augmentation d'amplitude des CPSIe.

De plus, une inflammation périphérique aiguë entraîne une augmentation de la synthèse de neurostéroïdes dans la CDME (Bereiter et al., 2019 ; Poisbeau et al., 2005). À notre connaissance, aucune étude ne s'est encore intéressée à la contribution des stéroïdes circulants d'une part, et des neurostéroïdes d'autre part, dans la modulation du traitement d'informations sensorielles. Une approche pour évaluer la contribution relative de ces molécules serait d'incuber les tranches de moelle épinière, provenant de souris en situation inflammatoire, avec du finastéride ou de l'aminoglutéthimide. Dans le premier cas, nous observerions la modulation de la transmission synaptique GABAergique par l'inhibition de la synthèse des métabolites de la progestérone qui provient de la circulation et d'une synthèse locale dans la moelle épinière. Dans le second cas, l'aminoglutéthimide est un inhibiteur du métabolisme du cholestérol, empêchant donc la synthèse locale de progestérone. Les effets potentiellement observés par rapport à la condition précédente ne seraient donc dus qu'aux métabolites de la progestérone circulante.

En outre, nous pourrions également songer à utiliser des femelles ovariectomisées pour voir si les stéroïdes circulants ont bien rôle dans la modulation de la transmission synaptique GABAergique de la lamina II.

En conclusion, la modulation de la transmission synaptique GABAergique dans les circuits neuronaux que nous avons étudiés semble contrôler le gain des informations nociceptives, principalement issues de stimulations mécaniques, lors de leur traitement dans la lamina II. Cette modulation est sexe-dépendante, mais également dépendante des stades du cycle œstral chez les souris femelles. Une inflammation périphérique aiguë modifie cette modulation, en modifiant les états fonctionnels des synapses GABAergiques dans la lamina II.

#### **4. Synapses GABAergiques de la lamina II: différents états fonctionnels selon l'état physiologique ?**

Nos résultats électrophysiologiques indiquent que les connexions GABAergiques de la lamina II présentent des propriétés distinctes en fonction de la nature du neurone postsynaptique, de la fréquence des stimulations et de plusieurs conditions physiologiques. Ces propriétés distinctes impliquent différents types de plasticité dont la temporalité peut varier. Ainsi, les connexions GABAergiques de la lamina II semblent présenter plusieurs états fonctionnels.

- **Plasticité à court-terme des connexions GABAergiques au cours d'une activité soutenue dans le réseau nociceptif spinal**

Lors d'un train de 11 stimulations à haute ou basse fréquence, la transmission synaptique GABAergique déprime, quels que soient la nature excitatrice ou inhibitrice du neurone postsynaptique enregistré, le sexe des souris utilisées ou la condition physiologique (voir Figure S4 de l'Article 1, données brutes à 50 Hz non montrées). Cette dépression est cependant plus importante sur les neurones GABAergiques, suggérant que lors d'une activité soutenue dans la lamina II, les neurones excitateurs sont plus inhibés que les neurones inhibiteurs, ce qui est en accord avec nos données de *patch-clamp* dynamique. La dépression de la transmission synaptique GABAergique a déjà été observée à plusieurs reprises dans la lamina II (Cathenaut et al., 2022 ; Labrakakis et al., 2009 ; Zhang & Schneider, 2011). Elle est donc dépendante du type de neurone postsynaptique et pourrait résulter de mécanismes classiques de plasticité à court-terme entraînant une diminution de la libération vésiculaire (voir Figure 12), impliquant notamment l'activation de récepteurs couplés aux protéines G présynaptiques, tels que les récepteurs A1 de l'adénosine et les récepteurs GABA<sub>B</sub> (Cathenaut et al., 2022 ; Hugel & Schlichter, 2003).

- **Potentielle plasticité à long-terme de la transmission synaptique GABAergique induite par une inflammation périphérique aiguë**

Une inflammation périphérique aiguë ne modifie pas le décours temporel de la diminution des amplitudes des CPSIe au cours d'un train de stimulations, mais peut induire une augmentation globale des amplitudes des CPSIe pour certaines connexions et de manière sexe-dépendante (voir Figures 2B-C-D-E de l'Article 1). Ce décalage concerne les connexions GABAergiques contactant les neurones GABAergiques lors d'une activité à basse fréquence, mais également les connexions GABAergiques contactant les neurones non GABAergiques chez les femelles lors du même type d'activité.

L'augmentation globale des amplitudes des CPSIe pourrait provenir d'une plus forte libération de GABA, ou de l'action synergique de ce neurotransmetteur en présence d'un neuromodulateur qui potentialise la transmission synaptique GABAergique. Cette augmentation pourrait s'apparenter à une LTP de la transmission synaptique GABAergique induite par l'injection intraplantaire de carraghénane. Une LTP des synapses de fibres afférentes en situation inflammatoire a été plusieurs fois observée (voir le paragraphe II. 3. b.). De même, une LTP des synapses glycinergiques dans la lamina II peut être induite par l'application d'IL-1 $\beta$  ou à la suite d'une injection intraplantaire de formaline (Chirila et al., 2014).

Pourtant, aucune étude ne s'est intéressée à une potentielle plasticité à long-terme des synapses GABAergiques dans la CDME en condition d'inflammation périphérique aiguë. Des mécanismes de LTP des synapses GABAergiques ont pourtant été décrits dans d'autres structures du système nerveux central (voir Figure 16 ; Castillo et al., 2011 ; Kullmann et al., 2012). Une stimulation répétée des fibres afférentes peut par ailleurs augmenter la concentration de monoxyde d'azote et de BDNF dans la CDME, qui peuvent tous deux participer à la mise en place d'une LTP inhibitrice (Dedek et al., 2022 ; Fenselau et al., 2011 ; Zhou et al., 2019). L'augmentation de BDNF résulte notamment de l'activation de microglies dans des modèles d'inflammation périphérique ou de neuropathie (Dedek et al., 2022 ; Gilabert et al., 2023 ; Mapplebeck et al., 2018 ; Sorge et al., 2015). De manière intéressante, cette activation microgliale pourrait être spécifique aux mâles (Dedek et al., 2022 ; Mapplebeck et al., 2018 ; Sorge et al., 2015), mais d'autres études n'ont pas relevé de différences liées au sexe (Gilabert et al., 2023 ; Huck et al., 2022).

Ainsi, la mise en place d'une LTP des synapses GABAergiques dans la lamina II, dont les caractéristiques sont sexe-dépendantes, n'est pas à exclure en situation inflammatoire.

D'autre part, les neurostéroïdes synthétisés en condition d'inflammation périphérique aiguë pourraient également potentialiser la transmission synaptique GABAergique chez les mâles et les femelles. Effectivement, en présence de métabolites de la progestérone synthétisés dans la CDME, la transmission synaptique GABAergique est modulée de manière tonique (Inquimbert et al., 2007 ; Poisbeau et al., 2005). De plus, la transmission synaptique GABAergique ne semble potentialisée qu'en phases PEM en situation inflammatoire chez les femelles (voir Figures S8 de l'Article 1). Cette observation pourrait être en accord avec une modification de l'expression de certaines des sous-unités des récepteurs GABA<sub>A</sub>, telle que cela a été décrit auparavant, avec l'expression de récepteurs insensibles aux neurostéroïdes en diœstrus. Si une telle hypothèse se confirmait, la transmission synaptique GABAergique serait donc modulée chez les femelles par une contribution de stéroïdes sexuels circulants et par la synthèse locale de neurostéroïdes en condition d'inflammation périphérique aiguë.

- **Plasticité activité-dépendante lors d'activité à haute fréquence**

Une augmentation de la sommation des CPSIe est également observée pour les deux types de connexions lors d'une activité à haute fréquence en situation inflammatoire, mais uniquement chez les mâles. Cette augmentation semble résulter d'un effet de plasticité train sur train, car seul le 1<sup>er</sup> train à 50 Hz en situation inflammatoire n'est pas différent de ceux enregistrés en condition contrôle. En effet, l'amplitude du 1<sup>er</sup> CPSIe à partir du 2<sup>e</sup> train est potentialisée en situation inflammatoire et pourrait expliquer l'augmentation

de la sommation des CPSIe (voir Figure S2). Cette potentialisation, dépendante de la répétition de trains de stimulations à haute fréquence, a déjà été mise en évidence par Labrakakis et ses collaborateurs (2009) avec des trains de 12 stimulations à 20 Hz. Cette plasticité, dont la durée n'a pas été examinée, a cependant été observée en situation contrôle, alors qu'elle est absente dans notre condition contrôle.

La mise en place d'une telle plasticité, uniquement observable à haute fréquence, pourrait provenir du recrutement d'un *pool* supplémentaire de vésicule synaptique. En effet, il a été montré dans le cervelet que différents *pools* de vésicules synaptiques pouvaient être recrutés en fonction de l'activité dans le réseau étudié (Doussau et al., 2017). Une activité à haute fréquence permet d'engager des vésicules supplémentaires pour compenser la déplétion rapide des vésicules exocytées. Dans notre cas, ce recrutement pourrait prendre place à la suite de notre 1<sup>er</sup> train de stimulations à 50 Hz et provoquerait la potentialisation du 1<sup>er</sup> CPSIe des trains suivants. Il est toutefois surprenant d'observer ce phénomène uniquement chez des mâles en situation inflammatoire. Il serait alors intéressant de savoir si les mécanismes d'exocytose des vésicules synaptiques diffèrent entre mâles et femelles, et s'ils peuvent être modulés lors d'une inflammation périphérique aiguë.

Dans nos conditions, nos procédures ont donc mis en évidence l'existence de plusieurs états fonctionnels des synapses GABAergiques de la lamina II. Ces états dépendent de plasticités synaptiques qui se mettent en place sur plusieurs échelles temporelles, permettant une modulation distincte du traitement des informations nociceptives par l'inhibition dans le réseau nociceptif spinal.

## CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Nous avons mis en évidence des modulations sexe-dépendantes de la transmission synaptique GABAergique dans la lamina II en fonction de certaines conditions physiologiques. Ces modulations sont caractérisées par différents états fonctionnels des synapses GABAergiques et l'établissement de plasticités synaptiques. Nos données indiquent que ces modulations pourraient affecter la balance excitation-inhibition dans le réseau nociceptif spinal, et donc le traitement des informations nociceptives. En conséquence, les seuils de sensibilité mécanique, notamment, pourraient être modifiés.

Notre étude s'est concentrée sur l'aspect purement fonctionnel du réseau neuronal de la lamina II, en s'intéressant aux connexions entre neurones supposément excitateurs et inhibiteurs. Nous n'avons pas pris en compte la diversité des sous-populations de neurones de la lamina II, dont certaines pourraient être plus impactées par une modification des conditions physiologiques de l'organisme. L'utilisation future de modèles transgéniques, qui permettraient de cibler certaines populations de neurones dans la CDME, serait une première approche pour étudier les plasticités synaptiques spécifiques à ces populations.

Une approche optogénétique *in vivo* en parallèle de tests nociceptifs pourrait être utilisée afin d'observer les conséquences comportementales de la stimulation ou de l'inhibition d'une certaine population de neurones. Nous pourrions stimuler ou inhiber des cellules verticales, neurones via lesquels les messages nociceptifs sortent de la lamina II, et qui sont contactés par les cellules centrales que nous avons enregistrées. Les cellules verticales constituent la population majoritaire de cellules qui expriment la somatostatine et l'ablation de ces neurones induit une perte totale de sensibilité mécanique (Duan et al., 2014). Les voies pro- et antinociceptives que nous avons étudiées pourraient donc bien être responsables d'un contrôle fin de la sensibilité mécanique, par le biais d'un équilibre entre inhibition et désinhibition des cellules centrales qui est soumis à des modulations de la transmission synaptique GABAergique.

De plus, nous avons mis en évidence des variations de seuils de sensibilité mécanique, mais aussi de la transmission synaptique GABAergique dans la lamina II, en fonction du cycle œstral. Une implication des stéroïdes circulants dans le traitement nociceptif spinal est donc soupçonnée, et pourrait être vérifiée via l'utilisation de femelles ovariectomisées, en complément de dosages de stéroïdes dans la CDME.

L'ensemble de ce projet a finalement permis de montrer des modulations de la transmission synaptique GABAergique chez des souris mâles et femelles en situation contrôle et inflammatoire. Il s'inscrit donc bien dans la recherche des mécanismes physiologiques qui sous-tendent les différences de réponses à la douleur entre hommes et femmes.

## **ANNEXE**

L'article présenté dans cette section correspond aux travaux effectués par Lou Cathenaut et ses collaborateurs, auxquels j'ai participé. L'étude porte sur la transmission synaptique GABAergique et sa modulation dans la lamina II, chez des souris mâles en condition physiologique de base. Ces travaux ont permis de mettre en évidence que les caractéristiques de la transmission synaptique GABAergique, et sa plasticité, différaient en fonction de la nature excitatrice ou inhibitrice du neurone postsynaptique. Une dépression de la transmission synaptique a été observée sur les neurones GABAergiques, au cours d'un train de 11 stimulations à basse et haute fréquence, tandis qu'aucune plasticité à court-terme des connexions GABAergiques sur les neurones non GABAergiques n'a été relevée (voir Figures 3B-4B de l'Annexe). Cette même différence d'évolution d'amplitudes des CPSie GABAergiques a pu être retrouvée chez des femelles en condition contrôle lors de mes enregistrements (voir Figure S4C de l'Article 1), ce qui pourrait être un indice d'une bonne réplicabilité des résultats. Ainsi, la transmission synaptique GABAergique n'étant pas distincte entre mâles et femelles en condition physiologique de base, les mécanismes de plasticité présentés dans l'Annexe ci-joint pourraient également être appliqués aux femelles. Toutefois, ces mécanismes ne seront pas discutés dans le cadre de ce manuscrit.

# Inhibitory interneurons with differential plasticities at their connections tune excitatory–inhibitory balance in the spinal nociceptive system

Lou Catheraut, Benjamin Leonardon, Robin Kuster, Perrine Inquimbert, Rémy Schlichter, Sylvain Hugel\*

## Abstract

Networks of the dorsal horn of the spinal cord process nociceptive information from the periphery. In these networks, the excitation–inhibition balance is critical to shape this nociceptive information and to gate it to the brain where it is interpreted as pain. Our aim was to define whether short-term plasticity of inhibitory connections could tune this inhibition–excitation balance by differentially controlling excitatory and inhibitory microcircuits. To this end, we used spinal cord slices from adult mice expressing enhanced green fluorescent protein (eGFP) under the GAD65 promoter and recorded from both eGFP+ (putative inhibitory) and eGFP– (putative excitatory) neurons of lamina II while stimulating single presynaptic GABAergic interneurons at various frequencies. Our results indicate that GABAergic neurons of lamina II simultaneously contact eGFP– and eGFP+ neurons, but these connections display very different frequency-dependent short-term plasticities. Connections onto eGFP– interneurons displayed limited frequency-dependent changes and strong time-dependent summation of inhibitory synaptic currents that was however subjected to a tonic activity-dependent inhibition involving A1 adenosine receptors. By contrast, GABAergic connections onto eGFP+ interneurons expressed pronounced frequency-dependent depression, thus favoring disinhibition at these synapses by a mechanism involving the activation of GABA<sub>B</sub> autoreceptors at low frequency. Interestingly, the balance favors inhibition at frequencies associated with intense pain, whereas it favors excitation at frequencies associated with low pain. Therefore, these target-specific and frequency-specific plasticities allow to tune the balance between inhibition and disinhibition while processing frequency-coded information from primary afferents. These short-term plasticities and their modulation by A1 and GABA<sub>B</sub> receptors might represent an interesting target in pain-alleviating strategies.

**Keywords:** Nociceptive information processing, Synaptic plasticity, Excitation–inhibition balance, Frequency-coded information, Spinal cord stimulation, GABA, Adenosine

## 1. Introduction

Nociceptive information conveyed from the periphery by primary afferents is integrated in the dorsal horn of the spinal cord before being forwarded to the brain where it can lead to pain perception. Among sensory neurons, C-primary and A $\delta$ -primary afferents conveying nociceptive information mostly project to networks within dorsal horn superficial layers (laminae I–III). In lamina II (LII), primary afferents synapse with local excitatory or inhibitory interneurons.<sup>24,30,33,34</sup> In turn, LII inhibitory interneurons contact either excitatory or inhibitory interneurons.<sup>24,33,34,44,54</sup> Inhibitory interneurons in these networks play a critical role in the processing

of nociceptive information, and alteration of inhibition is associated with physiological or pathological pain states.<sup>23,39,48,50</sup> Lamina II interneurons are inhibited by both GABAergic and glycinergic connections, but local inhibitory connections between LII neurons are mostly GABAergic.<sup>27,33</sup>

Sensory neurons projecting to these networks encode the intensity of adequate stimuli using an action potential frequency code.<sup>1,2,7,51</sup> In other regions of the central nervous system, the processing of such frequency-coded information is known to involve frequency-selective synapses.<sup>13,26,29</sup> These synapses display short-term plasticity (STP) processes changing dynamically their efficacy over time as a function of the delay between presynaptic action potentials.<sup>6,37</sup> Therefore, networks in the spinal nociceptive system are also expected to display STP to process frequency-coded sensory information. Surprisingly, this question has been little addressed experimentally and has mostly used simple paired-pulse stimulation protocols<sup>8,20,24,43,53</sup> and very rarely protocols using trains of stimulations.<sup>9,20,27,53</sup>

Data on the impacts of stimulation trains in information processing in the dorsal horn are also pending to fully understand the mechanisms engaged by the rapidly expanding stimulation approaches used in pain alleviation such as spinal cord stimulation.<sup>17,22</sup> Together with other targets, this approach has indeed been suggested to activate inhibitory LII interneurons.<sup>22</sup>

The objective of this study was to examine short-term plasticities of GABAergic connections onto LII neurons and to

Sponsorships or competing interests that may be relevant to content are disclosed at the end of this article.

Centre National de la Recherche Scientifique, Université de Strasbourg, Institut des Neurosciences Cellulaires et Intégratives, Strasbourg, France

\*Corresponding author. Address: Centre National de la Recherche Scientifique, Université de Strasbourg, Institut des Neurosciences Cellulaires et Intégratives, 8 allée du Général Rouvillois, F-67000 Strasbourg, France. Tel.: +33388456666. E-mail address: hugels@inci-cnrs.unistra.fr (S. Hugel).

Supplemental digital content is available for this article. Direct URL citations appear in the printed text and are provided in the HTML and PDF versions of this article on the journal's Web site ([www.painjournalonline.com](http://www.painjournalonline.com)).

PAIN 163 (2022) e675–e688

© 2021 International Association for the Study of Pain

<http://dx.doi.org/10.1097/j.pain.0000000000002460>

determine whether such plasticities were different when the synapses involved an excitatory or an inhibitory postsynaptic (target) neuron. To this end, we prepared acute slices from mice expressing enhanced green fluorescent protein (eGFP) under the control of the GAD65 promoter.<sup>10</sup> We recorded from either eGFP-expressing (eGFP+) or eGFP-negative (eGFP–) neurons and also performed simultaneous recordings of eGFP+ and eGFP– neurons while stimulating single presynaptic GABAergic neurons.

Our results indicate that GABAergic connections onto eGFP+ neurons of LII display different short-term plasticities than those onto eGFP– neurons, favoring inhibition at frequencies occurring during intense nociceptive stimulation and favoring excitation at frequencies occurring during nociceptive stimulation of low intensity.

## 2. Methods

### 2.1. Animals

For all experiments, we used male heterozygous C57BL/6 BAC transgenic mice eGFP under the control of the GAD65 promoter obtained from Ferenc Erdelyi and Gabor Szabo (Institute of Experimental Medicine, Budapest).<sup>10</sup> In these mice, ~80% of LII eGFP+ neurons are GABA immunopositive and ~60% of GABA-immunopositive neurons are eGFP+.<sup>10</sup> These mice were interbred at the local animal facility, the Chronobiotron (agreement number: A67-2018-38). The animals were housed at room temperature (22–25°C) with a 12-hour light–dark cycle with free access to food and water. All procedures used were in accordance with laws for laboratory animal welfare and approved by the Local Ethical Committee of the University of Strasbourg (CREMEAS; agreement number: APAFIS#8138-2016121008385362 v3).

### 2.2. Slicing procedure

Adult transgenic mice (5–9 weeks) were anaesthetized with urethane (1.9 g·kg<sup>-1</sup>). Under deep anesthesia, intracardiac perfusion was performed with oxygenated ice-cold (~4°C) sucrose artificial cerebrospinal fluid (sACSF) bubbled with carbogen (95% O<sub>2</sub>, 5% CO<sub>2</sub>) containing (in mM) 248 sucrose, 26 NaHCO<sub>3</sub>, 11 glucose, 2 KCl, 2 CaCl<sub>2</sub>, 1.3 MgSO<sub>4</sub>, 1.25 KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, and 2.5 kynurenic acid. The lumbar part (L3–L5) of the spinal cord was removed by laminectomy, and 400- $\mu$ m-thick transverse slices were cut with a vibrating microtome (Leica, VT1200S). Slices were kept until recording at room temperature (~25°C) in oxygenated ACSF containing (in mM) 126 NaCl, 2.5 KCl, 2 CaCl<sub>2</sub>, 2 MgCl<sub>2</sub>, 26 NaHCO<sub>3</sub>, 1.25 NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, and 10 glucose.

### 2.3. Patch-clamp recordings

After recovery (~1 hour), slices were transferred to the recording chamber, maintained at 32 ± 1°C and continuously perfused by oxygenated ACSF at 3 to 4 mL/min. To isolate GABAergic inhibitory postsynaptic currents (IPSCs), glycinergic and glutamatergic ionotropic transmissions were blocked by adding in ACSF 1  $\mu$ M strychnine and 10  $\mu$ M 6-cyano-7-nitroquinoxaline-2,3-dione (CNQX), respectively. Whole-cell patch recordings were made from inhibitory (eGFP+) and putative excitatory (eGFP–) LII neurons. Recording and extracellular stimulation electrodes (4–7 M $\Omega$ ) were pulled from borosilicate glass capillaries (1.2 mm inner diameter, 1.69 mm outer diameter, Warner Instruments, Harvard Apparatus) using a P1000 electrode puller (Sutter Instruments). Recording electrodes were filled with (in mM) 140 KCl, 2 MgCl, 10 HEPES, and 2 MgATP; pH 7.3. In experiments using increased stimulation amplitudes, 1 mM

QX314 was added to this intrapipette solution to prevent spiking of the recorded neuron. Junction potentials were not corrected. Whole-cell patch clamp recordings (in current-clamp and voltage-clamp recording modes) were made using a MultiClamp 700A amplifier (Molecular Devices). Signals were low-pass filtered at 5 kHz, sampled at 20 kHz, digitized using a BNC-2110 data acquisition card (National Instruments) and acquired with Strathclyde Electrophysiology Software (WinWCP, John Dempster, University of Strathclyde, Glasgow, United Kingdom).

### 2.4. Experimental design

Our recordings started in the current-clamp mode. Holding current was adjusted to keep the recorded neuron at a membrane potential of –60 mV. In this mode, firing patterns were determined in response to 1-s long depolarizing current injections through the recording electrode (20–80 pA in 20 pA steps). For some experiments in the current-clamp mode, we simulated excitatory postsynaptic potentials (EPSPs) by injecting EPSC traces. These EPSC traces were constructed by averaging excitatory postsynaptic currents evoked by local electrical extracellular stimulation (eEPSCs) recorded in LII neurons (same protocol as for evoked inhibitory postsynaptic currents [eIPSCs] described below) with 10  $\mu$ M bicuculline and 1  $\mu$ M strychnine. In these conditions, the average eEPSC was of 88.9 ± 10.6 pA with a rise time of 2.1 ± 0.3 milliseconds and a decay time constant of 5.7 ± 0.9 milliseconds (n = 4 neurons). To simulate the convergence of excitatory inputs as suggested by Grudt and Perl (2002) who recorded C-fiber-mediated EPSCs in islet cells of above 400 pA, we injected the current corresponding to 4 times the average eEPSC we measured.

After this initial phase, neurons were recorded in the voltage-clamp mode at a holding potential of –60 mV. Monosynaptic IPSCs were evoked by local extracellular electrical stimulation. This stimulation was performed by applying current steps (0.25 ms; 0.10–0.40 mA; average 0.21 ± 0.01 mA) through a patch pipette filled with ACSF. This stimulation electrode was placed at a distance of 20 to 150  $\mu$ m from the cell body of the recorded neuron. For each recorded neuron, the lowest amplitude of stimulation evoking inhibitory postsynaptic currents was determined. This amplitude was increased by 0.05 mA to eIPSCs for each stimulation applied. Synaptic contacts were identified as monosynaptic unitary connections when the following criteria were satisfied: (1) all-or-none appearance of eIPSCs, (2) absence of increase in eIPSC amplitude when minimal stimulation amplitude was increased by 0.05 mA, (3) disappearance of eIPSCs when stimulation polarity was inverted, and (4) constant latency of the eIPSCs.

The same criteria were applied for simultaneous recordings of pairs of eGFP– and eGFP+ neurons connected by the same presynaptic neuron.

For all neurons, paired-pulse stimulations were applied with an interstimulation interval (ISI) of 200 milliseconds repeated every 10 seconds. In a subset of neurons, paired-pulse stimulations with multiple ISIs were applied (ISIs of 20, 50, 75, 100, 200, and 300 ms) and pairs of stimulation were separated by 10 seconds. Trains of 11 stimulations repeated 10 times were used in most experiments. Unless otherwise stated, trains applied at 5 Hz were repeated every 20 seconds, whereas trains applied at 50 Hz were applied every 60 seconds.

### 2.5. Data quantification and analysis

Action potential firing patterns were analyzed offline using Clampfit 10 (Molecular Devices). Neurons firing multiple spikes

during the whole duration of the depolarizing current step and displaying a constant interval between each spike were classified as tonic firing (tonic) type (Fig. 1A); neurons with a burst of spikes at the beginning of depolarizing current step and showing a decrease in interspike interval duration during the step as well as a progressive reduction of spike amplitudes were classified as initial bursting (IB) type (Fig. 1A); neurons fulfilling neither of these criteria were classified as “other type” of firing pattern.

Evoked inhibitory postsynaptic currents were also analyzed offline using Clampfit 10. Synaptic inhibitory transmission was quantified by measuring the amplitude of individual eIPSCs. To take into account baseline changes due to eIPSC summation, the amplitude immediately before stimulation was subtracted from the peak amplitude of each eIPSC. Unless otherwise stated, stimulation protocols were applied 10 times in each neuron and the within-cell average across trials was calculated by averaging eIPSC amplitudes from these 10 repetitions. When protocols consisted of trains of stimulations, amplitudes of eIPSCs of the same rank in the train were averaged. These within-cell averages across 10 trials were used for statistical analysis (Fig. S1, <http://links.lww.com/PAIN/B478>).

Averaging amplitudes of raw eIPSCs gives greater weight to connections in which eIPSCs display larger amplitudes. Therefore, in addition to analyzing raw eIPSC amplitudes, we calculated normalized eIPSC amplitudes. These were calculated by normalizing for each neuron the averaged eIPSC amplitudes to the averaged amplitude of the first eIPSCs in the train. This allowed to analyze relative changes in amplitude during trains regardless of the initial raw amplitude values of eIPSCs.

Both raw and normalized eIPSC amplitudes were used for statistical analysis.

For paired-pulse stimulation experiments, the paired-pulse ratio (PPR) was calculated as the amplitude of the second eIPSC divided by the amplitude of the first eIPSC.

The weighted decay time constant ( $\tau_w$ ) was calculated as described in the study by Labrakakis et al.<sup>28</sup> from biexponential fits using Equation 1.

$$\tau_w = (\tau_f \cdot A_f + \tau_s \cdot A_s) / (A_f + A_s) \quad (1)$$

where  $\tau_f$  and  $\tau_s$  are the fast and slow decay time constants, respectively, and  $A_f$  and  $A_s$  the corresponding amplitudes used as weighting factors.

For experiments with GABA<sub>B</sub> and A1 antagonists, trains of stimulations were repeated before, during, and after perfusion of the antagonists. Ten trains were applied in control conditions, and the antagonist was subsequently applied for 10 minutes. The effect of antagonists was measured after at least 3 minutes of perfusion. For each neuron, amplitudes of eIPSCs of the same rank in the 2 conditions (ie, control vs antagonist) were averaged. Results are expressed as mean  $\pm$  SEM.

For some experiments, we recorded miniature IPSCs. These synaptic events were detected using WinEDR (V3.8.6, Strathclyde Electrophysiology Software, John Dempster, University of Strathclyde, Glasgow, United Kingdom) with an amplitude threshold detection algorithm and were visually inspected for validity. Peak amplitude of miniature IPSCs was determined using WinWCP (version 5.4.5). Events were detected during at least 200 seconds.

## 2.6. Statistics

Statistical analyses were performed using averaged eIPSC amplitudes (ie, within-cell average across trials) of each neurons

(Fig. S1, <http://links.lww.com/PAIN/B478>). These were calculated for each neuron by averaging amplitudes of eIPSCs of the same rank (2 ranks for paired-pulse experiments and 11 ranks for trains of stimulations). The number of neurons is given as the *n* value in the Results section.

The Student *t*-test was used to compare amplitudes of isolated eIPSCs, decay time constants, and miniature IPSCs (mIPSCs) after having tested for data normality (Kolmogorov–Smirnov test,  $P > 0.05$ ).

For paired-pulse protocols, the proportions of neurons displaying a facilitation (PPR  $> 1.1$ ), a depression (PPR  $< 0.9$ ), or no change in PPR (0.9–1.1) were analyzed with a log-linear analysis performed on the 3-way contingency table of the proportion of facilitation, ISI, and eGFP+/eGFP– condition using Statistica 13 (StatSoft). The  $\chi^2$  values and *P* values given in the text correspond to those of marginal associations between the 2 parameters examined. To compare amplitudes of the 2 first eIPSCs during stimulation trains protocols, the Wilcoxon signed-rank test for paired data was used because data were not always normally distributed.

Nonlinear regression analysis<sup>38</sup> was used to analyze PPR values as a function of ISIs and changes in eIPSC amplitudes during stimulation train protocols. Individual data of all neurons were always used for curve fitting, and average values were used for illustration (Fig. S1, <http://links.lww.com/PAIN/B478>).

Paired-pulse ratio values as a function of ISIs for eGFP+ and eGFP– neurons were fitted with Equation 2.

$$Y = A1 + ((A1 - A2) \times \text{EXP}(-X/A3)) \quad (2)$$

where  $A1$  corresponded to *Y* value for ISI = 0,  $A2$  corresponded to the asymptotic value of the fit, and  $A3$  corresponded to the exponential decay constant of PPR value as a function of ISIs. Parameters  $A1$ ,  $A2$ , and  $A3$  were determined by nonlinear curve fitting using KyPlot 6.0 (KyensLab, Tokyo, Japan). A global fit on the same data was also performed using the same equation. This global fit was compared with the sum of fits from separated data obtained from eGFP+ and eGFP– neurons.

Nonlinear curve fitting was used to analyze and compare changes in eIPSC amplitudes during stimulation train protocols. This analysis was performed using averaged eIPSC amplitudes of each neurons.

Amplitudes of eIPSCs as a function of their respective rank in the train were fitted using Equation 3.

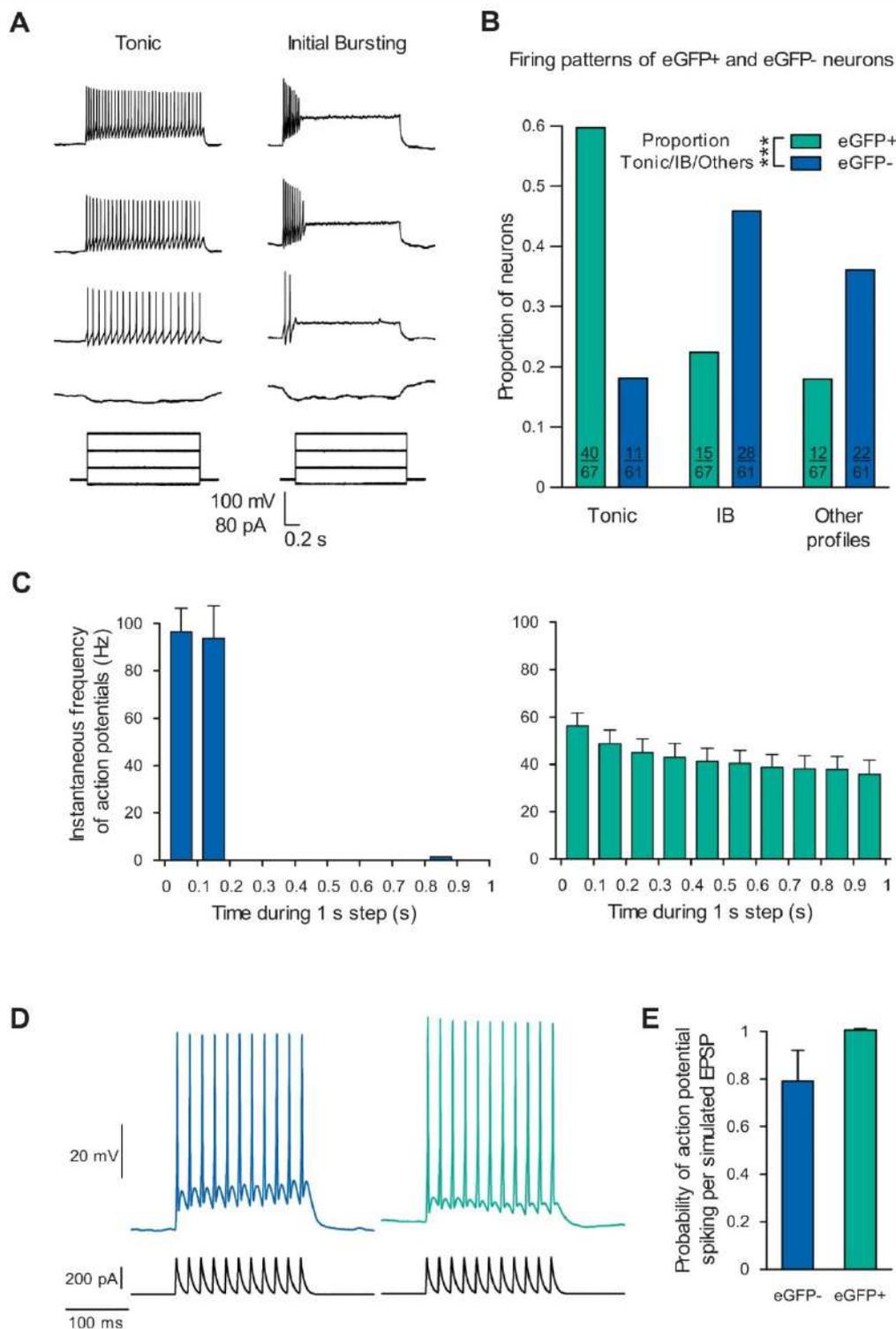
$$Y = A1 + A2 \times (1 - \text{EXP}(-X/A3)) \quad (3)$$

where  $A1$  corresponded to *Y* value of the first eIPSCs of the train,  $A2$  corresponded to the change in amplitude for the curve asymptote, and  $A3$  corresponded to the constant of the exponential function.

$A1$  and  $A2$  are in pA for fits of raw eIPSC amplitudes and are dimensionless for fits of normalized eIPSC amplitudes.  $A3$  unit is the rank of stimulation in the train.

To define whether STP was expressed during trains of stimulations, ie, whether significant changes in amplitude occurred during the train, fits with Equation 3 were compared with linear fits with slope values forced to 0. When fits with Equation 3 provided statistically significant improvements with respect to the linear fit with slope value forced to 0, the connections were considered as displaying a significant STP during the corresponding protocol.<sup>38</sup>

To compare 2 different conditions (eg, eGFP– vs eGFP+ or presence/absence of antagonists), data from each conditions



**Figure 1.** Action potential firing patterns in eGFP+ and eGFP- neurons. (A) Example of a tonic firing eGFP+ neuron (left) and of an initial bursting eGFP- neuron (right). (B) A majority of eGFP+ neurons were of tonic firing type (tonic), whereas a majority of eGFP- neurons were of initial bursting (IB) type. Proportions of firing patterns were significantly different in eGFP+ and eGFP- neurons (Fisher exact test,  $P = 6.3 \cdot 10^{-6}$ ;  $n = 67$  eGFP+ neurons and 61 eGFP- neurons). (C) Instantaneous firing frequency in 100 milliseconds bins in response to 1-s long 80 pA current injections in eGFP- IB neurons (left) and eGFP+ tonic neurons (right). (D) Spiking in an eGFP- (left) and an eGFP+ (right) neuron during a 50 Hz train of simulated EPSCs. (E) Probability of action potential spiking per simulated EPSPs in eGFP- neurons ( $n = 7$ ) and eGFP+ neurons ( $n = 4$ ). eGFP+, enhanced green fluorescent protein positive; eGFP-, enhanced green fluorescent protein negative; EPSP, excitatory postsynaptic potential.

were fitted with Equation 3, either individually (sum of 2 functions) or pooled (1 single function). When the sum of 2 individual fits provided statistically significant improvements about the fit of

pooled data, the 2 conditions were considered as having distinct effects.<sup>38</sup> Fits of pooled data are illustrated (in black) when the 2 conditions were not different, whereas individual fits are illustrated

(in color) when the 2 conditions were significantly different. For illustration purpose, these fits are illustrated together with the averages of “cross-trial averages.”

In the Results section, *P* value of model comparisons are given as well as the corresponding number of neurons (*n*). The significance level used for all analysis was set at 0.05. The goodness of fit was also compared by calculating for both conditions the Bayesian information criterion (BIC), Akaike information criterion (AIC), and corresponding sample size bias-corrected values (AICc).<sup>47</sup> A model was considered as better if model comparison *P* value was < 0.05 and if the model provided a reduction in AICc. The only case where the *P* value and AICc are in conflict (*P* < 0.05 and increase in AICc for the effect of DPCPX on eGFP+ neurons) is mentioned in the Results section. Details of all models (A1, A2, A3, degree of freedom, residual sum of squares, AIC, AICc, and BIC) as well as details of model comparison (F, *P*, differences in AIC, AICc, and BIC) are given in Supplementary Tables 1 to 8 (available at <http://links.lww.com/PAIN/B478>).

### 2.7. Drug application or pharmacology

All pharmacological agents were bath applied. To isolate GABAergic eIPSCs, 1  $\mu$ M strychnine and 10  $\mu$ M CNQX were present in all our electrophysiological experiments. CGP55845 ((2S)-3-[[[(1S)-1-(3,4-dichlorophenyl)ethyl]amino-2hydroxypropyl](phenylmethyl)phosphinic acid hydrochloride; 10  $\mu$ M, Tocris) and DPCPX (8-cyclopentyl-1,3-dipropylxanthine solid; 10  $\mu$ M, Sigma) were used to block GABA<sub>B</sub> receptors and adenosine A1 receptors, respectively. In a subset of experiments, eEPSCs were recorded in presence of strychnine (1  $\mu$ M) and bicuculline (10  $\mu$ M, sigma). Miniature IPSCs were recorded in the presence of tetrodotoxin (0.5  $\mu$ M, Latoxan). CNQX and CGP55845 were dissolved in DMSO, DPCPX was dissolved in ethanol, and strychnine in water; all were prepared as  $\times 10,000$  concentrated stock solutions. For experiments with these antagonists, analysis of changes in normalized eIPSC amplitudes allowed to detect modulations engaged during the train (phasic modulation). All substances were diluted to their final concentration in ACSF at the beginning of each experiment.

## 3. Results

### 3.1. Firing properties of enhanced green fluorescent protein-positive and enhanced green fluorescent protein-negative neurons

Lamina II neurons responded to sustained depolarizing current injections with various patterns of action potential firing.<sup>19,24,34</sup> Two main firing patterns dominated (Figs. 1A and B and S2, <http://links.lww.com/PAIN/B478>): tonic type (40%, 51/128) and IB type (34%, 43/128). Other firing patterns were less frequently observed (altogether 27%, 34/128). Most of eGFP- neurons displayed an IB firing pattern (46%, 28/61) and a lower proportion of tonic (36%, 11/61) and other firing patterns (18%, 22/61). Most of eGFP+ neurons displayed a tonic pattern (60%, 40/67) and a lower proportion of IB (22%, 15/67) and other firing patterns (18%, 12/67). The proportions of IB, tonic, and other firing patterns in eGFP- and eGFP+ neurons were significantly different (Fisher exact test,  $P = 6.3 \cdot 10^{-6}$ , Fig. 1B). The average firing frequency of both eGFP- IB neurons and eGFP+ tonic neurons was above 50 Hz during the first 200 milliseconds of 80 pA current steps ( $95.1 \pm 11.9$  Hz and  $52.4 \pm 5.7$  Hz, respectively, Fig. 1C). When EPSPs were simulated by injection of EPSCs at

50 Hz during 200 milliseconds, the proportion of EPSPs triggering an action potential was of  $79.1 \pm 13.0\%$  in eGFP- neurons ( $n = 7$ ) and  $100.0 \pm 13.0\%$  in eGFP+ neurons which occasionally discharge more than one action potential per simulated EPSP ( $n = 4$ ; Figs. 1D and E). These data indicate that neurons of LII are able to discharge action potentials at several tens of hertz, at least during few hundreds of milliseconds.

### 3.2. GABAergic synaptic transmission in lamina II

The average amplitude of pharmacologically isolated eIPSCs (Fig. 2A) was not significantly different when recorded in eGFP- neurons ( $-60.5 \pm 5.1$  pA;  $n = 54$ ) and eGFP+ neurons ( $-55.6 \pm 4.4$  pA;  $n = 49$ ) (unpaired Student *t*-test,  $t = -0.709$ ,  $df = 101$ ,  $P = 0.48$ ). Evoked inhibitory postsynaptic currents were evoked at similar stimulation amplitude intensity in eGFP- neurons ( $0.21 \pm 0.01$  mA;  $n = 53$ ) and eGFP+ neurons ( $0.21 \pm 0.01$  mA;  $n = 45$ ) (unpaired Student *t*-test,  $t = 0.176$ ,  $df = 96$ ,  $P = 0.86$ ).

The weighted decay time constant ( $\tau_w$ ) measured for isolated eIPSCs (Fig. 2B) was not significantly different when recorded in eGFP- neurons ( $32.8 \pm 2.8$  ms;  $n = 29$ ) and eGFP+ neurons ( $31.1 \pm 4.5$  ms,  $n = 18$ ) (unpaired Student *t*-test,  $t = -0.340$ ,  $df = 45$ ,  $P = 0.736$ ).

In the same preparation, the amplitude of mIPSCs (Fig. 2C) was not significantly different when recorded in eGFP- neurons ( $-16.7 \pm 0.9$  pA;  $n = 9$ ) and eGFP+ neurons ( $-17.8 \pm 1.2$  pA;  $n = 22$ ) (unpaired Student *t*-test,  $t = 0.526$ ,  $df = 29$ ,  $P = 0.603$ ). Therefore, eIPSC amplitude represented on average 3 times the amplitude of mIPSCs.

### 3.3. Postsynaptic target-specific paired-pulse plasticity at GABAergic connections in lamina II

Short-term synaptic plasticity was first examined using paired-pulse stimulation protocols with various ISIs.

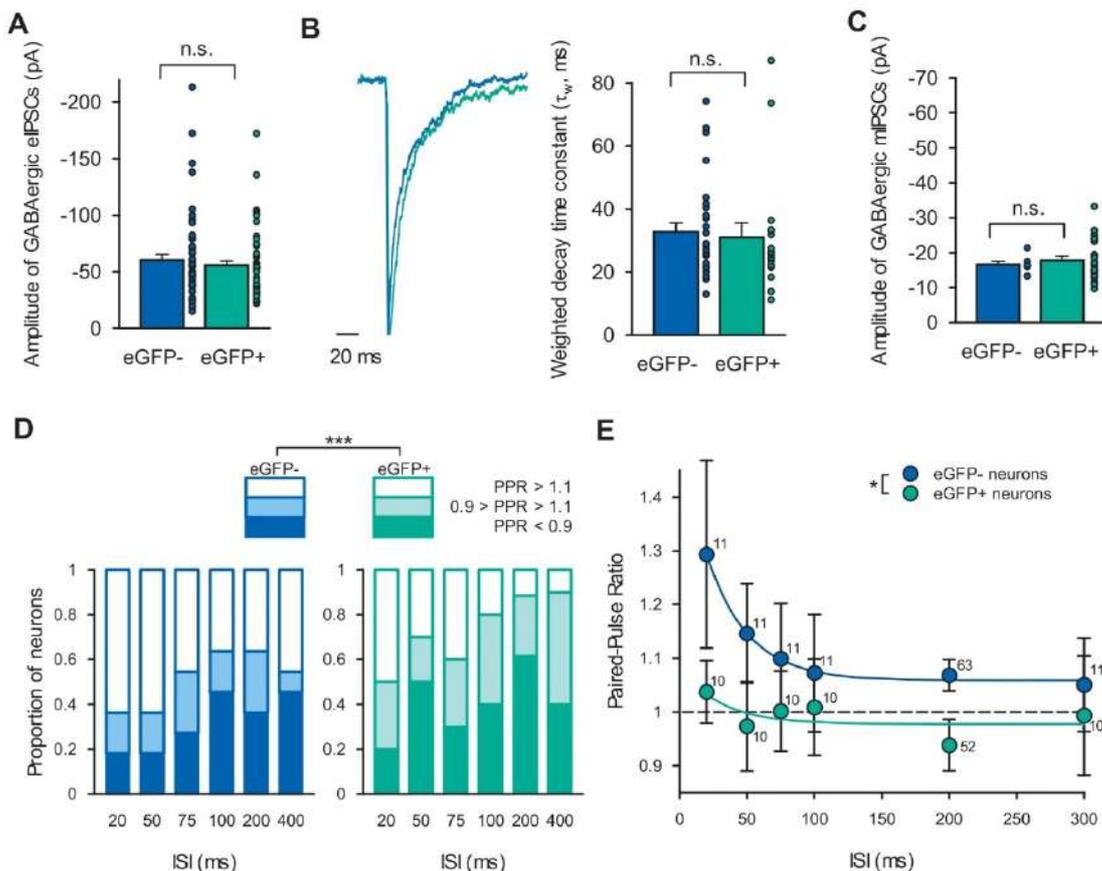
Inhibitory connections onto eGFP+ or eGFP- neurons can display paired-pulse facilitation (PPR > 1.1), paired-pulse depression (PPR < 0.9), or no change in PPR (PPR: 0.9-1.1). The proportions of neurons in each category were significantly different in eGFP- and eGFP+ neurons (Fig. 2D;  $\chi^2 = 11.97$ ;  $P = 0.003$ ), with a larger proportion of paired-pulse facilitation in eGFP- neurons.

Values of PPR at various ISIs were significantly different in eGFP+ and eGFP- neurons (nonlinear curve fitting,  $P = 7.2 \cdot 10^{-3}$ , Table S1, <http://links.lww.com/PAIN/B478>, Fig. 2E). In eGFP+ neurons, the average PPR values were close to 1 at all tested ISIs, whereas in eGFP- neurons, the average PPR values were above 1.1 for ISIs below 100 milliseconds and progressively decreased at longer ISIs.

These data indicate that GABAergic connections onto eGFP- neurons preferentially displayed facilitation at short ISIs and that GABAergic connections onto eGFP+ neurons preferentially displayed depression at long ISIs. Although PPR revealed differences between connections onto eGFP+ and eGFP- neurons, incoming information from the periphery is usually under the form of trains of action potentials rather than isolated pairs of impulses. In the following experiments, we therefore examined the effect of trains of stimulations.

### 3.4. Short-term plasticity during 5 Hz activation of GABAergic connections in lamina II

We examined the short-term synaptic plasticity expressed by GABAergic connections onto LII neurons during their repeated activation at low frequency. We applied trains of 11 stimulations at 5 Hz (Fig. 3A). These trains were repeated 10 times at an interval



**Figure 2.** GABAergic IPSCs recorded in eGFP+ and eGFP– neurons. (A) Amplitude of eIPSCs is similar in eGFP+ (green) and eGFP– neurons (blue). (B) Left: example of eIPSCs recorded in an eGFP+ and an eGFP– neuron (average of 10 eIPSCs; eIPSCs are scaled). Right: Weighted decay time constant of GABAergic eIPSCs is similar in eGFP+ and eGFP– neurons. (C) Amplitudes of mIPSCs are similar in eGFP+ and eGFP– neurons. (D) Proportions of neurons displaying a paired-pulse facilitation (PPR > 1.1), a paired-pulse depression (PPR < 0.9), or no change in PPR (0.9–1.1) at various ISIs in eGFP+ and eGFP– neurons. These proportions are significantly different in eGFP+ and eGFP– neurons (log-linear analysis;  $P = 0.003$ ). (E) Paired-pulse ratios as a function of ISIs were significantly different in eGFP+ and eGFP– neurons (nonlinear curve fitting,  $P = 7.20 \cdot 10^{-3}$ ). Curves correspond to fits with monoexponential functions. Numbers beside the points correspond to the number of neurons recorded. eIPSC, evoked inhibitory postsynaptic current; IPSC, inhibitory postsynaptic current; ISI, interstimulation interval; PPR, paired-pulse ratio.

of 20 seconds. For these experiments, 54 eGFP– and 49 eGFP+ neurons were recorded (averages from individual neurons Figs. S3A and B, <http://links.lww.com/PAIN/B478>; individual neurons Figs. S4A–D, <http://links.lww.com/PAIN/B478>).

Evolution of eIPSC amplitudes during 5 Hz trains remained similar in the first 5 and the last 5 trains for both eGFP– and eGFP+ neurons, indicating that no train-to-train plasticity was engaged under these experimental conditions ( $P_{\text{eGFP-}} = 0.889$ ,  $P_{\text{eGFP+}} = 0.312$ , Table S2, <http://links.lww.com/PAIN/B478>, Fig. 3). Moreover, eIPSC2/eIPSC1 remained unchanged in the first 5 and the last 5 trains for connections on both eGFP– and eGFP+ neurons ( $P_{\text{eGFP-}} = 0.678$ ,  $P_{\text{eGFP+}} = 0.223$ , Wilcoxon signed-rank test for paired data, Fig. S5A, <http://links.lww.com/PAIN/B478>). Therefore, for each neuron, amplitudes of eIPSCs of the same rank in all 10 trains were averaged.

The average amplitude of the first eIPSCs of 5 Hz trains was not significantly different when recorded in eGFP– or eGFP+ neurons ( $P = 0.349$ ). However, evolution of normalized eIPSC amplitudes during 5 Hz trains was significantly different in eGFP– or eGFP+ neurons ( $P = 1.94 \cdot 10^{-14}$ , Table S2, <http://links.lww.com/PAIN/B478>, Fig. 3B). Such significant difference between eGFP– and eGFP+ neurons was also observed in experiments where stimulation amplitudes were increased from 0.20 mA to 0.45 mA (11 eGFP– neurons and 11 eGFP+ neurons,  $P_{\text{normalized}} = 8.70 \cdot 10^{-15}$ , Table S3 and Fig. S6,

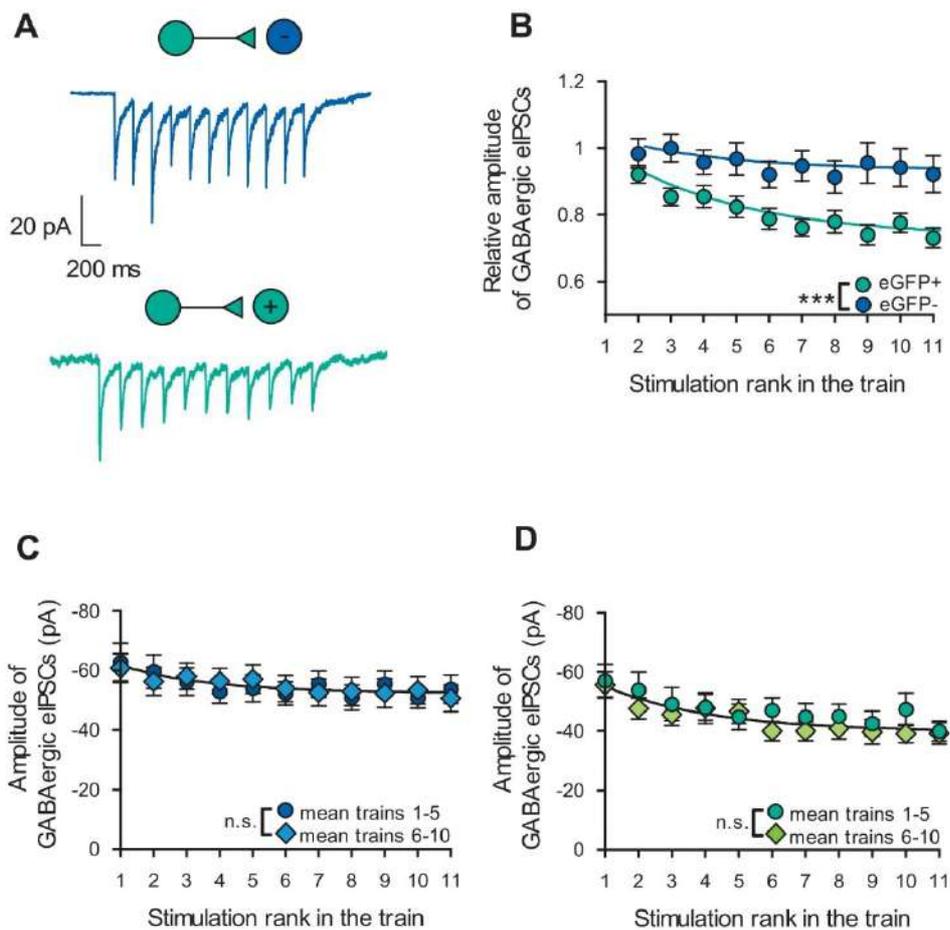
<http://links.lww.com/PAIN/B478>), indicating that changes in stimulation efficacy during trains of stimulations were unlikely to influence our results.

In eGFP– neurons, amplitudes of normalized eIPSCs did not significantly change (Fig. 3B and S3B, <http://links.lww.com/PAIN/B478>), indicating that no plasticity was expressed during the train ( $P_{\text{normalized}} = 0.451$ , Table S2, <http://links.lww.com/PAIN/B478>). Contrasting with these data, the amplitude of normalized eIPSCs recorded from eGFP+ neurons significantly decreased during the train ( $P_{\text{normalized}} = 4.17 \cdot 10^{-7}$ , Fig. 3B), decreasing by 20% at the asymptote (see parameters of the curve fitting Table S2, <http://links.lww.com/PAIN/B478>). Similar data were obtained for raw eIPSC amplitudes (Fig. S3A and Table S2, <http://links.lww.com/PAIN/B478>).

These data indicated that on average, GABAergic connections onto eGFP– neurons displayed no plasticity during 5 Hz trains, whereas connections onto eGFP+ neurons displayed strong depression.

### 3.5. Short-term plasticity during 50 Hz activation of GABAergic connections in lamina II

We examined the short-term synaptic plasticity expressed by GABAergic connections onto LII neurons during their repetitive



**Figure 3.** Short-term plasticity of GABAergic connections during trains at 5 Hz. (A) Representative average current trace recorded in an eGFP– neuron (top) and eGFP+ neuron (bottom). (B) Relative amplitudes of GABAergic eIPSCs recorded in eGFP– and eGFP+ neurons (amplitudes relative to eIPSCs of rank 1). (C, D) Changes in eIPSC amplitudes during the trains remained similar in the first 5 and the last 5 trains for connections on both eGFP– (C) and eGFP+ (D) neurons. Results of nonlinear regressions used to compare conditions are given as  $P > 0.5$ : n.s. and  $P < 0.001$ : \*\*\*  $n = 54$  eGFP– and  $n = 49$  eGFP+ neurons. Details of regressions and the corresponding analysis are given in Supplementary Table 1 (available at <http://links.lww.com/PAIN/B478>). eGFP+, enhanced green fluorescent protein positive; eGFP–, enhanced green fluorescent protein negative; eIPSC, evoked inhibitory postsynaptic current.

activation at high frequency ( $n = 27$  eGFP– neurons and  $n = 19$  eGFP+ neurons). We applied trains of 11 stimulations at 50 Hz (**Fig. 4A**). These trains were repeated 10 times (averages from individual neurons Figs. S3C–F, <http://links.lww.com/PAIN/B478>; individual neurons Figs. S4E–H, <http://links.lww.com/PAIN/B478>). In a first set of experiments, trains were repeated with long intertrain intervals of 60 seconds to limit the development of train-to-train plasticities. In these conditions, evolution of eIPSC amplitudes during 50 Hz trains remained similar in the first 5 and the last 5 trains for both eGFP– and eGFP+ neurons ( $P_{\text{eGFP–}} = 0.278$ ;  $P_{\text{eGFP+}} = 0.391$ , **Fig. 4**, Table S4, <http://links.lww.com/PAIN/B478>). This indicates, that no train-to-train plasticity was engaged under these experimental conditions allowing to average the traces of the 10 trains for each neuron.

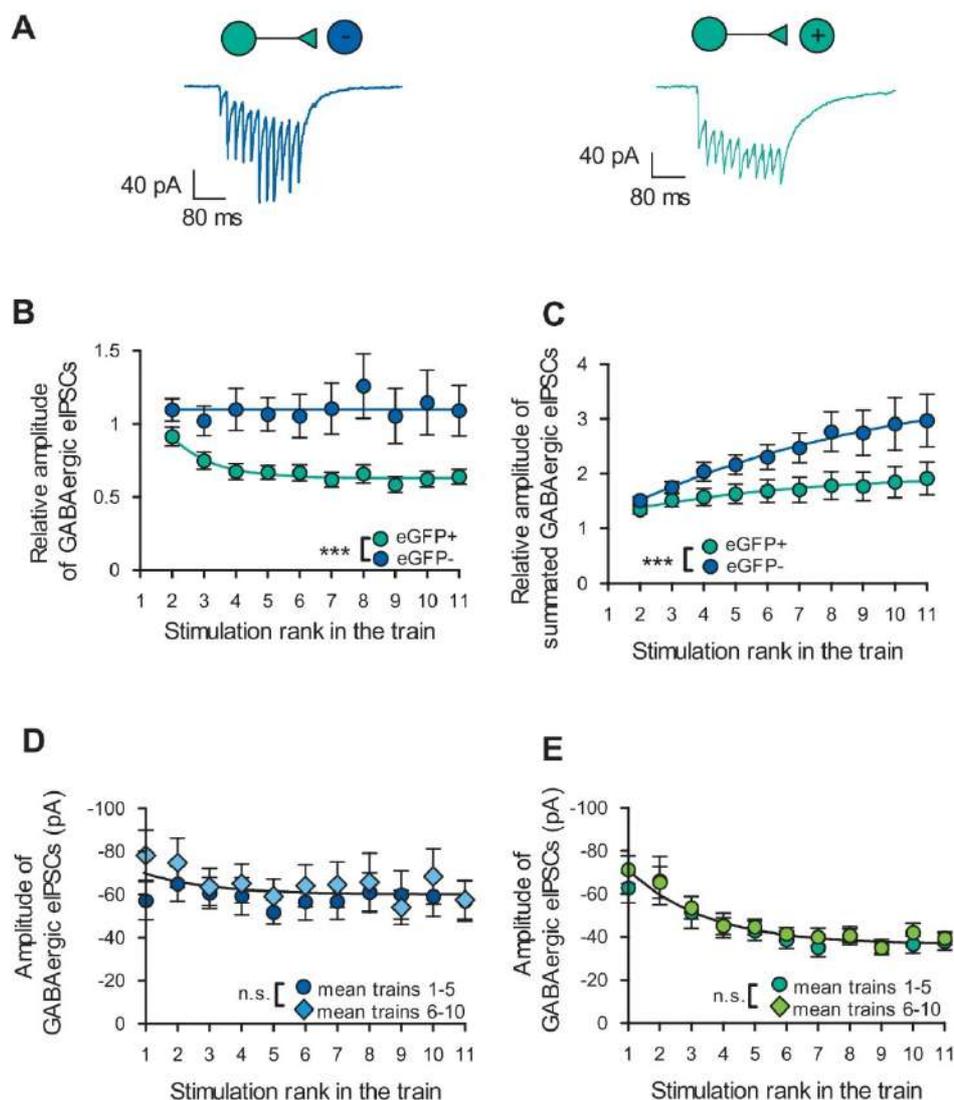
Nevertheless, the plasticity remained similar in the first 5 and the last 5 trains, whereas eIPSC2/eIPSC1 significantly decreased for connections onto eGFP– neurons but not onto eGFP+ neurons ( $P_{\text{eGFP–}} = 0.048$ ,  $P_{\text{eGFP+}} = 0.098$ , Wilcoxon signed-rank test for paired data, Fig. S5, <http://links.lww.com/PAIN/B478>), suggesting that the facilitation observed in eGFP– neurons during paired-pulse stimulation at short intervals (**Fig. 2E**) is replaced by other types of plasticities during repeated trains of stimulation at 50 Hz.

Evolution of eIPSC amplitudes during 50 Hz trains was significantly different in eGFP– or eGFP+ neurons for both normalized amplitudes ( $P = 1.88 \cdot 10^{-9}$ , Table S4, <http://links.lww.com/PAIN/B478>, **Fig. 4B**) and raw amplitudes ( $P = 3.73 \cdot 10^{-8}$ , Table S4 and Fig. S3C, <http://links.lww.com/PAIN/B478>). In eGFP– neurons, amplitudes of normalized eIPSCs did not significantly change, indicating that no plasticity was expressed during the train ( $P_{\text{normalized}} = 0.909$ , Table S1.4, <http://links.lww.com/PAIN/B478>, **Fig. 4B**). By contrast, the amplitude of normalized eIPSCs recorded in eGFP+ neurons significantly decreased during the train ( $P_{\text{normalized}} = 9.03 \cdot 10^{-6}$ , Table S4, <http://links.lww.com/PAIN/B478>, **Fig. 4B**), decreasing by 28% at the asymptote (see parameters of the curve fitting, Table S4, <http://links.lww.com/PAIN/B478>). Similar data were obtained for raw eIPSC amplitudes (Fig. S3C and Table S4, <http://links.lww.com/PAIN/B478>).

These data indicated that on average, GABAergic connections onto eGFP– neurons displayed no plasticity during 50 Hz trains, whereas connections onto eGFP+ neurons strongly depressed.

### 3.6. Comparison of plasticities at 5 Hz and 50 Hz

The evolution of normalized eIPSC amplitudes during 5 Hz and 50 Hz trains was significantly different for both eGFP– neurons ( $P =$



**Figure 4.** Short-term plasticity of GABAergic connections during trains at 50 Hz. (A) Representative average current trace recorded in an eGFP<sup>-</sup> neuron (left) and eGFP<sup>+</sup> neuron (right). (B) Relative amplitudes of GABAergic eIPSCs recorded in eGFP<sup>-</sup> and eGFP<sup>+</sup> neurons (amplitudes relative to eIPSCs of rank 1). (C) Same data as in (B) but with eIPSCs measured from the basal current level before the first eIPSC (summated eIPSC amplitudes). (D, E) Changes in eIPSC amplitudes during the trains remained similar in the first 5 and the last 5 trains for connections on both eGFP<sup>-</sup> (D) and eGFP<sup>+</sup> (E) neurons. Results of nonlinear regressions used to compare conditions are given as  $P > 0.5$ ; n.s. and  $P < 0.001$ ; \*\*\*  $n = 27$  eGFP<sup>-</sup> and  $n = 19$  eGFP<sup>+</sup> neurons. Details of regressions and the corresponding analysis are given in Supplementary Table 1 (available at <http://links.lww.com/PAIN/B478>). eGFP<sup>+</sup>, enhanced green fluorescent protein positive; eGFP<sup>-</sup>, enhanced green fluorescent protein negative; eIPSC, evoked inhibitory postsynaptic current.

$5.23 \cdot 10^{-3}$ , Table S5, <http://links.lww.com/PAIN/B478>, **Figs. 3B and 4B**) and eGFP<sup>+</sup> neurons ( $P = 2.76 \cdot 10^{-10}$ , Table S5, <http://links.lww.com/PAIN/B478>, **Figs. 3B and 4B**), indicating that the characteristics of the effects depended on the frequency (see parameters of the curve fitting, Table S5, <http://links.lww.com/PAIN/B478>). In eGFP<sup>+</sup> neurons, the decrease of normalized eIPSCs during 5 Hz and 50 Hz differed in both the magnitude and the kinetic of the depression. The decrease of normalized amplitudes at the asymptote was of 20% with 5 Hz protocols, whereas it was of 28% with 50 Hz protocols. In these neurons, 90% of asymptotic values were reached at the 11th stimulation with 5 Hz protocols and before the fifth stimulation with 50 Hz protocols.

These data indicate that plasticities expressed by GABAergic connections depended on both the neurochemical identity of the postsynaptic target neuron and the frequency of electrical activity of the presynaptic GABAergic neuron.

### 3.7. Summation of evoked inhibitory postsynaptic currents during trains at 50 Hz

During 50 Hz trains, the eIPSCs had not fully returned to baseline at the onset of the following stimulation, a situation that resulted in their summation. We therefore reanalyzed our data measuring summated eIPSC amplitudes from the basal holding current of each train (**Figs. 4C, S3E**, <http://links.lww.com/PAIN/B478>; statistics Table S4, <http://links.lww.com/PAIN/B478>). Evolution of summated eIPSC amplitudes during 50 Hz trains was significantly different in eGFP<sup>-</sup> and eGFP<sup>+</sup> neurons for both normalized amplitudes ( $P = 4.90 \cdot 10^{-7}$ , **Fig. 4C**) and raw amplitudes ( $P = 4.12 \cdot 10^{-8}$ , **Fig. S3E**, <http://links.lww.com/PAIN/B478>).

Amplitudes of summated eIPSCs significantly increased during 50 Hz trains in eGFP<sup>-</sup> neurons ( $P_{\text{normalized}} = 1.15 \cdot 10^{-5}$ , **Fig. 4C**;

$P_{\text{raw}} = 3.98 \cdot 10^{-10}$ , Table S4 and Fig. S3E, <http://links.lww.com/PAIN/B478>). At the asymptote, the increase in raw amplitude was of 123.33 pA and represented an increase by 2.29-fold of the normalized amplitudes. Importantly, only 86.5% of the asymptotic value was reached at the end of the train (ie, 11th eIPSC), suggesting that further summation was still possible with longer lasting trains. In eGFP+ neurons, no significant increase was detected for normalized summated eIPSCs ( $P_{\text{normalized}} = 6.76 \cdot 10^{-2}$ , Table S4, <http://links.lww.com/PAIN/B478>, Fig. 4C) but raw summated eIPSCs significantly increased during 50 Hz trains ( $P_{\text{raw}} = 2.67 \cdot 10^{-3}$ , Table S4 and Fig. S3E, <http://links.lww.com/PAIN/B478>). In these neurons, the increase in raw summated amplitude was of 44.47 pA and 95% of the asymptotic value was reached before the sixth eIPSC, indicating that maximal summation is reached after few eIPSCs.

This difference between eGFP- and eGFP+ neurons in eIPSC summation during 50 Hz trains was not caused by differences in deactivation kinetics of isolated eIPSCs because these were similar in eGFP- and eGFP+ neurons (see above).

These data indicated that GABAergic connections onto eGFP- and eGFP+ neurons displayed different characteristics of short-term plasticities under high-frequency activity: connections onto eGFP+ neurons showed strong depression and limited summation, whereas connections onto eGFP- neurons showed no depression and large summation.

### 3.8. Distinct short-term plasticity in simultaneously recorded enhanced green fluorescent protein-negative and enhanced green fluorescent protein-positive neurons.

We next defined whether connections from a given presynaptic neuron displayed distinct short-term plasticities when the postsynaptic neuron was eGFP- or eGFP+. To this end, we performed simultaneous recordings of eGFP- and eGFP+ neurons and searched for a presynaptic neuron connecting the recorded ones. For each pair of neuron, we subtracted the normalized eIPSC amplitudes recorded on eGFP+ neurons from those recorded on eGFP- neurons (Fig. 5).

For both 5 Hz and 50 Hz trains, the relative eIPSC amplitude difference was significantly larger than zero ( $P_{5\text{Hz}} = 1.66 \cdot 10^{-6}$ ,  $n = 6$  pairs;  $P_{50\text{Hz}} = 3.61 \cdot 10^{-6}$ ,  $n = 4$  pairs, Table S6, <http://links.lww.com/PAIN/B478>), indicating that eIPSCs recorded in eGFP+ neurons depressed with respect to eIPSCs simultaneously recorded in eGFP- neurons.

These data indicated that synapses involving the same presynaptic neuron expressed postsynaptic target-specific plasticities.

### 3.9. Target-specific short-term plasticity involving GABA<sub>B</sub> receptors

We next assessed whether the STP of GABAergic connections onto LII neurons may involve GABA<sub>B</sub> receptors activated by synaptically released GABA (Fig. 6, S7, <http://links.lww.com/PAIN/B478>, statistics Table S7, <http://links.lww.com/PAIN/B478>). The protocols of 10 trains of stimulations used in the previous experiments were applied twice, ie, before and during bath application of 10  $\mu\text{M}$  CGP55845, a GABA<sub>B</sub> receptors antagonist. First, trains at 5 Hz were repeated every 20 seconds, whereas trains at 50 Hz were repeated every 60 seconds.

When evolution of raw eIPSC amplitudes was considered, no significant effects of CGP55845 were detected during trains at 5 and 50 Hz in neither eGFP- nor eGFP+ neurons ( $P_{\text{eGFP-, 5 Hz}} = 0.892$ ,  $n = 6$ ;  $P_{\text{eGFP-, 50 Hz}} = 0.571$ ,  $n = 12$ ;  $P_{\text{eGFP+, 5 Hz}} = 0.881$ ,

$n = 8$ ;  $P_{\text{eGFP+, 50 Hz}} = 0.448$ ; Figs. S7B, E, H, K, <http://links.lww.com/PAIN/B478>), indicating that GABA<sub>B</sub> receptors were not tonically controlling these connections under these conditions.

Because GABA<sub>B</sub> receptors may be activated in a phasic manner by the GABA released during the train of activity, we also analyzed effects of CGP55845 on eIPSC amplitudes normalized to the first eIPSCs of the control trains (Figs. 6, S7 and Table S7, <http://links.lww.com/PAIN/B478>). Normalized eIPSCs recorded in eGFP- neurons were not modified in the presence of CGP55845 during both trains at 5 Hz and at 50 Hz ( $P_{\text{eGFP-, 5 Hz}} = 0.900$ ,  $n = 6$ ;  $P_{\text{eGFP-, 50 Hz}} = 0.232$ ,  $n = 12$ , Figs. 6A and B). Interestingly, in the presence of CGP55845, amplitudes of normalized eIPSCs recorded in eGFP+ neurons during trains at 5 Hz were significantly increased by 38% with respect to control trains ( $P_{\text{eGFP+, 5 Hz}} = 1.11 \cdot 10^{-10}$ ,  $n = 8$ , Fig. 6C). A weak inhibitory effect of CGP55845 was observed during trains at 50 Hz ( $P_{\text{eGFP+, 50 Hz}} = 6.05 \cdot 10^{-3}$ ,  $n = 6$ , Fig. 6D).

Because trains at 5 Hz were repeated every 20 seconds and trains at 50 Hz every 60 seconds, the longer delay for 50 Hz trains may be involved in the lack of CGP55845 effect at this frequency.

Nevertheless, CGP55845 had no effect when trains at 50 Hz were repeated every 20 seconds ( $P = 0.330$ ;  $n = 7$ , Fig. 6E), indicating that the effect of CGP55845 was not depending on the delay between trains.

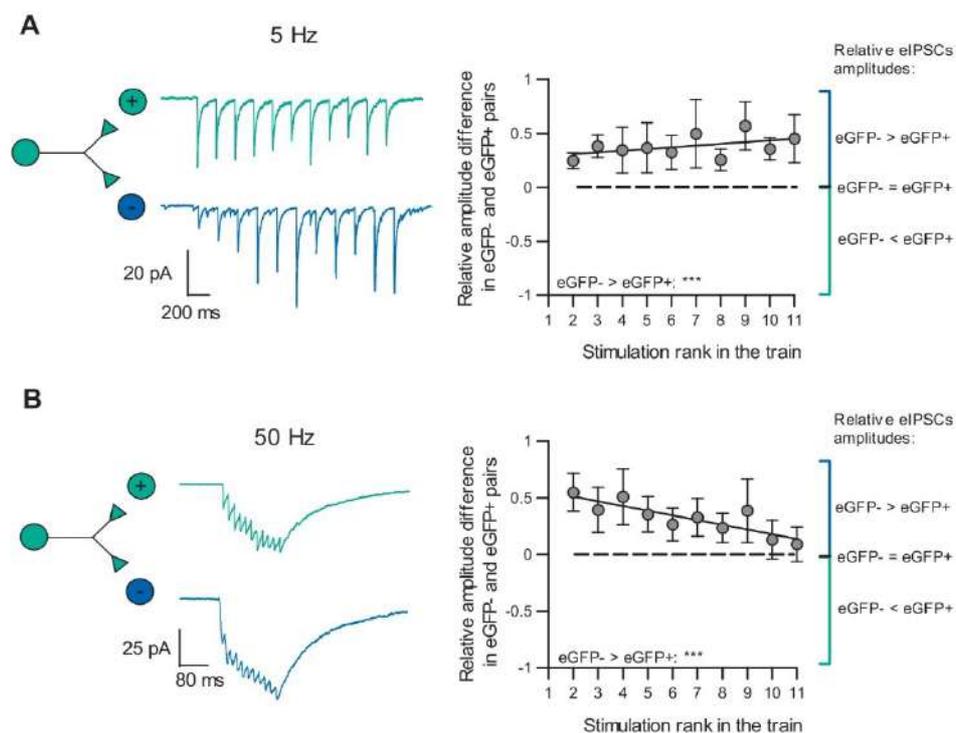
Importantly, in eGFP+ neurons, during trains at 50 Hz repeated every 20 seconds, control eIPSC amplitudes were larger than during protocols repeated every 60 seconds ( $P = 2.75 \cdot 10^{-9}$ ) and similar to amplitudes recorded in the presence of CGP55845 during trains at 5 Hz repeated every 20 seconds ( $P = 0.380$ ). This suggested that facilitating mechanisms engaged at 50 Hz might have overcome an inhibition by GABA<sub>B</sub> receptors (compare amplitudes Figs. 6D and E).

These results indicated that under our experimental conditions, GABA<sub>B</sub> receptors are involved in a phasic modulation of GABAergic connections between LII neurons. This involvement of GABA<sub>B</sub> receptors is target-specific, and it only occurs at synapses between 2 GABAergic neurons and at low stimulation frequency (ie, at 5 Hz).

### 3.10. Target-specific and frequency-dependent tonic inhibition involving adenosine A1 receptors

Because synaptic vesicles contain ATP which can be rapidly hydrolyzed into adenosine by extracellular ectonucleotidases,<sup>12</sup> we checked whether the STP of GABAergic connections onto LII neurons might involve the activation of adenosine A1 receptors (Fig. 7, S8, <http://links.lww.com/PAIN/B478>, statistics Table S8, <http://links.lww.com/PAIN/B478>). Protocols of 10 trains of stimulations as described previously were applied twice: before and during bath application of 10  $\mu\text{M}$  DPCPX, an antagonist of A1 receptors.

In eGFP- neurons (Figs. 7A-C), DPCPX significantly increased raw eIPSC amplitudes during trains at 5 Hz repeated every 20 seconds ( $P_{\text{eGFP-, 5 Hz}} = 6.28 \cdot 10^{-16}$ ,  $n = 9$ , Fig. 7A) and trains at 50 Hz repeated every 20 seconds ( $P_{\text{eGFP-, 50 Hz}} = 2.40 \cdot 10^{-3}$ ,  $n = 9$ , Fig. 7C) but not during trains at 50 Hz repeated every 60 seconds ( $P_{\text{eGFP-, 50 Hz}} = 0.119$ ,  $n = 7$ , Fig. 7B). In these neurons, no effect of DPCPX was detected on eIPSC amplitudes normalized to the first eIPSCs of the control trains (Fig. S8, <http://links.lww.com/PAIN/B478>), neither at 5 Hz every 20 seconds ( $P_{\text{eGFP-, 5 Hz}} = 0.777$ ,  $n = 9$ , Fig. S8C, <http://links.lww.com/PAIN/B478>), nor at 50 Hz every 20 seconds ( $P_{\text{eGFP-, 50 Hz}} = 0.050$ ,  $n = 9$ , Fig. S8I, <http://links.lww.com/PAIN/B478>), nor at 50 Hz every 60 seconds ( $P_{\text{eGFP-, 50 Hz}} = 0.600$ ,  $n = 7$ , Fig. S8F, <http://links.lww.com/PAIN/B478>). Effects on raw but not



**Figure 5.** Distinct short-term plasticities in simultaneously recorded eGFP<sup>-</sup> and eGFP<sup>+</sup> neurons. (A) Short-term plasticity during stimulation trains at 5 Hz. Left: representative average current trace simultaneously recorded in an eGFP<sup>-</sup> neuron (blue) and eGFP<sup>+</sup> neuron (green). Right: for each pair of eGFP<sup>-</sup> and eGFP<sup>+</sup> neuron and for all ranks during the train, the difference in relative eIPSC amplitude is calculated. This difference is significantly larger than zero, indicating that the relative increase in amplitude during the train at 5 Hz is larger in eGFP<sup>-</sup> than that in eGFP<sup>+</sup> neurons ( $P < 0.001$ ; \*\*\*,  $n = 6$  pairs). (B) Short-term plasticity during stimulation trains at 50 Hz. Left: representative average current trace simultaneously recorded in an eGFP<sup>-</sup> neuron (blue) and eGFP<sup>+</sup> neuron (green). Right: for each pair of eGFP<sup>-</sup> and eGFP<sup>+</sup> neuron and for all ranks during the train, the difference in relative eIPSC amplitude is calculated. This difference is significantly larger than zero, indicating that the relative increase in amplitude during the train at 50 Hz is larger in eGFP<sup>-</sup> than that in eGFP<sup>+</sup> neurons ( $P < 0.001$ ; \*\*\*,  $n = 4$  pairs). Linear regressions of the data were compared with a linear regression with a slope set at 0 which would correspond to no differences in eIPSC amplitudes in eGFP<sup>-</sup> and eGFP<sup>+</sup> neurons. Details of regressions and the corresponding analysis are given in Supplementary Table 1 (available at <http://links.lww.com/PAIN/B478>). eGFP<sup>+</sup>, enhanced green fluorescent protein positive; eGFP<sup>-</sup>, enhanced green fluorescent protein negative; eIPSC, evoked inhibitory postsynaptic current.

normalized amplitudes indicated that adenosine tonically controlled GABAergic connections onto eGFP<sup>-</sup> neurons. This tonic control was only engaged when trains were repeated every 20 seconds and not every 60 seconds, indicating that the tone of adenosine-controlling GABAergic connections onto eGFP<sup>-</sup> neurons was linked to the activity of these synapses.

In eGFP<sup>+</sup> neurons (Figs. 7D and E), DPCPX increased raw eIPSC amplitudes during both trains at 5 Hz repeated every 20 seconds ( $P_{\text{eGFP}^+, 5 \text{ Hz}} = 1.56 \cdot 10^{-2}$ ,  $n = 9$ , Fig. 7D) and trains at 50 Hz repeated every 60 seconds ( $P_{\text{eGFP}^+, 50 \text{ Hz}} = 3.70 \cdot 10^{-2}$ ,  $n = 7$ , Fig. 7E). At both frequencies, the effect of DPCPX on eGFP<sup>+</sup> neurons was statistically significant ( $P$ -value  $< 0.05$ ), but the hypothesis of a difference did not unambiguously correspond to the most parsimonious explanation of the data (only AIC but not AICc was lower, see Table S8, <http://links.lww.com/PAIN/B478>). In these eGFP<sup>+</sup> neurons, no effect of DPCPX was detected on eIPSC amplitudes normalized to the first eIPSCs of the control trains (Fig. S8, <http://links.lww.com/PAIN/B478>) at 5 Hz every 20 seconds ( $P_{\text{eGFP}^+, 5 \text{ Hz}} = 0.191$ ,  $n = 9$ , Fig. S8L, <http://links.lww.com/PAIN/B478>), but a weak effect was detected at 50 Hz every 60 seconds ( $P_{\text{eGFP}^+, 50 \text{ Hz}} = 6.18 \cdot 10^{-3}$ ,  $n = 7$ , Fig. S8O, <http://links.lww.com/PAIN/B478>). Effects on raw but not normalized amplitudes indicated that adenosine tonically controlled GABAergic connections onto eGFP<sup>+</sup> neurons. On these neurons, the effect of adenosine was kept when trains were repeated every 60 seconds.

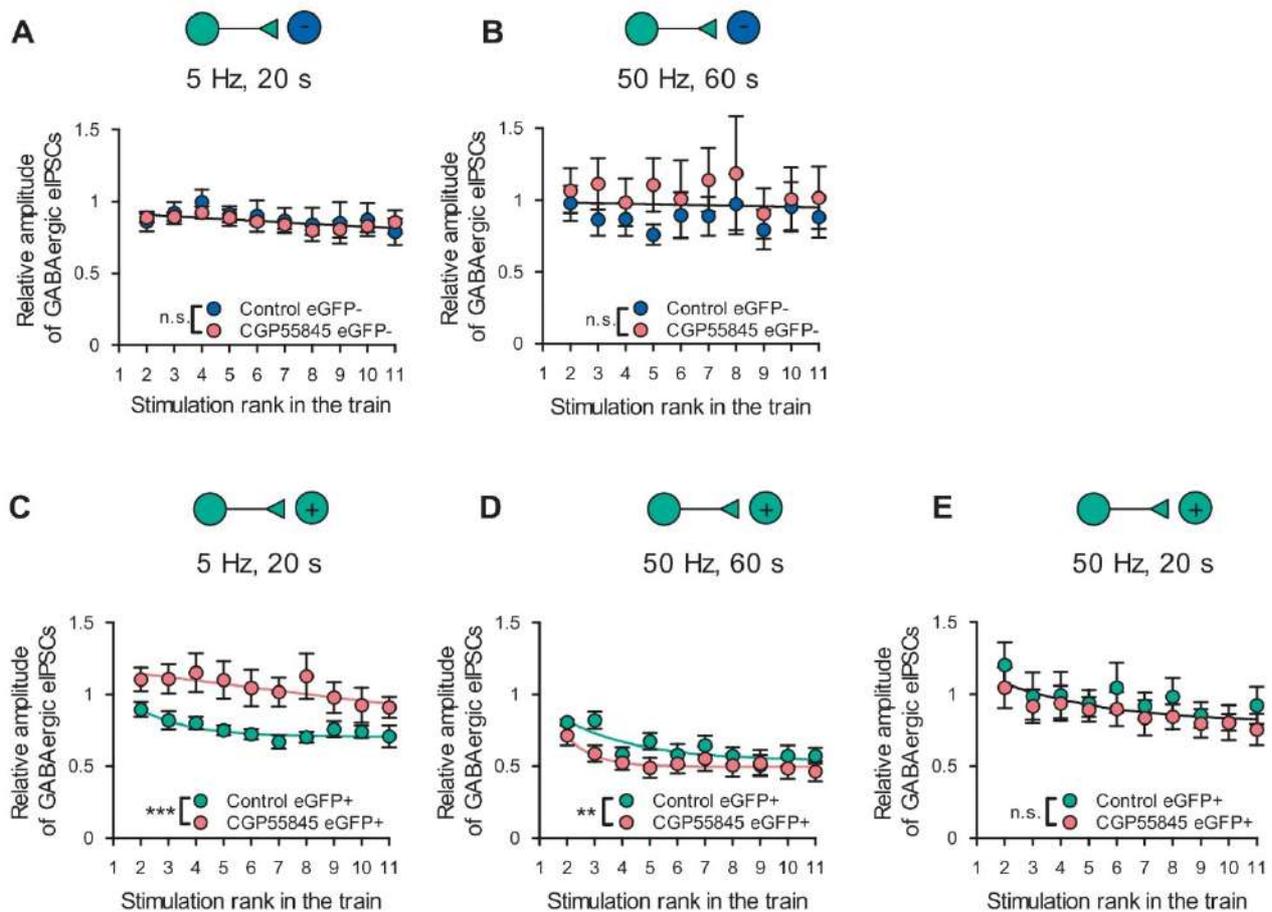
Interestingly, the tonic control by adenosine was significantly larger on connections onto eGFP<sup>-</sup> neurons than on connections onto eGFP<sup>+</sup> neurons ( $P = 2.73 \cdot 10^{-8}$ ; Fig. 7F). The average increase in amplitude during 5 Hz trains was of  $47.3 \pm 2.9$  pA in eGFP<sup>-</sup> neurons, whereas it was of  $15.8 \pm 1.5$  pA in eGFP<sup>+</sup> neurons.

These data indicated that A1 receptors could tonically inhibit GABAergic connections in LII.

This tonic inhibition was stronger on connections onto eGFP<sup>-</sup> neurons. In these neurons, this tonic control was only engaged when trains were repeated at short intervals.

#### 4. Discussion

Short-term plasticity is of major importance in information processing in sensory systems where the average number of spikes per unit of time encodes the intensity of adequate stimuli.<sup>1,2,7,51</sup> Using mice expressing eGFP under the control of the GAD65 promoter, we demonstrated that LII GABAergic connections onto putative inhibitory neurons (eGFP<sup>+</sup>) display different short-term plasticities than those onto putative excitatory neurons (eGFP<sup>-</sup>). Importantly, in the transgenic mice we used, ~80% of LII eGFP<sup>+</sup> neurons were shown to be GABA immunopositive and ~60% of GABA-immunopositive neurons express eGFP.<sup>10</sup> Therefore, eGFP<sup>+</sup> neurons mainly represent GABAergic neurons and eGFP<sup>-</sup> neurons excitatory neurons, although the



**Figure 6.** Effect of a GABA<sub>B</sub> receptor antagonist on GABAergic eIPSCs during trains of stimulations. (A–E) Average normalized amplitudes of GABAergic eIPSCs during trains of stimulations at 5 Hz and 50 Hz, before (blue and green) and during bath application of 10 μM CGP55845 (red), a GABA<sub>B</sub> receptors antagonist. For each neuron, trains of 11 stimulations were repeated 10 times in control condition and 10 times during bath application of 10 μM CGP55845. The type of neuron recorded (eGFP<sup>−</sup> or eGFP<sup>+</sup>), the frequency of stimulation (5 Hz or 50 Hz), and the interval between trains (20 seconds or 60 seconds) are given on the top of each panel. (A, B) CGP55845 had no effect on GABAergic connections onto eGFP<sup>−</sup> neurons, neither during trains at 5 Hz (A, n = 6 neurons) nor during trains at 50 Hz (B, n = 12 neurons). (C–E) In eGFP<sup>+</sup> neurons, CGP55845 significantly increased normalized eIPSC amplitudes during 5 Hz trains repeated every 20 seconds (C, n = 8 neurons) but neither during 50 Hz trains repeated every 60 seconds (D, n = 6 neurons) nor 50 Hz trains repeated every 20 seconds (E, n = 7 neurons). Results of nonlinear regressions used to compare conditions are given as P > 0.5: n.s., 0.05 < P < 0.01: \*, and P < 0.001: \*\*\*. Details of regressions and the corresponding analysis are given in Supplementary Table 1 (available at <http://links.lww.com/PAIN/B478>). eGFP<sup>+</sup>, enhanced green fluorescent protein positive; eGFP<sup>−</sup>, enhanced green fluorescent protein negative; eIPSC, evoked inhibitory postsynaptic current.

matching is not perfect. This may however partly explain the larger data dispersion observed in eGFP<sup>−</sup> neurons (eg, Fig. S4BD, <http://links.lww.com/PAIN/B478>).

Nevertheless, the strong difference in STP that we observed when comparing eGFP<sup>−</sup> and eGFP<sup>+</sup> neurons will probably have an impact on the excitation–inhibition balance within LII networks and affect the processing of nociceptive information within the dorsal horn.

#### 4.1. Action potential firing patterns

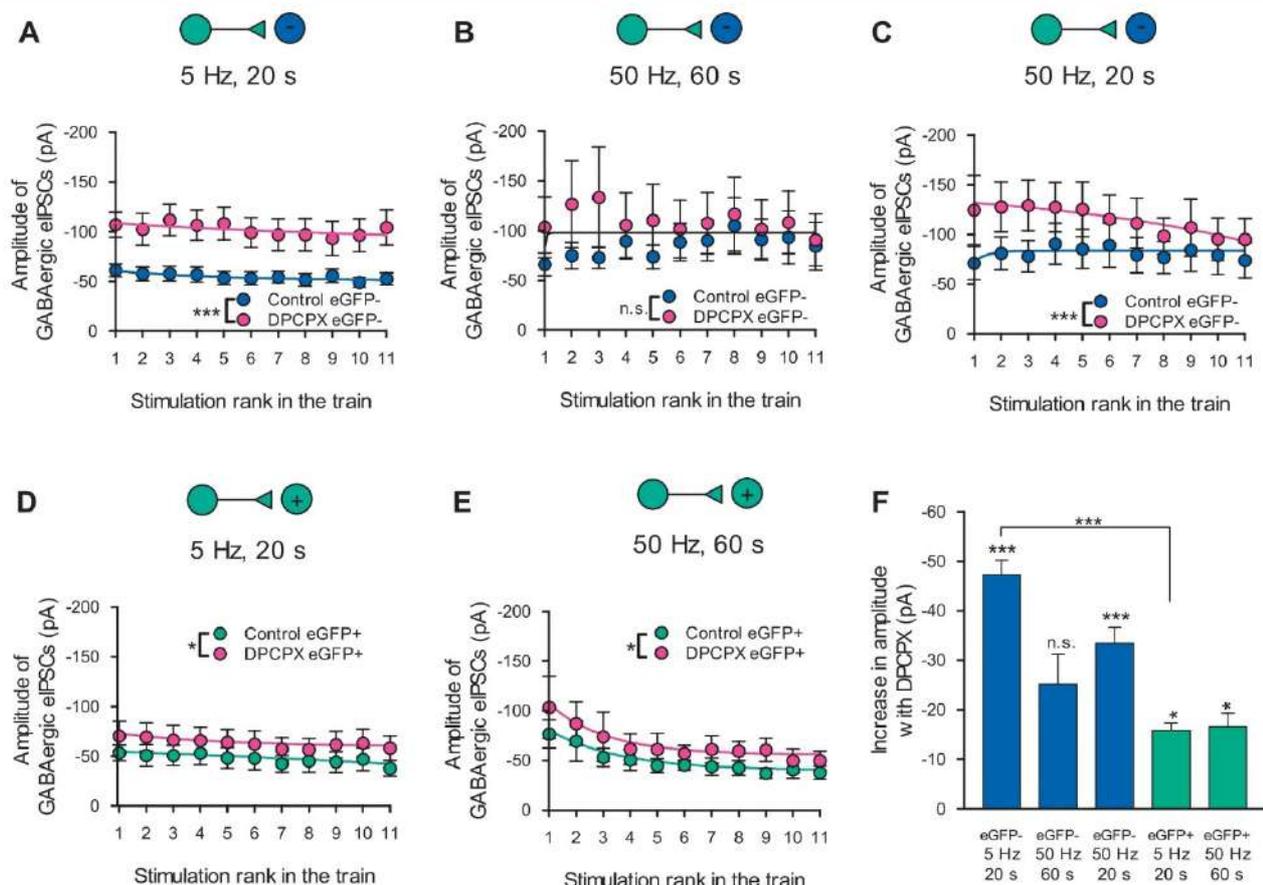
Most of eGFP<sup>+</sup> neurons we recorded from displayed a tonic action potential firing pattern.

Other groups have reported this firing type in a majority or in a large proportion of LII neurons identified as inhibitory by immunohistochemistry,<sup>52</sup> expression of GAD67,<sup>11</sup> GAD65,<sup>10,24</sup> other genetic markers,<sup>18</sup> or assumed from their morphology.<sup>16</sup> A very low proportion of tonic firing neurons has nevertheless been recorded in a single study in GAD67<sup>+</sup> neurons.<sup>19</sup> We mostly recorded putative excitatory neurons displaying non-tonic firing, as did other groups.<sup>16,52</sup> Nevertheless, in our experiments, eGFP<sup>−</sup> neurons were mostly IB, whereas in the same transgenic line these neurons mostly displayed a delayed firing.<sup>10</sup>

Such difference may be linked to distinct intracellular composition as well as distinct initial holding potential as it has already been shown in LII.<sup>52</sup> Our data also indicate that both eGFP<sup>−</sup> and eGFP<sup>+</sup> neurons can fire at 50 Hz and GABAergic neurons reliably trigger eIPSCs during stimulations at this frequency.

#### 4.2. Inhibitory connections between lamina II interneurons

Local inhibitory connections between LII neurons are mostly GABAergic, glycinergic transmission occurring in only 1 of the 15 inhibitory contacts recorded by Lu and Per<sup>33</sup> and possibly in 1 of the 3 inhibitory contacts recorded by Labrakakis et al.<sup>27</sup> We therefore focused on GABAergic connections because we aimed at examining the STP of inhibitory connections between LII neurons. Interestingly, spontaneously active inhibitory connections are dominated by GABAergic transmission in most LII neurons, whether these are dominated by glycinergic transmission in most neurons at the laminae II/III border.<sup>48</sup> Therefore, unlike GABAergic connections, glycinergic connections onto LII neurons most likely originate from neurons the cell bodies of which are localized in other laminae.



**Figure 7.** Effect of an A1 adenosine receptor antagonist on GABAergic eIPSCs during trains of stimulations. (A–E) Average raw amplitudes of GABAergic eIPSCs during trains at 5 Hz and 50 Hz before (blue and green) and during bath application of 10  $\mu$ M DPCPX (pink), an A1 receptor antagonist. For each neuron, trains of 11 stimulations were repeated 10 times in control condition and 10 times during bath application of DPCPX. The type of neuron recorded (eGFP– or eGFP+), the frequency of stimulation (5 Hz or 50 Hz), and the interval between trains (20 seconds or 60 seconds) are given on the top of each panel. (A–C) In eGFP– neurons, DPCPX significantly increased raw eIPSC amplitudes during 5 Hz trains repeated every 20 seconds (A,  $n = 9$  neurons) and 50 Hz trains repeated every 20 seconds (C,  $n = 9$  neurons) but not during 50 Hz trains repeated every 60 seconds (B,  $n = 7$  neurons). This indicated a tonic inhibition of GABAergic connections onto eGFP– neurons by adenosine depending on the delay between trains of stimulation. (D, E) In eGFP+ neurons, DPCPX significantly increased raw eIPSCs amplitudes during 5 Hz trains repeated every 20 seconds (D,  $n = 9$  neurons) and 50 Hz trains repeated every 60 seconds (E,  $n = 7$  neurons). This indicated a tonic inhibition of GABAergic connections onto eGFP+ neurons. (F) Average increase in raw eIPSC amplitudes in the presence of DPCPX with respect to control conditions. For trains at 5 Hz, the increase in amplitude is larger in eGFP– neurons than that in eGFP+ neurons. Evolution of eIPSC amplitudes during trains was compared with nonlinear regression. Details of regressions and the corresponding analysis are given in Supplementary Table 1 (available at <http://links.lww.com/PAIN/B478>). eGFP+, enhanced green fluorescent protein positive; eGFP–, enhanced green fluorescent protein negative; eIPSC, evoked inhibitory postsynaptic current.

### 4.3. Paired-pulse plasticity

During paired-pulse stimulation experiments at short ISIs, GABAergic connections onto eGFP– neurons preferentially facilitated, whereas, at long ISIs, GABAergic connections onto eGFP+ neurons preferentially depressed. In primary cultures of rat laminae I–III, paired-pulse inhibition of GABAergic eIPSCs was preferentially observed (84%) but facilitation occasionally occurred (16%).<sup>20</sup> Inhibitory eIPSCs in laminae II–V of Syrian hamsters, with no distinction between GABAergic and glycinergic transmissions, preferentially displayed facilitation.<sup>53</sup> These facilitating connections may correspond to glycinergic eIPSCs because LII glycinergic synapses display strong paired-pulse facilitation for 50-millisecond ISIs.<sup>24</sup> Thus, in LII, inhibitory connections showing paired-pulse facilitation may preferentially involve GABAergic synapses onto excitatory neurons or glycinergic connections onto inhibitory neurons. In the dorsal horn, paired-pulse depression of glycinergic eIPSCs has previously been shown in rat lamina I, with a maximal depression at ISIs of 150 to 200 milliseconds and involving GABA<sub>B</sub> autoreceptors.<sup>8</sup>

### 4.4. Frequency-dependent short-term plasticity

Our results indicate that GABAergic connections onto eGFP+ neurons strongly depress during trains of activity at both low (5 Hz) and high (50 Hz) frequency. In these neurons, trains at high frequency induce a larger depression reaching its maximum faster than during trains at low frequency. By contrast, GABAergic connections onto eGFP– neurons do not depress, allowing summated eIPSCs to reach larger amplitudes at high frequency.

We have reported previously that trains at 2.5 Hz induced a depression of eIPSCs in primary cultures of superficial dorsal horn neurons from rats.<sup>20</sup> During 10 Hz stimulations, either a depression or a facilitation of eIPSCs was recorded in laminae II–V of Syrian hamsters.<sup>53</sup>

With 20 Hz stimulations, eIPSCs onto GABAergic interneurons in LII of adult mice showed a facilitation during the first train and a depression during subsequent trains.<sup>27</sup>

Although in eGFP+ neurons we observed a tendency of such a facilitation–depression switch, it was not statistically significant (Fig. S6, <http://links.lww.com/PAIN/B478>), suggesting that the facilitation

described by other studies may have involved a glycinergic component which has been shown to display a potentiation in LII neurons in response to 2 Hz stimulations.<sup>24</sup> Interestingly, we observed a facilitation–depression switch for the second eIPSCs during repeated trains at 50 Hz in eGFP– neurons (Fig. S5B, <http://links.lww.com/PAIN/B478>), suggesting that the facilitation observed in eGFP– neurons during paired-pulse stimulation at short intervals is replaced by other types of plasticities during repeated trains of stimulation at 50 Hz. Such combination of short-term facilitation and depression at different repetitions, frequencies, and time scales has been observed in other structures and may be relatively common.<sup>3</sup>

Interestingly, in recordings performed at room temperature, GABAergic eIPSCs recorded in eGFP+ neurons display slower decay kinetics than those recorded in eGFP– neurons.<sup>28</sup> Such slower kinetics would allow a better summation of overlapping eIPSCs. Nevertheless, in our conditions, eIPSC kinetics were similar in eGFP+ and eGFP– neurons. Moreover, at high frequency, summated eIPSCs in eGFP– neurons reached larger amplitudes than summated eIPSCs in eGFP+ neurons, ruling out an involvement of different decay kinetics to explain a higher degree of summation of eIPSCs in eGFP– neurons.

#### 4.5. Modulation by GABA<sub>B</sub> and A1 receptors

Our results indicate that GABAergic connections onto LII neurons can be under a tonic inhibitory control by A1 adenosine receptors. This inhibition is much stronger on connections onto eGFP– neurons than onto eGFP+ neurons. In eGFP– neurons, this inhibition only occurred when trains were delivered at short intervals. This suggests that the tone of adenosine inhibiting these connections is built-up by ongoing activity and decays when activity decreases. These data were consistent with our previous work showing that in cultured dorsal horn neurons, presynaptic A1 autoreceptors control a subset of GABAergic synapses in an activity-dependent manner.<sup>20</sup> Tonic inhibition by adenosine receptors is not restricted to inhibitory transmission, and glutamatergic synapses in LII are also under an inhibitory tone of adenosine, even under low electrical activity within the network.<sup>49</sup>

Although inhibition of GABAergic connections by A1 receptors was tonic, we showed that GABA<sub>B</sub> receptors can be engaged in a phasic depression of GABAergic eIPSCs during trains of activity. This depression involving GABA<sub>B</sub> receptors is target-specific, occurring only in connections onto eGFP+ neurons. Interestingly, although GABA<sub>B</sub> receptors-mediated inhibition was phasic (it developed during trains), it was only seen when trains were applied at both low frequency and short intervals (5 Hz, 20 seconds). This suggests that this inhibition is activity-dependent but that underlying inhibitory mechanisms might have been surmounted by facilitation occurring during trains at high frequency (compare amplitudes **Figs. 6D and E**).

These results were consistent with previous work showing that presynaptic GABA<sub>B</sub> receptors decrease inhibitory synaptic transmission in the superficial dorsal horn<sup>8,15,20</sup> and that a tone of GABA activating GABA<sub>B</sub> receptors can occur in the dorsal horn under various conditions.<sup>14,31,35,42</sup>

Interestingly, intrathecal administration of GABA<sub>B</sub> and A1 agonists has antinociceptive effects<sup>21,45,46</sup> which may involve the types of modulation of STP described in the present work.

#### 4.6. Impact of frequency and target-specific short-term plasticities of GABAergic connections onto lamina II neurons

GABAergic connections onto inhibitory or excitatory neurons display very distinct frequency-dependent STPs which can engage

target-specific G-protein-coupled receptors when bursts of activity occur at short intervals. Similar differential STPs involving synapses contacting excitatory and inhibitory neurons have been described in other structures of the central nervous system and have been shown to directly affect the dynamic properties of networks and their excitation–inhibition balance.<sup>4,5,25,32,35,40,41</sup> Therefore, these synapse-specific short-term plasticities and their modulation under various levels of activity are of crucial importance to understand information processing by a network receiving frequency-coded information from the periphery.

At low frequency, corresponding to the activity at low intensity of sensory stimulation under basal physiological conditions, the inhibitory control onto putative excitatory neurons remains constant, whereas it depresses onto putative inhibitory neurons. At high frequency, the inhibitory control is increased by summation onto excitatory neurons, whereas it remains constant onto inhibitory neurons. Because the latter fire action potentials in a tonic manner, they are expected to be able to follow higher frequencies of excitatory inputs. Therefore, in basal physiological conditions, both STP and firing properties of inhibitory interneurons of LII might concur to favor inhibitory controls of nociceptive information, particularly at high intensity of sensory stimulation. Hence, the short-term plasticities within this network as well as their modulation by A1 and GABA<sub>B</sub> receptors might represent interesting targets in pain-alleviating strategies.

#### Conflict of interest statement

The authors declare no competing financial interests.

#### Acknowledgements

The authors thank Catherine Moreau and Chantal Fitterer for excellent technical assistance and Jean-Luc Rodeau for his help in statistical analysis. This work was supported by Centre National de la Recherche Scientifique, Université de Strasbourg, and the French National Research agency (ANR) contract ANR-17-EURE-0022. L. Catheraut was supported by EURIDOL Graduate School of Pain, Neuropole Strasbourg, and Société Française d'Etude et de Traitement de la Douleur (SFETD).

#### Appendix A. Supplemental digital content

Supplemental digital content associated with this article can be found online at <http://links.lww.com/PAIN/B478>.

#### Article history:

Received 19 May 2021

Received in revised form 22 July 2021

Accepted 18 August 2021

Available online 30 August 2021

#### References

- [1] Adrian ED. The recovery process of excitable tissues: part I. *J Physiol* 1920;54:1–31.
- [2] Adrian ED, Zotterman Y. The impulses produced by sensory nerve endings: part 3. Impulses set up by touch and pressure. *J Physiol* 1926; 61:465–83.
- [3] Anwar H, Li X, Bucher D, Nadim F. Functional roles of short-term synaptic plasticity with an emphasis on inhibition. *Curr Opin Neurobiol* 2017;43: 71–8.
- [4] Bartley AF, Dobrunz LE. Short-term plasticity regulates the excitation/inhibition ratio and the temporal window for spike integration in CA1 pyramidal cells. *Eur J Neurosci* 2015;41:1402–15.
- [5] Buononano DV. Decoding temporal information: a model based on short-term synaptic plasticity. *J Neurosci* 2000;20:1129–41.

- [6] Buonomano DV. The biology of time across different scales. *Nat Chem Biol* 2007;3:594–7.
- [7] Campero M, Serra J, Ochoa JL. C-polymodal nociceptors activated by noxious low temperature in human skin. *J Physiol* 1996;497:565–72.
- [8] Chery N, De Koninck Y. GABA(B) receptors are the first target of released GABA at lamina I inhibitory synapses in the adult rat spinal cord. *J Neurophysiol* 2000;84:1006–11.
- [9] Cordero-Erausquin M, Coull JA, Boudreau D, Rolland M, De Koninck Y. Differential maturation of GABA action and anion reversal potential in spinal lamina I neurons: impact of chloride extrusion capacity. *J Neurosci* 2005;25:9613–23.
- [10] Cui L, Kim YR, Kim HY, Lee SC, Shin HS, Szabo G, Erdelyi F, Kim J, Kim SJ. Modulation of synaptic transmission from primary afferents to spinal substantia gelatinosa neurons by group III mGluRs in GAD65-EGFP transgenic mice. *J Neurophysiol* 2011;105:1102–11.
- [11] Daniele CA, MacDermott AB. Low-threshold primary afferent drive onto GABAergic interneurons in the superficial dorsal horn of the mouse. *J Neurosci* 2009;29:686–95.
- [12] Dunwiddie TV, Diac L, Proctor WR. Adenine nucleotides undergo rapid, quantitative conversion to adenosine in the extracellular space in rat hippocampus. *J Neurosci* 1997;17:7673–82.
- [13] Froemke RC, Merzenich MM, Schreiner CE. A synaptic memory trace for cortical receptive field plasticity. *Nature* 2007;450:425–9.
- [14] Fukuhara K, Katafuchi T, Yoshimura M. Effects of baclofen on mechanical noxious and innocuous transmission in the spinal dorsal horn of the adult rat: in vivo patch-clamp analysis. *Eur J Neurosci* 2013;38:3398–407.
- [15] Grudt TJ, Henderson G. Glycine and GABA receptor-mediated synaptic transmission in rat substantia gelatinosa: inhibition by mu-opioid and GABA agonists. *J Physiol* 1998;507:473–83.
- [16] Grudt TJ, Perl ER. Correlations between neuronal morphology and electrophysiological features in the rodent superficial dorsal horn. *J Physiol* 2002;540:189–207.
- [17] Guan Y. Spinal cord stimulation: neurophysiological and neurochemical mechanisms of action. *Curr Pain Headache Rep* 2012;16:217–25.
- [18] Hantman AW, van den Pol AN, Perl ER. Morphological and physiological features of a set of spinal substantia gelatinosa neurons defined by green fluorescent protein expression. *J Neurosci* 2004;24:836–42.
- [19] Heinke B, Ruscheweyh R, Forsthuber L, Wunderbaldinger G, Sandkuhler J. Physiological, neurochemical and morphological properties of a subgroup of GABAergic spinal lamina II neurones identified by expression of green fluorescent protein in mice. *J Physiol* 2004;560:249–66.
- [20] Hugel S, Schlichter R. Convergent control of synaptic GABA release from rat dorsal horn neurones by adenosine and GABA autoreceptors. *J Physiol* 2003;551:479–89.
- [21] Jacobson KA, Gao ZG. Adenosine receptors as therapeutic targets. *Nat Rev Drug Discov* 2006;5:247–64.
- [22] Jensen MP, Brownstone RM. Mechanisms of spinal cord stimulation for the treatment of pain: still in the dark after 50 years. *Eur J Pain* 2019;23:652–9.
- [23] Kato G, Kawasaki Y, Ji RR, Strassman AM. Differential wiring of local excitatory and inhibitory synaptic inputs to islet cells in rat spinal lamina II demonstrated by laser scanning photostimulation. *J Physiol* 2007;580:815–33.
- [24] Kloc ML, Pradier B, Chirila AM, Kauer JA. NMDA receptor activation induces long-term potentiation of glycine synapses. *PLoS One* 2019;14:e0222066.
- [25] Klyachko VA, Stevens CF. Excitatory and feed-forward inhibitory hippocampal synapses work synergistically as an adaptive filter of natural spike trains. *PLoS Biol* 2006;4:e207.
- [26] Kuhlman SJ, Olivas ND, Tring E, Ikrar T, Xu X, Trachtenberg JT. A disinhibitory microcircuit initiates critical-period plasticity in the visual cortex. *Nature* 2013;501:543–6.
- [27] Labrakakis C, Lorenzo LE, Borjes C, Ribeiro-da-Silva A, De Koninck Y. Inhibitory coupling between inhibitory interneurons in the spinal cord dorsal horn. *Mol Pain* 2009;5:24.
- [28] Labrakakis C, Rudolph U, De Koninck Y. The heterogeneity in GABA receptor-mediated IPSC kinetics reflects heterogeneity of subunit composition among inhibitory and excitatory interneurons in spinal lamina II. *Front Cell Neurosci* 2014;8:424.
- [29] Letzkus JJ, Wolff SB, Meyer EM, Tovote P, Courtin J, Herry C, Luthi A. A disinhibitory microcircuit for associative fear learning in the auditory cortex. *Nature* 2011;480:331–5.
- [30] Light AR, Perl ER. Reexamination of the dorsal root projection to the spinal dorsal horn including observations on the differential termination of coarse and fine fibers. *J Comp Neurol* 1979;186:117–31.
- [31] Lin Q, Peng YB, Willis WD. Role of GABA receptor subtypes in inhibition of primate spinothalamic tract neurons: difference between spinal and periaqueductal gray inhibition. *J Neurophysiol* 1996;75:109–23.
- [32] Lovett-Barron M, Turi GF, Kaifosh P, Lee PH, Bolze F, Sun XH, Nicoud JF, Zemelman BV, Sternson SM, Losonczy A. Regulation of neuronal input transformations by tunable dendritic inhibition. *Nat Neurosci* 2012;15:423–30.S421–23.
- [33] Lu Y, Perl ER. A specific inhibitory pathway between substantia gelatinosa neurons receiving direct C-fiber input. *J Neurosci* 2003;23:8752–8.
- [34] Lu Y, Perl ER. Modular organization of excitatory circuits between neurons of the spinal superficial dorsal horn (laminae I and II). *J Neurosci* 2005;25:3900–7.
- [35] Malan TP, Mata HP, Porreca F. Spinal GABA(A) and GABA(B) receptor pharmacology in a rat model of neuropathic pain. *Anesthesiology* 2002;96:1161–7.
- [36] Moreno A, Morris RGM, Canals S. Frequency-dependent gating of hippocampal-neocortical interactions. *Cereb Cortex* 2016;26:2105–14.
- [37] Motanis H, Seay MJ, Buonomano DV. Short-term synaptic plasticity as a mechanism for sensory timing. *Trends Neurosci* 2018;41:701–11.
- [38] Motulsky HJ, Christopoulos A. Fitting models to biological data using linear and nonlinear regression. San Diego: GraphPad Software Inc., 2003.
- [39] Polgar E, Durrieux C, Hughes DI, Todd AJ. A quantitative study of inhibitory interneurons in laminae I–III of the mouse spinal dorsal horn. *PLoS One* 2013;8:e78309.
- [40] Pouille F, Scanziani M. Routing of spike series by dynamic circuits in the hippocampus. *Nature* 2004;429:717–23.
- [41] Royer S, Zemelman BV, Losonczy A, Kim J, Chance F, Magee JC, Buzsaki G. Control of timing, rate and bursts of hippocampal place cells by dendritic and somatic inhibition. *Nat Neurosci* 2012;15:769–75.
- [42] Salio C, Merighi A, Bardoni R. GABA(B) receptors-mediated tonic inhibition of glutamate release from Abeta fibers in rat laminae II/IV of the spinal cord dorsal horn. *Mol Pain* 2017;13:1744806917710041.
- [43] Santos SF, Luz LL, Szucs P, Lima D, Derkach VA, Safronov BV. Transmission efficacy and plasticity in glutamatergic synapses formed by excitatory interneurons of the substantia gelatinosa in the rat spinal cord. *PLoS One* 2009;4:e8047.
- [44] Santos SF, Rebelo S, Derkach VA, Safronov BV. Excitatory interneurons dominate sensory processing in the spinal substantia gelatinosa of rat. *J Physiol* 2007;581:241–54.
- [45] Sawynok J, LaBella FS. On the involvement of GABA in the analgesia produced by baclofen, muscimol and morphine. *Neuropharmacology* 1982;21:397–403.
- [46] Schenone S, Brullo C, Musumeci F, Bruno O, Botta M. A1 receptors ligands: past, present and future trends. *Curr Top Med Chem* 2010;10:878–901.
- [47] Spiess AN, Neumeyer N. An evaluation of R2 as an inadequate measure for nonlinear models in pharmacological and biochemical research: a Monte Carlo approach. *BMC Pharmacol* 2010;10:6.
- [48] Takazawa T, MacDermott AB. Synaptic pathways and inhibitory gates in the spinal cord dorsal horn. *Ann N Y Acad Sci* 2010;1198:153–8.
- [49] Tian L, Ji G, Wang C, Bai X, Lu Y, Xiong L. Excitatory synaptic transmission in the spinal substantia gelatinosa is under an inhibitory tone of endogenous adenosine. *Neurosci Lett* 2010;477:28–32.
- [50] Todd AJ. Plasticity of inhibition in the spinal cord. *Handb Exp Pharmacol* 2015;227:171–90.
- [51] Torebjork HE, Hallin RG. Responses in human A and C fibres to repeated electrical intradermal stimulation. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1974;37:653–64.
- [52] Yasaka T, Tiong SY, Hughes DI, Riddell JS, Todd AJ. 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* 2010;151:475–88.
- [53] Zhang W, Schneider SP. Short-term modulation at synapses between neurons in laminae II–V of the rodent spinal dorsal horn. *J Neurophysiol* 2011;105:2920–30.
- [54] Zheng J, Lu Y, Perl ER. Inhibitory neurones of the spinal substantia gelatinosa mediate interaction of signals from primary afferents. *J Physiol* 2010;588:2065–75.



## Bibliographie

- Abraira, V. E., Kuehn, E. D., Chirila, A. M., Springel, M. W., Toliver, A. A., Zimmerman, A. L., Orefice, L. L., Boyle, K. A., Bai, L., Song, B. J., Bashista, K. A., O'Neill, T. G., Zhuo, J., Tsan, C., Hoynoski, J., Rutlin, M., Kus, L., Niederkofler, V., Watanabe, M., Dymecki, S. M., ... Ginty, D. D. (2017). The Cellular and Synaptic Architecture of the Mechanosensory Dorsal Horn. *Cell*, 168(1-2), 295–310.e19. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.12.010>
- Aby, F., Lorenzo, L. E., Grivet, Z., Bouali-Benazzouz, R., Martin, H., Valerio, S., Whitestone, S., Isabel, D., Idi, W., Bouchatta, O., De Deurwaerdere, P., Godin, A. G., Herry, C., Fioramonti, X., Landry, M., De Koninck, Y., & Fossat, P. (2022). Switch of serotonergic descending inhibition into facilitation by a spinal chloride imbalance in neuropathic pain. *Science advances*, 8(30), eabo0689. <https://doi.org/10.1126/sciadv.abo0689>
- Ackley, M. A., Governo, R. J., Cass, C. E., Young, J. D., Baldwin, S. A., & King, A. E. (2003). Control of glutamatergic neurotransmission in the rat spinal dorsal horn by the nucleoside transporter ENT1. *The Journal of physiology*, 548(Pt 2), 507–517. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2002.038091>
- Adrian, E. D., & Zotterman, Y. (1926). The impulses produced by sensory nerve endings: Part 3. Impulses set up by Touch and Pressure. *The Journal of physiology*, 61(4), 465–483. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.1926.sp002308>
- Agashkov, K., Krotov, V., Krasniakova, M., Shevchuk, D., Andrianov, Y., Zabenko, Y., Safronov, B. V., Voitenko, N., & Belan, P. (2019). Distinct mechanisms of signal processing by lamina I spino-parabrachial neurons. *Scientific reports*, 9(1), 19231. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-55462-7>
- Ajayi, A. F., & Akhigbe, R. E. (2020). Staging of the estrous cycle and induction of estrus in experimental rodents: an update. *Fertility research and practice*, 6, 5. <https://doi.org/10.1186/s40738-020-00074-3>
- Andrew, D., & Greenspan, J. D. (1999). Mechanical and heat sensitization of cutaneous nociceptors after peripheral inflammation in the rat. *Journal of neurophysiology*, 82(5), 2649–2656. <https://doi.org/10.1152/jn.1999.82.5.2649>
- Antal, M., Petkó, M., Polgár, E., Heizmann, C. W., & Storm-Mathisen, J. (1996). Direct evidence of an extensive GABAergic innervation of the spinal dorsal horn by fibres descending from the rostral ventromedial medulla. *Neuroscience*, 73(2), 509–518. [https://doi.org/10.1016/0306-4522\(96\)00063-2](https://doi.org/10.1016/0306-4522(96)00063-2)
- Anwar, H., Li, X., Bucher, D., & Nadim, F. (2017). Functional roles of short-term synaptic plasticity with an emphasis on inhibition. *Current opinion in neurobiology*, 43, 71–78. <https://doi.org/10.1016/j.conb.2017.01.002>
- Asada, H., Kawamura, Y., Maruyama, K., Kume, H., Ding, R., Ji, F. Y., Kanbara, N., Kuzume, H., Sanbo, M., Yagi, T., & Obata, K. (1996). Mice lacking the 65 kDa isoform of glutamic acid decarboxylase (GAD65) maintain normal levels of GAD67 and GABA in their brains but are susceptible to seizures. *Biochemical and biophysical research communications*, 229(3), 891–895. <https://doi.org/10.1006/bbrc.1996.1898>
- Banks, W. A., Ortiz, L., Plotkin, S. R., & Kastin, A. J. (1991). Human interleukin (IL) 1 alpha, murine IL-1 alpha and murine IL-1 beta are transported from blood to brain in the mouse by a shared saturable mechanism. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*, 259(3), 988–996.
- Barrett, A. C., Smith, E. S., & Picker, M. J. (2002). Sex-related differences in mechanical nociception and antinociception produced by mu- and kappa-opioid receptor agonists in rats. *European journal of pharmacology*, 452(2), 163–173. [https://doi.org/10.1016/s0014-2999\(02\)02274-4](https://doi.org/10.1016/s0014-2999(02)02274-4)
- Barrot M. (2012). Tests and models of nociception and pain in rodents. *Neuroscience*, 211, 39–50. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2011.12.041>
- Bartley, E. J., & Fillingim, R. B. (2013). Sex differences in pain: a brief review of clinical and experimental findings. *British journal of anaesthesia*, 111(1), 52–58. <https://doi.org/10.1093/bja/aet127>
- Basbaum, A. I., Bautista, D. M., Scherrer, G., & Julius, D. (2009). Cellular and molecular mechanisms of pain. *Cell*, 139(2), 267–284. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.09.028>
- Belelli, D., & Lambert, J. J. (2005). Neurosteroids: endogenous regulators of the GABA(A) receptor. *Nature reviews. Neuroscience*, 6(7), 565–575. <https://doi.org/10.1038/nrn1703>

- Belkouch, M., Dansereau, M. A., Tétreault, P., Biet, M., Beaudet, N., Dumaine, R., Chraïbi, A., Mélik-Parsadaniantz, S., & Sarret, P. (2014). Functional up-regulation of Nav1.8 sodium channel in A $\beta$  afferent fibers subjected to chronic peripheral inflammation. *Journal of neuroinflammation*, 11, 45. <https://doi.org/10.1186/1742-2094-11-45>
- Bereiter, D. A., Thompson, R., & Rahman, M. (2019). Sex Differences in Estradiol Secretion by Trigeminal Brainstem Neurons. *Frontiers in integrative neuroscience*, 13, 3. <https://doi.org/10.3389/fnint.2019.00003>
- Bertolin, K., & Murphy, D. B. (2014). Reproductive Tract Changes During the Mouse Estrous Cycle. *The Guide to Investigation of Mouse Pregnancy*, 7, 85-94. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-394445-0.0007-2>
- Bigliardi-Qi, M., Gaveriaux-Ruff, C., Pfaltz, K., Bady, P., Baumann, T., Ruffli, T., Kieffer, B. L., & Bigliardi, P. L. (2007). Deletion of mu- and kappa-opioid receptors in mice changes epidermal hypertrophy, density of peripheral nerve endings, and itch behavior. *The Journal of investigative dermatology*, 127(6), 1479-1488. <https://doi.org/10.1038/sj.jid.5700661>
- Binshtok, A. M., Wang, H., Zimmermann, K., Amaya, F., Vardeh, D., Shi, L., Brenner, G. J., Ji, R. R., Bean, B. P., Woolf, C. J., & Samad, T. A. (2008). Nociceptors are interleukin-1beta sensors. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 28(52), 14062-14073. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3795-08.2008>
- Bohlhalter, S., Weinmann, O., Mohler, H., & Fritschy, J. M. (1996). Laminar compartmentalization of GABAA-receptor subtypes in the spinal cord: an immunohistochemical study. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 16(1), 283-297. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.16-01-00283.1996>
- Bonin, R. P., Wang, F., Desrochers-Couture, M., Ga Secka, A., Boulanger, M. E., Côté, D. C., & De Koninck, Y. (2016). Epidural optogenetics for controlled analgesia. *Molecular pain*, 12, 1744806916629051. <https://doi.org/10.1177/1744806916629051>
- Bouhassira, D., Lantéri-Minet, M., Attal, N., Laurent, B., & Touboul, C. (2008). Prevalence of chronic pain with neuropathic characteristics in the general population. *Pain*, 136(3), 380-387. <https://doi.org/10.1016/j.pain.2007.08.013>
- Bradshaw, H., Miller, J., Ling, Q., Malsnee, K., & Ruda, M. A. (2000). Sex differences and phases of the estrous cycle alter the response of spinal cord dynorphin neurons to peripheral inflammation and hyperalgesia. *Pain*, 85(1-2), 93-99. [https://doi.org/10.1016/S0304-3959\(99\)00253-5](https://doi.org/10.1016/S0304-3959(99)00253-5)
- Branchereau, P., Cattaert, D., Delpy, A., Allain, A. E., Martin, E., & Meyrand, P. (2016). Depolarizing GABA/glycine synaptic events switch from excitation to inhibition during frequency increases. *Scientific reports*, 6, 21753. <https://doi.org/10.1038/srep21753>
- Browne, T. J., Gradwell, M. A., Iredale, J. A., Madden, J. F., Callister, R. J., Hughes, D. I., Dayas, C. V., & Graham, B. A. (2020). Transgenic Cross-Referencing of Inhibitory and Excitatory Interneuron Populations to Dissect Neuronal Heterogeneity in the Dorsal Horn. *Frontiers in molecular neuroscience*, 13, 32. <https://doi.org/10.3389/fnmol.2020.00032>
- Bullitt E. (1991). Somatotopy of spinal nociceptive processing. *The Journal of comparative neurology*, 312(2), 279-290. <https://doi.org/10.1002/cne.903120210>
- Cairns, B. E., Arendt-Nielsen, L., & Sacerdote, P. (2015). Perspectives in Pain Research 2014: Neuroinflammation and glial cell activation: The cause of transition from acute to chronic pain?. *Scandinavian journal of pain*, 6(1), 3-6. <https://doi.org/10.1016/j.sjpain.2014.10.002>
- Campero, M., Serra, J., & Ochoa, J. L. (1996). C-polymodal nociceptors activated by noxious low temperature in human skin. *The Journal of physiology*, 497 ( Pt 2)(Pt 2), 565-572. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.1996.sp021789>
- Castillo, P. E., Chiu, C. Q., & Carroll, R. C. (2011). Long-term plasticity at inhibitory synapses. *Current opinion in neurobiology*, 21(2), 328-338. <https://doi.org/10.1016/j.conb.2011.01.006>
- Cathenaut, L., Leonardon, B., Kuster, R., Inquimbert, P., Schlichter, R., & Hugel, S. (2022). Inhibitory interneurons with differential plasticities at their connections tune excitatory-inhibitory balance in the spinal nociceptive system. *Pain*, 163(5), e675-e688. <https://doi.org/10.1097/j.pain.0000000000002460>
- Cathenaut, L., Schlichter, R., & Hugel, S. (2023). Short-term plasticity in the spinal nociceptive system. *Pain*, 164(11), 2411-2424. <https://doi.org/10.1097/j.pain.0000000000002999>

- Chang, J., Song, Z., Wei, S., Zhou, Y., Ju, J., Yao, P., Jiang, Y., Jin, H., Chi, X., & Li, N. (2023). Expression Mapping and Functional Analysis of Orphan G-Protein-Coupled Receptor GPR158 in the Adult Mouse Brain Using a GPR158 Transgenic Mouse. *Biomolecules*, 13(3), 479. <https://doi.org/10.3390/biom13030479>
- Charron, A., Pepino, L., Malapert, P., Debrauwer, V., Castets, F., Salio, C., & Moqrich, A. (2024). Sex-related exacerbation of injury-induced mechanical hypersensitivity in GAD67 haplodeficient mice. *Pain*, 165(1), 192–201. <https://doi.org/10.1097/j.pain.0000000000003012>
- Chen, Y., Navratilova, E., Dodick, D. W., & Porreca, F. (2020). An Emerging Role for Prolactin in Female-Selective Pain. *Trends in neurosciences*, 43(8), 635–648. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2020.06.003>
- Chéry, N., & De Koninck, Y. (2000). GABA(B) receptors are the first target of released GABA at lamina I inhibitory synapses in the adult rat spinal cord. *Journal of neurophysiology*, 84(2), 1006–1011. <https://doi.org/10.1152/jn.2000.84.2.1006>
- Chirila, A. M., Brown, T. E., Bishop, R. A., Bellono, N. W., Pucci, F. G., & Kauer, J. A. (2014). Long-term potentiation of glycinergic synapses triggered by interleukin 1 $\beta$ . *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 111(22), 8263–8268. <https://doi.org/10.1073/pnas.1401013111>
- Christensen, B. N., & Perl, E. R. (1970). Spinal neurons specifically excited by noxious or thermal stimuli: marginal zone of the dorsal horn. *Journal of neurophysiology*, 33(2), 293–307. <https://doi.org/10.1152/jn.1970.33.2.293>
- Collongues, N., Samama, B., Schmidt-Mutter, C., Chamard-Witkowski, L., Debouverie, M., Chanson, J. B., Antal, M. C., Benardais, K., de Seze, J., Velten, M., & Boehm, N. (2018). Quantitative and qualitative normative dataset for intraepidermal nerve fibers using skin biopsy. *PLoS one*, 13(1), e0191614. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0191614>
- Cordero-Erausquin, M., Coull, J. A., Boudreau, D., Rolland, M., & De Koninck, Y. (2005). Differential maturation of GABA action and anion reversal potential in spinal lamina I neurons: impact of chloride extrusion capacity. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 25(42), 9613–9623. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1488-05.2005>
- 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. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2016.08.048>
- Corpéchet, C., Young, J., Calvel, M., Wehrey, C., Veltz, J. N., Touyer, G., Mouren, M., Prasad, V. V., Banner, C., & Sjövall, J. (1993). Neurosteroids: 3 alpha-hydroxy-5 alpha-pregnan-20-one and its precursors in the brain, plasma, and steroidogenic glands of male and female rats. *Endocrinology*, 133(3), 1003–1009. <https://doi.org/10.1210/endo.133.3.8365352>
- Corpéchet, C., Collins, B. E., Carey, M. P., Tsouros, A., Robel, P., & Fry, J. P. (1997). Brain neurosteroids during the mouse oestrous cycle. *Brain research*, 766(1-2), 276–280. [https://doi.org/10.1016/s0006-8993\(97\)00749-x](https://doi.org/10.1016/s0006-8993(97)00749-x)
- Costigan, M., Scholz, J., & Woolf, C. J. (2009). Neuropathic pain: a maladaptive response of the nervous system to damage. *Annual review of neuroscience*, 32, 1–32. <https://doi.org/10.1146/annurev.neuro.051508.135531>
- Craft R. M. (2007). Modulation of pain by estrogens. *Pain*, 132 Suppl 1, S3–S12. <https://doi.org/10.1016/j.pain.2007.09.028>
- Cui, L., Kim, Y. R., Kim, H. Y., Lee, S. C., Shin, H. S., Szabó, G., Erdélyi, F., Kim, J., & Kim, S. J. (2011). 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(3), 1102–1111. <https://doi.org/10.1152/jn.00108.2010>
- Davis, O. C., Dickie, A. C., Mustapa, M. B., Boyle, K. A., Browne, T. J., Gradwell, M. A., Smith, K. M., Polgár, E., Bell, A. M., Kókai, É., Watanabe, M., Wildner, H., Zeilhofer, H. U., Ginty, D. D., Callister, R. J., Graham, B. A., Todd, A. J., & Hughes, D. I. (2023). Calretinin-expressing islet cells are a source of pre- and post-synaptic inhibition of non-peptidergic nociceptor input to the mouse spinal cord. *Scientific reports*, 13(1), 11561. <https://doi.org/10.1038/s41598-023-38605-9>
- de Tommaso M. (2011). Pain perception during menstrual cycle. *Current pain and headache reports*, 15(5), 400–406. <https://doi.org/10.1007/s11916-011-0207-1>
- Dedek, A., Xu, J., Lorenzo, L. É., Godin, A. G., Kandegedara, C. M., Glavina, G., Landrigan, J. A., Lombroso, P. J., De Koninck, Y., Tsai, E. C., & Hildebrand, M. E. (2022). Sexual dimorphism in a neuronal mechanism of spinal hyperexcitability across rodent and human models of pathological pain. *Brain : a journal of neurology*, 145(3), 1124–1138. <https://doi.org/10.1093/brain/awab408>

- Dickie, A. C., McCormick, B., Lukito, V., Wilson, K. L., & Torsney, C. (2017). Inflammatory Pain Reduces C Fiber Activity-Dependent Slowing in a Sex-Dependent Manner, Amplifying Nociceptive Input to the Spinal Cord. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 37(27), 6488–6502. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3816-16.2017>
- Djohri, L., Koutsikou, S., Fang, X., McMullan, S., & Lawson, S. N. (2006). Spontaneous pain, both neuropathic and inflammatory, is related to frequency of spontaneous firing in intact C-fiber nociceptors. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 26(4), 1281–1292. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3388-05.2006>
- Dougherty, P. M., & Chen, J. (2016). Relationship of membrane properties, spike burst responses, laminar location, and functional class of dorsal horn neurons recorded in vitro. *Journal of neurophysiology*, 116(3), 1137–1151. <https://doi.org/10.1152/jn.00187.2016>
- Doussau, F., Schmidt, H., Dorgans, K., Valera, A. M., Poulain, B., & Isope, P. (2017). Frequency-dependent mobilization of heterogeneous pools of synaptic vesicles shapes presynaptic plasticity. *eLife*, 6, e28935. <https://doi.org/10.7554/eLife.28935>
- Du, X., Hao, H., Yang, Y., Huang, S., Wang, C., Gigout, S., Ramli, R., Li, X., Jaworska, E., Edwards, I., Deuchars, J., Yanagawa, Y., Qi, J., Guan, B., Jaffe, D. B., Zhang, H., & Gamper, N. (2017). Local GABAergic signaling within sensory ganglia controls peripheral nociceptive transmission. *The Journal of clinical investigation*, 127(5), 1741–1756. <https://doi.org/10.1172/JCI86812>
- Duan, B., Cheng, L., Bourane, S., Britz, O., Padilla, C., Garcia-Campmany, L., Krashes, M., Knowlton, W., Velasquez, T., Ren, X., Ross, S., Lowell, B. B., Wang, Y., Goulding, M., & Ma, Q. (2014). Identification of spinal circuits transmitting and gating mechanical pain. *Cell*, 159(6), 1417–1432. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.11.003>
- Dubin, A. E., & Patapoutian, A. (2010). Nociceptors: the sensors of the pain pathway. *The Journal of clinical investigation*, 120(11), 3760–3772. <https://doi.org/10.1172/JCI42843>
- Dunwiddie, T. V., Diao, L., & Proctor, W. R. (1997). Adenine nucleotides undergo rapid, quantitative conversion to adenosine in the extracellular space in rat hippocampus. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 17(20), 7673–7682. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.17-20-07673.1997>
- Eide P. K. (2000). Wind-up and the NMDA receptor complex from a clinical perspective. *European journal of pain (London, England)*, 4(1), 5–15. <https://doi.org/10.1053/eujp.1999.0154>
- Evrard, H. C., & Balthazart, J. (2004). Rapid regulation of pain by estrogens synthesized in spinal dorsal horn neurons. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 24(33), 7225–7229. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1638-04.2004>
- Fáncsik, A., Linn, D. M., & Tasker, J. G. (2000). Neurosteroid modulation of GABA IPSCs is phosphorylation dependent. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 20(9), 3067–3075. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.20-09-03067.2000>
- Fenselau, H., Heinke, B., & Sandkühler, J. (2011). Heterosynaptic long-term potentiation at GABAergic synapses of spinal lamina I neurons. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 31(48), 17383–17391. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3076-11.2011>
- Fernandes, E. C., Luz, L. L., Mytakhir, O., Lukoyanov, N. V., Szucs, P., & Safronov, B. V. (2016). Diverse firing properties and A $\beta$ -, A $\delta$ -, and C-afferent inputs of small local circuit neurons in spinal lamina I. *Pain*, 157(2), 475–487. <https://doi.org/10.1097/j.pain.0000000000000394>
- Ferrini, F., Perez-Sanchez, J., Ferland, S., Lorenzo, L. E., Godin, A. G., Plasencia-Fernandez, I., Cottet, M., Castonguay, A., Wang, F., Salio, C., Doyon, N., Merighi, A., & De Koninck, Y. (2020). Differential chloride homeostasis in the spinal dorsal horn locally shapes synaptic metaplasticity and modality-specific sensitization. *Nature communications*, 11(1), 3935. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-17824-y>
- Fleischer, E., Handwerker, H. O., & Joukhadar, S. (1983). Unmyelinated nociceptive units in two skin areas of the rat. *Brain research*, 267(1), 81–92. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(83\)91041-7](https://doi.org/10.1016/0006-8993(83)91041-7)
- Fossat, P., Sibon, I., Le Masson, G., Landry, M., & Nagy, F. (2007). L-type calcium channels and NMDA receptors: a determinant duo for short-term nociceptive plasticity. *The European journal of neuroscience*, 25(1), 127–135. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2006.05256.x>

- François, A., Low, S. A., Sypek, E. I., Christensen, A. J., Sotoudeh, C., Beier, K. T., Ramakrishnan, C., Ritola, K. D., Sharif-Naeini, R., Deisseroth, K., Delp, S. L., Malenka, R. C., Luo, L., Hantman, A. W., & Scherrer, G. (2017). A Brainstem–Spinal Cord Inhibitory Circuit for Mechanical Pain Modulation by GABA and Enkephalins. *Neuron*, 93(4), 822–839.e6. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2017.01.008>
- Furue, H., Narikawa, K., Kumamoto, E., & Yoshimura, M. (1999). Responsiveness of rat substantia gelatinosa neurones to mechanical but not thermal stimuli revealed by in vivo patch-clamp recording. *The Journal of physiology*, 521 Pt 2(Pt 2), 529–535. <https://doi.org/10.1111/j.1469-7793.1999.00529.x>
- Gabel, F., Hovhannisyan, V., Andry, V., & Goumon, Y. (2023). Central metabolism as a potential origin of sex differences in morphine antinociception but not induction of antinociceptive tolerance in mice. *British journal of pharmacology*, 180(7), 843–861. <https://doi.org/10.1111/bph.15792>
- Gassmann, M., & Bettler, B. (2012). Regulation of neuronal GABA(B) receptor functions by subunit composition. *Nature reviews. Neuroscience*, 13(6), 380–394. <https://doi.org/10.1038/nrn3249>
- Ghazisaeidi, S., Muley, M. M., & Salter, M. W. (2023). Neuropathic Pain: Mechanisms, Sex Differences, and Potential Therapies for a Global Problem. *Annual review of pharmacology and toxicology*, 63, 565–583. <https://doi.org/10.1146/annurev-pharmtox-051421-112259>
- Giatti, S., Diviccaro, S., Serafini, M. M., Caruso, D., Garcia-Segura, L. M., Viviani, B., & Melcangi, R. C. (2020). Sex differences in steroid levels and steroidogenesis in the nervous system: Physiopathological role. *Frontiers in neuroendocrinology*, 56, 100804. <https://doi.org/10.1016/j.yfrne.2019.100804>
- Gieré, C., Melchior, M., Dufour, A., & Poisbeau, P. (2021). Spinal integration of hot and cold nociceptive stimuli by wide-dynamic-range neurons in anesthetized adult rats. *Pain reports*, 6(4), e983. <https://doi.org/10.1097/PR9.0000000000000983>
- Gilbert, D., Duveau, A., Carracedo, S., Linck, N., Langla, A., Muramatsu, R., Koch-Nolte, F., Rassendren, F., Grutter, T., Fossat, P., Boué-Grabot, E., & Ulmann, L. (2023). Microglial P2X4 receptors are essential for spinal neurons hyperexcitability and tactile allodynia in male and female neuropathic mice. *iScience*, 26(11), 108110. <https://doi.org/10.1016/j.isci.2023.108110>
- Gioiosa, L., Chen, X., Watkins, R., Klanfer, N., Bryant, C. D., Evans, C. J., & Arnold, A. P. (2008). Sex chromosome complement affects nociception in tests of acute and chronic exposure to morphine in mice. *Hormones and behavior*, 53(1), 124–130. <https://doi.org/10.1016/j.yhbeh.2007.09.003>
- Gobel S. (1978). Golgi studies of the neurons in layer II of the dorsal horn of the medulla (trigeminal nucleus caudalis). *The Journal of comparative neurology*, 180(2), 395–413. <https://doi.org/10.1002/cne.901800213>
- Göransson, L. G., Mellgren, S. I., Lindal, S., & Omdal, R. (2004). The effect of age and gender on epidermal nerve fiber density. *Neurology*, 62(5), 774–777. <https://doi.org/10.1212/01.wnl.0000113732.41127.8f>
- Greenspan, J. D., Craft, R. M., LeResche, L., Arendt-Nielsen, L., Berkley, K. J., Fillingim, R. B., Gold, M. S., Holdcroft, A., Lautenbacher, S., Mayer, E. A., Mogil, J. S., Murphy, A. Z., Traub, R. J., & Consensus Working Group of the Sex, Gender, and Pain SIG of the IASP (2007). Studying sex and gender differences in pain and analgesia: a consensus report. *Pain*, 132 Suppl 1(Suppl 1), S26–S45. <https://doi.org/10.1016/j.pain.2007.10.014>
- Grudt, T. J., & Perl, E. R. (2002). Correlations between neuronal morphology and electrophysiological features in the rodent superficial dorsal horn. *The Journal of physiology*, 540(Pt 1), 189–207. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2001.012890>
- Gutierrez, E. G., Banks, W. A., & Kastin, A. J. (1993). Murine tumor necrosis factor alpha is transported from blood to brain in the mouse. *Journal of neuroimmunology*, 47(2), 169–176. [https://doi.org/10.1016/0165-5728\(93\)90027-v](https://doi.org/10.1016/0165-5728(93)90027-v)
- Handwerker, H. O., Anton, F., & Reeh, P. W. (1987). Discharge patterns of afferent cutaneous nerve fibers from the rat's tail during prolonged noxious mechanical stimulation. *Experimental brain research*, 65(3), 493–504. <https://doi.org/10.1007/BF00235972>
- Hao, H., Ramli, R., Wang, C., Liu, C., Shah, S., Mullen, P., Lall, V., Jones, F., Shao, J., Zhang, H., Jaffe, D. B., Gamper, N., & Du, X. (2023). Dorsal root ganglia control nociceptive input to the central nervous system. *PLoS biology*, 21(1), e3001958. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.3001958>
- Hossaini, M., Goos, J. A., Kohli, S. K., & Holstege, J. C. (2012). Distribution of glycine/GABA neurons in the ventromedial medulla with descending spinal projections and evidence for an ascending glycine/GABA projection. *PLoS one*, 7(4), e35293. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0035293>

- Huck, N. A., Donovan, L. J., Shen, H., Jordan, C. E., Muwanga, G. P. B., Bridges, C. M., Forman, T. E., Cordonnier, S. A., Haight, E. S., Dale-Huang, F., Takemura, Y., & Tawfik, V. L. (2022). Sex-distinct microglial activation and myeloid cell infiltration in the spinal cord after painful peripheral injury. *Neurobiology of pain (Cambridge, Mass.)*, 12, 100106. <https://doi.org/10.1016/j.ynpai.2022.100106>
- Hugel, S., & Schlichter, R. (2003). Convergent control of synaptic GABA release from rat dorsal horn neurones by adenosine and GABA autoreceptors. *The Journal of physiology*, 551(Pt 2), 479–489. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2003.047894>
- Iacovides, S., Avidon, I., & Baker, F. C. (2015). Does pain vary across the menstrual cycle? A review. *European journal of pain (London, England)*, 19(10), 1389–1405. <https://doi.org/10.1002/ejp.714>
- 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, N.Y.)*, 312(5780), 1659–1662. <https://doi.org/10.1126/science.1127233>
- 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. *The European journal of neuroscience*, 26(10), 2940–2949. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2007.05919.x>
- Iyadomi, M., Iyadomi, I., Kumamoto, E., Tomokuni, K., & Yoshimura, M. (2000). Presynaptic inhibition by baclofen of miniature EPSCs and IPSCs in substantia gelatinosa neurons of the adult rat spinal dorsal horn. *Pain*, 85(3), 385–393. [https://doi.org/10.1016/S0304-3959\(99\)00285-7](https://doi.org/10.1016/S0304-3959(99)00285-7)
- Joshi, S., Williamson, J., Moosa, S., & Kapur, J. (2024). Progesterone Receptor Activation Regulates Sensory Sensitivity and Migraine Susceptibility. *The journal of pain*, 25(3), 642–658. <https://doi.org/10.1016/j.jpain.2023.09.017>
- Jubileum, E., Binzen, U., Treede, R. D., & Greffrath, W. (2022). Temporal and spatial summation of laser heat stimuli in cultured nociceptive neurons of the rat. *Pflugers Archiv : European journal of physiology*, 474(9), 1003–1019. <https://doi.org/10.1007/s00424-022-02728-1>
- Julius, D., & Basbaum, A. I. (2001). Molecular mechanisms of nociception. *Nature*, 413(6852), 203–210. <https://doi.org/10.1038/35093019>
- Kash, S. F., Johnson, R. S., Tecott, L. H., Noebels, J. L., Mayfield, R. D., Hanahan, D., & Baekkeskov, S. (1997). Epilepsy in mice deficient in the 65-kDa isoform of glutamic acid decarboxylase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 94(25), 14060–14065. <https://doi.org/10.1073/pnas.94.25.14060>
- Kato, G., Yasaka, T., Katafuchi, T., Furue, H., Mizuno, M., Iwamoto, Y., & Yoshimura, M. (2006). Direct GABAergic and glycinergic inhibition of the substantia gelatinosa from the rostral ventromedial medulla revealed by in vivo patch-clamp analysis in rats. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 26(6), 1787–1794. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4856-05.2006>
- Kato, G., Kawasaki, Y., Koga, K., Uta, D., Kosugi, M., Yasaka, T., Yoshimura, M., Ji, R. R., & Strassman, A. M. (2009). Organization of intralaminar and translaminar neuronal connectivity in the superficial spinal dorsal horn. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 29(16), 5088–5099. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.6175-08.2009>
- Kirsch J. (2006). Glycinergic transmission. *Cell and tissue research*, 326(2), 535–540. <https://doi.org/10.1007/s00441-006-0261-x>
- Klatzkin, R. R., Mechlin, B., & Girdler, S. S. (2010). Menstrual cycle phase does not influence gender differences in experimental pain sensitivity. *European journal of pain (London, England)*, 14(1), 77–82. <https://doi.org/10.1016/j.eipain.2009.01.002>
- Klein, T., Magerl, W., Hopf, H. C., Sandkühler, J., & Treede, R. D. (2004). Perceptual correlates of nociceptive long-term potentiation and long-term depression in humans. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 24(4), 964–971. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1222-03.2004>
- Kloc, M. L., Pradier, B., Chirila, A. M., & Kauer, J. A. (2019). NMDA receptor activation induces long-term potentiation of glycine synapses. *PLoS one*, 14(9), e0222066. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0222066>
- Knierim, J. J. (2014). Chapter 19 - Information Processing in Neural Network. From Molecules to Networks (3<sup>rd</sup> Edition), 563–589. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-397179-1.00019-1>
- Koch, S. C., Acton, D., & Goulding, M. (2018). Spinal Circuits for Touch, Pain, and Itch. *Annual review of physiology*, 80, 189–217. <https://doi.org/10.1146/annurev-physiol-022516-034303>

- Kókai, É., Luz, L. L., Fernandes, E. C., Safronov, B. V., Poisbeau, P., & Szucs, P. (2022a). Quantitative spatial analysis reveals that the local axons of lamina I projection neurons and interneurons exhibit distributions that predict distinct roles in spinal sensory processing. *The Journal of comparative neurology*, 530(18), 3270–3287. <https://doi.org/10.1002/cne.25413>
- Kókai, É., Alsulaiman, W. A., Dickie, A. C., Bell, A. M., Goffin, L., Watanabe, M., Gutierrez-Mecinas, M., & Todd, A. J. (2022b). Characterisation of deep dorsal horn projection neurons in the spinal cord of the Phox2a::Cre mouse line. *Molecular pain*, 18, 17448069221119614. <https://doi.org/10.1177/17448069221119614>
- Kopach, O., Dobropolska, Y., Belan, P., & Voitenko, N. (2023). Ca<sup>2+</sup>-Permeable AMPA Receptors Contribute to Changed Dorsal Horn Neuronal Firing and Inflammatory Pain. *International journal of molecular sciences*, 24(3), 2341. <https://doi.org/10.3390/ijms24032341>
- Kullmann, D. M., Moreau, A. W., Bakiri, Y., & Nicholson, E. (2012). Plasticity of inhibition. *Neuron*, 75(6), 951–962. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2012.07.030>
- Labombarda, F., Gonzalez, S. L., Gonzalez Deniselle, M. C., Vinson, G. P., Schumacher, M., De Nicola, A. F., & Guennoun, R. (2003). Effects of injury and progesterone treatment on progesterone receptor and progesterone binding protein 25-Dx expression in the rat spinal cord. *Journal of neurochemistry*, 87(4), 902–913. <https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.2003.02055.x>
- Laboute, T., Zucca, S., Holcomb, M., Patil, D. N., Garza, C., Wheatley, B. A., Roy, R. N., Forli, S., & Martemyanov, K. A. (2023). Orphan receptor GPR158 serves as a metabotropic glycine receptor: mGlyR. *Science (New York, N.Y.)*, 379(6639), 1352–1358. <https://doi.org/10.1126/science.add7150>
- Labrakakis, C., Lorenzo, L. E., Bories, C., Ribeiro-da-Silva, A., & De Koninck, Y. (2009). Inhibitory coupling between inhibitory interneurons in the spinal cord dorsal horn. *Molecular pain*, 5, 24. <https://doi.org/10.1186/1744-8069-5-24>
- LaPrairie, J. L., & Murphy, A. Z. (2007). Female rats are more vulnerable to the long-term consequences of neonatal inflammatory injury. *Pain*, 132 Suppl 1(Suppl 1), S124–S133. <https://doi.org/10.1016/j.pain.2007.08.010>
- Larsson M. (2017). Pax2 is persistently expressed by GABAergic neurons throughout the adult rat dorsal horn. *Neuroscience letters*, 638, 96–101. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2016.12.015>
- Lee, K. Y., Ratté, S., & Prescott, S. A. (2019). Excitatory neurons are more disinhibited than inhibitory neurons by chloride dysregulation in the spinal dorsal horn. *eLife*, 8, e49753. <https://doi.org/10.7554/eLife.49753>
- Lei, J., Jin, L., Zhao, Y., Sui, M. Y., Huang, L., Tan, Y. X., Chen, Y. K., & You, H. J. (2011). Sex-related differences in descending norepinephrine and serotonin controls of spinal withdrawal reflex during intramuscular saline induced muscle nociception in rats. *Experimental neurology*, 228(2), 206–214. <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2011.01.004>
- Leonardon, B., Cathena, L., Vial-Markiewicz, L., Hugel, S., Schlichter, R., & Inquimbert, P. (2022). Modulation of GABAergic Synaptic Transmission by NMDA Receptors in the Dorsal Horn of the Spinal Cord. *Frontiers in molecular neuroscience*, 15, 903087. <https://doi.org/10.3389/fnmol.2022.903087>
- Levitan, E. S., Blair, L. A., Dionne, V. E., & Barnard, E. A. (1988). Biophysical and pharmacological properties of cloned GABA<sub>A</sub> receptor subunits expressed in *Xenopus* oocytes. *Neuron*, 1(9), 773–781. [https://doi.org/10.1016/0896-6273\(88\)90125-0](https://doi.org/10.1016/0896-6273(88)90125-0)
- Levy, D. R., Hunter, N., Lin, S., Robinson, E. M., Gillis, W., Conlin, E. B., Anyoha, R., Shansky, R. M., & Datta, S. R. (2023). Mouse spontaneous behavior reflects individual variation rather than estrous state. *Current biology : CB*, 33(7), 1358–1364.e4. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2023.02.035>
- Li, D. P., Chen, S. R., Pan, Y. Z., Levey, A. I., & Pan, H. L. (2002). Role of presynaptic muscarinic and GABA(B) receptors in spinal glutamate release and cholinergic analgesia in rats. *The Journal of physiology*, 543(Pt 3), 807–818. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2002.020644>
- Liu, P., Zhang, X., He, X., Jiang, Z., Wang, Q., & Lu, Y. (2021). Spinal GABAergic neurons are under feed-forward inhibitory control driven by A $\delta$  and C fibers in Gad2 td-Tomato mice. *Molecular pain*, 17, 1744806921992620. <https://doi.org/10.1177/1744806921992620>
- Lu, Y., & Perl, E. R. (2003). A specific inhibitory pathway between substantia gelatinosa neurons receiving direct C-fiber input. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 23(25), 8752–8758. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.23-25-08752.2003>

- Lu, Y., & Perl, E. R. (2005). Modular organization of excitatory circuits between neurons of the spinal superficial dorsal horn (laminae I and II). *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 25(15), 3900–3907. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0102-05.2005>
- Lu, C. R., Willcockson, H. H., Phend, K. D., Lucifora, S., Darstein, M., Valtschanoff, J. G., & Rustioni, A. (2005). Ionotropic glutamate receptors are expressed in GABAergic terminals in the rat superficial dorsal horn. *The Journal of comparative neurology*, 486(2), 169–178. <https://doi.org/10.1002/cne.20525>
- Lundberg, L. E., Jørum, E., Holm, E., & Torebjörk, H. E. (1992). Intra-neural electrical stimulation of cutaneous nociceptive fibres in humans: effects of different pulse patterns on magnitude of pain. *Acta physiologica Scandinavica*, 146(1), 41–48. <https://doi.org/10.1111/j.1748-1716.1992.tb09391.x>
- Luo, C., Kuner, T., & Kuner, R. (2014). Synaptic plasticity in pathological pain. *Trends in neurosciences*, 37(6), 343–355. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2014.04.002>
- Luz, L. L., Lima, S., Fernandes, E. C., Kokai, E., Gomori, L., Szucs, P., & Safronov, B. V. (2023). Contralateral Afferent Input to Lumbar Lamina I Neurons as a Neural Substrate for Mirror-Image Pain. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 43(18), 3245–3258. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1897-22.2023>
- Mackie, M., Hughes, D. I., Maxwell, D. J., Tillakaratne, N. J., & Todd, A. J. (2003). Distribution and colocalisation of glutamate decarboxylase isoforms in the rat spinal cord. *Neuroscience*, 119(2), 461–472. [https://doi.org/10.1016/s0306-4522\(03\)00174-x](https://doi.org/10.1016/s0306-4522(03)00174-x)
- Malan, T. P., Mata, H. P., & Porreca, F. (2002). Spinal GABA(A) and GABA(B) receptor pharmacology in a rat model of neuropathic pain. *Anesthesiology*, 96(5), 1161–1167. <https://doi.org/10.1097/0000542-200205000-00020>
- Mapplebeck, J. C. S., Dalgarno, R., Tu, Y., Moriarty, O., Beggs, S., Kwok, C. H. T., Halievski, K., Assi, S., Mogil, J. S., Trang, T., & Salter, M. W. (2018). Microglial P2X4R-evoked pain hypersensitivity is sexually dimorphic in rats. *Pain*, 159(9), 1752–1763. <https://doi.org/10.1097/j.pain.0000000000001265>
- Marsden, K. C., Beattie, J. B., Friedenthal, J., & Carroll, R. C. (2007). NMDA receptor activation potentiates inhibitory transmission through GABA receptor-associated protein-dependent exocytosis of GABA(A) receptors. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 27(52), 14326–14337. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4433-07.2007>
- Maxwell, D. J., Belle, M. D., 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(Pt 2), 521–533. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2007.140996>
- Medlock, L., Sekiguchi, K., Hong, S., Dura-Bernal, S., Lytton, W. W., & Prescott, S. A. (2022). Multiscale Computer Model of the Spinal Dorsal Horn Reveals Changes in Network Processing Associated with Chronic Pain. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 42(15), 3133–3149. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1199-21.2022>
- Mellon, S. H., & Griffin, L. D. (2002). Neurosteroids: biochemistry and clinical significance. *Trends in endocrinology and metabolism: TEM*, 13(1), 35–43. [https://doi.org/10.1016/s1043-2760\(01\)00503-3](https://doi.org/10.1016/s1043-2760(01)00503-3)
- Mendell, L. M., & Wall, P. D. (1965). Responses Of Single Dorsal Cord Cells To Peripheral Cutaneous Unmyelinated Fibres. *Nature*, 206, 97–99. <https://doi.org/10.1038/206097a0>
- Mendell L. M. (1966). Physiological properties of unmyelinated fiber projection to the spinal cord. *Experimental neurology*, 16(3), 316–332. [https://doi.org/10.1016/0014-4886\(66\)90068-9](https://doi.org/10.1016/0014-4886(66)90068-9)
- Mensah-Nyagan, A. G., Kibaly, C., Schaeffer, V., Venard, C., Meyer, L., & Patte-Mensah, C. (2008). Endogenous steroid production in the spinal cord and potential involvement in neuropathic pain modulation. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology*, 109(3–5), 286–293. <https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2008.03.002>
- Merighi A. (2018). The histology, physiology, neurochemistry and circuitry of the substantia gelatinosa Rolandi (lamina II) in mammalian spinal cord. *Progress in neurobiology*, 169, 91–134. <https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2018.06.012>
- Meziane, H., Ouagazzal, A. M., Aubert, L., Wietrzyk, M., & Krezel, W. (2007). Estrous cycle effects on behavior of C57BL/6J and BALB/cByJ female mice: implications for phenotyping strategies. *Genes, brain, and behavior*, 6(2), 192–200. <https://doi.org/10.1111/j.1601-183X.2006.00249.x>

- Millan M. J. (1999). The induction of pain: an integrative review. *Progress in neurobiology*, 57(1), 1–164. [https://doi.org/10.1016/s0301-0082\(98\)00048-3](https://doi.org/10.1016/s0301-0082(98)00048-3)
- Millan M. J. (2002). Descending control of pain. *Progress in neurobiology*, 66(6), 355–474. [https://doi.org/10.1016/s0301-0082\(02\)00009-6](https://doi.org/10.1016/s0301-0082(02)00009-6)
- Millicamps, M., Sotocinal, S. G., Austin, J. S., Stone, L. S., & Mogil, J. S. (2023). Sex-specific effects of neuropathic pain on long-term pain behavior and mortality in mice. *Pain*, 164(3), 577–586. <https://doi.org/10.1097/j.pain.0000000000002742>
- Moayed, M., & Davis, K. D. (2013). Theories of pain: from specificity to gate control. *Journal of neurophysiology*, 109(1), 5–12. <https://doi.org/10.1152/jn.00457.2012>
- Mogil, J. S., & Bailey, A. L. (2010). Sex and gender differences in pain and analgesia. *Progress in brain research*, 186, 141–157. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-53630-3.00009-9>
- Mogil, J. S., Chesler, E. J., Wilson, S. G., Juraska, J. M., & Sternberg, W. F. (2000). Sex differences in thermal nociception and morphine antinociception in rodents depend on genotype. *Neuroscience and biobehavioral reviews*, 24(3), 375–389. [https://doi.org/10.1016/s0149-7634\(00\)00015-4](https://doi.org/10.1016/s0149-7634(00)00015-4)
- Mogil J. S. (2020). Qualitative sex differences in pain processing: emerging evidence of a biased literature. *Nature reviews. Neuroscience*, 21(7), 353–365. <https://doi.org/10.1038/s41583-020-0310-6>
- Moore, K. A., Kohno, T., Karchewski, L. A., Scholz, J., Baba, H., & Woolf, C. J. (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 : the official journal of the Society for Neuroscience*, 22(15), 6724–6731. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.22-15-06724.2002>
- Morgan, M. M., Whittier, K. L., Hegarty, D. M., & Aicher, S. A. (2008). Periaqueductal gray neurons project to spinally projecting GABAergic neurons in the rostral ventromedial medulla. *Pain*, 140(2), 376–386. <https://doi.org/10.1016/j.pain.2008.09.009>
- Motanis, H., Seay, M. J., & Buonomano, D. V. (2018). Short-Term Synaptic Plasticity as a Mechanism for Sensory Timing. *Trends in neurosciences*, 41(10), 701–711. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2018.08.001>
- Nasser, S. A., & Afify, E. A. (2019). Sex differences in pain and opioid mediated antinociception: Modulatory role of gonadal hormones. *Life sciences*, 237, 116926. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2019.116926>
- Nilsson, M. E., Vandenput, L., Tivesten, Å., Norlén, A. K., Lagerquist, M. K., Windahl, S. H., Börjesson, A. E., Farman, H. H., Poutanen, M., Benrick, A., Maliqueo, M., Stener-Victorin, E., Ryberg, H., & Ohlsson, C. (2015). Measurement of a Comprehensive Sex Steroid Profile in Rodent Serum by High-Sensitive Gas Chromatography-Tandem Mass Spectrometry. *Endocrinology*, 156(7), 2492–2502. <https://doi.org/10.1210/en.2014-1890>
- Nishida, K., Matsumura, S., Taniguchi, W., Uta, D., Furue, H., & Ito, S. (2014). Three-dimensional distribution of sensory stimulation-evoked neuronal activity of spinal dorsal horn neurons analyzed by in vivo calcium imaging. *PLoS one*, 9(8), e103321. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0103321>
- Noack, M., & Kolopp-Sarda, M. N. (2018). Cytokines et inflammation : physiologie, physiopathologie et utilisation thérapeutique. *Revue Francophone des Laboratoires*, 499, 28–37. [https://doi.org/10.1016/S1773-035X\(18\)30052-2](https://doi.org/10.1016/S1773-035X(18)30052-2)
- Noriega, N. C., Eghlidi, D. H., Garyfallou, V. T., Kohama, S. G., Kryger, S. G., & Urbanski, H. F. (2010). Influence of 17beta-estradiol and progesterone on GABAergic gene expression in the arcuate nucleus, amygdala and hippocampus of the rhesus macaque. *Brain research*, 1307, 28–42. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2009.10.011>
- Nowak, A., Mathieson, H. R., Chapman, R. J., Janzso, G., Yanagawa, Y., Obata, K., Szabo, G., & King, A. E. (2011). Kv3.1b and Kv3.3 channel subunit expression in murine spinal dorsal horn GABAergic interneurons. *Journal of chemical neuroanatomy*, 42(1), 30–38. <https://doi.org/10.1016/j.jchemneu.2011.02.003>
- Olsen R. W. (2018). GABA<sub>A</sub> receptor: Positive and negative allosteric modulators. *Neuropharmacology*, 136(Pt A), 10–22. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2018.01.036>
- Orts-Del'Immagine, A., & Pugh, J. R. (2018). Activity-dependent plasticity of presynaptic GABA<sub>B</sub> receptors at parallel fiber synapses. *Synapse (New York, N.Y.)*, 72(5), e22027. <https://doi.org/10.1002/syn.22027>

- Peirs, C., & Seal, R. P. (2016). Neural circuits for pain: Recent advances and current views. *Science (New York, N.Y.)*, 354(6312), 578–584. <https://doi.org/10.1126/science.aaf8933>
- Peirs, C., Williams, S. P., Zhao, X., Walsh, C. E., Gedeon, J. Y., Cagle, N. E., Goldring, A. C., Hioki, H., Liu, Z., Marell, P. S., & Seal, R. P. (2015). Dorsal Horn Circuits for Persistent Mechanical Pain. *Neuron*, 87(4), 797–812. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2015.07.029>
- Petitjean, H., Rodeau, J. L., & Schlichter, R. (2012). Interactions between superficial and deep dorsal horn spinal cord neurons in the processing of nociceptive information. *The European journal of neuroscience*, 36(11), 3500–3508. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2012.08273.x>
- Pinto, V., Szűcs, P., Derkach, V. A., & Safronov, B. V. (2008). Monosynaptic convergence of C- and Adelta-afferent fibres from different segmental dorsal roots on to single substantia gelatinosa neurones in the rat spinal cord. *The Journal of physiology*, 586(17), 4165–4177. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2008.154898>
- Poisbeau, P., Patte-Mensah, C., Keller, A. F., Barrot, M., Breton, J. D., Luis-Delgado, O. E., Freund-Mercier, M. J., Mensah-Nyagan, A. G., & Schlichter, R. (2005). Inflammatory pain upregulates spinal inhibition via endogenous neurosteroid production. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 25(50), 11768–11776. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3841-05.2005>
- Polgár, E., Durrieux, C., Hughes, D. I., & Todd, A. J. (2013). A quantitative study of inhibitory interneurons in laminae I–III of the mouse spinal dorsal horn. *PLoS one*, 8(10), e78309. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0078309>
- Pool, G. J., Schwegler, A. F., Theodore, B. R., & Fuchs, P. N. (2007). Role of gender norms and group identification on hypothetical and experimental pain tolerance. *Pain*, 129(1–2), 122–129. <https://doi.org/10.1016/j.pain.2006.10.008>
- Prescott, S. A., & Ratté, S. (2012). Pain processing by spinal microcircuits: afferent combinatorics. *Current opinion in neurobiology*, 22(4), 631–639. <https://doi.org/10.1016/j.conb.2012.02.010>
- Puri, J., Bellinger, L. L., & Kramer, P. R. (2011). Estrogen in cycling rats alters gene expression in the temporomandibular joint, trigeminal ganglia and trigeminal subnucleus caudalis/upper cervical cord junction. *Journal of cellular physiology*, 226(12), 3169–3180. <https://doi.org/10.1002/jcp.22671>
- Racine, M., Tousignant-Laflamme, Y., Kloda, L. A., Dion, D., Dupuis, G., & Choinière, M. (2012a). A systematic literature review of 10 years of research on sex/gender and experimental pain perception – part 1: are there really differences between women and men?. *Pain*, 153(3), 602–618. <https://doi.org/10.1016/j.pain.2011.11.025>
- Racine, M., Tousignant-Laflamme, Y., Kloda, L. A., Dion, D., Dupuis, G., & Choinière, M. (2012b). A systematic literature review of 10 years of research on sex/gender and pain perception – part 2: do biopsychosocial factors alter pain sensitivity differently in women and men?. *Pain*, 153(3), 619–635. <https://doi.org/10.1016/j.pain.2011.11.026>
- Raimondo, J. V., Markram, H., & Akerman, C. J. (2012). Short-term ionic plasticity at GABAergic synapses. *Frontiers in synaptic neuroscience*, 4, 5. <https://doi.org/10.3389/fnsyn.2012.00005>
- Regehr, W. G. (2012). Short-term presynaptic plasticity. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 4(7), a005702. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a005702>
- Ren, K., Wei, F., Dubner, R., Murphy, A., & Hoffman, G. E. (2000). Progesterone attenuates persistent inflammatory hyperalgesia in female rats: involvement of spinal NMDA receptor mechanisms. *Brain research*, 865(2), 272–277. [https://doi.org/10.1016/S0006-8993\(00\)02267-8](https://doi.org/10.1016/S0006-8993(00)02267-8)
- REXED B. (1952). The cytoarchitectonic organization of the spinal cord in the cat. *The Journal of comparative neurology*, 96(3), 414–495. <https://doi.org/10.1002/cne.900960303>
- Riley, J. L., 3rd, Robinson, M. E., Wise, E. A., Myers, C. D., & Fillingim, R. B. (1998). Sex differences in the perception of noxious experimental stimuli: a meta-analysis. *Pain*, 74(2–3), 181–187. [https://doi.org/10.1016/S0304-3959\(97\)00199-1](https://doi.org/10.1016/S0304-3959(97)00199-1)
- Rowley, N. M., Madsen, K. K., Schousboe, A., & Steve White, H. (2012). Glutamate and GABA synthesis, release, transport and metabolism as targets for seizure control. *Neurochemistry international*, 61(4), 546–558. <https://doi.org/10.1016/j.neuint.2012.02.013>
- Ruau, D., Liu, L. Y., Clark, J. D., Angst, M. S., & Butte, A. J. (2012). Sex differences in reported pain across 11,000 patients captured in electronic medical records. *The journal of pain*, 13(3), 228–234. <https://doi.org/10.1016/j.jpain.2011.11.002>

- Rudomin, P., & Schmidt, R. F. (1999). Presynaptic inhibition in the vertebrate spinal cord revisited. *Experimental brain research*, 129(1), 1–37. <https://doi.org/10.1007/s002210050933>
- Russ, D. E., Cross, R. B. P., Li, L., Koch, S. C., Matson, K. J. E., Yadav, A., Alkaslasi, M. R., Lee, D. I., Le Pichon, C. E., Menon, V., & Levine, A. J. (2021). A harmonized atlas of mouse spinal cord cell types and their spatial organization. *Nature communications*, 12(1), 5722. <https://doi.org/10.1038/s41467-021-25125-1>
- Salio, C., Aïmar, P., Malapert, P., Moqrigh, A., & Merighi, A. (2021). Neurochemical and Ultrastructural Characterization of Unmyelinated Non-peptidergic C-Nociceptors and C-Low Threshold Mechanoreceptors Projecting to Lamina II of the Mouse Spinal Cord. *Cellular and molecular neurobiology*, 41(2), 247–262. <https://doi.org/10.1007/s10571-020-00847-w>
- Sandkühler J. (2009). Models and mechanisms of hyperalgesia and allodynia. *Physiological reviews*, 89(2), 707–758. <https://doi.org/10.1152/physrev.00025.2008>
- Sands, S. A., Purisai, M. G., Chronwall, B. M., & Enna, S. J. (2003). Ontogeny of GABA(B) receptor subunit expression and function in the rat spinal cord. *Brain research*, 972(1-2), 197–206. [https://doi.org/10.1016/s0006-8993\(03\)02534-4](https://doi.org/10.1016/s0006-8993(03)02534-4)
- Santos, S. F., Luz, L. L., Szucs, P., Lima, D., Derkach, V. A., & Safronov, B. V. (2009). Transmission efficacy and plasticity in glutamatergic synapses formed by excitatory interneurons of the substantia gelatinosa in the rat spinal cord. *PLoS one*, 4(11), e8047. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0008047>
- Schepers, R. J., & Ringkamp, M. (2010). Thermoreceptors and thermosensitive afferents. *Neuroscience and biobehavioral reviews*, 34(2), 177–184. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2009.10.003>
- Schneider, S. P., & Perl, E. R. (1994). Synaptic mediation from cutaneous mechanical nociceptors. *Journal of neurophysiology*, 72(2), 612–621. <https://doi.org/10.1152/jn.1994.72.2.612>
- Schouenborg J. (1984). Functional and topographical properties of field potentials evoked in rat dorsal horn by cutaneous C-fibre stimulation. *The Journal of physiology*, 356, 169–192. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.1984.sp015459>
- Schuler, V., Lüscher, C., Blanchet, C., Klix, N., Sansig, G., Klebs, K., Schmutz, M., Heid, J., Gentry, C., Urban, L., Fox, A., Spooren, W., Jatón, A. L., Vigouret, J., Pozza, M., Kelly, P. H., Mosbacher, J., Froestl, W., Käslin, E., Korn, R., ... Bettler, B. (2001). Epilepsy, hyperalgesia, impaired memory, and loss of pre- and postsynaptic GABA(B) responses in mice lacking GABA(B1). *Neuron*, 31(1), 47–58. [https://doi.org/10.1016/s0896-6273\(01\)00345-2](https://doi.org/10.1016/s0896-6273(01)00345-2)
- Schwartz-Giblin, S., Canonaco, M., McEwen, B. S., & Pfaff, D. W. (1988). Effects of in vivo estradiol and progesterone on tritiated flunitrazepam binding in rat spinal cord. *Neuroscience*, 25(1), 249–257. [https://doi.org/10.1016/0306-4522\(88\)90023-1](https://doi.org/10.1016/0306-4522(88)90023-1)
- Seagrove, L. C., Suzuki, R., & Dickenson, A. H. (2004). Electrophysiological characterisations of rat lamina I dorsal horn neurones and the involvement of excitatory amino acid receptors. *Pain*, 108(1-2), 76–87. <https://doi.org/10.1016/j.pain.2003.12.004>
- Sedláček, M., Korínek, M., Petrovič, M., Cais, O., Adamusová, E., Chodounská, H., & Vyklický, L., Jr (2008). Neurosteroid modulation of ionotropic glutamate receptors and excitatory synaptic transmission. *Physiological research*, 57 Suppl 3, S49–S57. <https://doi.org/10.33549/physiolres.931600>
- Selim, M. M., Wendelschafer-Crabb, G., Hodges, J. S., Simone, D. A., Foster, S. X. Y., Vanhove, G. F., & Kennedy, W. R. (2010). Variation in quantitative sensory testing and epidermal nerve fiber density in repeated measurements. *Pain*, 151(3), 575–581. <https://doi.org/10.1016/j.pain.2010.06.034>
- Shannon, C. E. (1948). A Mathematical Theory of Communication. *The Bell System Technical Journal* 27, 379–423.
- Shimizu-Okabe, C., Kobayashi, S., Kim, J., Kosaka, Y., Sunagawa, M., Okabe, A., & Takayama, C. (2022). Developmental Formation of the GABAergic and Glycinergic Networks in the Mouse Spinal Cord. *International journal of molecular sciences*, 23(2), 834. <https://doi.org/10.3390/ijms23020834>
- Sorge, R. E., Martin, L. J., Isbester, K. A., Sotocinal, S. G., Rosen, S., Tuttle, A. H., Wieskopf, J. S., Acland, E. L., Dokova, A., Kadoura, B., Leger, P., Mapplebeck, J. C., McPhail, M., Delaney, A., Wigerblad, G., Schumann, A. P., Quinn, T., Frasnelli, J., Svensson, C. I., Sternberg, W. F., ... Mogil, J. S. (2014). Olfactory exposure to males, including men, causes stress and related analgesia in rodents. *Nature methods*, 11(6), 629–632. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2935>

- Sorge, R. E., Mapplebeck, J. C., Rosen, S., Beggs, S., Taves, S., Alexander, J. K., Martin, L. J., Austin, J. S., Sotocinal, S. G., Chen, D., Yang, M., Shi, X. Q., Huang, H., Pillon, N. J., Bilan, P. J., Tu, Y., Klip, A., Ji, R. R., Zhang, J., Salter, M. W., ... Mogil, J. S. (2015). Different immune cells mediate mechanical pain hypersensitivity in male and female mice. *Nature neuroscience*, 18(8), 1081–1083. <https://doi.org/10.1038/nn.4053>
- Spike, R. C., Puskár, Z., Andrew, D., & Todd, A. J. (2003). A quantitative and morphological study of projection neurons in lamina I of the rat lumbar spinal cord. *The European journal of neuroscience*, 18(9), 2433–2448. <https://doi.org/10.1046/j.1460-9568.2003.02981.x>
- Steen, K. H., Reeh, P. W., Anton, F., & Handwerker, H. O. (1992). Protons selectively induce lasting excitation and sensitization to mechanical stimulation of nociceptors in rat skin, in vitro. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 12(1), 86–95. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.12-01-00086.1992>
- Stork, O., Ji, F. Y., Kaneko, K., Stork, S., Yoshinobu, Y., Moriya, T., Shibata, S., & Obata, K. (2000). Postnatal development of a GABA deficit and disturbance of neural functions in mice lacking GAD65. *Brain research*, 865(1), 45–58. [https://doi.org/10.1016/s0006-8993\(00\)02206-x](https://doi.org/10.1016/s0006-8993(00)02206-x)
- Street, S. E., Walsh, P. L., Sowa, N. A., Taylor-Blake, B., Guillot, T. S., Vihko, P., Wightman, R. M., & Zylka, M. J. (2011). PAP and NT5E inhibit nociceptive neurotransmission by rapidly hydrolyzing nucleotides to adenosine. *Molecular pain*, 7, 80. <https://doi.org/10.1186/1744-8069-7-80>
- Sullivan, S. J., & Sdrulla, A. D. (2022). Excitatory and Inhibitory Neurons of the Spinal Cord Superficial Dorsal Horn Diverge in Their Somatosensory Responses and Plasticity in Vivo. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 42(10), 1958–1973. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1860-21.2021>
- Sundt, D., Gamper, N., & Jaffe, D. B. (2015). Spike propagation through the dorsal root ganglia in an unmyelinated sensory neuron: a modeling study. *Journal of neurophysiology*, 114(6), 3140–3153. <https://doi.org/10.1152/jn.00226.2015>
- Takazawa, T., & MacDermott, A. B. (2010). Glycinergic and GABAergic tonic inhibition fine tune inhibitory control in regionally distinct subpopulations of dorsal horn neurons. *The Journal of physiology*, 588(Pt 14), 2571–2587. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2010.188292>
- Takazawa, T., Choudhury, P., Tong, C. K., Conway, C. M., Scherrer, G., Flood, P. D., Mukai, J., & MacDermott, A. B. (2017). Inhibition Mediated by Glycinergic and GABAergic Receptors on Excitatory Neurons in Mouse Superficial Dorsal Horn Is Location-Specific but Modified by Inflammation. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 37(9), 2336–2348. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2354-16.2017>
- Takanami, K., Sakamoto, H., Matsuda, K., Hosokawa, K., Nishi, M., Prossnitz, E. R., & Kawata, M. (2010). Expression of G protein-coupled receptor 30 in the spinal somatosensory system. *Brain research*, 1310, 17–28. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2009.11.004>
- Tashima, R., Koga, K., Sekine, M., Kanehisa, K., Kohro, Y., Tominaga, K., Matsushita, K., Tozaki-Saitoh, H., Fukazawa, Y., Inoue, K., Yawo, H., Furue, H., & Tsuda, M. (2018). Optogenetic Activation of Non-Nociceptive A $\beta$  Fibers Induces Neuropathic Pain-Like Sensory and Emotional Behaviors after Nerve Injury in Rats. *eNeuro*, 5(1), ENEURO.0450-17.2018. <https://doi.org/10.1523/ENEURO.0450-17.2018>
- Tian, L., Ji, G., Wang, C., Bai, X., Lu, Y., & Xiong, L. (2010). Excitatory synaptic transmission in the spinal substantia gelatinosa is under an inhibitory tone of endogenous adenosine. *Neuroscience letters*, 477(1), 28–32. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2010.04.029>
- Todd A. J. (2010). Neuronal circuitry for pain processing in the dorsal horn. *Nature reviews. Neuroscience*, 11(12), 823–836. <https://doi.org/10.1038/nrn2947>
- Todd A. J. (2015). Plasticity of inhibition in the spinal cord. *Handbook of experimental pharmacology*, 227, 171–190. [https://doi.org/10.1007/978-3-662-46450-2\\_9](https://doi.org/10.1007/978-3-662-46450-2_9)
- Torebjörk, H. E., & Hallin, R. G. (1974). Responses in human A and C fibres to repeated electrical intradermal stimulation. *Journal of neurology, neurosurgery, and psychiatry*, 37(6), 653–664. <https://doi.org/10.1136/jnnp.37.6.653>
- Torsney, C., & MacDermott, A. B. (2006). Disinhibition opens the gate to pathological pain signaling in superficial neurokinin 1 receptor-expressing neurons in rat spinal cord. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 26(6), 1833–1843. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4584-05.2006>
- Tran, M., Kuhn, J. A., Bráz, J. M., & Basbaum, A. I. (2017). Neuronal aromatase expression in pain processing regions of the medullary and spinal cord dorsal horn. *The Journal of comparative neurology*, 525(16), 3414–3428. <https://doi.org/10.1002/cne.24269>

- Tsao, C. H., Wu, K. Y., Su, N. C., Edwards, A., & Huang, G. J. (2023). The influence of sex difference on behavior and adult hippocampal neurogenesis in C57BL/6 mice. *Scientific reports*, 13(1), 17297. <https://doi.org/10.1038/s41598-023-44360-8>
- Wall, E. G., Desai, R., Khant Aung, Z., Yeo, S. H., Grattan, D. R., Handelsman, D. J., & Herbison, A. E. (2023). Unexpected Plasma Gonadal Steroid and Prolactin Levels Across the Mouse Estrous Cycle. *Endocrinology*, 164(6), bqad070. <https://doi.org/10.1210/endo/bqad070>
- Walmer, D. K., Wrona, M. A., Hughes, C. L., & Nelson, K. G. (1992). Lactoferrin expression in the mouse reproductive tract during the natural estrous cycle: correlation with circulating estradiol and progesterone. *Endocrinology*, 131(3), 1458–1466. <https://doi.org/10.1210/endo.131.3.1505477>
- Wan, Y. H., & Hu, S. J. (2003). Short-term depression at primary afferent synapses in rat substantia gelatinosa region. *Neuroreport*, 14(2), 197–200. <https://doi.org/10.1097/00001756-200302100-00007>
- Wan, Y. H., Jian, Z., Wang, W. T., Xu, H., Hu, S. J., & Ju, G. (2006). Short-term plasticity at primary afferent synapse in rat spinal dorsal horn and its biological function. *Neuro-Signals*, 15(2), 74–90. <https://doi.org/10.1159/000094657>
- Wercberger, R., & Basbaum, A. I. (2019). Spinal cord projection neurons: a superficial, and also deep, analysis. *Current opinion in physiology*, 11, 109–115. <https://doi.org/10.1016/j.cophys.2019.10.002>
- Williams, S. J., Chung, K., Om, A. S., & Papka, R. E. (1997). Cytosolic estrogen receptor concentrations in the lumbosacral spinal cord fluctuate during the estrous cycle. *Life sciences*, 61(26), 2551–2559. [https://doi.org/10.1016/s0024-3205\(97\)01009-6](https://doi.org/10.1016/s0024-3205(97)01009-6)
- Wise, E. A., Price, D. D., Myers, C. D., Heft, M. W., & Robinson, M. E. (2002). Gender role expectations of pain: relationship to experimental pain perception. *Pain*, 96(3), 335–342. [https://doi.org/10.1016/S0304-3959\(01\)00473-0](https://doi.org/10.1016/S0304-3959(01)00473-0)
- Woolf, C. J., & Costigan, M. (1999). Transcriptional and posttranslational plasticity and the generation of inflammatory pain. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96(14), 7723–7730. <https://doi.org/10.1073/pnas.96.14.7723>
- Woolf C. J. (1983). Evidence for a central component of post-injury pain hypersensitivity. *Nature*, 306(5944), 686–688. <https://doi.org/10.1038/306686a0>
- Xiao, W. H., & Bennett, G. J. (2007). Persistent low-frequency spontaneous discharge in A-fiber and C-fiber primary afferent neurons during an inflammatory pain condition. *Anesthesiology*, 107(5), 813–821. <https://doi.org/10.1097/01.anes.0000286983.33184.9c>
- Yan, X., Jiang, E., & Weng, H. R. (2015). Activation of toll like receptor 4 attenuates GABA synthesis and postsynaptic GABA receptor activities in the spinal dorsal horn via releasing interleukin-1 beta. *Journal of neuroinflammation*, 12, 222. <https://doi.org/10.1186/s12974-014-0222-3>
- Yang, F., Guo, J., Sun, W. L., Liu, F. Y., Cai, J., Xing, G. G., & Wan, Y. (2014). The induction of long-term potentiation in spinal dorsal horn after peripheral nociceptive stimulation and contribution of spinal TRPV1 in rats. *Neuroscience*, 269, 59–66. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2014.03.037>
- Yasaka, T., Kato, G., Furue, H., Rashid, M. H., 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(Pt 2), 603–618. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2006.123919>
- You, H. J., Cao, D. Y., Yuan, B., & Arendt-Nielsen, L. (2006). Sex differences in the responses of spinal wide-dynamic range neurons to subcutaneous formalin and in the effects of different frequencies of conditioning electrical stimulation. *Neuroscience*, 138(4), 1299–1307. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2005.11.060>
- Zeilhofer, H. U., Wildner, H., & Yévenes, G. E. (2012). Fast synaptic inhibition in spinal sensory processing and pain control. *Physiological reviews*, 92(1), 193–235. <https://doi.org/10.1152/physrev.00043.2010>
- Zhang, H., & Dougherty, P. M. (2011). Acute inhibition of signalling phenotype of spinal GABAergic neurons by tumour necrosis factor-alpha. *The Journal of physiology*, 589(Pt 18), 4511–4526. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2011.215301>
- Zhang, W., & Schneider, S. P. (2011). Short-term modulation at synapses between neurons in laminae II–V of the rodent spinal dorsal horn. *Journal of neurophysiology*, 105(6), 2920–2930. <https://doi.org/10.1152/jn.00684.2010>

Zhang, W., Liu, L. Y., & Xu, T. L. (2008). Reduced potassium-chloride co-transporter expression in spinal cord dorsal horn neurons contributes to inflammatory pain hypersensitivity in rats. *Neuroscience*, *152*(2), 502–510. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2007.12.037>

Zhao, W., Li, Q., Ma, Y., Wang, Z., Fan, B., Zhai, X., Hu, M., Wang, Q., Zhang, M., Zhang, C., Qin, Y., Sha, S., Gan, Z., Ye, F., Xia, Y., Zhang, G., Yang, L., Zou, S., Xu, Z., Xia, S., ... Zhang, H. (2021). Behaviors Related to Psychiatric Disorders and Pain Perception in C57BL/6J Mice During Different Phases of Estrous Cycle. *Frontiers in neuroscience*, *15*, 650793. <https://doi.org/10.3389/fnins.2021.650793>

Zheng, J., Lu, Y., & Perl, E. R. (2010). Inhibitory neurones of the spinal substantia gelatinosa mediate interaction of signals from primary afferents. *The Journal of physiology*, *588*(Pt 12), 2065–2075. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2010.188052>

Zhou, S., & Yu, Y. (2018). Synaptic E-I Balance Underlies Efficient Neural Coding. *Frontiers in neuroscience*, *12*, 46. <https://doi.org/10.3389/fnins.2018.00046>

Zhou, L. J., Peng, J., Xu, Y. N., Zeng, W. J., Zhang, J., Wei, X., Mai, C. L., Lin, Z. J., Liu, Y., Murugan, M., Eyo, U. B., Umpierre, A. D., Xin, W. J., Chen, T., Li, M., Wang, H., Richardson, J. R., Tan, Z., Liu, X. G., & Wu, L. J. (2019). Microglia Are Indispensable for Synaptic Plasticity in the Spinal Dorsal Horn and Chronic Pain. *Cell reports*, *27*(13), 3844–3859.e6. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2019.05.087>

Zumbusch, A. S., McEachern, E. L. F., Morgan, O. B., Nickner, E., & Mogil, J. S. (2024). Normative Preclinical Algesiometry Data on the von Frey and Radiant Heat Paw-Withdrawal Tests: An Analysis of Data from More Than 8,000 Mice Over 20 Years. *The journal of pain*, *S1526-5900(24)00342-0*. Advance online publication. <https://doi.org/10.1016/j.jpain.2024.01.333>



**Robin KUSTER**

**Modulation sexe-dépendante du traitement des informations nociceptives  
par l'inhibition GABAergique spinale**

**Résumé en français suivi des mots-clés en français**

La plasticité à court-terme des synapses GABAergiques dans la lamina II de la moelle épinière est essentielle pour le traitement des messages nociceptifs. Cette plasticité diffère selon le type de neurone postsynaptique, excitateur ou inhibiteur. Nos résultats indiquent une modulation liée au sexe de la transmission synaptique GABAergique, et donc une modification de la plasticité des synapses GABAergiques, notamment en réponse à une inflammation périphérique aiguë. Ces modulations soulignent l'importance de la balance entre l'inhibition et l'excitation dans le traitement des informations nociceptives. Ces observations suggèrent que les mécanismes de modulation de la transmission synaptique GABAergique pourraient expliquer les disparités de sensibilité mécanique et thermique au chaud selon le sexe. Nos travaux enrichissent la compréhension des mécanismes neurobiologiques de la nociception, en tenant compte des différences liées au sexe encore trop souvent négligées.

Mots clés :

Nociception – Douleur – Inflammation périphérique – Electrophysiologie – Corne dorsale de la moelle épinière – GABA – Inhibition – Plasticité synaptique à court-terme – Traitement de l'information – Différences sexe-dépendantes

**Résumé en anglais suivi des mots-clés en anglais**

The short-term plasticity of GABAergic synapses in the lamina II of the spinal cord is essential for processing nociceptive information. This plasticity varies depending on the type of postsynaptic neuron, whether excitatory or inhibitory. Our findings indicate a sex-specific modulation of GABAergic synaptic transmission, particularly in response to acute peripheral inflammation. These observations highlight the importance of maintaining a balance between inhibition and excitation in processing nociceptive information. They also suggest that mechanisms regulating GABAergic synaptic transmission may explain differences in mechanical and thermal sensitivity between males and females. Our work enhances understanding of the neurobiological mechanisms of nociception, considering often overlooked sex-related differences.

Keywords:

Nociception – Pain – Peripheral inflammation – Electrophysiology – Dorsal horn of the spinal cord – GABA – Inhibition – Short-term synaptic plasticity – Information processing – Sex-dependent differences