



PhD-FLSHASE-2013-24  
Faculté des Lettres, des Sciences Humaines,  
des Arts et des Sciences de l'Éducation

Faculté des Sciences de la Vie

## THÈSE

Soutenue le 22/11/2013 à Strasbourg

En vue de l'obtention du grade académique de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DU LUXEMBOURG  
EN BIOLOGIE

ET

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE STRASBOURG  
EN NEUROSCIENCES

Par

**Vivien Zell**

Né le 26 avril 1985 à Saverne (France)

IMPACT DES GLUCOCORTICOÏDES PLASMATIQUES  
SUR LA MATURATION ET LE FONCTIONNEMENT DE  
L'INHIBITION SPINALE GABAERGIQUE

### Jury de thèse

Dr Pascal Darbon, codirecteur de thèse	<i>Maître de conférences, Université de Strasbourg</i>
Dr Fernand Anton, codirecteur de thèse	<i>Professeur, Université du Luxembourg</i>
Dr Luis Villanueva, président	<i>Directeur de recherche, CNRS, Paris</i>
Dr Laurent Vinay, président suppléant	<i>Directeur de recherche, CNRS, Marseille</i>
Dr Philippe Isope	<i>Chargé de recherche, CNRS, Strasbourg</i>
Dr Anne-Florence Keller	<i>Chef de programme, Rhénovia Pharma, Mulhouse</i>



# REMERCIEMENTS

Merci au « Fonds National de la Recherche du Luxembourg » pour avoir financé ces quatre années de doctorat et de m'avoir permis de mener ces travaux à bien.

Je tiens à remercier sincèrement le Docteur Luis Villanueva, le Docteur Laurent Vinay, le Docteur Anne-Florence Keller et le Docteur Philippe Isope pour avoir bien voulu accepter d'être les membres de mon jury de thèse.

Je remercie très sincèrement Pascal Darbon pour m'avoir jugé capable de mener ce projet à bien, mais aussi d'avoir compté sur moi pour effectuer le transfert de technologie vers l'Université du Luxembourg.

Merci pour tes nombreux conseils, ton soutien et les nombreuses discussions que nous avons eues. Merci aussi pour ta patience et ta présence au cours de ces quatre années. Cette thèse m'a beaucoup appris, et sur bien des plans.

Je remercie très chaleureusement Fernand Anton de m'avoir accueilli au sein de son équipe et pour avoir fait preuve d'une confiance totale en mes capacités pour l'installation du laboratoire d'électrophysiologie *in vitro* à l'Université du Luxembourg.

Merci de t'être intéressé à mes travaux qui ont donné naissance à des discussions constructives. Merci pour ton aide et ton soutien.

Merci à Pierrick Poisbeau de m'avoir accueilli dans son équipe de recherche. Merci pour toutes ces discussions, les idées partagées et tes nombreuses remarques pertinentes.

Merci à Pierre Eric Juif pour son aide précieuse, sa disponibilité ainsi que sa patience notamment pour les études d'électrophysiologie *in vivo*. Merci pour tes points de vue toujours avisés et pour ta disponibilité.

Un grand merci à Ulrike Hanesch et à Jessica Tapp pour leur aide précieuse quant à la mise en place de l'étude immunohistochimique et la gestion de l'animalerie.

Merci encore à Ulrike Hanesch pour les discussions pratiques et ciblées.

Merci à Dominique Ciocca pour ses conseils avisés et pour m'avoir aidé à mettre en place l'expérience de dosage radio-immunologique. Un grand merci à Béatrice Bothorel et à Vincent-Joseph Poirel pour leur aide précieuse, leur disponibilité et leur formation tant pratique que théorique me permettant de mener à bien cette expérience.

Je tiens à remercier Glenn-Marie Le Coz pour son aide quant à l'adaptation à la vie luxembourgeoise. Merci aussi pour son soutien.

Merci à Fredrik pour ses discussions intéressantes autour du patch clamp, entre deux enregistrements.

Merci à Sylvain Hugel et Rémy Schlichter pour avoir été présents lorsque j'avais besoin de conseils.

Je remercie aussi mes amis et collègues Romain, Alex, Mickael, Antoine, Laetitia, Joseph, Paul, Laurent, croisés le temps de boire un verre de ci de là entre deux manip' et deux aller-retour entre Strasbourg et Luxembourg.

Je remercie aussi mes amis Mathieu, Drian, Hombeline, Cécile, Claire, Julien, Lucas, Mox, Nico, Julia, MC et Jerem. Merci pour votre présence, votre intérêt et votre soutien.

Je tiens à remercier ma famille pour leur intérêt envers mes travaux, leur soutien, leur disponibilité sans limite et bien plus encore. Merci à vous trois.

Un immense merci à Hélène. Ton soutien et ta patience ont été les aides les plus précieuses et les plus nécessaires pendant ces quatre années de thèse.

# TABLE DES MATIERES

<b>PUBLICATIONS ET COMMUNICATIONS</b>	<b>4</b>
<i>Communication orale</i>	4
<i>Publications des travaux de thèse</i>	4
<i>Publications de travaux en collaboration</i>	4
<b>LISTE DES ABREVIATIONS</b>	<b>6</b>
<b>TABLE DES ILLUSTRATIONS</b>	<b>9</b>
<b>RESUME</b>	<b>12</b>
<b>INTRODUCTION</b>	<b>15</b>
<i>I. L'axe HPA et les glucocorticoïdes</i>	15
I. 1. L'axe hypothalamo-hypophysaire surrénalien	16
I. 1. a. L'hypothalamus	16
I. 1. b. L'hypophyse et son lobe antérieur	17
I. 1. c. Les glandes surrénales.	18
- La médullosurrénale	19
- La corticosurrénale	19
I. 1. d. Maturation de l'axe HPA	21
I. 1. e. Modèles animaux	21
I. 2. Les glucocorticoïdes	22
I. 2. a. Voies de biosynthèse et réductions	22
I. 2. b. Effets génomiques des glucocorticoïdes	24
- Mécanismes d'action	24
- Effets anti-inflammatoires et métaboliques	25
- Effets sur la fonction neuronale	26
I.2.c. Effets non- génomiques des glucocorticoïdes sur la fonction neuronale	28
- Inhibition de la libération de CRH et d'ACTH	29
- Modulation des courants post-synaptiques	30
I. 2. d. Utilisation clinique des glucocorticoïdes	30
<i>II. Le circuit nociceptif</i>	32
II. 1. Organisation des cornes dorsales de la moelle épinière	32
II. 1. a. La substance blanche	33
II. 1. b. La substance grise	33
II. 2. Les différents types d'afférences primaires et leurs propriétés	35
II. 2. a. Propriétés physiques	36
II. 2. b. Propriétés neurochimiques	36
II. 2. c. Les terminaisons libres périphériques	38
- Stimulation mécanique nociceptive	38
- Stimulation thermique et chimique nociceptive	39
II. 2. d. Modulation des afférences primaires	39
II. 3. Les interneurons	40
II. 4. Les neurones de projection et voies ascendantes	41
II. 5. La neurotransmission dans la Lamina II	43
II. 5. a. La transmission synaptique glutamatergique	44
II. 5. b. La transmission synaptique glycinergique	46
II. 6. c. La transmission synaptique GABAergique	47
II. 5. d. La transmission synaptique mixte GABA-glycine	50

II. 5. e. La transmission extra-synaptique	51
II. 5. f. Équilibre spinal entre excitation et inhibition	54
II. 6. Les contrôles descendants	55
<i>III. Stéroïdes et douleur</i>	58
III. 1. Stéroïdes et système nerveux central	58
III. 2. Stéroïdes et douleur	59
III. 2. a. Douleur inflammatoire et stéroïdes	59
III. 2. b. Modulation de la neurotransmission spinale	60
Modulation de la transmission glutamatergique	61
Modulation de la transmission glycinergique	61
Modulation de la transmission GABAergique	62
III. 3. Glucocorticoïdes et douleur	64
<b>OBJECTIFS DE LA THESE</b>	<b>67</b>
<b>MATERIEL ET METHODES</b>	<b>69</b>
<i>I. Animaux</i>	69
<i>II. Enregistrements électrophysiologiques in vitro</i>	70
II. 1. Préparation des tranches	70
II. 1. a. Solutions	70
II. 1. b. Extrusion de la moelle épinière	72
II. 1. c. Section des tranches de moelle épinière	72
II. 2. Enregistrements électrophysiologiques	73
II. 2. a. Préparation des pipettes d'enregistrement	73
II. 2. b. Poste et chaîne de mesure	74
II. 2. c. Solution intracellulaire et force efficace	75
II. 2. d. Protocole d'approche et acquisition	77
II. 2. e. Analyse des enregistrements	79
II. 2. f. Applications pharmacologiques	80
- Incubations	80
- Perfusions	81
- Injections	81
<i>III. Enregistrements électrophysiologiques in vivo</i>	83
III. 1. Animaux et préparation	83
III. 2. Enregistrements électrophysiologiques	84
III. 2. a. Protocole d'acquisition	84
III. 2. b. Analyse des enregistrements	86
III. 2. c. Paramètres mesurés	87
III. 2. d. Applications pharmacologiques	88
<i>IV. Tests comportementaux</i>	89
<i>V. Dosage radio-immunologique</i>	90
V. 1. Prélèvements sanguins et préparation du plasma	90
V.2. Dosage radio-immunologique	90
<i>VI. Marquages immunohistochimiques</i>	92
VI. 1. Préparation des tranches	92
VI. 2. Immunofluorescence et montage des coupes	92
<b>LE TRANSFERT DE TECHNOLOGIE :MONTAGE D'UN LABORATOIRE DE PATCH CLAMP</b>	<b>94</b>
<i>I. Mise en place d'une reproduction de rat</i>	94
<i>II. Matériel et optimisation</i>	96
II. 1) L'étireuse de pipettes	96
II. 2) Plateforme et stabilité	97
II. 3) Chambre d'enregistrement et approche de la tranche	98

II. 4) Gestion du bruit et mise à la masse	98
Conclusion	100
<b>RESULTATS</b>	<b>101</b>
<i>I. Caractérisation des transmissions inhibitrices</i>	<i>101</i>
I. 1 Les transmissions synaptiques GABA et glycine	102
I. 2 La transmission synaptique mixte GABA/glycine	103
I. 3 La transmission extra-synaptique GABA	104
I. 4 Caractéristiques du courant extra-synaptique GABAergique	105
I. 5 Comparaison des transmissions synaptiques et extra-synaptiques GABAergiques	106
<i>II. Maturation des transmissions inhibitrices</i>	<i>108</i>
II. 1. Maturation de la transmission synaptique glycinergique	108
II. 2. Maturation de la transmission synaptique GABAergique	109
II.3. Maturation de la transmission synaptique mixte	110
II. 4. Maturation de la transmission extra-synaptique GABAergique	112
<i>III. Concentration plasmatique de CORT</i>	<i>114</i>
<i>IV. Marquage des <math>\delta</math>GABA<sub>A</sub>R dans la lamina II</i>	<i>115</i>
<i>V. Impact de la corticostérone plasmatique sur la sensibilité mécanique</i>	<i>116</i>
<i>VI. Impact de l'application de corticostérone sur la transmission inhibitrice spinale et le traitement de l'information nociceptive</i>	<i>118</i>
<i>VII. Impact de l'injection de corticostérone sur la transmission inhibitrice spinale et le traitement de l'information nociceptive</i>	<i>119</i>
VII. 1. Modulation de la transmission synaptique	119
VII. 2. Modulation de la réponse à une stimulation du champ récepteur sensoriel	120
VII. 2. a. Modulation de la décharge des fibres C dans la lamina II	121
VII. 2. b. Modulation de la décharge des fibres A et C dans la lamina V	122
<i>VIII. Impact de l'application de THDOC sur la transmission inhibitrice spinale et le traitement de l'information nociceptive</i>	<i>125</i>
VIII. 1. Modulation de la transmission synaptique	125
VIII. 2. Modulation de la transmission extra-synaptique	127
VIII. 3. Modulation de la réponse à une stimulation du champ récepteur sensoriel	128
VIII.3. a. Lamina II	128
VIII.3. b. Lamina V	130
<b>DISCUSSION</b>	<b>131</b>
<i>Identification in vitro de l'inhibition GABAergique spinale et considérations méthodologiques</i>	<i>131</i>
Inhibition synaptique dans la lamina II	132
Inhibition extra-synaptique dans la lamina II	134
Comparaison de l'inhibition synaptique et extra-synaptique	137
<i>Glucocorticoïdes et maturation de l'inhibition</i>	<i>140</i>
Influence des glucocorticoïdes sur la maturation de l'inhibition synaptique	140
Influence des glucocorticoïdes sur la maturation de l'inhibition extra-synaptique	146
<i>Influence des glucocorticoïdes plasmatiques sur la transmission inhibitrice spinale mature</i>	<i>151</i>
<i>Influence des glucocorticoïdes plasmatiques sur intégration in vivo de l'information nociceptive</i>	<i>156</i>
<b>CONCLUSION GENERALE</b>	<b>166</b>
<b>PERSPECTIVES</b>	<b>169</b>
<b>BIBLIOGRAPHIE</b>	<b>173</b>

## PUBLICATIONS ET COMMUNICATIONS

### COMMUNICATION ORALE

**Zell V**, Hanesch U, Poisbeau P, Anton F, Darbon P. Circulating Glucocorticoids Shape Phasic and Tonic GABA Inhibition in Lamina II of Rat Spinal Cord. FENS Abstr. (2012) : 6.22; 153

### PUBLICATIONS DES TRAVAUX DE THESE

**Zell V**, Hanesch U, Poisbeau P, Anton F, Darbon P (à soumettre à J Physiol London fin 2013). Circulating Glucocorticoids Impacts Developmental Postnatal Maturation of Spinal GABAergic Inhibition.

**Zell V**, Hanesch U, Poisbeau P, Anton F, Darbon P (en cours d'écriture, à soumettre à fin 2013). Circulating Glucocorticoids Tune Spinal Pain Processing via a Neurosteroid Tonus.

### PUBLICATIONS DE TRAVAUX EN COLLABORATION

Aouad M, **Zell V**, Juif PE, Lacaud A, Goumon Y, Darbon P, Lelièvre V, Poisbeau P (resoumis après corrections mineures à Pain en octobre 2013 : PAIN-D-13-11210). Etifoxine Analgesia in Experimental Monoarthritis: a Combined Action that Protects Spinal Inhibition and Limits Central Inflammatory Processes.



**Zell V**, Prévot M, Zeitler A, Juif PE, Poisbeau P, Darbon P (à soumettre à J Physiol fin 2013). Persistent Sodium Current Blockade Alters Coding Properties of Spinal Cord Interneurons.

Juif PE, Salio C, **Zell V**, Lacaud A, Merighi A, Anton F, Darbon P, Lelièvre V, Poisbeau P (à soumettre à Ann Neurol fin 2013). Maternal Deprivation Freezes the Spinal Nociceptive Maturation.

## LISTE DES ABREVIATIONS

11 $\beta$ -HSD :	11 $\beta$ hydroxysteroid deshydrogenase
17 $\beta$ E :	estradiol 17 $\beta$
3 $\beta$ -HSD :	3 $\beta$ -hydroxysteroid deshydrogenase
5-HT :	sérotonine
5HTX :	récepteur à la sérotonine de type X
Ac :	anticorps
ACTH :	adrenocorticotropin hormone
AMPA :	$\alpha$ -hydroxy-5-methylisoxazole-4-propionic acid
AP-1 :	activator protein 1
ASIC-X :	acid sensing ion channel de type X
BHE :	barrière hémato-encéphalique
BIC :	bicuculline
BLA :	noyau basal de l'amygdale
BSA :	bovine serum albumine
CA <sub>1</sub> :	corne d'Ammon 1 de l'hippocampe
CBG :	corticosteroid-binding globulin
CCK :	cholecystokinine
CDF :	contrôle descendant facilitateur
CDI :	contrôle descendant inhibiteur
CGRP :	calcitonin gene-related peptide
CORT :	corticostérone
CPSE/I :	courant post-synaptique excitateur/inhibiteur
CREB :	cAMP response element-binding protein
CRH :	corticotropin releasing hormone
CRHBP :	CRH binding protein
CRHR :	récepteur du CRH
DEX :	dexaméthasone
DHEA :	déhydroépiandrostérone
DHEA-S :	déhydroépiandrostérone sulfate
DNIC :	diffuse noxious inhibitory controls
DOC :	déoxycorticostérone
DRG :	ganglion rachidien dorsal
Dusp1 :	dual specificity phosphatase 1
EAAT :	excitatory amino-acid transporter
FIN :	finastéride
FIS :	Fischer
FITC :	fluorescein isothiocyanate
GABA :	$\gamma$ -aminobutyric acid
GABA <sub>A</sub> R :	récepteur du GABA de type A
GABA <sub>B</sub> R :	récepteur du GABA de type B
GABARAP :	GABA receptor-associated protein
GAT :	GABA transporter

---

## LISTE DES ABREVIATIONS

---

GBZ :	gabazine
GC :	glucocorticoïde
GDNF :	glial-derived neurotrophic factor
GluA :	récepteurs au glutamate de type A (anciennement AMPA)
GluAX :	sous-unité de type X du récepteur GluA
GluK :	récepteurs au glutamate de type K (anciennement kaïnate)
GluKX :	sous-unité de type X du récepteur GluK
GluN :	récepteurs au glutamate de type K (anciennement NMDA)
GluNX :	sous-unité de type X du récepteur GluN
GlyR :	récepteur de la glycine
GR :	récepteur aux glucocorticoïdes
GRE :	glucocorticoid responsive element
HPA (axe) :	Hypothalamic-pituitary-adrenal (axis)
hsp :	heat shock protein
i.p. :	intra-péritonéale
IL-X :	interleukine X
KCC :	cotransporteur potassium / chlorure
LCSA :	liquide cérébrospinal artificiel
LCSAs :	liquide cérébrospinal artificiel saccharose
LEW :	Lewis
MAPK :	mitogen-activated protein kinase
MC <sub>2</sub> :	melanocortin receptor de type 2
mGluR :	récepteur métabotrope du glutamate
mGR / mMR :	récepteur membranaire aux gluco- / minéralocorticoïdes
MR :	récepteur aux minéralocorticoïdes
NAd :	noradrénaline
NF- $\kappa$ B :	nuclear factor- $\kappa$ B
NGF :	nerve growth factor
nGRE :	negative glucocorticoid responsive element
NKCC :	cotransporteur sodium / potassium / chlorure
NMDA :	N-methyl-D-aspartic acid
NP :	neurone de projection
NPB :	noyau parabrachial
NPY :	neuropeptide Y
NS :	nociceptif spécifique
NSC :	noyau suprachiasmatique
NST :	noyau du lit de la strie terminale
PX :	X <sup>ème</sup> jour postnatal
PA :	potentiel d'action
PAF :	paraformaldéhyde
PAG :	substance grise périaqueducule
PBS :	phosphate buffer saline
PKA :	protéine kinase C
PKC :	protéine kinase C
POMC :	pro-opiomélanocortine
PREG :	prégnénolone
PREG-S :	prégnénolone sulfate
PVN :	noyau paraventriculaire
RCPG :	récepteur couplé aux protéines G
RIA :	dosage radio-immunologique
RVM :	bulbe rostro-ventro-médian

---

## LISTE DES ABREVIATIONS

---

SD :	Sprague-Dawley
SHRP :	stress hyporesponsive period
SIA :	stress induced analgesia
SNC :	système nerveux central
SP :	substance P
StAR :	steroidogenic acute regulatory protein
STR :	strychnine
TC :	tronc cérébral
THDOC :	tetrahydrodeoxycorticostérone
THIP :	4,5,6,7-tetrahydroisoxazolo(5,4-c)pyridin-3-ol
TNF :	tumor necrosis factor
TPMPA :	acide 1,2,5,6-tetrahydropyridine-4-yl methylphosphinique
TSPO :	translocator protein
trkA :	tyrosine kinase receptor A
TRPA-X :	transcient receptor potentiel ankyrin-like de type X
TRPMX :	transcient receptor potentiel melastatin de type X
TRPV-X :	transcient receptor potentiel vanilloïde de type X
VIAAT :	vesicular inhibitory amino acid transporter
WDR :	wide dynamic range
$\beta$ -LPH :	$\beta$ -lipotropine
$\delta$ GABA <sub>A</sub> R :	GABA <sub>A</sub> R contenant la sous-unité $\delta$

## TABLE DES ILLUSTRATIONS

### INTRODUCTION

<b>Figure 1 :</b>	L'axe hypothalamo-hypophysaire surrénalien	16
<b>Figure 2 :</b>	L'hypothalamus et le noyau paraventriculaire	16
<b>Figure 3 :</b>	L'hypophyse	17
<b>Tableau 1 :</b>	Les grandes fonctions endocrines du lobe antérieur l'hypophyse	17
<b>Figure 4 :</b>	La glande surrénale	19
<b>Figure 5 :</b>	Structure des stéroïdes	22
<b>Figure 6 :</b>	Synthèse des glucocorticoïdes	23
<b>Figure 7 :</b>	Réduction de glucocorticoïdes et production de THDOC	23
<b>Figure 8 :</b>	Mécanismes d'action génomiques des GC	25
<b>Figure 9 :</b>	Organisation des cornes dorsales de la moelle épinière	33
<b>Figure 10 :</b>	Les populations neuronales des couches superficielles	34
<b>Figure 11 :</b>	Propriétés physiques des différentes afférences primaires	36
<b>Figure 12 :</b>	Les voies ascendantes empruntant le tractus antérolatéral	42
<b>Figure 13 :</b>	Cinétique d'activation du récepteur canal au glutamate	44
<b>Figure 14 :</b>	Structure du récepteur glycinergique	46
<b>Figure 15 :</b>	Cinétiques des CPSI GABAergiques et glycinergiques	46
<b>Figure 16 :</b>	La maturation postnatale du gradient chlorure	49
<b>Figure 17 :</b>	La transmission extra-synaptique et le spillover	53

### MATERIEL ET METHODES

<b>Tableau 2 :</b>	Composition du LCSA et LCSAs en mM	71
<b>Tableau 3 :</b>	Composition du milieu intracellulaire en mM	76
<b>Figure 18 :</b>	L'approche par la technique du seal test en patch clamp	78
<b>Figure 19 :</b>	Calcul de la charge inhibitrice des courants synaptiques et extra-synaptiques	80
<b>Figure 20 :</b>	Enregistrements électrophysiologiques <i>in vivo</i> sur le rat	85
<b>Figure 21 :</b>	Différentiation <i>in vivo</i> des types de d'afférences primaires par analyse du temps de latence	86
<b>Figure 22 :</b>	Présentation de la pince calibrée	89
<b>Figure 23 :</b>	Principe général du dosage radio-immunologique (RIA)	90

### RESULTATS

<b>Figure 24 :</b>	Caractéristiques pharmacologique des CPSI GABAergiques et glycinergiques	102
<b>Tableau 4 :</b>	Caractéristiques des CPSI de la lamina II mature ( $\geq$ P21)	103
<b>Tableau 5 :</b>	Caractéristiques des CPSI mixtes dans la lamina II mature ( $\geq$ P21)	104
<b>Figure 25 :</b>	Caractéristiques cinétiques des événements mixtes GABA/glycine	104
<b>Figure 26 :</b>	Illustration du courant GABAergique extra-synaptique	104

<b>Figure 27 :</b>	Relation entre le courant GABAergique extra-synaptique et la fréquence des CPSI GABAergiques	105
<b>Figure 28 :</b>	Comparaison des charges inhibitrices synaptiques et extra-synaptiques	106
<b>Figure 29 :</b>	Évolution postnatale de la fréquence des CPSI glycinergiques	108
<b>Tableau 6 :</b>	Caractéristiques des CPSI glycinergiques de la lamina II immature ( $\leq$ P10)	108
<b>Figure 30 :</b>	Évolution postnatale des cinétiques des CPSI GABAergiques chez les SD, FIS et LEW	109
<b>Tableau 7 :</b>	Caractéristiques des CPSI GABAergiques de la lamina II immature ( $\leq$ P10)	109
<b>Figure 31 :</b>	Effet du finastéride sur le $\tau_D$ GABAergique à P8 et P21 chez le FIS	110
<b>Figure 32 :</b>	Évolution postnatale des paramètres des CPSI mixtes chez les SD, FIS et LEW	111
<b>Tableau 8 :</b>	Caractéristiques des CPSI mixtes dans la lamina II immature ( $\leq$ P10)	111
<b>Figure 33 :</b>	Évolution postnatale de la densité de courant extra-synaptique GABAergique basale chez les SD, FIS et LEW	112
<b>Figure 34 :</b>	Évolution postnatale de la densité de courant extra-synaptique GABAergique maximale révélée par application de THIP chez les SD, FIS et LEW	113
<b>Figure 35 :</b>	Évolution postnatale de la concentration plasmatique de CORT.	114
<b>Figure 36 :</b>	Marquage immunohistochimique des $\delta$ GABA <sub>A</sub> R dans les cornes dorsales de la moelle épinière.	115
<b>Figure 37 :</b>	Différence de sensibilité mécanique entre SD, FIS et LEW	116
<b>Figure 38 :</b>	Mesure de la sensibilité mécanique des SD après injection de CORT	116
<b>Tableau 9 :</b>	Valeurs de seuils de retrait de la patte suite à une stimulation nociceptive mécanique avec la pince calibrée chez les rats SD P21	117
<b>Figure 39 :</b>	Effet d'une incubation des tranches de moelle épinière dans la CORT sur la cinétique des CPSI GABAergiques des rats SD	118
<b>Figure 40 :</b>	Impact de l'injection de CORT sur la cinétique des CPSI GABAergiques chez les rats SD	119
<b>Figure 41 :</b>	Effet d'une injection de CORT sur la fréquence de décharge de PA dans la lamina II suite à une stimulation mécanique nociceptive du champ récepteur sensoriel	121
<b>Figure 42 :</b>	Effet d'une injection de CORT sur les seuils de déclenchement des fibres C dans la lamina II	121
<b>Figure 43 :</b>	Impact d'une injection de CORT sur la décharge des fibres C dans la lamina II suite à une stimulation électrique isolée du champ récepteur sensoriel	122
<b>Figure 44 :</b>	Effet d'une injection de CORT sur la décharge des fibres C dans la lamina II suite à une stimulation électrique du champ récepteur sensoriel à 1 Hz	122
<b>Figure 45 :</b>	Effet d'une injection de CORT sur la fréquence de décharge de PA dans la lamina V suite à une stimulation mécanique nociceptive du champ récepteur sensoriel	123
<b>Figure 46 :</b>	Effet d'une injection de CORT sur les seuils de déclenchement des fibres A et C dans la lamina V	123
<b>Figure 47 :</b>	Effet d'une injection de CORT sur la décharge des fibres A et C dans la lamina V suite à une stimulation électrique isolée du champ récepteur sensoriel	124

<b>Figure 48 :</b>	Effet d'une injection de CORT sur décharge des fibres A et C dans la lamina V suite à une stimulation électrique du champ récepteur sensoriel à 1 Hz	124
<b>Figure 49 :</b>	Effet du THDOC sur la cinétique des CPSI GABAergiques chez les SD, FIS et LEW	125
<b>Figure 50 :</b>	Effet du THDOC sur les cinétiques des CPSI GABAergiques dans la lamina II chez le FIS après une incubation des tranches dans le finastéride	126
<b>Figure 51 :</b>	Effet du THDOC sur le courant extra-synaptique GABAergique chez les SD, FIS et LEW	127
<b>Figure 52 :</b>	Effet du THDOC sur la fréquence de décharge de PA dans la lamina II suite à une stimulation mécanique nociceptive du champ récepteur sensoriel	128
<b>Figure 53 :</b>	Effet du THDOC sur les seuils de déclenchement des fibres C dans la lamina II	128
<b>Figure 54 :</b>	Effet du THDOC sur la décharge des fibres C dans la lamina II suite à une stimulation électrique isolée du champ récepteur sensoriel	129
<b>Figure 55 :</b>	Effet du THDOC sur la décharge des fibres C dans la lamina II suite à une stimulation électrique du champ récepteur sensoriel à 1 Hz	129
<b>Figure 56 :</b>	Effet du THDOC sur la fréquence de décharge de PA dans la lamina V suite à une stimulation mécanique nociceptive du champ récepteur sensoriel	130
<b>Figure 57 :</b>	Effet du THDOC sur les seuils de déclenchement des fibres A et C dans la lamina V	130
<b>Figure 58 :</b>	Effet du THDOC sur la décharge des fibres A et C dans la lamina V suite à une stimulation électrique isolée du champ récepteur sensoriel	131
<b>Figure 59 :</b>	Effet du THDOC sur la décharge des fibres A et C dans la lamina V suite à une stimulation électrique du champ récepteur sensoriel à 1 Hz	131

### CONCLUSION GENERALE

<b>Figure 60 :</b>	Influence de la neurostéroïdogenèse sur la transmission GABAergique	165
<b>Figure 61 :</b>	Influence des GC circulants sur la transmission GABAergique	166

## RESUME

Les glucocorticoïdes (GC) sont des hormones stéroïdes synthétisées par les glandes surrénales suite à l'activation de l'axe hypothalamo-hypophysaire-surrénalien (ou axe HPA pour hypothalamic-pituitary-adrenal). Leur sécrétion pulsatile est sous le contrôle de l'hormone hypophysaire ACTH (adrenocorticotropin hormone). Les bolus de GC sont libérés à une fréquence d'environ une heure et leur taille peut varier sous l'influence des différents facteurs que sont la libération de CRH (corticotropin releasing hormone) par le thalamus, la concentration de GC, le stress, l'alimentation et le cycle veille / sommeil. La production de ces GC est une des réponses de l'organisme pour rétablir l'homéostasie qui a été perturbée. Pour cela, les GC ont des actions anti-inflammatoires, métaboliques ou même des effets centraux sur le comportement et la douleur. C'est ce dernier qui a fait l'objet de mes travaux dans le cadre de cette thèse.

La douleur est définie comme une expérience sensorielle et émotionnelle désagréable associée à un dommage tissulaire existant ou potentiel décrite en terme d'un tel dommage (association internationale pour l'étude de la douleur). Ce sont les afférences sensorielles primaires qui véhiculent les informations depuis la périphérie dans le système nerveux central (SNC), directement dans les cornes dorsales de la moelle épinière. Ces informations peuvent être nociceptives (à la base de la douleur perçue une fois l'information acheminée au cerveau) mais aussi extéroceptives et proprioceptives relayant les informations de nos muscles, articulations et viscères ou encore les informations sensorielles tactiles de notre peau. Ces informations sont ensuite modulées par un réseau complexe de neurones au niveau des cornes dorsales de la moelle épinière avant d'être transmises aux centres supraspinaux en empruntant des voies ascendantes spécifiques. Ces



différents centres vont intégrer ces informations, et nous allons avoir conscience des sensations qui se déroulent à la périphérie. Dans le cadre de la douleur, l'enjeu sera de comprendre les mécanismes qui peuvent altérer cette transmission dans des cas pathologiques, et de pouvoir traiter ces derniers. Les cornes dorsales de la moelle épinière, qui sont le premier relais de ces informations, constituent donc une cible de choix pour lutter contre les douleurs pathologiques. Nous verrons qu'il y a un lien direct entre les GC et la transmission de l'information nociceptive dans ces cornes dorsales. Ces derniers sont aussi impliqués dans la maturation de transmission inhibitrice faisant intervenir le neurotransmetteur GABA ( $\gamma$ -aminobutyric acid), le neurotransmetteur inhibiteur le plus répandu dans le SNC. Dans les cornes dorsales de la moelle épinière, l'inhibition est portée par deux neurotransmetteurs : le GABA et la glycine. Cette inhibition est cruciale pour les mécanismes de transmission de l'information nociceptive car une diminution de cette dernière entraîne des symptômes caractéristiques des douleurs pathologiques neuropathiques tels que l'hyperalgésie mécanique et thermique (douleur accrue pour un stimulus douloureux) et l'allodynie mécanique (lorsqu'un stimulus non douloureux le devient). Tous deux peuvent agir au niveau de la synapse ou alors sur des sites extra-synaptiques.

L'objectif de ma thèse aura été dans un premier temps de caractériser l'impact des GC sur la maturation ontogénétique des différents types de transmissions inhibitrices dans les cornes dorsales. D'identifier les interactions entre GC et transmission inhibitrice dans le système spinal mature et de caractériser les interactions ainsi que la provenance des GC (centrale ou périphérique) qui peuvent altérer cette transmission et moduler la perception douloureuse.



# INTRODUCTION

## I. L'AXE HPA ET LES GLUCOCORTICOÏDES

L'axe hypothalamo-hypophysaire-surrénalien (HPA) est un axe neuroendocrinien qui participe au maintien de l'homéostasie. Cet axe contrôle la production endogène de glucocorticoïdes (GC) comme le cortisol chez l'homme ou la corticostérone (CORT) chez le rat. Ce système est activé par un stress et inhibé par les GC eux-mêmes qui exercent un rétrocontrôle négatif sur l'axe HPA. Il est également sous l'influence de plusieurs paramètres comme le cycle veille / sommeil et l'alimentation.

Cet axe est activé de manière pulsatile à une fréquence horaire et journalière sous l'influence de différents centres supraspinaux. Cependant, suite à un stress il sera stimulé pour palier aux effets néfastes de ce dernier sur l'organisme et ainsi rétablir l'homéostasie en provoquant une réponse orchestrée de changements physiologiques. Ces mécanismes comprennent (1) la mobilisation de l'énergie et l'augmentation du débit sanguin pour maintenir

les muscles et le cerveau en fonction, (2) l'augmentation de l'attention sur la menace, (3) la modulation des fonctions immunitaires et (4) l'inhibition des systèmes physiologiques « non nécessaires » comme le comportement reproductif, le transit gastro-intestinal ou encore l'appétit.

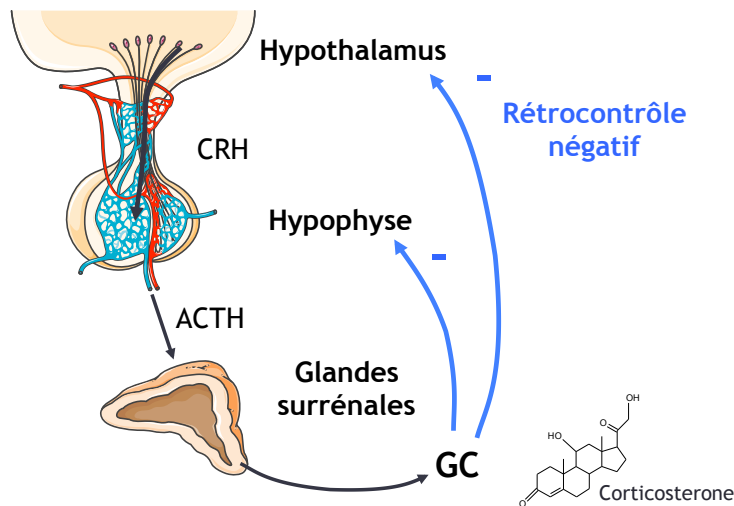
### **I. 1. L'axe hypothalamo-hypophysaire surrénalien**

L'axe HPA comprend trois acteurs principaux : les noyaux paraventriculaires de l'hypothalamus, le lobe antérieur de l'hypophyse et finalement le cortex des glandes surrénales qui vont synthétiser et libérer les GC dans la circulation sanguine générale (Figure 1).

#### **I. 1. a. L'hypothalamus**

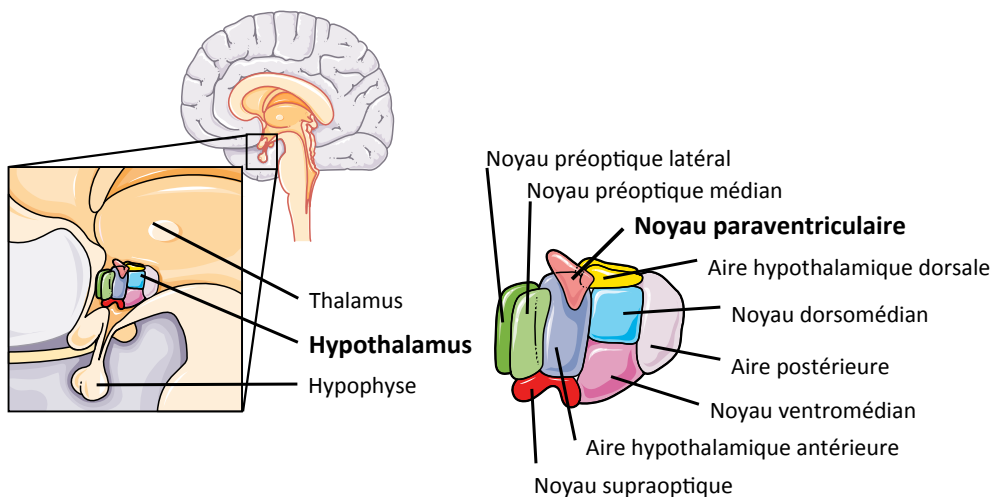
L'hypothalamus est un ensemble de noyaux faisant partie du diencephale et qui se trouve en dessous du thalamus (Figure 2). L'hypothalamus se situe donc juste derrière le chiasma optique et il est délimité postérieurement par le tractus mamillothalamique et le complexe mamillaire. Surplombant la glande hypophysaire, cet acteur majeur des voies neuroendocrines a pour rôle principal d'assurer les grandes fonctions de l'homéostasie générale de l'organisme. On y retrouvera par exemple le centre responsable du maintien de la température corporelle (aire hypothalamique antérieure), de l'équilibre hydrique (noyau supraoptique), de la pression artérielle (noyau peroptique médian) mais aussi l'horloge biologique (noyau suprachiasmatique).

L'hypothalamus contient deux types de neurones : les neurones parvocellulaires et magnocellulaires. Ce sont les neurones parvocellulaires du noyau paraventriculaire (PVN, Figure 2) qui sécrètent le facteur CRH



**Figure 1 :** L'axe hypothalamo-hypophysaire surrénalien

L'activation de l'axe HPA (hypothalamic-pituitary adrenal en anglais) conduit à la production des glucocorticoïdes comme la corticostérone chez le rat. Il comprend plusieurs acteurs comme l'hypothalamus qui va sécréter le facteur CRH dans le système porte hypophysaire. Ce dernier va induire la production d'ACTH qui sera libéré dans la circulation sanguine générale et va agir au niveau des glandes surrénales pour induire la synthèse et production des glucocorticoïdes. Ces derniers exercent un rétrocontrôle négatif sur l'hypothalamus et l'hypophyse, cet axe HPA est donc une boucle endocrine autorégulée.



**Figure 2 :** L'hypothalamus et le noyau paraventriculaire

L'hypothalamus est une structure complexe formée de plusieurs sous-noyaux anatomiquement indépendants qui régissent chacun une ou plusieurs fonctions du maintien de l'homéostasie de l'organisme. Cet ensemble de noyaux est situé juste sous le thalamus et au dessus de l'hypophyse à laquelle il est relié par la tige hypophysaire. L'hypothalamus est une structure symétrique coupée en son milieu par le troisième ventricule.

Le noyau paraventriculaire qui intervient dans l'activation de l'axe HPA par la synthèse de CRH dans la circulation hypophysaire se trouve au pôle supérieur de l'hypothalamus.

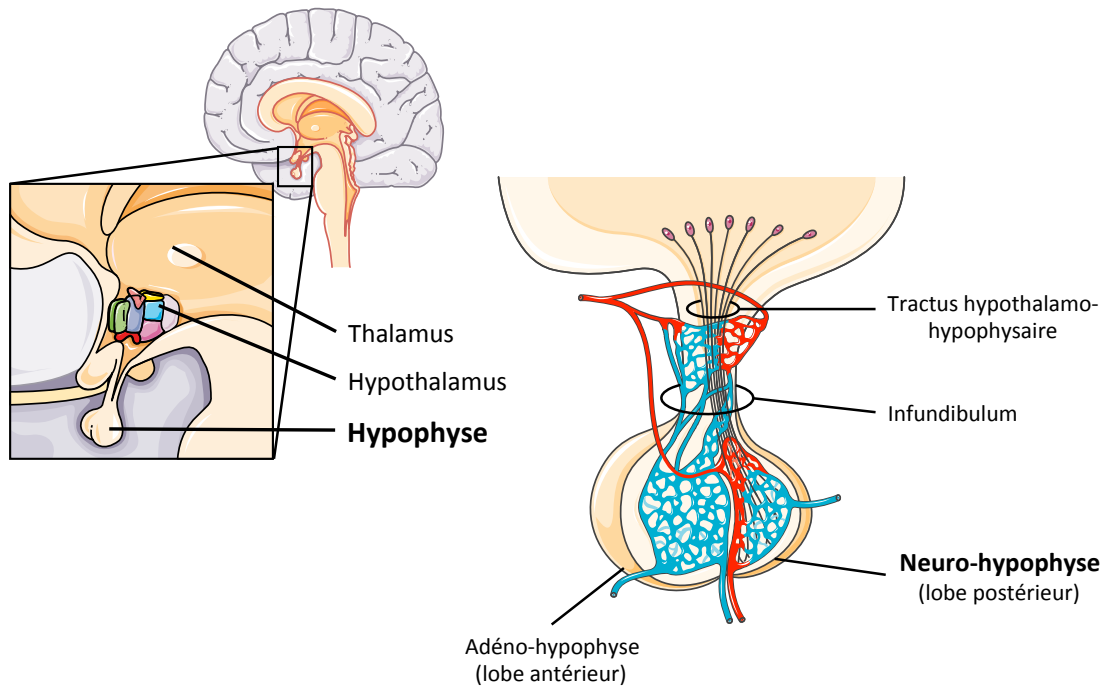
(corticotropin releasing hormone), peptide de 41 acides aminés qui sera l'effecteur primaire de l'activation de l'axe HPA. Le facteur CRH est sécrété par l'hypothalamus dans le système porte hypothalamo-hypophysaire et il va activer son récepteur spécifique CRHR dans le lobe antérieur de l'hypophyse (Smith et al., 1998; Bale & Vale, 2004).

Par ailleurs il a été montré que le PVN intègre les informations issues du noyau central de l'amygdale ou du noyau du lit de la strie terminale (NST) suite à un stress. Cette voie amygdalo-hypothalamique joue un rôle important dans l'activation de l'axe HPA et par conséquent dans la réponse corticosurrénalienne aux stimuli somatosensoriels du stress (Gray, 1993).

### **I. 1. b. L'hypophyse et son lobe antérieur**

L'hypophyse est une glande endocrine se situant dans la selle turcique de l'os sphénoïde à la base du crâne, directement sous l'hypothalamus. Elle est reliée à ce dernier de manière anatomique et fonctionnelle par l'éminence médiane (Figure 3).

L'hypophyse est composée de deux parties principales : le lobe antérieur (*Pars distalis* aussi appelé adénohypophyse) qui possède une origine ectodermique. Le lobe postérieur (*Pars nervosa* aussi appelé neurohypophyse) qui a une origine neuroectodermique, elle est un prolongement de l'infundibulum. Le lobe antérieur se distingue du lobe postérieur par sa composition tissulaire, il s'agit d'un organe glandulaire sécrétoire endocrine alors que le lobe postérieur possède une composition neurale. Une troisième partie existe aussi et est appelée le lobe intermédiaire (*Pars intermedia*), se situant entre les deux lobes précédents. L'hypophyse est bien connue comme la glande endocrine principale régulant plusieurs fonctions physiologiques comme le stress, la croissance et la reproduction par la production et sécrétion de diverses hormones peptides (Tableau 1). Cette glande est sous l'influence du



**Figure 3 : L'hypophyse**

*L'hypophyse est une glande neuroendocrine subdivisée en deux lobes et reliée à l'hypothalamus de manière anatomique et fonctionnelle par la tige hypophysaire (infundibulum). Les cellules corticotropes du lobe antérieur sécrètent l'ACTH dans la circulation sanguine générale suite à leur activation des par le facteur CRH hypothalamique.*

**Tableau 1 : Les grandes fonctions endocrines du lobe antérieur l'hypophyse**

	Facteur sécrété	Abréviation	Organes cibles	Fonctions
<b>Lobe hypophysaire antérieur</b>	Hormone de croissance	GH	Os et tissus	Croissance staturale et tissulaire
	Prolactine	PRL	Glande mammaire	Lactation
	Hormone folliculo-stimulante	FSH	Ovaire	Ovulation
			Testicule	Production de spermatozoïdes
	Hormone lutéinisante	LH	Ovaire	Ovulation et maturation folliculaire
			Testicule	Production de testostérone par les testicules
	Hormone thyroïdostimulante	TSH	Thyroïde	Développement, croissance, activation du métabolisme
<b>Hormone adrénocorticotrope</b>	<b>ACTH</b>	<b>Cortex surrénalien</b>	<b>Éveil, cycle veille / sommeil, stress</b>	
Hormone mélano-stimulante	MSH	Mélanocytes	Pigmentation de la peau	

*Le lobe antérieur de l'hypophyse assure les grandes fonctions endocrines de l'organisme comme le développement et la croissance, la reproduction, le maintien de l'homéostasie et le cycle veille / sommeil. Ces effets sont régulés par différentes hormones sécrétées par l'hypophyse ayant un ou plusieurs organes cibles au sein de l'organisme pour assurer leurs fonctions.*

rétrocontrôle négatif de facteurs sécrétés par les organes cibles que sont les glandes surrénales, le foie, la glande thyroïde et les gonades. Dans le cadre de l'axe HPA ce sont les cellules corticotropes de l'hypophyse qui vont sécréter l'ACTH. Le CRH est libéré dans la circulation hypophysaire couplé au CRHBP (CRH binding protein). L'action du CRH passe par trois types de récepteurs couplés aux protéines G (RCPG) : CRHR<sub>1</sub>, CRHR<sub>2</sub> et CRHR<sub>3</sub> induisant une augmentation d'AMPc (adénosine monophosphate cyclique) stimulant la synthèse du précurseur protéique de l'ACTH : la pro-opiomélanocortine (POMC).

La POMC est une protéine de 241 acides aminés qui est maturée dans les cellules corticotropes. Des enzymes spécifiques, les pro-hormone convertases produisent plusieurs molécules à partir de la POMC : la  $\beta$ -lipotropine ( $\beta$ -LPH), la  $\beta$ -endorphine et l'ACTH qui est un polypeptide de 39 acides aminés.

Les sécrétions d'ACTH par l'hypophyse (pilote par l'hypothalamus) en plus d'être pulsatiles en suivant un rythme ultradien de l'ordre de l'heure, suivent aussi un rythme circadien journalier montrant un taux plasmatique maximal avant la période d'activité. Chez le rat (qui est un animal nocturne) la production maximale de CORT se situera vers 19h00 tandis que chez l'homme, le taux plasmatique maximal de cortisol se situera le matin vers 08h00. Les rythmes de sécrétion circadiens sont sous contrôle de l'horloge interne du noyau suprachiasmatique (NSC).

### **I. 1. c. Les glandes surrénales.**

Les glandes surrénales sont au nombre de deux, situées chacune sur le pôle supérieur de chaque rein. Elles ont une forme de pyramide aplatie et leur anatomie comprend deux grandes parties majeures : la zone médullaire (médullosurrénale, représente environ 20% de l'organe total) et la zone corticale (corticosurrénale, 80% de la glande).



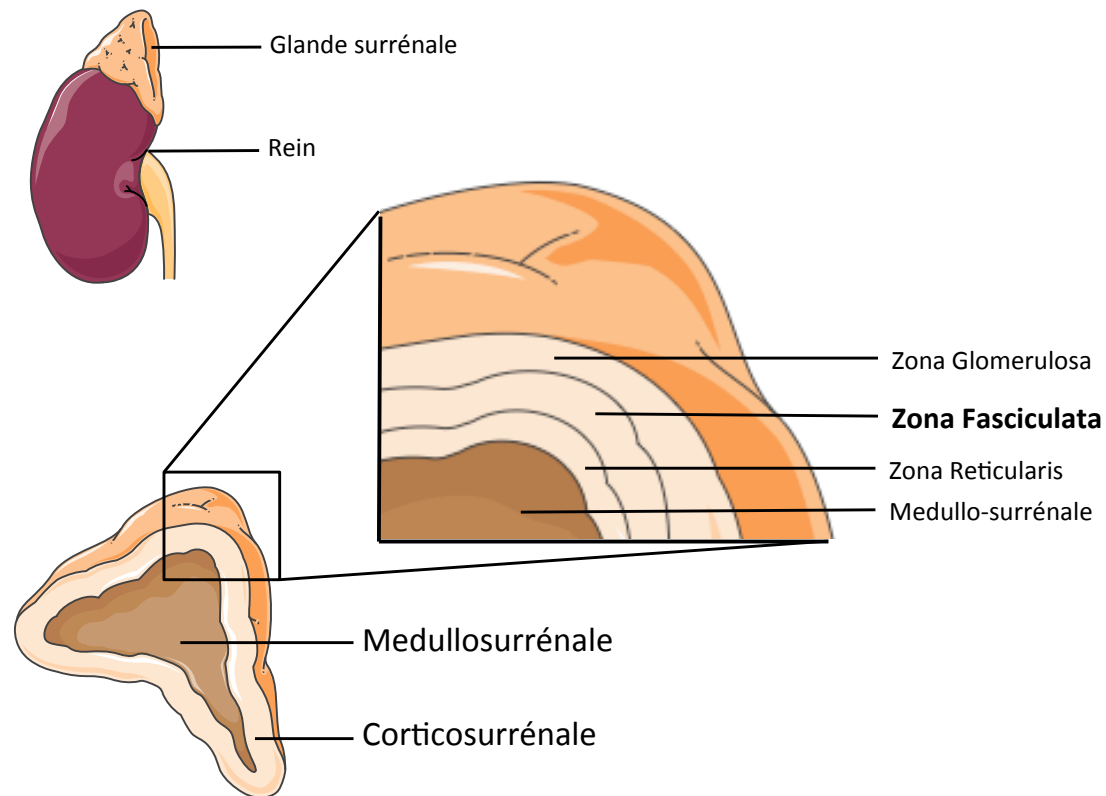
- *La médullosurrénale*

Les cellules chromaffines de la médullosurrénale synthétisent et sécrètent deux catécholamines : l'épinéphrine (adrénaline) et la norépinéphrine (noradrénaline, NAd). Leur sécrétion est dépendante de l'activité des enzymes de synthèse que sont la tyrosine hydroxylase, la dopamine  $\beta$ -hydroxylase et la phenylethanolamine N-méthyltransférase. L'activité de ces enzymes est sous le contrôle de l'ACTH et des GC et est augmentée suite à événement stressant (Axelrod & Reisine, 1984). De manière générale les effets produits par ces deux catécholamines sont similaires à une activation directe des organes cibles par les nerfs sympathiques : vasoconstriction, augmentation de la fréquence et de la force de contraction du cœur, dilatation des bronchioles, stimulation de la lipolyse, augmentation du métabolisme par glycolyse, inhibition de certains processus « non-essentiels » tels que la sécrétion gastro-intestinale et l'activité locomotrice.

- *La corticosurrénale*

La partie corticale de la glande surrénale est la plus importante en terme de volume et comprend trois grandes couches définies par leurs cytologies spécifiques mais aussi leur fonction (Figure 4) :

- La *zona glomerulosa* produit de l'aldostérone et les minéralocorticoïdes.
- La *zona fasciculata* (zone fasciculée) comprend des cellules synthétisant les GC.
- La *zona reticularis* produit les précurseurs aux androgènes (testostérone et estrogènes) : la déhydroépiandrostérone (DHEA) et la DHEA sulfate (DHEA-S).



**Figure 4 :** La glande surrénale

*La glande surrénale est caractérisée par une forme pyramidale et se situe juste au dessus des reins. Elle est composée d'une partie médullaire et corticale renfermée par la capsule. La partie médullaire synthétise et sécrète les catécholamines (adrénaline et noradrénaline) dans la circulation générale. La partie corticale est formé de trois couches cellulaire chacune synthétisant des hormones. La zona glomerulosa synthétise les minéralocorticoïdes comme l'aldostérone. Les cellules de la zona fasciculata synthétisent les glucocorticoïdes (cortisol chez l'homme ou corticostérone chez le rat) après leur activation par l'ACTH hypophysaire et la zona reticularis synthétise les gonadocorticoïdes comme la déhydroépiandrostérone.*

La *zona fasciculata* est donc la cible privilégiée de l'axe HPA, sous le contrôle direct de l'ACTH hypophysaire. Cette dernière va activer son récepteur MC<sub>2</sub> (melanocortin receptor, RCPG à sept domaines transmembranaires) et induire *via* l'augmentation d'AMPc l'activation de la protéine kinase A (PKA, Clark & Weber, 1998). La PKA va à son tour activer le facteur StAR (steroidogenic acute regulatory protein) *via* des acteurs intermédiaires ou bien en activant le facteur de transcription CREB (cAMP response element-binding protein). Ces différents effecteurs vont provoquer la transcription des plusieurs enzymes nécessaires à la synthèse de GC (Clark & Weber, 1998). L'élévation des taux plasmatiques de GC atteint un maximum 30 minutes à 1 heure après activation de l'axe (Paris *et al.*, 1987). Chez l'homme, le cortisol sera produit car l'enzyme qui hydroxyle la pregnénolone (la 17 $\alpha$ -hydroxylase) est présente dans la structure. Ce n'est pas le cas chez le rongeur qui, à la place synthétisera la CORT.

Cette CORT aura un effet de rétrocontrôle sur sa propre production directement sur le PVN et le lobe antérieur de l'hypophyse. Elle inhibe la production de CRH par les neurones parvocellulaire de l'hypothalamus et la production d'ACTH par les cellules corticotropes de l'hypophyse.

Par ailleurs l'ACTH stimule aussi la recapture de lipoprotéines augmentant ainsi la disponibilité du cholestérol nécessaire à la production de stéroïdes (Dexter *et al.*, 1967). Elle stimule aussi l'import du cholestérol dans la mitochondrie ainsi que l'activité de l'enzyme cytochromique de clivage du cholestérol, la p450-scc (p450-side chain clivage) au niveau de la matrice mitochondriale (Clark & Weber, 1998) : deux étapes limitantes de la production de stéroïdes comme les GC.

### I. 1. d. Maturation de l'axe HPA

Au cours de la maturation du système neuroendocrinien il existe une période au cours de laquelle la réponse adrénocorticale à un stress est minimale voire inexistante. Cette période est appelée SHRP pour « stress hyporesponsive period » (Levine, 2001). Juste après la naissance les niveaux de CORT diminuent mais sont toujours élevés durant les deux premiers jours, puis ce niveau atteint une concentration très faible aux alentours du quatrième jour postnatal et perdure durant les deux premières semaines, tout comme les niveaux de CRH et d'ACTH (Walker et al., 1986). Pendant la SHRP la réponse de l'axe HPA à un stress est elle aussi très faible (hypo-réponse) ou inexistante, n'induisant aucune élévation de CRH ou d'ACTH. Durant cette période il y a aussi une baisse de sensibilité des glandes surrénales, car l'application exogène d'ACTH n'induit pas de production de CORT chez le rat (Levine *et al.*, 1967). Cependant, une séparation maternelle peut induire l'augmentation des taux de CORT plasmatique pendant la SHRP (Stanton *et al.*, 1987; Levine *et al.*, 1991). L'axe est donc fonctionnel durant cette période, mais inhibé par des facteurs maternels encore peu connus apportés par l'allaitement et / ou la présence de la mère (Levine, 2006).

### I. 1. e. Modèles animaux

Il existe deux souches de rats génétiquement différentes *per se* présentant des différences de réactivité de l'axe HPA (Ramos *et al.*, 2002). Les rats de la souche Fischer (FIS) présentent un taux plasmatique basal de CORT élevé ainsi qu'une réponse exagérée suite à un stress se traduisant par une élévation encore accrue du taux de CORT plasmatique, tandis que les rats de la souche Lewis (LEW) montrent une hypo-réponse et ont moins de CORT plasmatique (Sternberg *et al.*, 1992; Dhabhar *et al.*, 1997).

Cela implique des conséquences physiologiques fonctionnelles : les FIS sont plus prompts à développer une analgésie par rapport à la souche Sprague-Dawley (SD ; Rosecrans et al., 1986). Il a été montré aussi que les FIS ont une plus forte résistance à l'inflammation due à une réactivité plus importante de l'axe HPA tandis que la souche LEW montre une action moindre des GC lors d'un phénomène inflammatoire (Sternberg *et al.*, 1989).

En plus des différents effets sur l'inflammation et la douleur associée aux mécanismes inflammatoires, les FIS présentent un métabolisme différent de celui des LEW. L'action des GC active aussi plusieurs mécanismes métaboliques qui de manière générale inhibent la mise en réserve de l'énergie (glucides, protéines, lipides) la rendant plus disponible. Cet effet est directement observé sur le phénotype des différentes souches de rat car les FIS ont un poids systématiquement inférieur aux LEW et aux SD (notre souche de référence).

Les souches LEW et FIS constituent donc un bon modèle pour l'étude des conséquences d'une variation des taux plasmatiques de GC sur un système comme l'inhibition spinale.

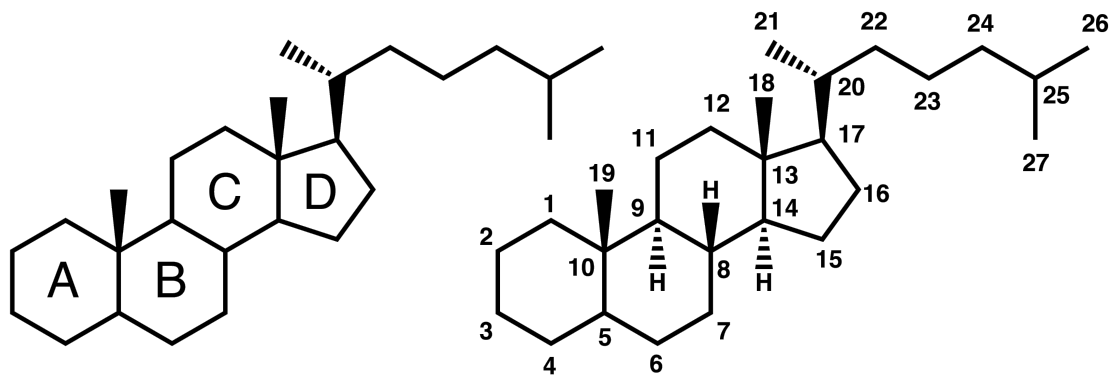
## I. 2. Les glucocorticoïdes

### I. 2. a. Voies de biosynthèse et réductions

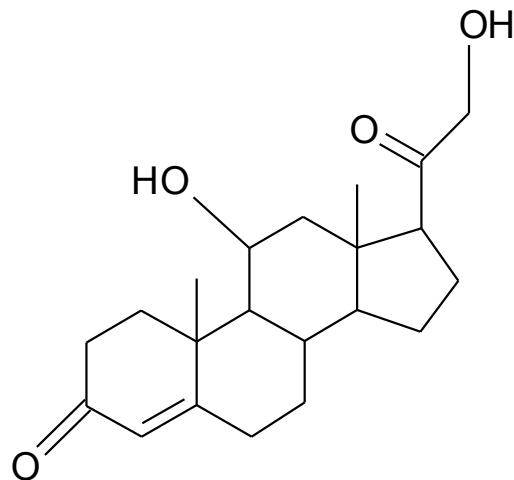
Les GC font partie de la famille des stéroïdes. Ces stéroïdes sont tous produits à partir du cholestérol et sont définis structuralement comme tout composé ayant trois cycles composés de six carbones et un cycle de cinq carbones (Figure 5). Cet ensemble structural est appelé le noyau stéroïde. Le cortisol tout comme la CORT sont des composés stéroïdes possédant 21 atomes de carbone (caractéristique de la famille des GC).

Le cholestérol doit tout d'abord être importé dans la matrice mitochondriale par un transporteur spécifique de 18 kDa : le TSPO

A.



B.



**Figure 5 :** Structure des stéroïdes

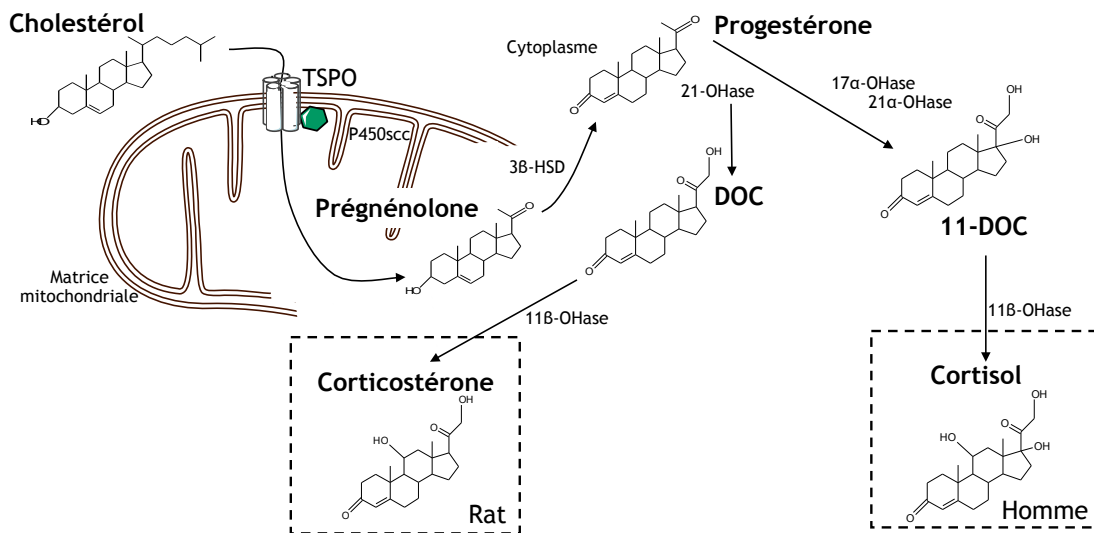
A. Tous les stéroïdes possèdent la même structure de base composée de trois noyaux à 6 carbones (notés ici A, B et C) et un noyau à 5 carbones (D) suivis d'une chaîne aliphatique qui peut être plus ou moins longue en fonction de la famille de stéroïde (ici il s'agit d'une représentation du cholestérol, précurseur commun à tous les stéroïdes).

B. Les glucocorticoïdes possèdent 21 atomes de carbone, c'est à dire une succession de deux carbones (en plus des cycles A, B, C, D) en position 17 du cycle D.

(translocator protein). Ce dernier fait parti d'un complexe multi-protéique (Papadopoulos et al., 2006; Rupprecht et al., 2010 ; Figure 6). Il est ensuite transformé en prégnénolone par la p450-scc. C'est cette prégnénolone qui servira de précurseur cytoplasmique à l'ensemble des GC. Elle est convertie en progestérone premièrement par la 3 $\beta$ -HSD (3 $\beta$ -hydroxysteroid deshydrogenase) puis cette dernière sera métabolisée en déoxycorticostérone (DOC) par la 21-hydroxylase. Pour synthétiser la CORT une étape supplémentaire est nécessaire faisant intervenir la 11 $\beta$ -HSD (11 $\beta$ -hydroxysteroid deshydrogenase Compagnone & Mellon, 2000).

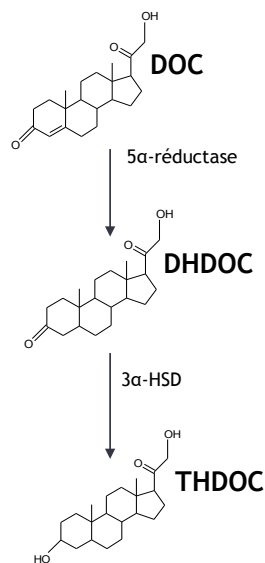
La DOC peut aussi subir deux étapes successives de réduction sur les positions 5 $\alpha$  et 3 $\alpha$ , respectivement sous l'action de la 5 $\alpha$ -réductase et de la 3 $\alpha$ -HSD (Figure 7). L'isoforme stéroïdien réduit ainsi produit, la tetrahydroxydeoxycorticostérone (THDOC) est un puissant modulateur de la transmission GABAergique.

Bien que la synthèse des GC a lieu dans la glande surrénale, ces GC peuvent aussi être synthétisés dans le SNC. En effet, l'ensemble des enzymes nécessaires à leur production sont présentes dans plusieurs structures du SNC comme la moelle épinière. On y retrouvera la p450scc (Compagnone *et al.*, 1995), la 3 $\beta$ -HSD qui est surtout exprimée dans les couches superficielles des cornes dorsales (Coirini *et al.*, 2002), la 11 $\beta$ -HSD et la 21-hydroxylase (Yu *et al.*, 2002). Les deux enzymes nécessaires à la réduction des GC : la 5 $\alpha$ -réductase et la 3 $\alpha$ -HSD sont aussi présentes dans ces cornes dorsales (Patte-Mensah et al., 2006). Ces stéroïdes peuvent donc être synthétisés directement dans la moelle épinière à partir du cholestérol, on parlera alors de neurostéroïdes.



**Figure 6 :** Synthèse des glucocorticoïdes

Les glucocorticoïdes dérivent comme tous les stéroïdes du cholestérol. Il est d'abord importé dans la matrice mitochondriale par le transporteur TSPO puis clivé en prégnénolone qui servira de précurseur cytoplasmique aux glucocorticoïdes. Plusieurs enzymes cytosoliques interviennent ainsi pour produire in fine le cortisol chez l'homme alors que chez le rat ce sera la corticostérone.



**Figure 7 :** Réduction de glucocorticoïdes et production de THDOC

Les glucocorticoïdes synthétisés peuvent subir deux étapes de réduction enzymatique faisant intervenir la 5α-réductase et la 3α hydroxystéroïde-déshydrogénase. Ces composés 3α5α-réduits comme le tétrahydroxydeoxycorticostérone (THDOC) possèdent plusieurs actions de modulation allostériques de récepteurs centraux comme par exemple la potentialisation du récepteur GABA de type A.



### I. 2. b. Effets génomiques des glucocorticoïdes

#### - Mécanismes d'action

La CORT circule dans le sang sous deux formes : une forme libre et une forme liée. À plus de 90% la CORT circule liée à des molécules chaperonnes : les CBG (corticosteroid-binding globulin, ou transcortine) lui conférant une demi-vie d'environ 50 minutes (60 à 90 minutes pour le cortisol), et une plus petite proportion peut aussi lier l'albumine. Les 10% restant circulent librement et sont biologiquement actifs (Hammond, 1990).

Les GC peuvent se lier à deux types de récepteurs cytosoliques : les récepteurs aux minéralocorticoïdes (MR) avec une affinité forte ( $K_d \approx 0,5 \text{ nM}$ ) et les récepteurs aux glucocorticoïdes (GR) avec une affinité moins importante ( $K_d \approx 5 \text{ nM}$  ; De Kloet et al., 1998). En conditions basales, les GC occupent donc préférentiellement les MR. Suite à une élévation de GC ce sont les GR qui vont être activés.

Ces récepteurs peuvent moduler l'expression de différents gènes en activant ou inhibant leur transcription. Ils font partie de la superfamille des récepteurs nucléaires et nécessitent une dimérisation une fois couplé à leur ligand pour pénétrer depuis le cytoplasme dans le noyau. Les GR sont composés de différents domaines fonctionnels. La partie C-terminale est commune à tous les récepteurs de cette famille ( $\approx 250$  acides aminés), et sert à lier le GC. Un domaine est consacré à la liaison des hsp (heat shock protein) qui sont des protéines assurant l'intégrité du GR. Le domaine central est impliqué dans la liaison directe avec l'ADN et possède une fonction activatrice de transcription. Il contient deux boucles protéiques distinctes structurées en doigt de zinc (faisant chacune intervenir quatre résidus cystéine liés à une molécule de zinc). Ce sont ces deux molécules de zinc qui permettent au récepteur de se lier à la double hélice d'ADN. Le zinc joue aussi un rôle dans la dimérisation de deux GR (Van der Velden, 1998).

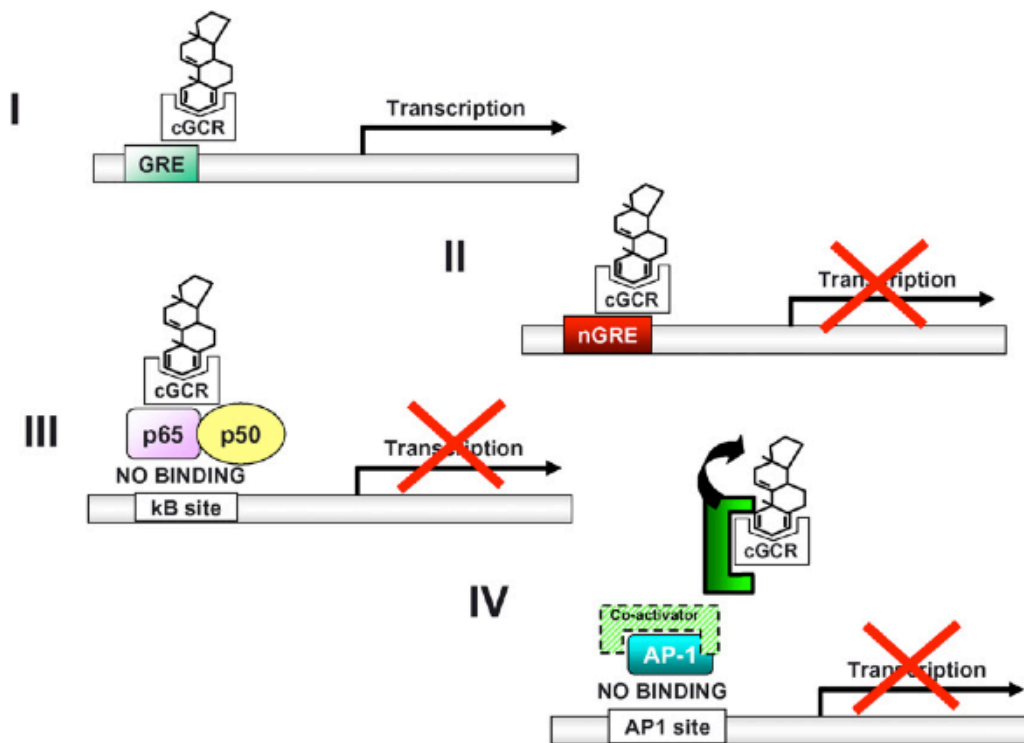
En l'absence de GC, le GR est présent dans le cytoplasme de la cellule sous forme d'hétéro-oligomère couplé à plusieurs hsp: deux hsp90, une hsp70 et une hsp56, ainsi qu'à des immunophilines et d'autres facteurs assurant sa maturation et prévenant sa dégradation (Cheung & Smith, 2000). La fixation d'un GC sur son récepteur cytosolique disloque les deux hsp90 et la hsp56, tandis que la hsp70 ne se dissocie qu'une fois le complexe arrivé dans le noyau.. La liaison des homodimères GC-GR sur les régions GRE (glucocorticoid responsive element) situées au niveau du promoteur des gènes cibles peut activer l'expression d'un gène (trans-activation *via* les régions positives GRE) ou la réprimer *via* les régions « negative GRE » : les nGRE (Buttgereit et al., 2004; Stahn et al., 2007 ; Figure 8). L'inhibition de la transcription de certains gènes peut aussi s'effectuer *via* une compétition avec d'autres facteurs de transcription ou encore par un mécanisme de trans-répression où le complexe GC-GR interagit avec un autre facteur de transcription afin d'inhiber son action (Buttgereit et al., 2004).

Les MR et les GR sont exprimés dans la moelle épinière (González *et al.*, 1990). Dans les cornes dorsales les GR sont plus exprimés dans les laminae I et II que dans les couches plus profondes V-VI (Marlier *et al.*, 1995).

#### *- Effets anti-inflammatoires et métaboliques*

Les actions anti-inflammatoires des GC peuvent passer soit par l'activation de gènes conduisant à l'expression de protéines anti-inflammatoires, soit par la répression de gènes pro-inflammatoires.

Ainsi l'activation de Dusp1 (dual specificity phosphatase 1) par le complexe GC-GR inactive les MAPKs (mitogen-activated protein kinase) nécessaires à l'activation de facteurs de transcription pro-inflammatoires tels que AP-1 (activator protein 1) ou NF- $\kappa$ B (nuclear factor-  $\kappa$ B ; Vandevyver et al., 2013). Le complexe GC-GR peut aussi activer l'expression de l'Annexin-1 (ou lipocortine) qui inhibe l'activité de la phospholipase A<sub>2</sub> produisant de l'acide



**Figure 8 :** Mécanismes d'action génomiques des GC

*Les mécanismes d'action génomiques des glucocorticoïdes (GC) sont multiples. Suite à l'activation de leur récepteur cytosolique (les GRs), les GC peuvent induire ou réprimer la transcription et l'expression de gènes en se fixant respectivement sur les domaines GRE et nGRE (glucocorticoid response elements et non GRE). L'inhibition de la transcription de certains gènes peut aussi s'effectuer par des mécanismes de compétition avec d'autres facteurs de transcription (d'après Buttgereit et al., 2004).*

arachidonique, précurseur de différents médiateurs pro-inflammatoires (prostaglandines et leukotriènes).

Les actions anti-inflammatoires de GC peuvent aussi passer par la répression de gènes des molécules pro-inflammatoires comme les interleukines IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-3 et IL-6, ou le facteur NF- $\kappa$ B (Sorrells & Sapolsky, 2007).

En plus de ces effets anti-inflammatoires, les GC sont aussi impliqués dans le maintien de l'homéostasie métabolique en régulant la disponibilité du glucose et des acides aminés et en mobilisant les réserves lipidiques. De manière générale, les GC sont un effecteur du métabolisme oxydatif et activent la lipolyse, la protéolyse et la production de glucose hépatique. Toutes les actions métaboliques des GC sont synergiques et visent à la mobilisation des réserves d'énergie et en les mettant à disposition des muscles et du cerveau en vue de permettre à l'organisme de préparer la réponse au stress.

#### *- Effets sur la fonction neuronale*

En plus de leurs effets anti-inflammatoires et métaboliques bien décrits, les GC ont plusieurs effets au niveau du SNC. Il est généralement admis que de par leur nature lipophile, les GC passent librement la barrière hémato-encéphalique (BHE). Cependant, une étude a pu démontrer qu'ils pourraient aussi utiliser un transporteur particulier à ce niveau (Mason *et al.*, 2010).

Par ailleurs, les GC comme les autres hormones stéroïdes peuvent influencer l'activité électrique des neurones, et donc leur excitabilité en régulant l'expression de canaux ioniques et des récepteurs aux neurotransmetteurs ou en modulant leur activité de manière indirecte ou encore *via* des seconds messagers.

*Régulation de l'expression de canaux voltage dépendants*

Les GC peuvent moduler l'excitabilité neuronale en agissant sur l'expression de canaux voltage-dépendants produisant des changements de l'excitabilité membranaire. Cet effet est majoritairement dû à des effets transcriptionnels affectant le nombre de canaux voltage dépendants exprimés à la membrane du neurone. Cela a par exemple été montré pour les canaux potassiques des cellules pituitaires dont l'expression augmente suite à l'application d'un GC de synthèse : la dexaméthasone (DEX ; Levitan et al., 1991; Takimoto et al., 1993). Il a aussi été montré que la cinétique de canaux voltage dépendants sodiques et calciques peut être altérée suite à un traitement de corticostéroïde (Werkman *et al.*, 1997). Cela peut être dû à l'expression d'isoformes alternatifs de ces canaux ayant une composition différente en sous-unités ou alors à l'expression d'enzymes comme les kinases qui peuvent alors modifier l'activité des canaux membranaires.

*Régulation de la plasticité synaptique*

Dans l'hippocampe il a été montré qu'un faible taux de GC facilite la plasticité synaptique en potentialisant l'amplitude des décharges provenant de la CA1 alors qu'un fort taux de GC l'inhibe (Diamond *et al.*, 1992).

*Modulation des courants post-synaptiques*

L'amygdale comprend des MR et des GR (Wang *et al.*, 2013). Une application de CORT dans l'amygdale augmente les courants post-synaptiques excitateurs (CPSE) pendant plus d'une heure, et cet effet fait intervenir des mécanismes de synthèse protéique (Karst *et al.*, 2010). Mais aussi, les GC peuvent augmenter l'activité neuronale dans le noyau basal de l'amygdale (BLA) en potentialisant l'activité des canaux calciques de type L dans un délai de l'ordre de l'heure et diminuent l'amplitude des courants post-synaptiques inhibiteurs (CPSI) GABAergiques (Duvarci & Paré, 2007). Par ailleurs, l'exposition à un stress aigu ou une application de CORT aura pour effet

d'augmenter la transmission glutamatergique dans le cortex préfrontal par un mécanisme nécessitant une modulation génique (Yuen *et al.*, 2011).

#### *Régulation de l'expression de neuromodulateurs*

Dans les cornes dorsales l'expression des GR dépend de la lamination. En effet, les GR sont très présents dans la couche superficielle, et beaucoup moins dans les laminae plus profondes V-VI des cornes dorsales (Marlier *et al.*, 1995). Les MR sont exprimés aussi dans la moelle épinière mais la quantification des ARNm montre qu'il y a 10 fois plus de GR au niveau lombaire (Marlier *et al.*, 1997).

Les GR collocalisent avec des marqueurs spécifiques des afférences sensorielles primaires nociceptives (DeLeón *et al.*, 1994). Pinto-Ribeiro et collaborateurs (2009) ont montré que l'activation des GR réduisait l'expression de ces marqueurs (CGRP pour calcitonin gene-related peptide et SP pour substance P) et avait un impact comportemental anti-nociceptif.

#### **I.2.c. Effets non- génomiques des glucocorticoïdes sur la fonction neuronale**

Pour Makara et Haller (2001) un effet est dit non génomique lorsqu'il (1) apparait rapidement afin de ne pas engendrer la machinerie transcriptionnelle, (2) est indépendant de la machinerie traductionnelle ou transcriptionnelle et (3) doit être indépendant de l'internalisation nucléaire des GR ou MR.

Les effets non génomiques des GC peuvent passer par des récepteurs de types GR et MR exprimés à la membrane plasmique ou par des RCPG membranaires encore peu caractérisés (Malcher-Lopes *et al.*, 2006). Les mécanismes faisant intervenir ces récepteurs membranaires sont encore peu connus. L'application extracellulaire de CORT permet de les activer dans un

délai de l'ordre de la minute, ce qui permet de différencier ces récepteurs des MR et GR cytosoliques (de Kloet et al., 2008).

Ces récepteurs membranaires ont récemment été appelés mGR et mMR (Prager & Johnson, 2009) et leur localisation est principalement post-synaptique (Johnson *et al.*, 2005) mais certains mMR se trouvent aussi sur le neurone pré-synaptique (Karst *et al.*, 2005). Des études de microscopie électronique ont pu mettre en évidence l'existence de MR et de GR à la membrane plasmique, au niveau des dendrites sur les versants pré- et post-synaptiques suggérant qu'ils peuvent jouer un rôle dans la neurotransmission (Johnson *et al.*, 2005; Prager *et al.*, 2010).

#### - Inhibition de la libération de CRH et d'ACTH

*In vitro*, la libération d'ACTH par les cellules corticotropes de l'hypophyse est inhibée en 20 minutes après une application de CORT. Cette inhibition persiste en présence de cycloheximide, (un inhibiteur de la synthèse protéique), montrant ainsi une action non génomique (Widmaier & Dallman, 1984). Ce même type d'expérience a été menée *in vivo* sur le rat anesthésié avec les mêmes résultats (Hinz & Hirschelmann, 2000).

Jones et collaborateurs (1976) ont démontré que les GC inhibent la sécrétion de CRH par les cellules de l'hypothalamus *in vitro*. De plus, la CORT diminue la fréquence des CPSE des neurones du PVN, démontrant un effet pré-synaptique sur la libération vésiculaire, et donc la diminution de la transmission synaptique (Di *et al.*, 2003). De même, les GC à très forte dose augmentent la fréquence des CPSI GABAergiques reçus par ces neurones (Di *et al.*, 2005).

L'ensemble de ces mécanismes ont été proposés comme faisant partie de l'action de rétrocontrôle des GC sur les acteurs de l'axe HPA que sont l'hypophyse et l'hypothalamus.

*- Modulation des courants post-synaptiques*

Dans le BLA, la CORT produit une augmentation rapide de la fréquence des CPSE miniatures, mais une seconde application de CORT dans un délai court aura un effet inhibiteur (Karst *et al.*, 2010). Au niveau de l'hippocampe, la CORT augmente la fréquence des CPSE dans la CA1 et le gyrus denté dans un délai de l'ordre de la minute, donc par un mécanisme non génomique mais qui dépend des MR situés à la membrane du neurone pré-synaptique (Karst *et al.*, 2005; Olijslagers *et al.*, 2008; Pasricha *et al.*, 2011).

Il existe aussi des mécanismes de modulation allostérique des récepteurs canaux par les stéroïdes en général et par les GC. Celle-ci est présente dans la moelle épinière notamment et fait intervenir plusieurs stéroïdes ainsi que leurs composés réduits. Ces actions seront plus largement détaillées dans la partie III de ce manuscrit traitant des interactions entre GC et douleur.

### **I. 2. d. Utilisation clinique des glucocorticoïdes**

Les GC sont très largement utilisés en clinique à cause leurs propriétés anti-inflammatoires. En effet, plusieurs GC de synthèse ont été développés en vue d'applications cliniques comme la prednisone, le dexaméthasone ou encore la bétaméthasone. Ils sont appliqués dans le traitement de beaucoup de maladies inflammatoires comme l'asthme ou l'arthrite rhumatoïde par exemple (Thiele *et al.*, 2005) mais aussi pour certaines obstructions pulmonaires chroniques pour lesquels on préconise l'inhalation de GC (Heijdra, 2007).



Ces traitements comportent toutefois des effets secondaires importants en fonction de la dose et de la durée d'utilisation : l'ostéoporose, atrophie de l'épiderme, apparence dite « cushingoïde » (gonflement facial et de la partie supérieure du corps) diabète ou encore glaucome, limitant l'utilisation à long terme des GC (Löwenberg *et al.*, 2008). Sans compter les dérèglements métaboliques qui sont multiples (développement de l'adiposité, fonte de la masse musculaire, insulino-résistance, hyperglycémie). Tous les ans il y a environ dix millions de nouvelles prescriptions par voie orale de GC uniquement aux USA (Schäcke *et al.*, 2002).

Aujourd'hui les GC sont utilisés pour traiter certaines douleurs cancéreuses. Ils réduisent significativement les douleurs dues aux gonflements et aux inflammations secondaires. Dans le cas de douleurs non cancéreuses, les GC sont notamment utilisés pour traiter les différentes formes d'arthroses. Toutefois ces actions analgésiques sont principalement les conséquences de l'action anti-inflammatoire des GC.

## II. LE CIRCUIT NOCICEPTIF

La moelle épinière constitue le premier relais central des informations sensorielles provenant de la périphérie. Ce sont les afférences sensorielles primaires qui acheminent les informations périphériques directement dans les cornes dorsales de la moelle épinière. Certaines afférences primaires sont spécialisées dans la transmission de l'information nociceptive. Cette information peut prendre différentes modalités (tactile, thermique ou chimique) et est propre à toute stimulation pouvant être néfaste ou dommageable pour l'organisme.

Au niveau spinal, l'information nociceptive va être modulée avant d'être envoyée aux centres supra-spinaux *via* les voies ascendantes par les neurones de projection (NP). Cette mise en forme du message nociceptif s'effectue par des populations d'interneurones locaux et par les contrôles descendants.

### II. 1. Organisation des cornes dorsales de la moelle épinière

La moelle épinière se compose d'une colonne caudo-rostrale de matière grise entourée par une gaine de substance blanche. La matière grise est composée de neurones, leurs neurites (prolongements dendritiques et axonaux) et de cellules gliales. C'est la quantité de corps cellulaires présent dans la matière grise qui lui donne cette apparence grisâtre. La substance blanche doit son nom à sa couleur blanchâtre provenant de la myéline des axones qui la composent principalement. On y trouve aussi de la microglie ainsi que des vaisseaux sanguins assurant une large vascularisation.

De manière générale les neurones des cornes dorsales de la moelle épinière relayent les informations sensorielles, tandis que la partie ventrale comprend les motoneurones qui innervent les muscles striés squelettiques. Cette fonction motrice est aussi modulée par plusieurs populations d'interneurones dans les cornes ventrales.

Une zone se situant autour du canal de l'épendyme relaie quant à elle les informations proprioceptives des viscères.

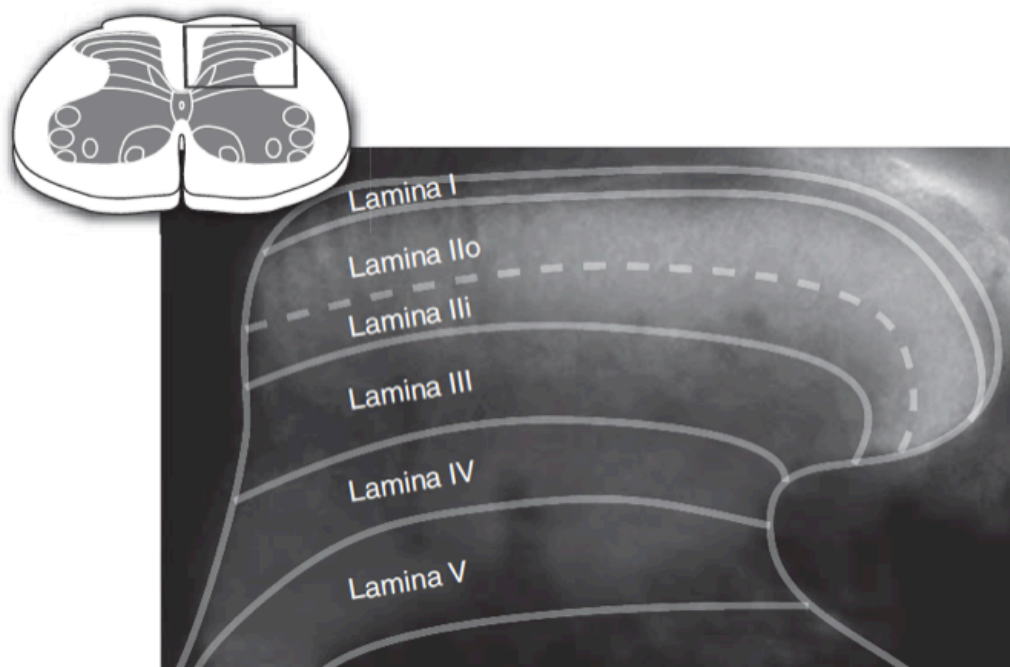
### **II. 1. a. La substance blanche**

La substance blanche est subdivisée anatomiquement en trois principales sections nommées funiculus dorsal, ventral et latéral. La substance blanche comprend les grandes voies ascendantes acheminant les informations de la moelle épinière vers les centres supra-spinaux mais aussi les voies descendantes modulant cette même information spinale sous l'influence des centres supérieurs. Ces voies et leurs principaux acteurs seront abordés plus loin.

Toutes les informations nociceptives entrent dans le SNC soit dans la moelle épinière soit par le système trigéminal pour la sensibilité de la face et de la tête.

### **II. 1. b. La substance grise**

La substance grise est organisée en neuf couches auxquelles s'ajoute la région qui entoure le canal central, notées laminae I-X (Figure 9). Cette lamination proposée par le neuroanatomiste suédois Bror Rexed (Rexed, 1952) tient compte de la cytologie propre aux cellules de chaque couche. Les couches I à VI forment les cornes dorsales de la moelle épinière tandis que les couches VII à IX forment la partie ventrale de la moelle épinière.



**Figure 9 :** Organisation des cornes dorsales de la moelle épinière

*Le schéma en haut à gauche représente une coupe transverse du niveau lombaire de la moelle épinière. La substance blanche entoure la substance grise, elle même délimitée en dix couches distinctes : les laminae de Rexed (1952). La photographie est celle d'une coupe transverse d'une corne dorsale de la moelle épinière. La lamina II (substance gélatineuse) se distingue par son aspect translucide à cause du manque de fibres myélinisées arrivant dans cette couche (d'après Graham et al., 2007).*

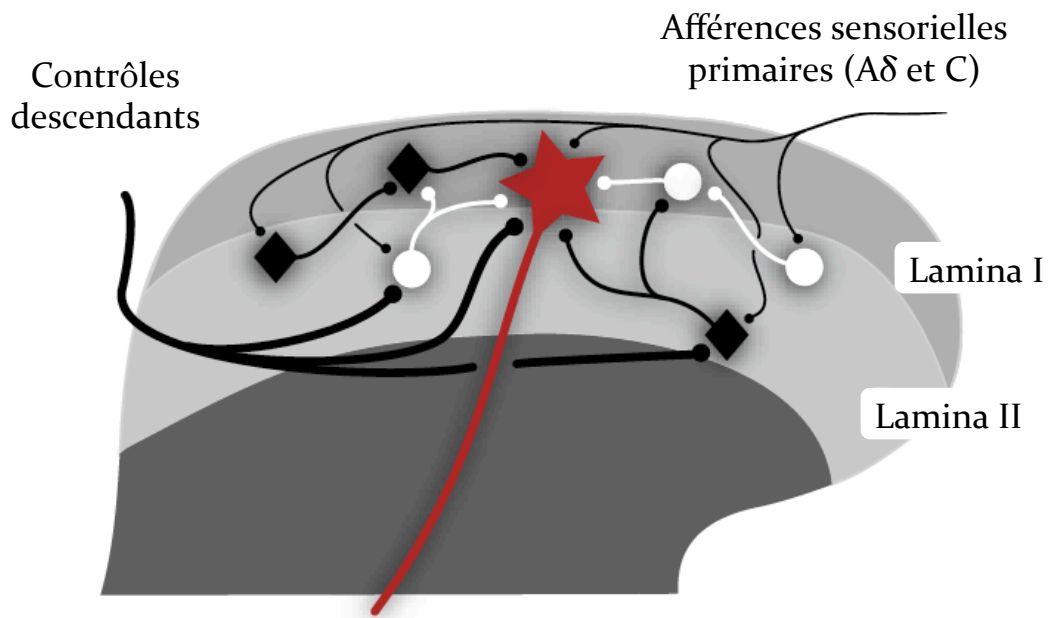
Les informations nociceptives, en condition normale arrivent dans les cornes dorsales majoritairement par les afférences primaires de type A $\delta$  et C (et une très faible population de fibres A $\beta$ ). Les informations proprioceptives tactiles sont relayées par les fibres de type A $\beta$ .

- La couche I, aussi connue sous le nom de couche marginale de Waldeyer contient un réseau d'interneurones ainsi que des NP.

- La couche II regroupe des neurones à petit corps cellulaire impliqués dans le traitement de l'information nociceptive. Les axones des neurones de cette couche sont peu ou pas du tout myélinisés et l'ensemble de ces propriétés lui confèrent un aspect grisâtre d'où son nom alternatif de substance gélatineuse de Rolando. La lamina II est subdivisée entre sa zone la plus dorsale : la lamina Ilo (outer) et sa zone ventrale : lamina Ili (inner). Les interneurones de la lamina II projettent vers la lamina I et vers les laminae plus profondes (IV et V ; Petitjean et al., 2012).

L'ensemble de ces deux laminae forme les couches superficielles qui sont spécialisées dans le traitement de l'information nociceptive. Les neurones sont ainsi qualifiés de « nociceptif spécifiques » (NS) car ils ne traitent que de l'information nociceptive acheminée par les fibres de type A $\delta$  et C. Plusieurs éléments neuronaux distincts sont retrouvés dans l'ensemble des couches superficielles : (1) les terminaisons centrales des afférences primaires de type A $\delta$  et C, (2) un réseau d'interneurones locaux qui peuvent être excitateurs ou inhibiteurs, (3) les NP, et (4) les terminaisons axonales des voies descendantes (Figure 10).

Ce réseau neuronal module l'information nociceptive acheminée depuis la périphérie par les afférences primaires avant de la transmettre aux NP. L'intérêt clinique de cette structure est très important car il s'agit d'une cible de choix pour lutter contre les phénomènes pathologiques liés entre autres à la douleur chronique.



**Figure 10** : Les populations neuronales des couches superficielles

*Il y a deux types neuronaux distincts que l'on retrouve dans les lamina superficielles des cornes dorsales de la moelle épinière : Les neurones de projection (NP) en rouge, les interneurons qui peuvent être excitateurs (blanc) ou inhibiteurs (noir). À cette population locale s'ajoutent les terminaisons des afférences sensorielles primaires (majoritairement nociceptives de types Aδ et C dans les laminae I et II) ainsi que les terminaisons axonales des contrôles descendants. Les afférences primaires peuvent contacter les interneurons locaux ainsi que les NP. En retour ces interneurons peuvent contacter les afférences primaires pour moduler leur excitabilité. Finalement, les terminaisons des contrôles descendant modulent les afférences primaires et les NP par des contacts directs ou indirects via des interneurons locaux (d'après Graham et al., 2007).*

- Les couches III et IV sont souvent considérées comme un ensemble et sont aussi nommées : noyau propre. Ce dernier possède de nombreux NP et les interneurons qui y résident ont leurs fibres myélinisées. Les arbres dendritiques ventro-dorsaux de ces derniers peuvent remonter jusque dans les couches les plus superficielles (I et II) mais peuvent aussi descendre jusque dans la couche V. Les neurones de ces laminae intègrent aussi bien des informations proprioceptives relayées par les fibres A $\beta$  que nociceptives relayées par les fibres de type A $\delta$  et C. Ils sont appelés WDR pour « wide dynamic range », aussi appelés neurones de convergence.

- Les couches V et VI forment les couches les plus profondes des cornes dorsales. La couche V possède de nombreux NP. Les neurones de ces laminae sont principalement de type WDR, mais il y a aussi une population de neurones nociceptifs spécifiques.

## **II. 2. Les différents types d'afférences primaires et leurs propriétés**

Les afférences sensorielles primaires détectent les stimuli périphériques et transmettent ces informations dans le SNC. Il s'agit de neurones pseudo-unipolaires en « T » avec deux branches axonales : l'une innerve la périphérie et l'autre le SNC dans les cornes dorsales de la moelle épinière. Leurs corps cellulaires se situent dans les ganglions rachidiens dorsaux (DRG pour dorsal root ganglion) ou dans les ganglions trijumeaux.

Pour la transduction des informations sensorielles tactiles (température, pression, vibration), les terminaisons périphériques des afférences primaires sont des récepteurs spécifiques de la modalité sensorielle (corpuscules de Paccini, Ruffini, Merkel, Krause et Meissner). Pour les informations nociceptives, il s'agit de terminaisons périphériques libres.

Il existe plusieurs types d'afférences sensorielles primaires. Elles peuvent être classées en fonction de leurs propriétés physiques telles que leur diamètre ou leur vitesse de conduction (Figure 11), ou bien en fonction de leurs propriétés neurochimiques les caractérisant par l'expression d'un ou de plusieurs marqueurs (expression de neurotransmetteur, peptide, récepteur).

### II. 2. a. Propriétés physiques

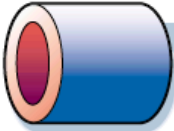


Ces dernières se classent ainsi en trois catégories appelées A, B et C (Figure 11). Le groupe des fibres A se subdivise en trois catégories désignées  $\alpha$  (ayant la plus grande vitesse de conduction),  $\beta$  et  $\delta$  (les plus lentes). Les fibres A $\beta$  sont larges de plus de 10  $\mu\text{m}$  de diamètre, fortement myélinisées et leur vitesse de conduction est grande : 30 à 100 m/sec. Elles sont principalement non-nociceptives bien qu'un contingent de ces fibres de l'ordre de 20% à été montré comme véhiculant des informations nociceptives (Djouhri & Lawson, 2004). Les fibres A $\delta$  sont plus faiblement myélinisées, plus petites (de 2 à 6  $\mu\text{m}$ ) et leur vitesse s'étend de 12 à 30 m/sec. Les fibres C ne sont pas myélinisées. Elles sont de petit diamètre : 0,4 à 1,2  $\mu\text{m}$  et ont une vitesse de conduction n'excédant pas 2 m/sec. Les fibres A $\delta$  et C véhiculent majoritairement les informations nociceptives, mais certaines fibres A $\delta$  véhiculent des informations non-nociceptives mécanosensibles à partir de la base des poils. Dans le même ordre d'idée, une très petite population de fibres C est aussi non nociceptive et véhicule des informations mécaniques et thermiques (Alvarez & Fyffe, 2000).

### II. 2. b. Propriétés neurochimiques

Toutes les afférences primaires libèrent du glutamate au niveau de leur terminaison spinales et ont donc une action excitatrice dans les cornes dorsales.



### Axones des afférences primaires sensorielles

	Seuil thermique	Vitesse de conduction
 <p><b>Fibres A<math>\beta</math></b></p> <p>Myélinisées Grand diamètre : <math>\approx 10 \mu\text{m}</math> Information proprioceptive, tactile</p>	Aucun	30 – 100 m/s
 <p><b>Fibres A<math>\delta</math></b></p> <p>Faiblement myélinisées Diamètre : 2 à 6 <math>\mu\text{m}</math> Information nociceptive (mécanique, thermique, chimique)</p>	$\approx 43 \text{ }^\circ\text{C}$	12 - 30 m/s
 <p><b>Fibres C</b></p> <p>Non-myélinisées Faible diamètre : 0.4 à 1.2 <math>\mu\text{m}</math> Information nociceptive (mécanique, thermique, chimique) Température non-nociceptive</p>	$\approx 43 \text{ }^\circ\text{C}$	< 2 m/s

**Figure 11** : Propriétés physiques des différentes afférences primaires

*Les afférences sensorielles primaires peuvent être différenciées par leurs propriétés physiques. Les fibres A $\beta$  véhiculent majoritairement des informations proprioceptives, non nociceptives. Elles sont fortement myélinisées, possèdent un diamètre élevé et ont donc une grande vitesse de conduction du signal. Les fibres A $\delta$  sont plus faiblement myélinisées et leur diamètre axonal est moins important. Elles véhiculent des informations nociceptives. Les fibres C ne sont pas myélinisées et leur diamètre est très petit. Ces fibres sont essentiellement nociceptives (d'après Julius & Basbaum, 2001).*

Il existe aussi un grand nombre de neuromodulateurs qui peuvent être libérés par ces fibres, permettant de les classer grâce à ces critères neurochimique.

Les fibres C peuvent être classées en deux groupes distincts en fonction de leur nature neurochimique et de leur localisation anatomique. Les fibres C peptidergiques sont caractérisées par l'expression de neuropeptides comme la SP ou le CGRP ainsi que la présence du récepteur trkA (tyrosine kinase receptor A) ayant une forte affinité pour le NGF (nerve growth factor). La neurokinine A, la galanine et l'endomorphine-2 sont exclusivement exprimés par les fibres C peptidergiques (Hökfelt et al., 1994). Les fibres C non peptidergiques sont caractérisés par la présence de récepteurs purinergiques P<sub>2</sub>X<sub>3</sub> et la faculté de lier la lectine IB<sub>4</sub>. Ils expriment aussi le récepteur au GDNF (glial-derived neurotrophic factor).

Ces deux groupes se différencient aussi par la topologie propre de leurs terminaisons périphériques : alors que les fibres C non-peptidergiques ont leur terminaisons au niveau de la peau, innervant l'épiderme, les fibres C peptidergiques innervent des zones tissulaires plus profondes.

Toutefois, ces marqueurs ne sont pas spécifiques des fibres C, certaines fibres A $\delta$  expriment aussi la SP : il s'agit d'un contingent de mécanorécepteurs sensibles à de hauts seuils de stimulation. Cette population exprime aussi le récepteur à la sérotonine 5-HT<sub>3</sub> mais aucun peptide ni de récepteur P<sub>2</sub>X<sub>3</sub> et ces fibres ne lient pas l'IB<sub>4</sub>. Par ailleurs, les peptides CGRP et SP sont aussi très faiblement exprimés par une très petite population de fibre A $\beta$  nociceptives spécifiques, tout comme le récepteur trkA (Djoughri & Lawson, 2004). Les canaux voltage dépendants NaV 1.9 sont exprimés par la majorité des nocicepteurs de type C, et A $\delta$  (Djoughri & Lawson, 2004) et permettent de les différencier des fibres proprioceptives.

Bien que plusieurs marqueurs permettent de différencier certains types de fibres, aucune classification neurochimique ne permet aujourd'hui de classer les différentes afférences sensorielles primaires de manière stricte.

### II. 2. c. Les terminaisons libres périphériques

Le système nociceptif peut être activé par différentes modalités : les modalités thermiques, mécaniques et chimiques. Il existe des récepteurs spécialisés dans la détection de stimuli à haut seuils, donc nocifs : les nocicepteurs. Les terminaisons nociceptives sont des terminaisons libres. Ces dernières sont retrouvées un peu partout dans l'organisme mais surtout dans les tissus épithéliaux (épiderme, muqueuses, glandes) et dans les tissus conjonctifs (ligaments, tendons, articulations).

Les terminaisons libres périphériques expriment des récepteurs spécialisés dans la détection d'une modalité spécifique. Cependant certaines terminaisons libres sont plurimodales. La détection de stimuli périphériques génère un potentiel gradué dans la terminaison libre qui déclenchera un PA acheminé jusqu'à la moelle épinière.

#### *- Stimulation mécanique nociceptive*

La détection d'une stimulation mécanique par les terminaisons libres des nocicepteurs est rendue possible par la présence des canaux ASIC-1, 2 et 3 (acid sensing ion channel). Ils sont activés par un étirement, et cette activation provoque une entrée de sodium dans la terminaison. Ils sont activés par un stimulus physique mécanique mais aussi par des stimuli chimiques notamment par les protons (acidité). Les canaux ASIC-2 et 3 sont retrouvés sur les fibres A $\beta$  et A $\delta$  uniquement tandis que ASIC-1 se trouve sur les trois types de fibres. Le canal TRPV-2 (transient receptor potentiel vanilloïde) peut aussi être responsable de la détection de stimuli mécaniques. Il fait parti de la famille des canaux TRP (transient receptor potentiel).

*- Stimulation thermique et chimique nociceptive*

L'activation des nocicepteurs par des températures nocives passe par l'activation de la famille des récepteurs TRP (Dhaka et al., 2006). Les récepteurs TRPV-1 et 2 détectent les températures nocives chaudes supérieures à 45 °C bien que le récepteur TRPV-2 peut aussi détecter des stimuli nociceptifs mécaniques. Les récepteurs TRPA-1 (ankyrin-like) et TRPM8 (melastatin) seraient spécialisés dans la détection de températures nocives froides inférieures à 15 °C. Il s'agit de canaux perméables aux cations, principalement au calcium (Latorre *et al.*, 2007). TRPV-1 est exprimé par les fibres C peptidergiques exclusivement, il est aussi activé par des agents chimiques comme la capsaïcine et les protons. TRPV-2 se trouve sur les fibres A $\beta$  et A $\delta$

#### **II. 2. d. Modulation des afférences primaires**

Le message provenant de la périphérie, amené dans les cornes dorsales par les afférences primaires est glutamatergique. Toutefois, ce message peut être modulé sur les terminaisons centrales des fibres, directement par des contacts axo-axoniques.

Les récepteurs au glutamate GluA (anciennement AMPA pour  $\alpha$ -hydroxy-5-methylisoxazole-4-propionic acid), GluK (anciennement kaïnate) et GluN (anciennement NMDA pour N-methyl-D-aspartic acid) sont présents sur les terminaisons centrales des afférences primaires de même que les récepteurs canaux du GABA (récepteurs de type A, GABA<sub>A</sub>R). La présence de ces récepteurs suggère que les afférences primaires sont sous le contrôle d'interneurones spinaux puisque les neurotransmissions GABAergique et glutamatergique sont retrouvées dans les couches superficielles (Todd, 2012).

On retrouve aussi d'autres types de récepteurs participant à la modulation de la transmission du message des afférences primaires. La

présence de récepteurs aux opioïdes  $\mu$  et  $\delta$  se situant sur leurs terminaisons centrales suggère une modulation par les contrôles descendants qui peuvent être opioïdergiques.

Ces récepteurs produisent un contrôle local de l'excitabilité des afférences primaires, issu des interneurons pré-synaptiques ou des contrôles descendants émanant des centres supraspinaux.

### II. 3. Les interneurons

Les interneurons représentent la majeure partie des neurones de la couche superficielle. Ils n'intègrent donc que les informations propres à ces couches et modulent l'information nociceptive. Ces interneurons peuvent être de différents types : (1) excitateurs : libérant du glutamate, ou (2) inhibiteurs : libérant du GABA, de la glycine ou les deux.

Dans la lamina II, la classification la plus acceptée reste celle de Grudt et collaborateurs (2002). Ces auteurs ont combiné des études morphologiques avec des enregistrements électrophysiologiques. Quatre types de neurones différents ont pu être mis en évidence selon la cytoarchitecture de leur arbre dendritique : les cellules en îlot, les cellules centrales, les cellules verticales et les cellules radiales. Leur ségrégation morphologique est corrélée en majeure partie avec leurs profils de décharge de potentiels d'action (PA) en réponse à une stimulation électrique. Le patron de décharge peut être de quatre types différents : (1) répétitif : déchargeant pendant toute la durée du stimulus ; (2) phasique : lorsque la bouffée de PA n'est présente qu'en début de stimulation ; (3) PA unique : ne déchargeant qu'un seul PA en début de stimulation (4) retardé : ne déchargeant qu'en fin de stimulation (Grudt & Perl, 2002). Ces données ont pu être complétées par Yasaka et collaborateurs (2010) et Maxwell et collaborateurs (2007), faisant à nouveau un parallèle entre morphologie et fonction des interneurons spinaux.

D'autres approches ont établi différentes sous-populations de neurones en utilisant différents marqueurs neurochimiques. Ainsi certains neuropeptides comme la somatostatine, la neurotensine, ou la SP seraient exclusivement exprimés par les neurones glutamatergiques ; le neuropeptide Y (NPY) et la galanine par les neurones GABAergiques et l'enképhaline et la dynorphine dans les deux types de neurones. Cependant le large spectre de marqueurs présents dans les laminae I-III ne permet pas d'être totalement certain de définir la nature d'un neurone en suivant uniquement sa nature neurochimique.

Bien qu'aujourd'hui il n'existe pas de corrélation absolue entre morphologie, électrophysiologie et neurochimie des neurones, les différents marqueurs et autres paramètres étudiés constituent une base permettant une première ségrégation des interneurons spinaux en vue de leur attribuer une fonction spécifique.

#### **II. 4. Les neurones de projection et voies ascendantes**

Les NP envoient les informations spinales à différents centres intégrateurs du tronc cérébral, du mésencéphale et du diencéphale *via* les voies ascendantes. À ce niveau supraspinal l'information nociceptive est intégrée et s'y ajoutent des composantes cognitives : émotionnelles, affectives, motivationnelles. On parle alors de douleur.

Les NP sont tous glutamatergiques (Broman, 1994), mais ne sont pas une population homogène. Ils sont présents dans les laminae I et III-VI, ils sont absents dans la lamina II. La majorité des NP de la lamina I projette vers le noyau parabrachial (NPB). Dix pourcents de ces NP projettent directement dans le thalamus (Yu *et al.*, 2005).

Les informations intégrées par les NP des laminae III et IV sont de type non-nociceptives et WDR. Cependant certains neurones possèdent des dendrites qui vont dans les couches superficielles (LI, II).

Des approches de traçage ont révélé les principales structures de projection spinales (Gauriau & Bernard, 2004 ; Almeida et al., 2004). Les différentes voies ascendantes dérivent de deux systèmes phylogénétiques différents : le premier (le plus ancien) passe par la région médiane du tronc cérébral (TC) tandis que le second, plus récent, occupe la région latérale du TC (Millan, 1999).

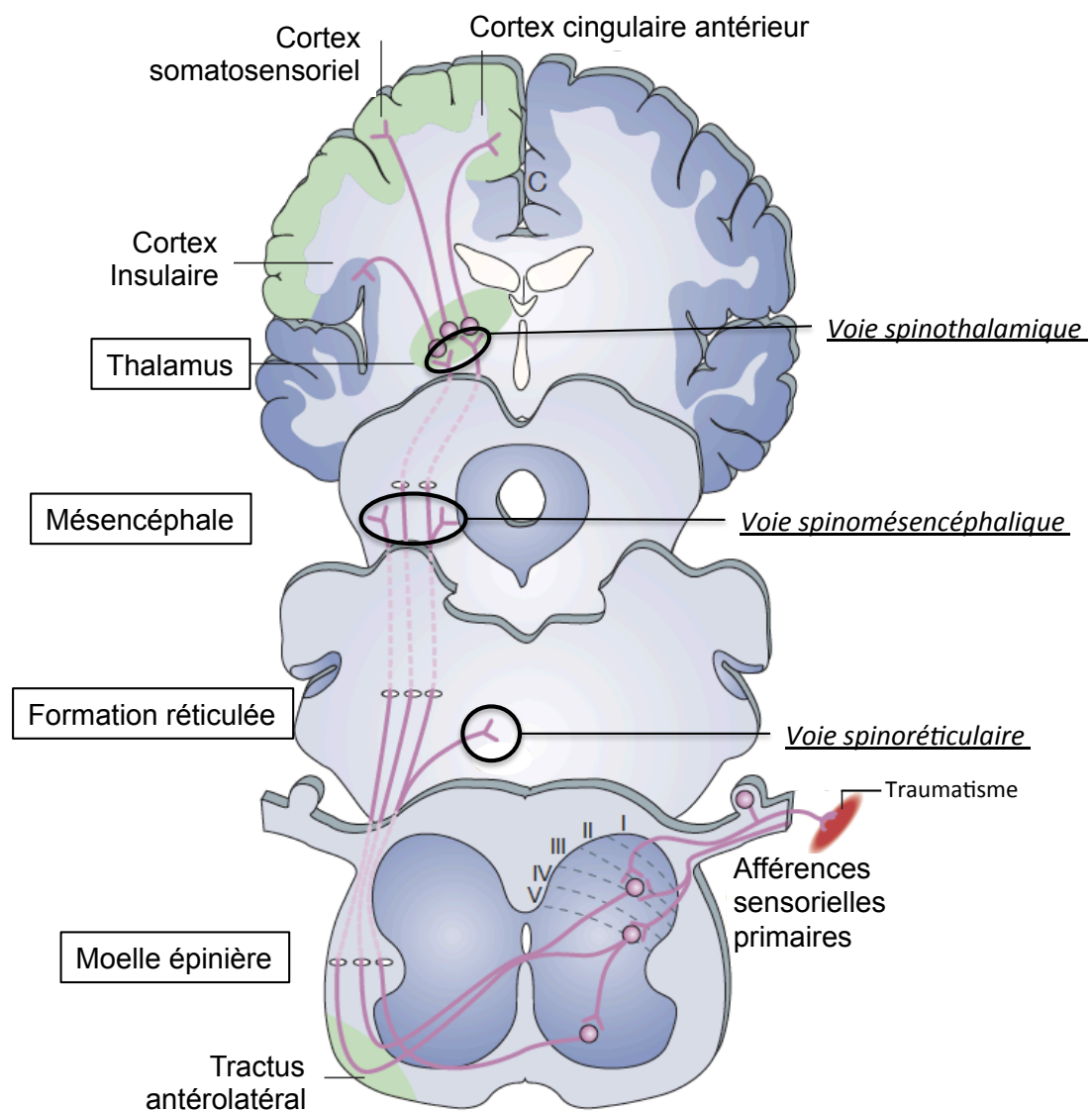
Les trois voies ascendantes nociceptives principales sont illustrées dans la Figure 12 :

- Le tractus spinothalamique véhicule des informations nociceptives multimodales.

Le faisceau spino-thalamique latéral provient principalement des laminae I, IV, V et VI de la moelle épinière. Il projette vers la partie thalamique latérale puis vers les aires corticales somatosensorielles primaires et secondaires qui mettent en forme l'aspect sensori-discriminatif de la douleur.

Le faisceau spino-thalamique antérieur provient des laminae V, VI et X. Il projette vers la partie thalamique médiane puis vers le cortex cingulaire antérieur et préfrontal qui mettent en forme les composantes affectives et émotionnelles de la douleur.

- Le tractus spino-réticulaire prend son origine dans les laminae I et V et arrive dans le noyau latéral de la formation réticulée, le noyau gigantocellulaire et dans la formation réticulée ponto bulbaire médiane. Ces deux voies sont impliquées dans les composantes motivationnelles et affectives ainsi que dans les réponses neurovégétatives à la douleur.
- Le tractus spino-mésencéphalique prend son origine dans les couches I, IV, V, et VI de la moelle épinière et arrive vers la substance grise



**Figure 12 :** Les voies ascendantes empruntant le tractus antérolatéral

*Au niveau de la moelle épinière, les neurones de projection envoient l'information aux centres à différents niveaux supraspinaux via le tractus antérolatéral. Le même faisceau d'axones ascendants émet des collatérales dans les structures réticulée, mésencéphalique avant d'arriver au thalamus. Le thalamus est un relais central des informations nociceptives avant de les transmettre à plusieurs structures corticales qui vont mettre en forme les différents aspects de l'expérience douloureuse, notamment émotionnel dans les cortex cingulaire et insulaire (modifié d'après Fields, 2004).*



périaqueducale (PAG) et le NPB. Cette voie est responsable des réponses autonomes, ainsi que des composantes motivationnelles et affectives de la douleur.

- Le tractus spino-parabrachial relaie des informations uniquement nociceptives issues de la lamina I directement dans le NPB. Des afférences d'autres voies ascendantes convergent vers le NPB constituant la voie nociceptive indirecte. Le NPB projette vers le thalamus et l'amygdale attribuant à cette voie des fonctions autonomes motivationnelles, affectives ainsi qu'un rôle dans la réponse neuroendocrine à la douleur.

## **II. 5. La neurotransmission dans la Lamina II**

Le réseau d'interneurones de la lamina II fait intervenir des neurones excitateurs glutamatergiques, et des neurones inhibiteurs libérant le GABA ou la glycine ou les deux.

La neurotransmission peut être limitée à la fente synaptique, où un neurone pré-synaptique libère les neurotransmetteurs contenus dans ses vésicules au niveau la fente synaptique qui iront agir sur leurs récepteurs se trouvant sur le neurone post-synaptique. La fente synaptique est aussi délimitée par les astrocytes qui la ferment assurant ainsi une bonne résolution spatiale de la transmission. Il s'agit de la transmission synaptique.

Cependant, outre cette transmission synaptique, il existe un autre mécanisme de communication neuronale faisant intervenir des récepteurs se trouvant hors de la synapse : la transmission extra-synaptique produisant un courant tonique. Ces récepteurs sont activés par les neurotransmetteurs se situant dans le milieu extracellulaire. On parle aussi de transmission volumique, ou transmission dite « non-câblée ».

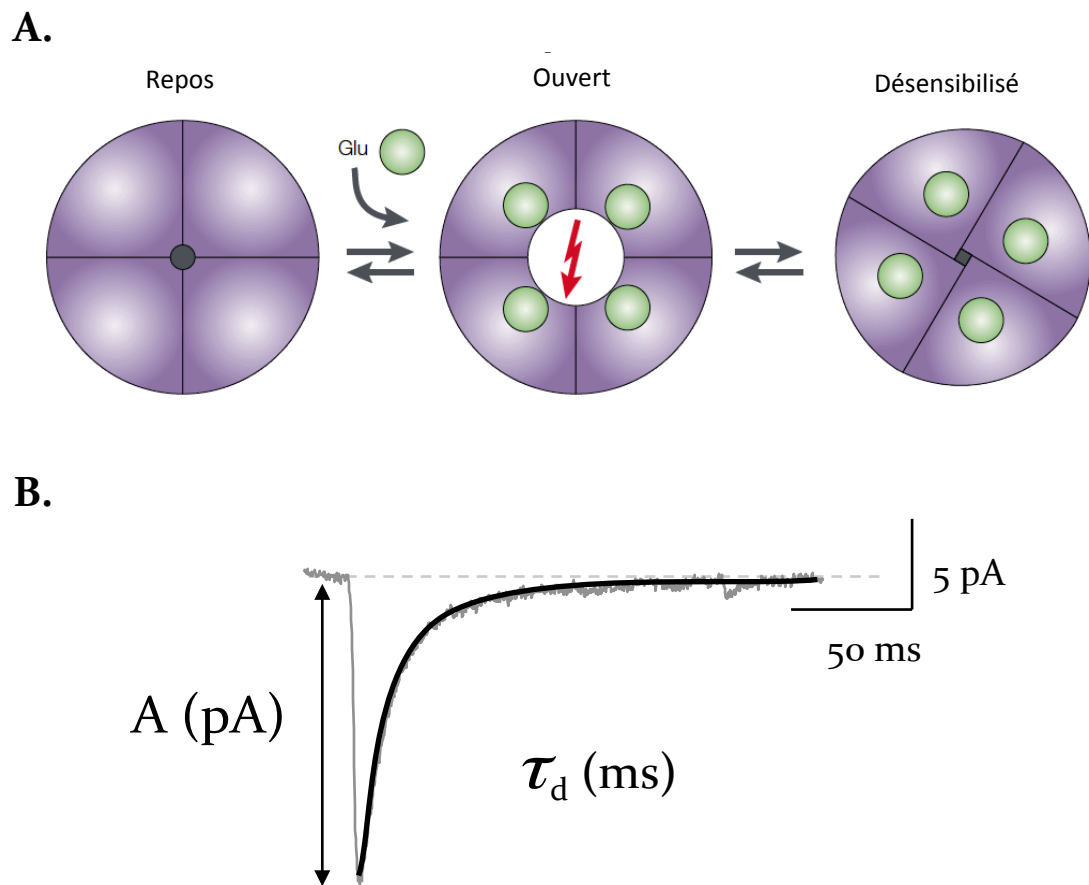
### II. 5. a. La transmission synaptique glutamatergique

Le glutamate est le neurotransmetteur exciteur principal du SNC et on le retrouve très largement dans les cornes dorsales. En plus des afférences primaires qui sont de nature glutamatergique une large population de neurones de la lamina II le sont également.

Les récepteurs canaux du glutamate sont des tétramères (Figure 13). La fixation de quatre molécules de glutamate sur le récepteur va induire son ouverture provoquant des CPSE. Les récepteurs ionotropiques du glutamate sont de trois types : le récepteur GluA, GluN, et GluK.

- Le récepteur GluA (anciennement AMPA) est perméable aux ions sodium et potassium mais aussi au calcium suivant sa composition en sous-unités. Le récepteur est un hétérotétramère formé de quatre sous-unités notées GluA<sub>1-4</sub>. Les plus présentes dans les cornes dorsales de la moelle épinière sont les GluA<sub>1</sub> et GluA<sub>2</sub> (Jakowec et al., 1995).

- Le récepteur GluN (anciennement NMDA) est perméable au sodium au potassium et au calcium. Il est activé dans les conditions physiologiques par deux molécules de glutamate ainsi que deux molécules de glycine qui ont le rôle de co-activateur (Lehmann *et al.*, 1991). Il comprend deux sous-unités GluN<sub>1</sub> liant la glycine. La sous-unité GluN<sub>1</sub> est très largement exprimée dans les cornes dorsales (Tolle et al., 1993). Deux sous-unités GluN<sub>2</sub> le composent aussi, lui donnant ses propriétés électrophysiologiques en fonction du variant utilisé (GluN<sub>2</sub>A-D). Les sous-unités GluN<sub>2</sub> possèdent le site de liaison au glutamate et définissent l'affinité du récepteur pour ce dernier, ainsi que la perméabilité au calcium ou encore le blocage du pore du récepteur par le magnésium. Plus récemment deux sous-unités GluN<sub>3</sub>A et B ont été mises en évidence, formant des récepteurs fonctionnels avec GluN<sub>1</sub> et n'étant activé que par la glycine (Chatterton *et al.*, 2002). L'ensemble des sous-unités GluN<sub>1</sub> et GluN<sub>2</sub>A-D et



**Figure 13** : Cinétique d'activation du récepteur canal au glutamate

*A. Au repos le récepteur canal est fermé, aucune conductance n'est activée. Lorsque les molécules de glutamate se lient au récepteur elles provoquent son ouverture et l'induction d'une conductance dépolarisante dans le neurone cible. Le récepteur passe ensuite dans un état désensibilisé, puis fermé lorsque les molécules sont libérées du récepteur (d'après Madden, 2002).*

*B. Le passage de l'état ouvert à désensibilisé de l'ensemble des récepteurs présents à la synapse suit une constante de temps que l'on peut ajuster par une fonction exponentielle qui est appelée constante de désactivation :  $\tau_D$ . Cette constante de temps permet de caractériser le CPSE glutamatergique tout comme son amplitude et sa fréquence.*

GluN<sub>3</sub>B sont retrouvées dans les cornes dorsales de la moelle épinière (Shiokawa *et al.*, 2010)

- Le récepteur GluK (anciennement kaïnate) est perméable aux ions sodium et potassium. Ils ont une structure similaire au récepteur GluA, avec les sous-unités GluK<sub>1-5</sub> (anciennement GluR<sub>5, 6 et 7 et KA<sub>1-2</sub>) qui peuvent former des homotétramères ou des hétérotétramères. Toutes les sous-unités GluK<sub>1-5</sub> sont retrouvées dans la moelle épinière avec une expression très concentrée dans cornes dorsales (Cui *et al.*, 2012).</sub>

Tous ces récepteurs produisent des CPSE qui sont caractérisés par plusieurs paramètres (Figure 13) : leur amplitude (de l'ordre du picoampère), leur fréquence et leur constante de désactivation ( $\tau_D$ , exprimé en millisecondes). La cinétique décroissante des CPSE est due à la fermeture ou la désensibilisation de l'ensemble des récepteurs canaux activés par le glutamate à la synapse suite à la séparation du neurotransmetteur de son site récepteur. Cette cinétique peut être ajustée par une fonction mathématique de laquelle on en extrait la valeur de  $\tau$  et cette dernière est propre à chaque type de sous-unité formant le récepteur.

De plus, le glutamate peut aussi agir sur des récepteurs métabotropiques couplés aux protéines G : les mGluR qui sont au nombre de 8 (notés mGluR<sub>1-8</sub>). La plupart de ces récepteurs sont pré-synaptiques (mGluR<sub>2, 3, 4, 7 et 8</sub>) et induisent une diminution de la libération de glutamate. Les récepteurs mGluR<sub>1 et 5</sub> sont présents dans les cornes dorsales de la moelle épinière et sont post-synaptiques (Alvarez *et al.*, 2000), tout comme les mGluR<sub>4, 7 et 3</sub> (Berthele *et al.*, 1999).

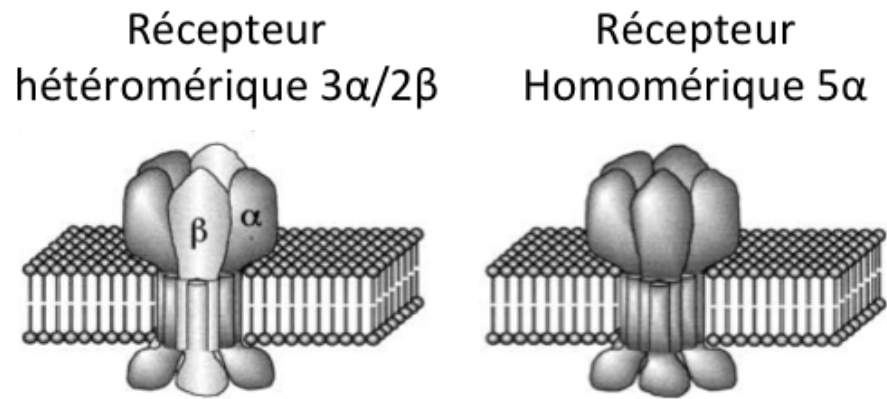
### II. 5. b. La transmission synaptique glycinergique

La transmission glycinergique, tout comme la transmission GABAergique sont inhibitrices dans la lamina II mature. Elles font intervenir deux neurotransmetteurs : la glycine et le GABA. Dans les couches superficielles ces deux transmissions inhibitrices représentent des proportions non négligeables d'interneurones puisque 24 à 33% des neurones sont GABAergiques dans les lamina I-III alors que 14% seraient glycinergiques dans la lamina II (Todd & McKenzie, 1989; Todd & Sullivan, 1990).

La glycine est importée dans les vésicules synaptiques grâce à un transporteur vésiculaire commun à celui du GABA : le VIAAT (vesicular inhibitory amino acid transporter). La colibération des deux neurotransmetteurs est donc possible comme décrite plus bas. Une fois la glycine libérée, elle va diffuser dans la fente et va agir sur son récepteur sur le neurone post-synaptique.

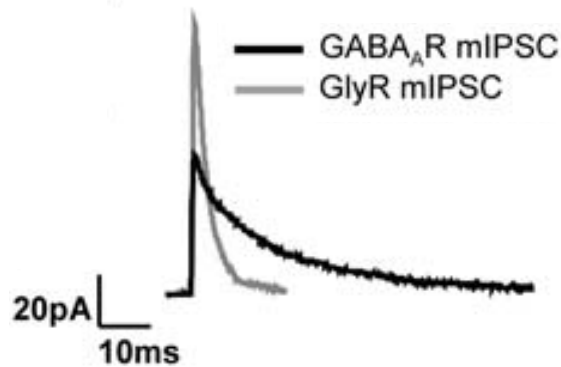
Le récepteur canal ionotrope de la glycine (GlyR) est un pentamère (Figure 14). La sous-unité  $\alpha$  a plusieurs isoformes  $\alpha_1-4$  et un seul existe pour la sous-unité  $\beta$  (Zeilhofer *et al.*, 2012). Le GlyR se présentera sous deux formes dont la forme hétéromérique  $3\alpha_2\beta$  est principalement retrouvée avec une localisation synaptique. La forme homomérique  $5\alpha$  du GlyR est retrouvée préférentiellement avec une localisation extra-synaptique (Legendre, 2001). Dans la moelle épinière on retrouvera surtout l'isoforme  $\alpha_1$  composant le GlyR post-synaptique alors que la sous-unité  $\alpha_3$  semble être spécifique des laminae I et II (Harvey *et al.*, 2004). Son canal est sélectivement perméable aux ions chlorures, il a donc une action hyperpolarisante et inhibitrice dans la lamina II mature suite à son activation par deux molécules de glycine.

Les CPSI glycinergiques sont caractérisés par leur constante de désactivation ( $\tau_D$ ) rapide :  $\tau_D < 12$  ms (Figure 15 ; Keller *et al.*, 2004; Mitchell *et al.*, 2007).



**Figure 14 :** Structure du récepteur glycinergique

*Le récepteur glycinergique est composé de cinq sous unités dont il existe quatre isoformes  $\alpha$  et un  $\beta$ . Ce récepteur peut donc être hétéromérique (composé de sous-unités  $\alpha$  et  $\beta$ ) ou homomérique composé de cinq sous-unité  $\alpha$  (d'après Legendre, 2001).*



**Figure 15 :** Cinétiques des CPSI GABAergiques et glycinergiques

*La transmission glycinergique est caractérisée par une constante de désactivation ( $\tau_D$ ) rapide. Dans la lamina II de la moelle épinière dorsale cette constante est toujours inférieure à 12 ms. Cette même constante caractérisant les courants inhibiteurs GABAergiques est plus importante et dans la lamina II est supérieure à 15 ms. Les deux types de courants peuvent donc être séparés sur la base de leur propriétés cinétiques (traces tirées de Mitchell et al., 2007)*

La transmission glycinergique subit une maturation durant les premières semaines postnatales. Elle n'a effectivement un impact comportemental qu'aux environs de la seconde semaine postnatale chez le rat bien que les GlyR soient présents et fonctionnels dès la naissance (Baccei & Fitzgerald, 2004; Koch et al., 2012). Avant le 21<sup>ème</sup> jour postnatal (P21), tous les neurones de la lamina I et la majeure partie (72 %) de ceux de la lamina II sont contactés par des afférences glycinergiques et GABAergiques simultanément. Ce n'est qu'à partir de P21 qu'une population de neurones est sous le contrôle d'une transmission glycinergique 'pure' (Keller *et al.*, 2001; Rajalu *et al.*, 2009).

La transmission glycinergique joue un rôle important dans la modulation de la transmission nociceptive puisque l'ajout de son antagoniste, la strychnine (STR) produit des symptômes caractéristiques de douleurs neuropathiques (Yaksh, 1989; Charlet *et al.*, 2008). De plus la transmission glycinergique est réprimée par des facteurs de l'inflammation comme la prostaglandine E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) inhibant le GlyR $\alpha$ <sub>3</sub> lui conférant un rôle important dans la sensibilisation centrale à l'inflammation (Ahmadi *et al.*, 2002; Harvey *et al.*, 2004).

### II. 6. c. La transmission synaptique GABAergique

Le GABA est importé dans les vésicules synaptiques par le même transporteur vésiculaire que la glycine : le VIAAT.

Les récepteurs ionotropiques du GABA (GABA<sub>A</sub>R) sont pentamériques. Il existe de nombreuses classes de sous-unités différentes notées :  $\alpha$ <sub>1-6</sub>,  $\beta$ <sub>1-3</sub>,  $\gamma$ <sub>1-3</sub>,  $\delta$ ,  $\epsilon$  et  $\rho$ <sub>1-3</sub>. Cette diversité confère au récepteur un très large spectre d'assemblage possible, mais seulement un petit nombre aura été démontré comme fonctionnellement actif au sein du SNC. La composition en sous-unités confère au récepteur GABA ses propriétés fonctionnelles électrophysiologiques

et pharmacologiques propres, ainsi que sa localisation cellulaire et subcellulaire. La combinaison  $\alpha_3$ ,  $\beta_3$  et  $\gamma_2$  est largement prédominante dans la couche superficielle de la moelle épinière tandis que la sous-unité  $\alpha_1$  semble être spécifique des laminae plus profondes (Bohlhalter *et al.*, 1996). Les sous-unités  $\beta_2$  et  $\beta_3$  auraient exclusivement une localisation somato-dendritique. De manière générale la sous-unité  $\gamma_2$  est représentative des récepteurs post-synaptiques grâce notamment à son association avec les protéines d'ancrages que sont la gephyrin ou GABARAP (GABA receptor-associated protein ; Essrich *et al.*, 1998; Kneussel, 2002). La sous-unité  $\rho_2$  semble être présente dans les couches superficielles de la moelle épinière (Rozzo *et al.*, 2002). Ces récepteurs sont bloqués par plusieurs antagonistes comme la bicuculline (BIC), la gabazine (GBZ) ou encore la picrotoxine. Les homopentamères  $\rho$  (anciennement GABA<sub>C</sub>) sont insensibles à la BIC et son agoniste principal est le TPMPA (l'acide 1,2,5,6-tetrahydropyridine-4-yl methylphosphinique).

Deux molécules de GABA sont nécessaires pour activer le récepteur. Elles se fixent sur le GABA<sub>A</sub>R, à l'interface entre les sous-unités  $\alpha$  et  $\beta$  et induisent une conductance chlorure dans le neurone cible, donc inhibitrice pour les neurones post-synaptiques de la lamina II mature.

Dans la lamina II, les CPSI GABAergiques sont caractérisés par une constante de désactivation lente ( $\tau_D > 15$  ms ; Figure 15 ; Keller *et al.*, 2004; Mitchell *et al.*, 2007). Les GABA<sub>A</sub>R ont plusieurs agonistes compétitifs spécifiques comme le muscimol ou l'isoguvascine.

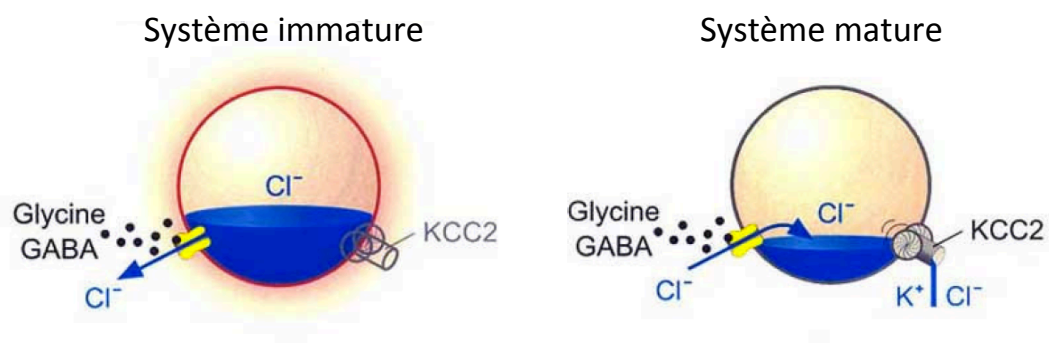
La transmission GABA subit une maturation postnatale. Cette dernière repose sur la perméabilité de ses récepteurs canaux aux ions chlorures, et donc sur le maintien d'un gradient électrochimique propice à l'inhibition du neurone cible (Rajalu & Poisbeau, 2006). La régulation de ce gradient chlorure repose essentiellement sur l'activité de deux cotransporteurs potassium / chlorure (KCC<sub>2</sub>) et sodium / potassium / chlorure (NKCC<sub>1</sub>). Le transporteur NKCC<sub>1</sub> induit une entrée de chlorure dans la cellule, alors que le KCC<sub>2</sub> favorise son



extrusion. La présence du cotransporteur KCC2 est donc associée à une faible concentration intracellulaire d'ions chlorures et lors de l'ouverture d'un canal membranaire perméable à ces ions, ils entreront dans la cellule induisant une hyperpolarisation membranaire, donc une inhibition (Figure 16). C'est le cas de transmission GABA dans les couches superficielles de la moelle épinière. Dans les premiers jours postnataux l'expression de KCC2 est très faible, par conséquent la concentration intracellulaire en ions chlorure est forte. Dans ces conditions, l'activation du GABA<sub>A</sub>R produit une sortie de ces ions et donc une dépolarisation membranaire (Price *et al.*, 2006).

Durant les trois premières semaines postnatales la transmission GABAergique est aussi sous une influence stéroïdienne. Les stéroïdes (qui peuvent traverser la BHE) ou les neurostéroïdes produits *de novo* dans la moelle épinière vont agir continuellement sur le GABA<sub>A</sub>R *via* différents métabolites réduits et augmenter la probabilité d'ouverture du récepteur modifiant le profil cinétique des CPSI (Keller *et al.*, 2004). Le GABA<sub>A</sub>R est modulé par les neurostéroïdes à des concentrations nanomolaires qui prolongent le temps d'ouverture du canal (Barker *et al.*, 1987). Ces courants ont ainsi une cinétique de désactivation très lente dans la première semaine postnatale ( $\tau_D > 30$  ms) et cette cinétique s'accélère jusqu'à la troisième semaine postnatale pour atteindre les cinétiques des CPSI GABAergiques matures ( $\tau_D > 15$  ms).

Le GABA peut aussi agir sur son récepteur métabotropique GABA<sub>B</sub> couplé aux protéines Gi/o, lui conférant une action majoritairement inhibitrice qui passe par l'activation de conductances potassiques. Il s'agit d'un récepteur hétérodimérique constitué de deux sous-unités principales GABA<sub>B1</sub> et GABA<sub>B2</sub>. GABA<sub>B1</sub> se situe préférentiellement en pré-synaptique et GABA<sub>B2</sub> est post-synaptique (Bettler *et al.*, 2004). Le GABA<sub>B</sub>R est présent dans la moelle épinière et particulièrement dans la couche superficielle (Yang *et al.*, 2001) et son activation produit des effets anti-nociceptifs. Il peut être pré- ou post-synaptique. Son action pré-synaptique bloque les canaux calciques inhibant ainsi la sécrétion de glutamate et de SP par les afférences primaires (Malcangio



**Figure 16 :** La maturation postnatale du gradient chlorure

*Dans le système immature le cotransporteur KCC2 n'est pas exprimé, ne permettant pas l'extrusion des ions chlorures hors de la cellule. La conséquence est un excès de chlorure dans la cellule, et donc une sortie de ces ions lors de l'ouverture d'une conductance chlorure se traduisant par une dépolarisation de la cellule. Lors de la maturation du système, KCC2 est progressivement exprimé dans les cornes dorsales de la moelle épinière, et permet alors l'extrusion des ions chlorures. L'ouverture de conductances chlorures cette fois induit l'entrée des ions, et donc une hyperpolarisation de la cellule caractéristique d'une inhibition (d'après Price et al., 2006).*

& Bowery, 1993). Il joue aussi un rôle dans la modulation de la libération de GABA par son action inhibitrice pré-synaptique (Bonanno *et al.*, 1998). Le GABA<sub>B</sub>R est stimulé par le baclofen et son antagoniste est le saclofen.

Dans les cornes dorsales, il a été montré que l'utilisation d'antagonistes des GABA<sub>A</sub>R produit hypersensibilité nociceptive avec des symptômes caractéristiques des douleurs pathologiques comme l'hyperalgésie et l'allodynie (Yaksh, 1989). Une désinhibition spinale (hyperexcitabilité du réseau spinal) est donc corrélée avec l'apparition de symptômes pathologiques et c'est pourquoi cette inhibition est une cible centrale pour lutter contre ces types de douleurs en clinique

#### II. 5. d. La transmission synaptique mixte GABA-glycine

Suite aux travaux de Todd et Sullivan en 1990 démontrant une colocalisation neurochimique de deux marqueurs propres à la glycine et au GABA, il a été montré qu'une cotransmission GABA/glycine existe dans la moelle épinière. Il s'avère que tous les neurones glycinergiques sont aussi GABAergiques, alors qu'uniquement la moitié des neurones GABAergiques démontrent une colocalisation avec un marqueur glycinergique (Todd & Sullivan, 1990). De plus ces deux neurotransmetteurs inhibiteurs sont importés dans les vésicules synaptiques par le même transporteur (VIAAT), et peuvent donc théoriquement être colibérés à une seule et même synapse (Chéry & De Koninck, 1999). Pour que la cotransmission ait lieu il faut que les récepteurs spécifiques de chacun de ces neurotransmetteurs soient présents sur le versant post-synaptique. Plusieurs études ont pu mettre en évidence la colocalisation des GlyR et des GABA<sub>A</sub>R dans les cornes dorsales de la moelle épinière (Todd *et al.*, 1996; Bohlhalter *et al.*, 1994).

Chacune des transmissions Glycine et GABA dans la lamina II ont des caractéristiques cinétiques propres comme vu précédemment : la constante de

déactivation ( $\tau_D$ ) du courant GABAergique est systématiquement plus lente que celle du courant glycinergique (Inquimbert et al., 2007; Keller et al., 2001; Chéry & De Koninck, 1999; Rajalu et al., 2009). La cotransmission mixte glycine/GABA est un événement qui représente une réponse combinée de CPSI GABAergiques et glycinergiques. De manière générale dans la lamina II, les CPSI issus de cette cotransmission ont une amplitude plus importante que leur contreparties GABAergiques et glycinergiques 'pures' (Keller *et al.*, 2001, 2004; Mitchell *et al.*, 2007). Sa constante de déactivation possède la particularité d'être ajustée par une fonction biexponentielle. On en extrait deux valeurs de  $\tau$ . En effet elle possède une première exponentielle rapide notée  $\tau_{\text{glycine}}$ , liée à l'activation des GlyR et une seconde beaucoup plus lente notée  $\tau_{\text{GABA}}$  correspondant à l'activation des GABA<sub>A</sub>R (Mitchell *et al.*, 2007). La fréquence des CPSI mixtes est plus faible que celle des courants synaptiques GABAergiques et glycinergiques. Elle subit aussi une maturation dans les cornes dorsales au cours du développement de l'animal : jusqu'à la seconde semaine postnatale, elle est de l'ordre de 20% puis diminue jusqu'à disparaître aux alentours de la troisième semaine postnatale (Keller *et al.*, 2001).

### II. 5. e. La transmission extra-synaptique

La transmission extra-synaptique a été démontrée pour plusieurs neurotransmetteurs notamment le glutamate (LoTurco et al., 1990; Sah et al., 1989), la glycine (Takazawa & MacDermott, 2010) et le GABA (Ataka & Gu, 2006; Bonin et al., 2011; Maeda et al., 2010; Takahashi et al., 2006) dans les cornes dorsales de la moelle épinière. Pour les deux derniers, on retrouve donc un courant tonique inhibiteur dans le réseau neuronal de la lamina II de la moelle épinière.

Certaines sous-unités du récepteur GABA<sub>A</sub> sont spécifiques d'une localisation extra-synaptique :  $\alpha_1$ ,  $\alpha_4$ ,  $\alpha_5$ ,  $\alpha_6$  et  $\delta$ . Les combinaisons les plus retrouvées dans le SNC sont  $\alpha_4\beta\chi\delta$ ,  $\alpha_5\beta_3\gamma_2/3$ ,  $\alpha_6\beta_2/3\delta$ ,  $\alpha_1\beta_2\gamma_2$ , bien que de

manière générale la sous-unité  $\gamma 2$  soit associée à une localisation synaptique. Dans la moelle épinière, peu d'études ont pu mettre en évidence la présence de certains types de sous-unités spécifiques. Toutefois, la sous-unité  $\delta$  se trouve dans la moelle épinière (Ataka & Gu, 2006; Peng et al., 2009; Bonin et al., 2011). La présence d'ARNm pour les sous-unités  $\alpha 4$  et  $\alpha 5$  a aussi été démontrée suggérant leur implication dans le courant GABAergique extra-synaptique (Takahashi *et al.*, 2006).

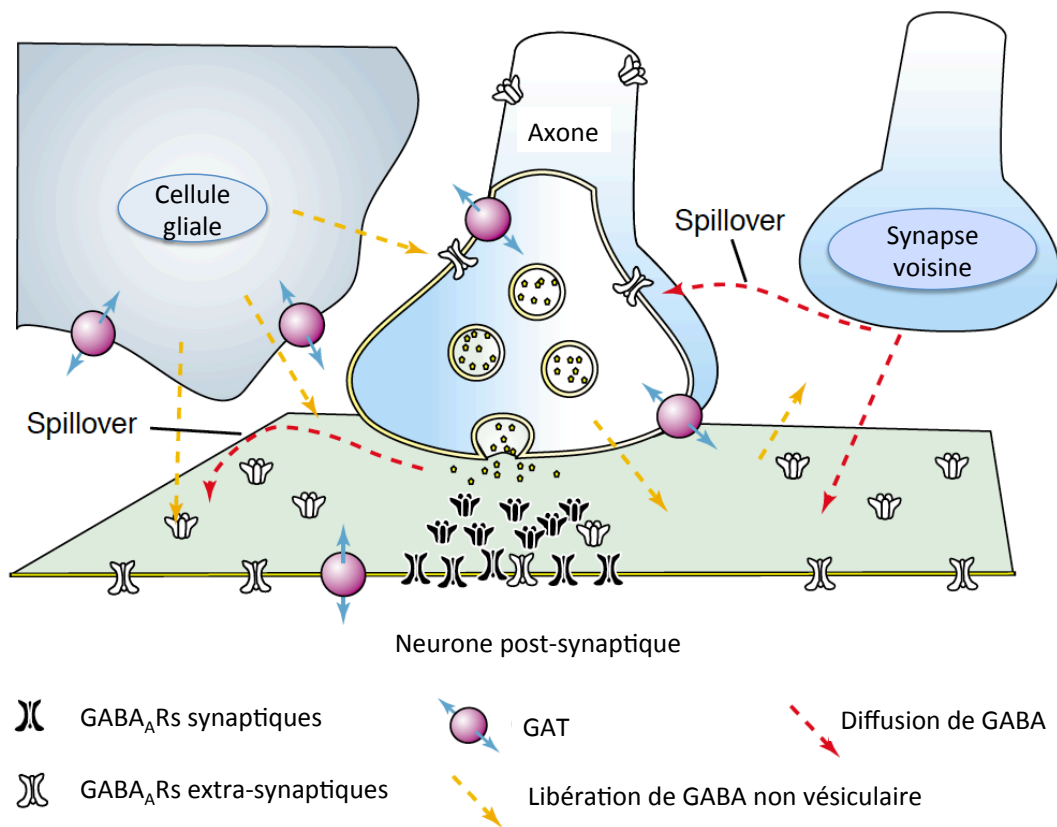
Les GABA<sub>A</sub>R extra-synaptiques sont perméables aux ions chlorures et leur activation provoque une hyperpolarisation dans les neurones de la lamina II mature. Le courant tonique induit par l'activité de ces récepteurs dépend de la concentration ambiante (extracellulaire) de GABA. Lorsque la concentration extracellulaire est suffisante pour activer les récepteurs extra-synaptiques, le courant tonique basal peut être révélé en utilisant les antagonistes du GABA<sub>A</sub>R comme la BIC, la picrotoxine ou la GBZ qui en bloquant les récepteurs synaptiques et extra-synaptiques actifs diminuent la conductance de la cellule. La GBZ a cette particularité de ne bloquer que les courants phasiques lorsqu'elle est appliquée à une concentration inférieure au micromolaire (Nusser & Mody, 2002). Le THIP (4,5,6,7-tetrahydroisoxazolo(5,4-c)pyridin-3-ol) serait un agoniste spécifique des GABA<sub>A</sub>R contenant la sous-unité  $\delta$  ( $\delta$ GABA<sub>A</sub>R) à faible concentration et de tous les récepteurs extra-synaptiques lorsqu'il est utilisé à haute concentration (Bonin *et al.*, 2011).

Alors que dans la transmission synaptique les concentrations de GABA peuvent atteindre plusieurs centaines de millimolaires à proximité des récepteurs, il s'avère que dans l'espace extra-synaptique la concentration ambiante de GABA serait beaucoup moins importante : de 0,5 à 1  $\mu$ M. Cette concentration très faible ne pourra activer que des récepteurs à haute affinité qui ne désensibilisent que très peu ou pas du tout. Dans la lamina II cette concentration est suffisante pour activer de manière constante les récepteurs extra-synaptiques. Le fait de pouvoir augmenter la conductance de ce courant en augmentant le GABA dans l'espace extra-synaptique (Bonin *et al.*, 2011) implique que la faible concentration ambiante ne sature pas les récepteurs et

leur confère une grande marge d'activité. L'amplitude du courant tonique dépend donc directement de la concentration en GABA. Beaucoup de travaux se sont intéressés à la source de ce GABA ambiant, ciblant le débordement (ou « spillover ») du GABA hors de la fente synaptique comme source majeure (Isaacson, 2000; Mitchell & Silver, 2000; Wei et al., 2003; Figure 17). En effet, suite à une augmentation de fréquence des CPSI GABAergiques, la synapse saturerait (récepteurs et systèmes de recapture) et le GABA sortirait de la fente synaptique jusque dans le milieu extra-synaptique où il activerait les récepteurs qui s'y trouvent. D'autres sources non synaptiques de GABA ambiant ont aussi été discutées dans la littérature comme le fonctionnement inverse des transporteurs de recapture GAT (GABA transporter) libérant du GABA depuis les neurones ou les cellules gliales dans le milieu extracellulaire. Cela a été montré faisant intervenir les transporteurs membranaires GAT-2 et GAT-3 astrocytaires (Heja *et al.*, 2012). Cependant plusieurs études ont montré qu'en bloquant spécifiquement le transporteur GAT l'amplitude du courant tonique augmentait (Mitchell *et al.*, 2007), indiquant que ce mode de libération n'est pas responsable de la présence de GABA dans l'espace extracellulaire (Nusser & Mody, 2002).

Dans certaines structures supraspinales, des études ont démontré une maturation de ce courant tonique. Dans les cellules granulaires du cervelet, ce courant extra-synaptique augmente avec la maturation (Brickley *et al.*, 1996). Alors que dans l'hippocampe le courant extra-synaptique est très présent dans le système immature et absent chez le rat adulte (Demarque *et al.*, 2002). Dans la moelle épinière aucune donnée n'est disponible à ce jour.

Le courant tonique peut aussi être modulé par les neurostéroïdes (Brown *et al.*, 2002; Vicini *et al.*, 2002; Ferando & Mody, 2012) comme le THDOC qui est un modulateur allostérique positif des GABA<sub>A</sub>R. Cependant l'action modulatrice du récepteur implique qu'il y ait une activité basale. Il a été montré que le  $\delta$ GABA<sub>A</sub>R est sensible au THDOC qui augmente l'amplitude du courant tonique. Cet effet est inexistant chez les souris KO  $\delta$  -/- (Lambert *et al.*, 2003a; Stell *et al.*, 2003; Herd *et al.*, 2007).



**Figure 17 :** La transmission extra-synaptique et le spillover

Les sources de GABA extra-synaptiques peuvent être multiples, mais certaines études ciblent le débordement synaptique (ou spillover) comme source principale de GABA ambiant. Lorsqu'une synapse a une grande fréquence de libération, il arrive que le neurotransmetteur (dans ce cas, le GABA) sature la fente synaptique, les récepteurs et les systèmes de recapture GAT. Dans ces conditions le GABA va sortir de la synapse et va pouvoir activer les récepteurs se trouvant en dehors de la synapse : les GABA<sub>A</sub>R extra-synaptiques. Il est aussi possible que la source de GABA ambiant provienne d'une libération non vésiculaire de la part des neurones ou des cellules gliales, mais ce dernier mode de libération est encore en discussion dans la littérature, tout comme le fonctionnement inverse des transporteurs membranaires neuronaux et gliaux GAT (d'après Semyanov et al, 2004).

Ce courant tonique GABAergique découvert récemment est encore mal connu dans son ensemble mais les auteurs s'accordent à lui donner une importance capitale car il est beaucoup plus important que le courant GABAergique synaptique en terme de conductance (Semyanov et al., 2004). De plus il a un impact sur l'excitabilité neuronale d'un réseau, conférant au courant tonique GABAergique un rôle de filtre à information, afin de sélectionner de manière spécifique l'information nécessaire dans une condition donnée.

La transmission extra-synaptique a une moins bonne résolution temporelle que la transmission synaptique qui dépend de l'arrangement spatial de l'espace extra-synaptique et de la présence de systèmes de recapture du neurotransmetteur. La définition spatiale est diffuse puisque le domaine d'action des neurotransmetteurs sur leurs récepteurs est beaucoup plus large. Ces paramètres soulignent une activation qui peut être paracrine ou autocrine somatique, dendritique ou axonale.

### **II. 5. f. Équilibre spinal entre excitation et inhibition**

La neurotransmission dans les couches superficielles est donc duale faisant intervenir des interneurons excitateurs et inhibiteurs pour moduler la transmission de l'information depuis les afférences primaires vers les NP. On parle d'équilibre entre excitation et inhibition.

Si cet équilibre est déplacé en faveur de l'excitation dans le réseau des couches superficielles naîtra une hypersensibilité caractéristique des douleur pathologiques comme les phénomènes d'allodynie (lorsqu'une stimulation non nociceptive le devient) ou l'hyperalgésie (lorsqu'une réponse est exagérée suite à un stimulus nociceptif) et ces mêmes symptômes apparaissent dans le cas d'une baisse de l'inhibition spinale (Yaksh, 1989). L'augmentation de la transmission inhibitrice par contre, ou la diminution de la transmission excitatrice dans les cornes dorsales est donc directement corrélée avec les phénomènes d'analgésie. Cette régulation fine peut donc être perturbée de



manière pathologique dans le cas de neuropathie ou d'inflammation par exemple donnant lieu aux phénomènes d'allodynie ou d'hyperalgésie. Pour cela les cornes dorsales de la moelle épinière sont une cible centrale pour lutter contre la douleur en clinique.

## II. 6. Les contrôles descendants

Les centres supra-spinaux peuvent projeter sur les cornes dorsales de la moelle épinière et moduler la transmission synaptique et l'excitabilité du réseau. Leurs actions de modulation de l'information nociceptive peuvent cibler plusieurs populations neuronales au sein des cornes dorsales : (1) les neurones de projection, (2) les afférences sensorielles primaires et (3) des interneurons (excitateurs ou inhibiteurs).

Ces contrôles descendants sont de plusieurs types, et caractérisés par les neurotransmetteurs libérés dans les cornes dorsales. On retrouvera entre autres un contrôle noradrénergique, sérotoninergique et un contrôle plus diffus faisant intervenir le GABA et la glycine (Millan, 2002). Il s'agit d'un système très complexe faisant intervenir plusieurs voies, neurotransmetteurs et autres neuromodulateurs ainsi que nombre de leurs récepteurs pouvant avoir des effets variables sur l'excitabilité du réseau spinal. Ces contrôles descendant peuvent ainsi faciliter la transmission de l'information nociceptive spinale (CDF pour contrôles descendants facilitateurs) ou l'inhiber (CDI) en fonction du récepteur et de la cible dans les cornes dorsales de la moelle épinière.

La sérotonine (5-HT) comme la NAd provenant respectivement du bulbe rostro-ventro-médian (RVM) et du Locus Cœruleus peuvent avoir des actions inhibitrices sur la transmission nociceptive spinale ou bien excitatrices en fonction du récepteur présent dans la moelle et de sa localisation cellulaire dans le réseau des cornes dorsales. Ces deux structures sont donc impliquées aussi bien dans les phénomènes d'analgésie que d'allodynie et / ou d'hyperalgésie

L'hypothalamus joue un rôle central dans la coordination des contrôles descendants. Il contacte la PAG et de la RVM qui sont à la base des contrôles descendants sérotoninergiques. La stimulation de la RVM produit une forte analgésie et atténue les comportements liés à la douleur (Fields et al., 1977). Cependant, plusieurs hypothèses avancent que la 5-HT ne serait pas le seul acteur de ce contrôle descendant émanant de cette structure, mais que d'autres neurotransmetteurs et neuromodulateurs pourraient être impliqués dans les mécanismes d'inhibition induits. L'ocytocine par exemple peut être libérée dans la moelle épinière depuis le PVN thalamique produisant une analgésie suite à son action spinale (Breton *et al.*, 2008).

Le GABA provenant du noyau réticulaire gigantocellulaire et du raphé magnus peut être libéré au niveau spinal (McGowan & Hammond, 1993; Sorkin et al., 1993). Ces résultats ont été corroborés par Antal et collaborateurs montrant que majoritairement le GABA mais aussi la glycine ont une action dans la moelle épinière suite à l'activation de la RVM, participant ainsi au contrôle de l'excitabilité du réseau dans les cornes dorsales (Antal *et al.*, 1996).

D'autres systèmes contrôlant l'excitabilité dans les cornes dorsales sont moins caractérisés tout comme le DNIC (diffuse noxious inhibitory controls). Il s'agit d'une inhibition de l'excitabilité des neurones des couches superficielles de la moelle épinière suite à une stimulation nociceptive hors du champ récepteur de ces mêmes neurones. Ce contrôle activé uniquement par les afférences primaires nociceptives impliquerait le sous-noyau reticularis dorsalis dans une boucle spino-bulbo-spinale inhibitrice (Le Bars et al., 1992).

Des peptides provenant de projections supraspinales peuvent jouer un rôle de neuromodulation dans les cornes dorsales. Les peptides opioïdes (dynorphine, enképhalines, endomorphine) ont des actions majoritairement anti-nociceptives dans les cornes dorsales *via* leurs récepteurs de type  $\mu$ ,  $\delta$  et  $\kappa$  (Dickenson, 1995). La cholecystokinine (CCK) est un autre peptide exerçant une

action pronociceptive via ses RCPG  $CCK_1$  et  $CCK_2$ . Elle provient majoritairement des neurones de la moelle épinière dorsale mais un contingent de fibres provenant de la RVM et de la PAG peut en libérer au niveau des cornes dorsales, participant à la facilitation de la transmission de l'information nociceptive. Cette facilitation fait aussi intervenir d'autres peptides comme la neurotensine ou la galanine. Le premier proviendrait de la RVM tandis que la galanine du noyau du tractus solitaire et du NPB. Alors que la neurotensine aurait une action pronociceptive, la galanine peut avoir une action facilitatrice ou inhibitrice sur la nociception en fonction du récepteur sur lequel elle va agir (Millan, 2002).

### III. STÉROÏDES ET DOULEUR

En plus de leurs effets physiologiques « classiques », les stéroïdes peuvent avoir différents effets centraux, génomiques et non génomiques dont des effets allostériques. Les enzymes permettant la synthèse des stéroïdes sont présentes dans les afférences primaires, les cornes dorsales de la moelle épinière, le TC, le thalamus, l'amygdale et le cortex, leur suggérant un rôle dans la nociception et la douleur en condition physiologique et / ou pathologiques (Keller & Poisbeau, 2009).

#### III. 1. Stéroïdes et système nerveux central

Les stéroïdes comme les GC sont majoritairement produits en périphérie dans les glandes stéroïdogènes, cependant leur nature lipophile leur permet d'atteindre le SNC en traversant la BHE. De plus, ces mêmes stéroïdes peuvent être synthétisés par les cellules du SNC à partir de l'importation du cholestérol dans la mitochondrie et en l'absence de tout précurseur périphérique (Compagnone & Mellon, 2000; Mellon et al., 2001). On parle alors de neurostéroïdes. Ainsi les stéroïdes comme la progestérone, la testostérone, l'estradiol 17 $\beta$  (17 $\beta$ E), la prégénolone (PREG) au même titre que la CORT peuvent être synthétisés *de novo* dans le SNC.

Les GC peuvent être synthétisés dans les cornes dorsales de la moelle épinière car toutes les enzymes sont présentes et fonctionnelles (Patte-mensah et al., 2006; Keller & Poisbeau, 2009).

Les neurostéroïdes tout comme les stéroïdes circulants (ou plasmatiques) peuvent subir une réduction faisant intervenir deux enzymes : la 5 $\alpha$ -réductase et la 3 $\alpha$ -déshydrogénase. Elles sont retrouvées dans les cornes dorsales de la moelle épinière et permettent la production de composés réduits

au niveau des positions  $3\alpha$  et en  $5\alpha$  qui sont neuroactifs comme le THDOC ou l'alloprégnanone (Patte-Mensah et al., 2004).

La production des GC en périphérie suit une maturation postnatale : leur production est très faible au cours des deux premières semaines postnatales, une période connue sous le nom de SHRP. Il a été montré que la production spinale de stéroïdes réduits en  $5\alpha$  suit aussi une maturation. En effet, il existe un tonus de stéroïdes  $5\alpha$ -réduits dans les cornes dorsales de la moelle épinière qui diminue jusqu'à disparaître au bout de la troisième semaine postnatale (Keller *et al.*, 2004).

### **III. 2. Stéroïdes et douleur**

L'IASP (Association Internationale pour l'Étude de la Douleur) définit la douleur comme « Une expérience sensorielle et émotionnelle désagréable associée à un dommage tissulaire existant ou potentiel ou décrite en terme d'un tel dommage ».

Il existe plusieurs types de douleur. La douleur aiguë prévient l'organisme d'un danger, d'une menace pouvant être dommageable. Dans ce cas la douleur est un signal d'alarme nécessaire à l'organisme. Cependant la douleur peut devenir chronique, et donc pathologique. Les deux formes de douleurs chroniques connues à ce jour sont la douleur inflammatoire et la douleur neuropathique.

#### **III. 2. a. Douleur inflammatoire et stéroïdes**

La douleur inflammatoire est caractérisée par une augmentation de la sensibilité mécanique et thermique du tissu affecté. Les différents médiateurs de l'inflammation contribuent au développement de mécanismes comme

l'hyperalgésie caractérisé par une hyperexcitabilité des afférences primaires ou par la sensibilisation centrale par les cytokines comme l'IL-1 $\beta$  et le TNF (tumor necrosis factor) qui réduisent les seuils nociceptifs après une injection intraplantaire (Cunha *et al.*, 1992). Les GC induisent la répression des différents facteurs inflammatoires comme les cytokines diminuant ainsi la douleur liée à l'inflammation.

La douleur neuropathique survient après une lésion ou inflammation des nerfs périphériques ou de partie du SNC. Dans ces conditions les axones des afférences primaires vont être sensibilisés induisant une hyperexcitabilité dans les cornes dorsales qui se traduit par une décharge ectopique. Dans ce cas, une augmentation des cytokines pro-inflammatoires a lieu et l'inhibition de leur production par les GC permet une diminution de l'hyperalgésie induite (Uçeyler *et al.*, 2010). Ces corticostéroïdes peuvent aussi inhiber l'initiation de la douleur neuropathique pendant la phase inflammatoire, ou diminuer cette douleur par des mécanismes rapides et directs indépendants des effets anti-inflammatoires (Devor *et al.*, 1985). Les GR sont surexprimés après l'induction d'une douleur neuropathique chez le rat et répriment l'expression du transporteur neuronal au glutamate EAAT<sub>3</sub> (excitatory amino-acid transporter) dans la moelle épinière après sept jours, contribuant ainsi à la diminution de l'excitabilité du réseau spinal (Wang *et al.*, 2006).

### III. 2. b. Modulation de la neurotransmission spinale

Parmi les modes d'action non génomiques des GC, il a été montré de nombreuses interactions avec la neurotransmission (voir chapitre I. 2. c.). Et donc la modulation de la neurotransmission peut avoir un impact sur l'équilibre entre excitation et inhibition dans les cornes dorsales de la moelle épinière. Les conséquences d'un tel déséquilibre peuvent avoir un impact considérable sur la sensibilité nociceptive (Yaksh, 1989). Pour ces raisons, la

majorité des études en relation avec la nociception focalisant sur une modulation de la transmission neuronale spinale dans les cornes dorsales mettent en avant une réduction de l'excitabilité de ce réseau comme un mécanisme anti-nociceptif. De la même manière, une augmentation de l'inhibition peut être suffisante pour avoir des effets analgésiques.

#### *Modulation de la transmission glutamatergique*

Les stéroïdes sont connus pour moduler les récepteurs ionotropiques du glutamate soit par un mécanisme direct : allostérique, soit par un mécanisme indirect en faisant intervenir le récepteur  $\sigma$ , ou encore par des mécanismes de phosphorylation. Le récepteur  $\sigma_1$  est dit orphelin car on ne lui connaît pas encore de ligand endogène. Il est cependant très exprimé dans le SNC (et présent dans la moelle épinière dorsale Alonso et al., 2000; Roh et al., 2008) et il est sensible à une neuromodulation portée par certains composés stéroïdiens.

La prégnénolone sulfate (PREG-S) est un modulateur allostérique positif des GluN (Wu *et al.*, 1991). Cet effet peut être direct, donc allostérique induisant une augmentation de la probabilité d'ouverture du canal (Ceccon *et al.*, 2001), mais il a été montré que l'effet potentialisateur de la PREG-S peut faire intervenir le récepteur  $\sigma_1$  (Bergeron *et al.*, 1996).

Les effets de stéroïdes sur les récepteurs GluA et GluK sont très peu documentés. Néanmoins, une étude récente a mis en évidence deux sites de fixation aux stéroïdes sur les récepteurs GluA suggérant une interaction allostérique sur le récepteur (Cameron *et al.*, 2012).

#### *Modulation de la transmission glycinergique*

Les effets de stéroïdes sur les GlyR sont encore très peu documentés. Cependant Wu et collaborateurs (1990) ont montré que la progestérone

diminue le courant induit par une application exogène de glycine sur des neurones spinaux en culture. La même observation a été réalisée par Jiang et collaborateurs (2006) suite à l'application de PREG sur des neurones de corne dorsale de moelle épinière. De plus, la PREG diminue aussi l'amplitude et la fréquence des CPSI glycinergiques. Ces mêmes auteurs ont montré que l'application de l'isomère 5 $\alpha$ -réduit de la PREG, l'allopregnanolone potentialise les courants glycinergiques dans les cornes dorsales suggérant une modulation de la transmission de l'information nociceptive.

Ces résultats ont été corroborés par Charlet et collaborateurs (2008) qui montrent qu'une injection intratécale d'allopregnanolone suite à une allodynie induite par la bicuculline provoque une proalgie transitoire chez le rat.

### *Modulation de la transmission GABAergique*

#### *Transmission GABAergique synaptique*

Les composés stéroïdes 5 $\alpha$ -réduits ont une forte activité de modulation de la transmission synaptique GABAergique comme l'allopregnanolone ou la tétrahydroxydeoxycorticostérone (THDOC), dérivé glucocorticoïde réduit. Ils agissent comme des modulateurs allostériques positifs et augmentent le temps d'ouverture du canal, potentialisant la transmission inhibitrice GABAergique (Schlichter et al., 2006; Strömberg et al., 2005). Les stéroïdes 5 $\alpha$ -réduits potentialisent les GABA<sub>A</sub>R via deux sites intermembranaire sur le récepteur (Hosie et al., 2006, 2007). Cela aura un impact significatif sur la transmission synaptique GABAergique, en ralentissant la cinétique de désactivation ce qui a pour effet de prolonger l'action du courant (Twyman & Macdonald, 1992).

L'évolution postnatale du tonus spinal en stéroïdes 5 $\alpha$ -réduits a un impact direct sur la cinétique des CPSI GABAergiques dans les cornes dorsales de la moelle épinière (Keller et al., 2004). Lorsque le tonus en stéroïdes 5 $\alpha$ -réduits est élevé, la constante de désactivation des CPSI GABAergiques est



grande. Cette dernière diminue en parallèle de la diminution du tonus pendant les trois premières semaines postnatales avant de se stabiliser après 21 jours. Dans le système spinal mature cette cinétique peut toujours être modulée par ces mêmes stéroïdes 5 $\alpha$ -réduits lors d'applications exogènes ou lors de leur surexpression dans le cas de douleur chronique (Poisbeau *et al.*, 2005).

#### *Transmission GABAergique extra-synaptique*

L'action de modulation allostérique des stéroïdes 5 $\alpha$ -réduits est bien connue et documentée sur les GABA<sub>A</sub>R synaptiques. D'autres travaux mettent en évidence son impact sur les GABA<sub>A</sub>R extra-synaptiques. Il a été montré que l'action de modulation allostérique du THDOC impacte aussi les  $\delta$ GABA<sub>A</sub>R extra-synaptiques (Brown *et al.*, 2002; Yamada *et al.*, 2007; Maguire & Mody, 2009).

Une augmentation de conductance chlorure peut être enregistrée après application de THDOC sur les neurones de l'hippocampe sur une souris « wild type », mais pas chez la souris ayant un KO du gène codant pour le  $\delta$ GABA<sub>A</sub>R,  $\delta(-/-)$  (Mihalek *et al.*, 1999). L'effet modulateur des stéroïdes 5 $\alpha$ -réduits sur les récepteurs GABA extra-synaptiques renforce ainsi la conductance chlorure membranaire et donc l'inhibition du neurone ce qui induira la baisse de l'excitabilité neuronale (Lambert *et al.*, 2003).

Dans la lamina II de la moelle épinière, il a été montré qu'une augmentation du courant GABAergique extra-synaptique diminue l'excitabilité du réseau neuronal inhibant la transmission de l'information nociceptive chez la souris (Bonin *et al.*, 2011). Il y a donc une action synergique sur les différents GABA<sub>A</sub>R synaptiques et extra-synaptiques. L'action des stéroïdes 5 $\alpha$ -réduits sur ces deux types de récepteurs augmente l'inhibition générale dans les cornes dorsales de la moelle épinière, et diminue les symptômes douloureux (Schlichter *et al.*, 2006).

### *Modulation de l'excitabilité neuronale*

Les stéroïdes peuvent avoir des effets sur les canaux voltages dépendants. Ces canaux influencent directement l'excitabilité neuronale et donc la transmission de l'information.

Les stéroïdes peuvent agir sur l'excitabilité neuronale en modulant les canaux ioniques voltages dépendants. La PREG, la PREG-S ainsi que les GC comme la CORT, le cortisol et le THDOC inhibent les courant calciques voltages dépendants dans la CA<sub>1</sub> par l'activation d'un RCPG activant la protéine kinase C (PKC ; Ffrench-Mullen et al., 1994). Ces canaux calciques sont des acteurs clés du couplage pré-synaptique entre excitation et libération vésiculaire de neurotransmetteurs.

Les canaux potassiques à rectification entrante ont un rôle inhibiteur participant à l'inhibition des récepteurs métabotropiques comme le GABA<sub>B</sub>R. Le 17βE diminue la réponse induite par l'agoniste du GABA<sub>B</sub>R et induit son action par l'activation d'un récepteur membranaire qui active la phospholypase C (Schlichter et al., 2006).

### **III. 3. Glucocorticoïdes et douleur**

En 1927 Cashin et Moravek observaient un effet anesthésique d'une injection intraveineuse de cholestérol (Cashin & Moravek, 1927) . En 1942, il a été montré que la deoxycorticostérone pouvait avoir des effets sédatifs et anesthésiques chez le rat (Selye & Masson, 1942). Plus récemment les effets analgésiques des GC sont démontrés (Yarushkina *et al.*, 2011). Aujourd'hui les GC sont largement utilisés à des fins thérapeutiques non seulement pour leurs propriétés anti-inflammatoires mais aussi contre la douleur.

Les GC et leurs composés réduits (THDOC) sont largement impliqués dans la modulation de la transmission GABAergique spinale. Cette modulation fait varier l'équilibre excitation / inhibition en faveur de cette dernière, limitant la transmission de l'information nociceptive. D'autres études ont mis en avant une implication des GC dans la douleur

Le stress aigu a un effet analgésique faisant intervenir les centres supraspinaux *via* des mécanismes complexes et connus sous le nom de SIA, pour « stress induced analgesia » (Madden et al., 1977; Willer et al., 1981; Butler & Finn, 2009; Yilmaz et al., 2010).

Les effets du stress chronique sont encore controversés : certains auteurs mesurent une hyperalgésie après un stress chronique (Gamaro *et al.*, 1998) alors que d'autres une analgésie (Clark et al., 1986). Pinto-Ribeiro et collaborateurs ont observé une hausse du taux plasmatique de GC tout au long d'une l'expérience d'induction de stress chronique chez le rat et ont impliqué ces GC dans l'analgésie mesurée (Pinto-Ribeiro *et al.*, 2004).

À l'étage spinal, les GR montrent une colocalisation immunohistochimique avec des marqueurs spécifique des fibres nociceptives : les peptides CGRP et SP au niveau des ganglions rachidiens dorsaux (DRG) dans les corps cellulaires des afférences primaires (DeLeón *et al.*, 1994). Une surrénalectomie produit une augmentation du nombre de cellules exprimant la SP, montrant un rôle inhibiteur des GC sur son expression dans les DRG (Coveñas *et al.*, 1994). Par ailleurs des rats traités avec de la CORT montrent une diminution du nombre d'afférences sensorielles primaires exprimant le peptide CGRP après 21 jours et une augmentation de l'expression du GABA<sub>B</sub>R dans les laminae I et II de la moelle épinière. De plus ces rats montrent une diminution du comportement nociceptif (Pinto-Ribeiro et al., 2009). Ces résultats confirment que les GC peuvent moduler la transmission de l'information nociceptive en inhibant l'expression de facteurs pro-nociceptifs tels que le CGRP et la SP et en induisant l'expression de facteurs anti-

nociceptifs tels que le GABA<sub>B</sub>R directement dans les couches superficielles de la moelle épinière.

## OBJECTIFS DE LA THESE

L'objectif de ces travaux, était d'étudier afin de caractériser l'influence des GC plasmatiques sur (1) la maturation de la transmission inhibitrice dans la lamina II et sur (2) son fonctionnement dans le système spinal mature ainsi que (3) ses conséquences fonctionnelles sur la transmission de l'information nociceptive et finalement sur (4) la sensibilité mécanique nociceptive.

Pour cela, nous avons utilisé un modèle animal qui se décline en trois souches de rats ayant une différence de réactivité de l'axe HPA et qui présentent des taux plasmatiques différents en GC. La souche FIS est hypercorticolémique, la souche LEW est hypocorticolémique et ces deux souches ont été comparées entre elles mais aussi à notre contrôle représenté par la souche Sprague-Dawley.

Une première série d'expériences en utilisant la technique d'enregistrement électrophysiologique *in vitro* sur tranches nous a permis de caractériser l'évolution postnatale de la transmission inhibitrice GABAergique synaptique et extra-synaptique, et de la mettre en relation avec la présence périphérique et spinale de stéroïdes.

Toujours en utilisant la technique électrophysiologique *in vitro*, nous avons dans un second temps caractérisé l'influence des taux plasmatiques de CORT sur l'inhibition GABAergique spinale. Nous avons pu mettre en évidence de cette manière l'implication des stéroïdes réduits ainsi que des neurostéroïdes sur la modulation de cette transmission.

Cette étude a été complétée par des expériences d'enregistrements extracellulaires *in vivo* sur l'animal anesthésié nous permettant de caractériser l'influence de forts taux plasmatiques de CORT sur la transmission de l'information nociceptive. Ces expériences nous ont aussi permis de mettre en évidence l'influence des stéroïdes réduits sur ce paramètre.

Finalement une étude comportementale illustre les conséquences de ces modulations spinales de la transmission GABAergique et de la transmission de l'information nociceptive sur la sensibilité nociceptive mécanique.

L'ensemble de ces résultats contribue à une meilleure compréhension des effets des GC sur la transmission nociceptive non seulement dans le système spinal mature, mais aussi au cours de son développement ontogénétique sur la transmission GABAergique tant synaptique qu'extra-synaptique.

Ce travail de thèse s'inscrit également dans le cadre d'un transfert de technologie entre l'Université de Strasbourg et l'Université du Luxembourg au sein de laquelle j'ai été chargé de mettre en place l'ensemble des éléments d'un laboratoire d'électrophysiologie *in vitro* de patch clamp. Ce transfert de technologie qui a été mené à bien sera présenté dans une partie spécifique du Matériel et Méthodes.

# MATERIEL ET METHODES

## I. ANIMAUX

Les rats des trois souches utilisées : Lewis (LEW), Fischer (FIS) et Sprague-Dawley (SD). Ils ont été élevés au sein de l'animalerie de l'institut de physiologie et de chimie biologique (IPCB) à Strasbourg. La souche SD a aussi été élevée au sein du laboratoire de l'Université du Luxembourg : Integrative Research Unit on Social and Individual Development (INSIDE).

Dans les deux laboratoires, tous les rats ont été élevés à une température constante de  $21,9 \pm 1,5$  °C et une hygrométrie de  $55 \pm 5$  % avec eau et nourriture *ad libitum* et constamment soumis à une photopériode 12/12 de 07h à 19h.

Pour les différentes expériences, les animaux ont été utilisés entre 08h00 et 10h00 du matin afin d'éviter toute incidence de la production endogène de glucocorticoïdes, les expériences étant réalisées au nadir de cette production. Les animaux utilisés étaient âgés de 8 à 30 jours (P8 - P30).

Les expérimentations ont toutes été effectuées en regard de la législation européenne directive 2010/63/4E du 22 septembre 2010 et du décret 2013-118 du 1<sup>er</sup> février 2013. Certificat d'autorisation d'expérimentation PaD B67-304 VZ formation ED.

## II. ENREGISTREMENTS ELECTROPHYSIOLOGIQUES *IN VITRO*

Nous avons utilisé la technique d'enregistrement électrophysiologique *in vitro* en patch clamp afin de mesurer les courants membranaires. L'activation de canaux ioniques induit une augmentation de la conductance du neurone (donc une baisse de la résistance) qui est directement corrélée au courant qui traverse le canal à cause du transfert de charges électriques portées par les ions. L'enregistrement de ces courants est rendu possible en imposant électroniquement le potentiel à la cellule enregistrée avec cette technique du patch clamp.

Le patch clamp peut prendre différentes configurations d'enregistrement de la cellule. Dans notre cas, tous les enregistrements ont été effectués en configuration cellule entière. C'est à dire que le patch de membrane est rompu induisant une dialyse de l'intérieur de la cellule avant les enregistrements. Dans la configuration utilisée : la configuration cellule entière, c'est l'ensemble des courants membranaires du neurone enregistré qui sont enregistrés. Cependant en jouant sur le potentiel d'inversion des différents ions et le potentiel de maintien il nous sera possible de sélectionner électriquement les courants excitateurs des courants inhibiteurs. Ces courants peuvent être synaptiques et extra-synaptiques.

### II. 1. Préparation des tranches

#### II. 1. a. Solutions

Le prélèvement de la moelle épinière s'effectue par extrusion hydraulique. Pour cela différentes solutions adaptées sont utilisées pour les enregistrements et pour la préparation des tranches. Les enregistrements



s'effectuent dans un liquide cérébrospinal artificiel préparé (LCSA, voir composition dans le tableau 2) assurant une survie optimale des neurones grâce au glucose et au saccharose ainsi qu'à un apport en O<sub>2</sub> par un bullage constant avec du carbogène : 5% CO<sub>2</sub> – 95% O<sub>2</sub>. De plus celui-ci permet un équilibre chimique avec les ions bicarbonates assurant le maintien du pH par action tampon. Les ions présents dans la solution respectent les proportions retrouvées chez le rat *in vivo* et assurent le maintien de l'homéostasie des neurones et des cellules gliales.

Pour le prélèvement de la moelle épinière une solution modifiée de LCSA est utilisée dans laquelle les ions NaCl ont été remplacés par du saccharose (LCSAs, voir composition dans le tableau 2). L'intérêt de cette solution est de diminuer au maximum l'excitabilité du réseau spinal lors de l'extrusion et de la coupe des tranches. En effet cette excitabilité peut augmenter très fortement suite à l'extrusion de la moelle et la coupe des tranches et engendrer la mort cellulaire par excitotoxicité, ce que l'on cherche à minimiser. En plus de cela la solution est refroidie à 4 °C pour d'empêcher la genèse de PA et la libération de NT.

**Tableau 2** : Composition du LCSA et LCSAs en mM

	LCSA	LCSAs
NaCl	126	-
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,25	-
KCl	2,5	2
CaCl <sub>2</sub>	2	2
MgCl <sub>2</sub>	2	-
MgSO <sub>4</sub>	-	1,3
NaHCO <sub>3</sub>	26	26
Glucose	10	11
Saccharose	-	248

**II. 1. b. Extrusion de la moelle épinière**

Pour la préparation des tranches de moelle épinière, les animaux sont anesthésiés avec une injection intra-péritonéale (i.p.) de kétamine (Imalgène® Merial France, 75 mg/kg). La kétamine est un antagoniste des récepteurs GluN et son action anesthésique est systématiquement vérifiée par une aréflexie de retrait de la patte par un pincement. Après l'anesthésie, les rats sont décapités puis placés sur une planche de dissection. Une incision rostro-caudale de la peau du dos avec un scalpel permet de dégager la colonne vertébrale entre les niveaux sacré et cervical. À l'aide d'une paire de ciseaux deux sections au niveau sacré et cervical permettent de sélectionner la zone lombaire d'intérêt. L'extrusion de la moelle épinière s'effectue à l'aide d'une seringue de 20 mL contenant du LCSAs à 4 °C. Un cône de pipettmann de 200 µL placé à l'extrémité de cette seringue sera inséré dans le canal rachidien au niveau sacré. L'injection de LCSAs dans le canal rachidien induit l'extrusion par pression hydraulique de la moelle épinière du côté cervical. La moelle est directement récupérée puis placée dans le LCSAs à 4 °C maintenu dans la glace. Le retrait des méninges s'effectue à l'aide de deux pinces à dissection fines.

**II. 1. c. Section des tranches de moelle épinière**

Les tranches de moelle épinière sont réalisées à l'aide d'un vibratome (Leica VT 1000 / Leica VT 1200 S). Afin d'obtenir des tranches transversales de tissus, la moelle doit être placée à 90° de la lame. Pour cela elle est incluse dans un bloc d'agarose (5%, Euromedex). Un sillon sera taillé dans le bloc d'agar afin de maintenir fermement la moelle épinière mais sans l'écraser. Le cube d'agarose est ensuite collé avec de la superglue sur la platine du vibratome. Cette dernière est rapidement déposée dans la cuve du vibratome contenant du LCSAs à 4 °C et toujours bullé avec du carbogène. Le tranchage du renflement lombaire est effectué à une vitesse de 200 µm/s avec une fréquence de vibration

de 20 Hz. L'épaisseur des tranches est de 600  $\mu\text{m}$ , permettant de conserver un large réseau de neurones. Les tranches sont récoltées dans une chambre contenant le LCSA à température ambiante constamment bullé avec un mélange de 95%  $\text{O}_2$  et 5%  $\text{CO}_2$ . Ces tranches sont conservées environ 1 h à température ambiante avant de débiter les enregistrements électrophysiologiques.

## II. 2. Enregistrements électrophysiologiques

### II. 2. a. Préparation des pipettes d'enregistrement

Les pipettes sont étirées le jour même des enregistrements à partir de capillaires de borosilicate. Leur diamètre externe est de 1,2 mm et le diamètre interne de 0,69 mm (Harvard Apparatus). Elles comprennent à l'intérieur un filament permettant un bon remplissage par le milieu intracellulaire par capillarité. La mise au point de l'étireuse (P-1000, Sutter Instruments) tient compte de plusieurs paramètres permettant d'optimiser la résistance finale, la longueur de la pointe et la forme plus ou moins effilée de la pipette.

Le principe général de l'étireuse est de faire chauffer un filament en forme de carré au milieu duquel se trouve le capillaire en verre maintenu fermement par deux pinces qui exercent une pression constante d'étirement pendant les cycles de chauffe. Les premiers cycles servent à mettre en forme la pointe de la pipette (effilement et formation de la pointe). Dans nos conditions ces deux paramètres doivent aboutir à un effilement assez long puisque les pipettes doivent pouvoir enregistrer un neurone situé très en profondeur dans la tranche sans abimer le réseau neuronal environnant. La dernière température appliquée dans le cycle sera responsable de la séparation du capillaire en deux pipettes d'enregistrement conférant à chaque pipette son diamètre d'ouverture et donc sa résistance. Les paramètres de température et de vitesse permettent une régulation très fine de cette valeur de résistance qui doit être comprise

entre 4 et 7 M $\Omega$  dans nos expériences. De plus, le nombre de cycles de chauffe doit être constant et leur durée stable pour éviter les variations de résistance.

### II. 2. b. Poste et chaîne de mesure

La technique du patch clamp en aveugle nécessite l'utilisation d'une loupe binoculaire afin de cibler la structure d'intérêt : la lamina II. De cette manière, les neurones enregistrés aléatoirement nous permettent d'avoir une réflexion sur l'ensemble de la structure plutôt qu'à une sous-population sélectionnée visuellement. La limite principale de cette technique est que l'on ne peut jamais connaître le type cellulaire enregistré au préalable, ni la condition de la cellule par une appréciation visuelle. L'approche de la tranche s'effectue grâce à un micromanipulateur (Leica Microsystems). Ce dernier permet de maintenir la pipette d'enregistrement à 90° au dessus de la tranche permettant une approche à la verticale. Ce micromanipulateur permet un déplacement dans les trois axes x, y et z ainsi que sur un axe de rotation afin de pouvoir cibler la zone d'intérêt avec précision. La chambre d'enregistrement est perfusée par le LCSA pendant la durée de l'expérience. Ce système de perfusion amène directement le LCSA dans la chambre d'enregistrement par une tubulure fine à un débit d'environ 2 mL/min.

Tout cet ensemble est placé sur une table anti-vibration afin d'éviter les interactions des vibrations environnantes lors de l'approche du neurone et pendant son enregistrement. La table est elle même comprise dans une cage de Faraday nous permettant de nous affranchir des bruits électriques environnants.

Le signal électrophysiologique enregistré est de l'ordre du picoampère (pA) ou du millivolt (mV), il est donc nécessaire de l'amplifier. Les données acquises par l'électrode d'enregistrement passent directement par un préamplificateur et sont envoyées à l'amplificateur (Axopatch 200B, Axon

Instruments) qui permet d'amplifier, de filtrer mais aussi d'imposer le potentiel au neurone enregistré. L'amplificateur permet aussi de compenser électroniquement les résistances et capacités en séries pouvant créer une distorsion du signal. Il permet finalement d'imposer le potentiel à la cellule afin d'enregistrer les courants, c'est le mode 'potentiel imposé', mais il peut aussi imposer un courant à la cellule permettant de mesurer ses variations de potentiel, avec le mode 'courant imposé'.

Les données analogiques récoltées nécessitent d'être numérisées afin d'être exploitables par le logiciel d'acquisition (pClamp 10, Molecular Devices). La numérisation des signaux digitaux s'effectue au niveau d'une carte d'acquisition externe (Digidata 1440A, Molecular Devices). Cette interface régit la communication entre l'ordinateur et son logiciel et l'amplificateur.

### II. 2. c. Solution intracellulaire et force efficace

Le milieu utilisé dans la pipette sera le milieu intracellulaire qui remplira le neurone enregistré après rupture de la membrane plasmique. Pour cela sa composition proche de la composition ionique du cytosol doit permettre d'enregistrer des courants synaptiques par échange d'ions avec le milieu extracellulaire (le LCSA) *via* les différents canaux de la cellule. Sa composition est donnée dans le tableau 3. L'osmolarité du milieu intracellulaire est mesurée et doit être égale à  $300 \pm 10$  mOsm. Si il y a un écart de cette valeur d'environ 15 %, l'osmolarité peut être ajustée par l'ajout de saccharose. Le pH est ajusté à 7,3 avec une solution de CsOH.

**Tableau 3** : Composition du milieu intracellulaire en mM

<b>Milieu Intracellulaire</b>	
Cs <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	126
MgCl <sub>2</sub>	1,25
CsCl	2,5
HEPES	2
MgATP	2
NaGTP	26
Biocytine	10

Le milieu intrapipette a été préparé de façon à pouvoir séparer les CPSE des CPSI en appliquant un potentiel différent au neurone enregistré (potentiel de maintien). Le gradient électrochimique transmembranaire pour les ions considérés détermine le sens au courant généré par l'ouverture d'un canal ionique. Le sens du courant est en effet défini par la force efficace qui prend la valeur :

$$(E_m - E_{ion})$$

$E_m$  est le potentiel de membrane (imposé au neurone) et  $E_{ion}$  le potentiel d'équilibre de l'ion donné. Ce dernier est défini par la différence de concentration ionique entre les milieux intra et extracellulaires, il est de 0 mV pour les cations et de -60 mV pour les anions. Ainsi lors d'enregistrements avec un potentiel imposé de -60 mV (potentiel d'inversion du courant chlorure dans nos conditions), il sera possible de n'enregistrer que les CPSE qui auront alors une force efficace de 60 mV :  $(-60) - 0 = -60$  mV. Les anions seront à leur potentiel d'équilibre avec une force efficace nulle :  $(-60) - (-60) = 0$  mV. Notons que la valeur de la force efficace des CPSE est négative, les courants seront donc dirigés vers le bas pendant les enregistrements. Lorsqu'un ion se trouve à son potentiel d'équilibre, le flux net transmembranaire pour cet ion est nul donc l'ouverture d'un canal perméable à cet ion n'engendrera aucun courant. Dans

nos conditions les enregistrements électrophysiologiques avec un potentiel de maintien de 0 mV permettent de ne sélectionner que les CPSI qui seront dans ces conditions dirigés vers le haut.

La présence d'ions césium ( $\text{Cs}^+$ ) permet d'obtenir des enregistrements stables lorsque l'on applique un potentiel dépolarisant au neurone, nécessaire pour l'enregistrement des CPSI de la lamina II. Le  $\text{Cs}^+$  bloque les conductances potassiques activées par le voltage qui génèrent des courant sortants dès que le potentiel appliqué est supérieur à environ -40 mV.

### II. 2. d. Protocole d'approche et acquisition

Une électrode d'argent est insérée dans la pipette qui est fixée sur le préamplificateur. L'électrode d'enregistrement en argent est chlorurée au préalable et sera immergée dans le milieu intrapipette. Elle permet grâce à un échange ionique de mesurer les courants de la cellule enregistrée. Avant l'approche de la tranche de moelle épinière, une pression positive est appliquée dans la pipette grâce à une seringue de 10 mL reliée par un tuyau fin au holder. L'application de cette pression permet d'éviter l'obstruction de la pipette lors de la descente par des particules ou débris cellulaires. Un créneau de 5 mV, d'une durée de 5 ms et de fréquence 50 Hz est généré par l'amplificateur lors de la descente. Ce créneau permettra de mesurer les variations de résistance, et donc d'apprécier la distance séparant la pipette du neurone. Cette technique de détection est appelée le « seal test » et son principe repose sur la loi d'Ohm :

$$U = RI.$$

Le courant mesuré est donc :

$$\Delta I = \Delta V/R$$

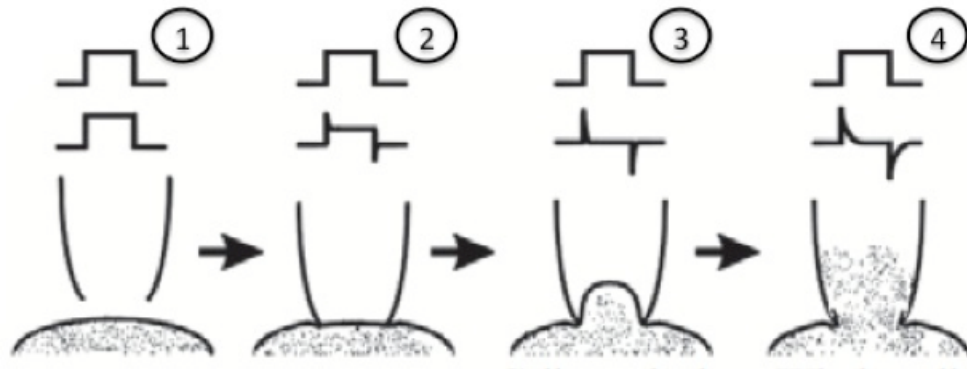
Ce courant ne dépendra donc que de la résistance de la pipette ( $\Delta V$  est appliqué à une valeur constante de 5 mV). Lorsque la pipette touche une cellule

cela induit une augmentation de la résistance qui se traduit par la diminution du créneau de courant mesuré. À ce stade, la pression positive appliquée en début de descente est relâchée ce qui permet d'accroître le contact entre le neurone et la pipette, et donc la résistance. Une légère aspiration est ensuite appliquée, et le potentiel de maintien est amené depuis 0 mV à un potentiel proche du potentiel de repos du neurone : -60 mV. Cela permet d'établir une forte adhésion (seal) du neurone au bout de la pipette : une résistance de l'ordre du G $\Omega$  s'établit, on parle alors de « gigaseal ». Dans cette configuration, le créneau de courant du seal test aura disparu, laissant place aux pics capacitifs de la pipette : c'est la configuration cellule attachée (Figure 18).

Pour passer dans la configuration cellule entière, il faut rompre le patch de membrane entre la pipette et la cellule. Pour cela, une pression légère et continue est appliquée jusqu'à ce que la membrane soit rompue et que l'accès électrique à l'intérieur de la cellule soit effectif. L'entrée dans la configuration cellule entière se traduit par l'apparition d'un courant membranaire de la cellule ainsi qu'un « élargissement » des courants capacitifs. Ce courant est compensé électroniquement grâce à l'amplificateur. La résistance de série nous indique la valeur et la qualité de l'accès électrique à la cellule. Pour qu'un enregistrement soit optimal, cette valeur doit rester stable et ne pas dépasser 50 M $\Omega$ . Après l'étape de compensation l'application du seal test est stoppée et l'enregistrement peut commencer.

La fréquence d'acquisition du signal est de 10 kHz et ce dernier est filtré à 2 kHz. Le potentiel appliqué à la cellule est de -60 mV au début de l'enregistrement. Dans ces conditions la présence de CPSE permet d'affirmer que la cellule enregistrée est un neurone et qu'il est contacté par des neurones pré-synaptiques glutamatergiques. Afin de nous intéresser aux CPSI, il faudra doucement monter le potentiel de maintien jusqu'à 0 mV en prenant garde de ne pas activer les canaux sensibles aux variations de potentiel et éviter ainsi la genèse de PA qui pourraient interférer avec les enregistrements. Dans ces conditions, les enregistrements à 0 mV nous permettent de sélectionner que les courants glycinergiques et GABAergiques de la lamina II.





**Figure 18** : L'approche par la technique du seal test en patch clamp

Les traces du haut montrent les enregistrements électrophysiologiques. La trace du haut représente le créneau appliqué expérimentalement, dans notre cas il est de 5 mV. La trace en dessous représente le créneau de courant qui résulte de l'application du premier créneau de potentiel (1). Le potentiel est donc fixé, le courant est mesuré et le paramètre que l'on mesure est la résistance au bout de la pipette qui augmente lorsque l'on touche un neurone. Dans ce cas le créneau de courant va diminuer (2) et une aspiration faible va être effectuée pour « coller » le neurone et rentrer dans une configuration où la résistance est très grande (de l'ordre du  $G\Omega$ ) et donc le créneau de courant très petit (3) : Cette configuration appelée « cellule attachée ». Après une aspiration brève et nette, le fragment de membrane sous la pipette va se rompre apportant un accès à l'ensemble de la cellule (4), la configuration « cellule entière » est atteinte.

### II. 2. e. Analyse des enregistrements

Les CPSE et CPSI sont analysés à partir des tracés enregistrés sur l'ordinateur d'acquisition. Les courants sont détectés grâce au logiciel WinEDR (Dempster, Strathclyde Electrophysiology Software). Pour que les variations de la trace brute soient interprétées comme des courants synaptiques, il faut qu'elles dépassent un seuil de 4 pA et qu'elles l'atteignent en moins de 1,5 ms. Tous les courants synaptiques seront validés par un contrôle visuel *a posteriori*. Les courants sélectionnés seront ensuite analysés avec le logiciel WinWCP (Dempster, Strathclyde Electrophysiology Software) afin des les caractériser selon plusieurs paramètres qui sont : l'amplitude (en pA), la fréquence (en Hz), la constante de désactivation (en ms) et l'aire (en pA.ms). La constante de désactivation nécessite d'ajuster une fonction mathématique sur la partie décroissante du courant post-synaptique. Cette fonction est exponentielle et on peut en extraire la valeur de  $\tau$ . Toutefois, pour les événements mixtes, cette fonction et une exponentielle double qui nous donne deux valeurs de  $\tau$  : le  $\tau_{\text{glycine}}$  et le  $\tau_{\text{GABA}}$  et cet ajustement permet aussi de déterminer les amplitudes relatives à chaque composante :  $A_{\text{glycine}}$  et  $A_{\text{GABA}}$ .

Pour l'analyse des courants toniques, le logiciel pClamp 10 a été utilisé. Le principe est d'avoir une valeur moyenne de la trace de courant dans chaque condition. Pour cela la période d'intérêt est délimitée par des curseurs et un histogramme de tous les points de la trace ainsi délimitée est effectué. Il suit une distribution normale centrée sur la valeur moyenne de courant. En ajustant une fonction Gaussienne sur la distribution de l'histogramme, la valeur moyenne du courant est extraite et nous permet de calculer l'amplitude du courant extra-synaptique en soustrayant la valeur test de la valeur mesurée en condition contrôle.

Afin de comparer les deux types de courants (i.e. synaptique et extra-synaptique) nous avons calculé la charge inhibitrice portée par ces courants (Figure 19) :

$$\overline{Q_{CPSIs}} = \overline{A_{CPSIs}} \times Freq_{CPSIs} \times \Delta t$$

$$\overline{Q_{Tonique}} = \Delta_A \times \Delta t$$

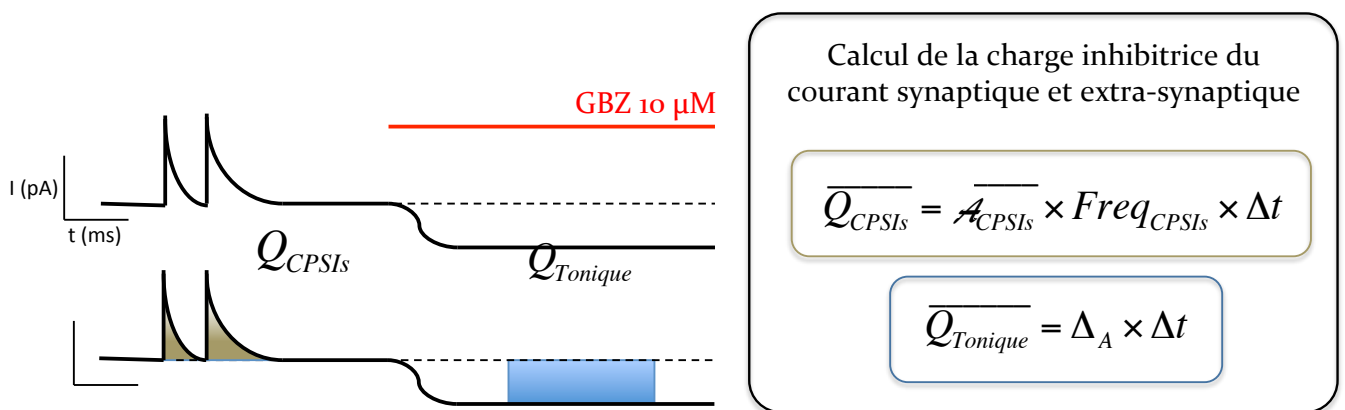
La charge inhibitrice des courants synaptiques :  $Q_{CPSI}$  (en fC) tient compte de l'aire moyenne de ces courants et de leur fréquence sur une période de temps donné, dans nos conditions  $\Delta t$  est de 1 minute. La charge inhibitrice des courants extra-synaptiques :  $Q_{Tonique}$  (en fC) est le produit de son amplitude et de la période de temps considérée ( $\Delta t = 1 \text{ min}$ ).

## II. 2. f. Applications pharmacologiques

### - Incubations

Lorsque le finastéride (inhibiteur de la  $5\alpha$ -réductase, FIN) est utilisé sur nos tranches de moelle épinière, son action nécessite une incubation longue. Pour cela, après la coupe les tranches de moelle épinière sont directement placées dans le LCSA contenant  $50 \mu\text{M}$  de FIN pour une durée de trois heures avant le début des enregistrements.

Le FIN est préparé dans une solution mère de 10 mL et préalablement dissout dans 2 mL d'éthanol absolu à une concentration de 50 mM. Pour l'incubation, 1 mL de cette solution mère est ajouté à 1 L de LCSA.



**Figure 19 :** Calcul de la charge inhibitrice des courants synaptiques et extra-synaptiques

*Le schéma est une représentation théorique d'un enregistrement électrophysiologique d'un courant tonique. En condition contrôle les CPSI GABAergiques sont présents et définis par leur aires et leur fréquence. Ces deux paramètres sont pris en compte dans le calcul de leur charge inhibitrice :  $Q_{CPSI}$  (en fC). L'application de GBZ en plus de bloquer les CPSI GABAergiques produit une baisse de la valeur du courant moyen : le courant tonique. Ce dernier est caractérisé par une amplitude qu'il suffit d'intégrer à une période de temps pour avoir la valeur de sa charge inhibitrice :  $Q_{Tonique}$ .*

*- Perfusions*

Pour l'ensemble des autres applications pharmacologiques, il s'agit de perfusion directement dans la chambre d'enregistrement.

- Pour les applications des antagonistes sélectifs des GlyR : la strychnine (STR) et des GABA<sub>A</sub>R : la bicuculline (BIC) et la gabazine (GBZ), des solutions mères sont préparées à des concentrations de 10 mM, puis des aliquots de 100 µL sont conservés à -20 °C. Ces aliquots sont utilisée extemporanément dans 100 mL de LSCA permettant une concentration appliquée de 10 µM.

- Le THDOC est préparée dans une solution mère de 10 mL à une concentration de 1 mM dans une solution d'eau distillée comprenant 10 % d'éthanol absolu. Cette solution mère est conservée à 4 °C pendant une période maximale d'un mois. Pour son application, 100 µL de la solution mère sont ajoutés extemporanément dans 100 mL de LCSA permettant une application à une concentration de 1 µM.

- La CORT a été préparée dans une solution mère de 2 mL à 1 mM puis des aliquots de 100 µL sont conservés à -20 °C. Ces aliquots sont utilisés extemporanément dans 100 mL de LSCA permettant une concentration appliquée de 1 µM.

- Le THIP a été préparé dans une solution mère de 100 mM et des aliquots de 100 µL sont conservés à -20 °C. Pour son application, 100 µL de la solution mère sont ajoutés extemporanément dans 100 mL de LCSA permettant une application à une concentration de 100 µM.

*- Injections*

Pour certaines expériences les rats ont subi des traitements consistants en des injections de substances par voie sous-cutanée (s.c.) dans la nuque ou intra-péritonéale (i.p.). La CORT a été préalablement dissoute dans une solution d'éthanol 20% et huile d'olive avant d'être injectée en s.c. dans un volume final de 500 µL à 30 mg/kg. Les rats contrôles ont été injectés

uniquement avec la même solution d'éthanol 20% et huile d'olive. Le finastéride (FIN, inhibiteur de l'activité enzymatique de la 5 $\alpha$ -réductase) a été dissout dans une solution d'éthanol 20% et huile minérale avant d'être injecté en i.p. dans un volume final de 200  $\mu$ L à 30 mg/kg.

### III. ENREGISTREMENTS ELECTROPHYSIOLOGIQUES *IN VIVO*

Les enregistrements *in vivo* sont effectués non pas sur une préparation tissulaire isolée mais dans une structure ciblée d'un l'animal anesthésié. Elle permet d'étudier les propriétés actives des neurones et du réseau spinal en mesurant des paramètres d'excitabilité tout en conservant l'environnement naturel et sa régulation. Cette technique permet de faire intervenir les champs récepteurs périphériques donc d'utiliser des stimulations physiologiques et de raisonner sur la transmission d'une information (comme la nociception ici) depuis la périphérie.

#### III. 1. Animaux et préparation

Le rat est anesthésié dans une boîte à induction en plexiglass dans laquelle est vaporisé de l'isoflurane (3%, poussé avec de l'O<sub>2</sub> à un débit de 800 ml/min, Harvard Apparatus). Une fois l'aréflexie contrôlée (réflexes de la patte), l'animal inconscient est placé sur une couverture chauffante et une sonde rectale est insérée afin de mesurer la température qui est maintenue à 37 °C. Le museau de l'animal est placé dans un masque et l'anesthésie est réduite (2% isoflurane, O<sub>2</sub>) pour la chirurgie. La peau est incisée au niveau des vertèbres lombaires et sacrées laissant apparaître les muscles du dos. Du niveau thoracique T<sub>12</sub>, jusqu'au niveau lombaire L<sub>5</sub>, les muscles et tissus conjonctifs sont retirés jusqu'à ce que les vertèbres soient bien visibles. En utilisant une pince à os, les processus transverses (latéraux) et épineux (dorsaux) sont brisés. En le rongant, l'os est fragilisé permettant de retirer délicatement la partie dorsale de la vertèbre mettant à jour la moelle épinière dorsale au niveau lombaire. De cette manière, deux à trois niveaux lombaires sont ôtés. Le renflement lombaire sert de contrôle anatomique pour cette chirurgie. Il faut

impérativement éviter d'abimer la moelle épinière pendant la préparation afin de ne pas provoquer d'hématomes sous-duraux ce qui provoquerait une mort neuronale importante et rapide. Une compresse imbibée de liquide physiologique (NaCl 0,9%) à température ambiante est placée sur la moelle afin de la protéger.

Le rat est ensuite placé dans un cadre stéréotaxique où les barres d'oreilles permettent de maintenir la tête du rat et le museau est placé dans un masque pour diffuser l'anesthésique (isoflurane 2%, O<sub>2</sub>). Deux clamps spinaux placés de part et d'autre de la laminectomie pratiquée permettent de maintenir la colonne vertébrale surélevée afin que les mouvements de respiration de l'animal interfèrent le moins possible dans les enregistrements. Les parties de la peau du dos entourant la moelle épinière sont surélevées grâce à quatre points de suture permettant ainsi la création d'une sorte de chambre naturelle qui contient en son centre la moelle épinière dégagée. De l'agarose 5% liquide (Euromedex) est coulé dans ce puits à une température tout juste supérieur à son point de solidification ( $\approx 45$  °C), la moelle est toujours protégée par la compresse imbibée de liquide physiologique. Lorsque l'agar est solidifié un puits est découpé au dessus de la moelle et la compresse est retirée afin de la dégager. Les méninges sont alors dégagées puis de l'huile minérale est ajoutée dans le bain permettant de ne pas diluer le liquide céphalo-rachidien qui est produit *in vivo* et de limiter sa perte.

### **III. 2 Enregistrements électrophysiologiques**

#### **III. 2. a. Protocole d'acquisition**

Une électrode en tungstène (FHC, UK) est utilisée pour enregistrer les neurones des cornes dorsales de la moelle épinière de manière juxta-cellulaire. Cette dernière est reliée à une masse qui se trouve dans le bain d'agar. Le signal

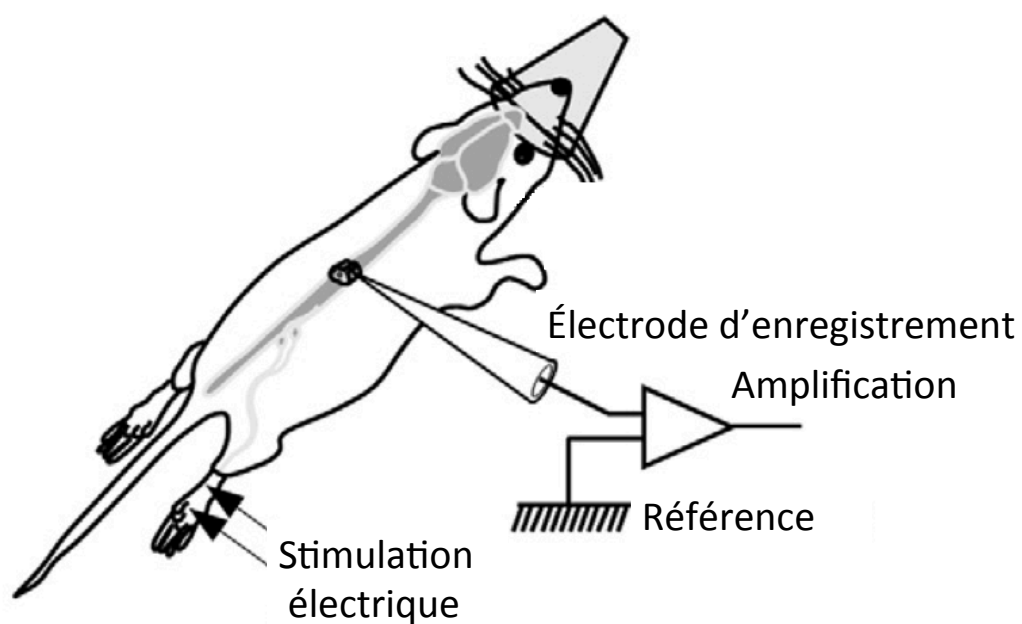


sera d'abord pré-amplifié puis envoyé à un amplificateur (DAM 80, World Precision Instruments). L'électrode reliée au préamplificateur lui-même fixé au micromanipulateur. Une cage de Faraday est placée autour de l'électrode d'enregistrement permet de limiter les interférences. L'amplificateur intègre un filtre passe-bas (le signal est acquis à 3 kHz et filtré à 300 Hz) puis le signal est envoyé aux différents moniteurs : oscilloscope, ordinateur équipé du logiciel Spike 2 et haut-parleurs. Pour être interprété, le signal analogique doit néanmoins être digitalisé à l'aide d'une carte d'acquisition (CED 1401, UK).

L'électrode d'enregistrement peut être déplacée dans les trois axes x, y et z. Pendant la descente verticale dans le tissu spinal, la patte ipsilatérale est stimulée électriquement grâce à une paire d'électrodes de stimulation envoyant un courant d'intensité supraliminaire déterminée expérimentalement depuis un stimulateur. Cela permet de détecter les neurones du champ récepteur de la patte stimulée qui répondent à la stimulation. La Figure 20 représente un schéma du principe expérimental.

L'intérêt de la stimulation électrique est multiple : elle est très reproductible (à l'inverse d'une stimulation mécanique au niveau du champ récepteur), induit peu de dommages tissulaires à court terme et peut permettre de sélectionner spécifiquement les différents types de fibres (nociceptives ou non-nociceptives). La descente s'effectue jusqu'à ce qu'un neurone unique répondant aux stimulations de la patte soit isolé. Ainsi une réponse électrophysiologique (décharge de PA) mesurée de manière juxtacellulaire est interprétée comme un neurone intégrant les informations du champ récepteur de la patte. Une réponse sortant du bruit de fond ambiant par un rapport 4 / 1 au minimum est optimale, et l'amplitude des PA doit être constante.

Les neurones sont enregistrés au niveau lombaire et sont caractérisés en fonction de leur profondeur. Les lamina I et II (couches superficielles) se trouvent dans les premiers 250  $\mu\text{m}$  tandis que les laminae V et VI s'étendent entre 500 et 1000  $\mu\text{m}$  de profondeur (Urch & Dickenson, 2003). Leur localisation laminaire confère aux neurones des caractéristiques particulières. Les neurones des laminae I et II sont contactés par les fibres A $\delta$  et C car elles



**Figure 20** : Enregistrements électrophysiologiques *in vivo* sur le rat

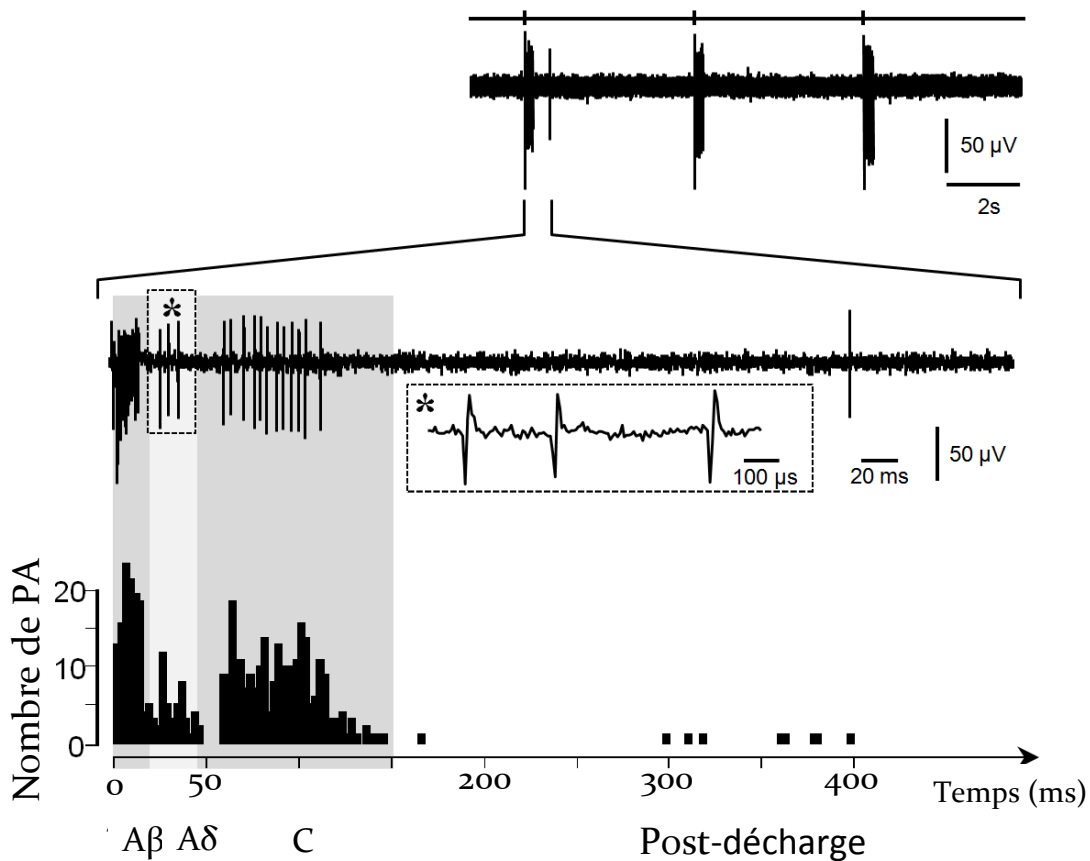
*L'électrode d'enregistrement est descendue dans les cornes dorsales de la moelle épinière afin d'enregistrer les neurones de manière juxta-cellulaire pendant que la patte ipsilatérale est stimulée électriquement grâce à une paire d'électrodes de stimulation. Cette stimulation d'intensité supraliminaire permet de détecter les neurones du champ récepteur de la patte stimulée qui répondent à la stimulation dans la moelle épinière.*

sont principalement de type nociceptives spécifiques. Les neurones des couches V et VI sont principalement des neurones à convergence (ou WDR pour wide dynamic range) car ils intègrent des informations nociceptives et non-nociceptives.

Les réponses enregistrées suite à la stimulation du champ récepteur cutané peuvent être véhiculées par les fibres de type A et C. La différenciation de ces types de fibre s'effectue lors de l'analyse du temps de latence (qui dépend de la vitesse de conduction propre à chaque type de fibre mais aussi de la taille de l'animal). Dans nos conditions, la stimulation des fibres A provoque une décharge dans les cornes dorsales de la moelle épinière entre 0 et 50 ms après la stimulation, tandis que les fibres C provoquent une réponse spinale entre 50 et 250 ms après la stimulation. L'activité survenant après l'enregistrement des fibres C (250–800 ms) correspond à une décharge ectopique de ces fibres C appelée la post-décharge (Figure 21). Elle est générée par un mécanisme impliqué dans le phénomène de 'wind-up', ce dernier étant caractérisé par une facilitation de la réponse neuronale suite à un train de stimulation à fréquence et intensité nociceptive constantes. Ce phénomène met en jeu les fibres C et la post décharge induite par l'excitabilité des C (Dickenson & Sullivan, 1987).

### III. 2. b. Analyse des enregistrements

La détection des PA sur les enregistrements bruts s'effectue à l'aide du logiciel Spike 2 (Cambridge Electronic Design, Cambridge UK). Cette détection automatique tient compte d'un seuil delà duquel les variations de la trace brute seront interprétées comme des PA. Ce seuil est ajusté manuellement afin de prendre tous les PA en compte et d'exclure le bruit de fond. En fonction du temps de latence après la stimulation, les différents types de fibres peuvent être séparées (voir plus haut), et analysés séparément.



**Figure 21** : Différentiation in vivo des types de d'afférences primaires par analyse du temps de latence

*Les réponses enregistrées suite à la stimulation du champ récepteur cutané sont véhiculées par les fibres de type Aβ, Aδ et C. Dans nos conditions, la stimulation des fibres A provoque une décharge dans les cornes dorsales de la moelle épinière entre 0 et 50 ms après la stimulation, tandis que les fibres C provoquent une réponse spinale entre 50 et 250 ms après la stimulation. L'activité survenant après l'enregistrement des fibres C (250-800 ms) correspond à la post-décharge. Dans nos conditions, nous ne pouvons pas discriminer les fibres de type Aβ des fibres de type Aδ car les rats sont trop jeunes.*

Pour que les facilitations observées suite à la stimulation répétée à 1 Hz soient interprétées comme un wind-up, il faut impérativement que le nombre de PA générés par une stimulation excède 10 fois le nombre de PA générés après la première stimulation de la série.

### III. 2. c. Paramètres mesurés

Plusieurs caractéristiques sont mesurées pour comparer les décharges d'un neurone dans une condition donnée afin de raisonner sur l'excitabilité du réseau spinal.

- Le seuil de réponse est déterminé par l'application d'une intensité croissante aux stimuli électriques délivrés sur la patte ipsilatérale au niveau du champ récepteur sensoriel jusqu'à ce qu'une réponse soit enregistrée au niveau spinal. Une augmentation de seuil reflète une diminution de l'excitabilité du réseau ou une altération du nocicepteur.

- Les stimulations électriques isolées sont appliquées à trois fois le seuil de réponse des fibres C et le nombre de PA suite à la stimulation est compté. Une moyenne est ensuite afin d'exprimer nos résultats en nombre de PA moyen par stimulation isolée. Une diminution du nombre de PA générés par la stimulation entre deux conditions est interprétée comme une baisse de l'excitabilité spinale ou une adaptation / altération des nocicepteurs ou de la transmission nerveuse.

- L'application de stimuli électriques successifs à une fréquence de 1 Hz et trois fois l'intensité nécessaire à induire un seuil de réponse des fibres C est un protocole qui permet d'induire un phénomène de wind-up. Il s'agit d'un phénomène de sommation d'activité dépendant des récepteurs GluN qui se traduit par une facilitation de l'activité induite par les fibres C (Dickenson & Sullivan, 1987). Le wind-up reflète ainsi un phénomène de plasticité spinale expérimentale.

- Les stimuli mécaniques nociceptifs sont induit au milieu du champ récepteur par un pincement de 600 g pendant environ 5 secondes. Le nombre de PA pendant la durée de la stimulation est mesuré.

#### III. 2. d. Applications pharmacologiques

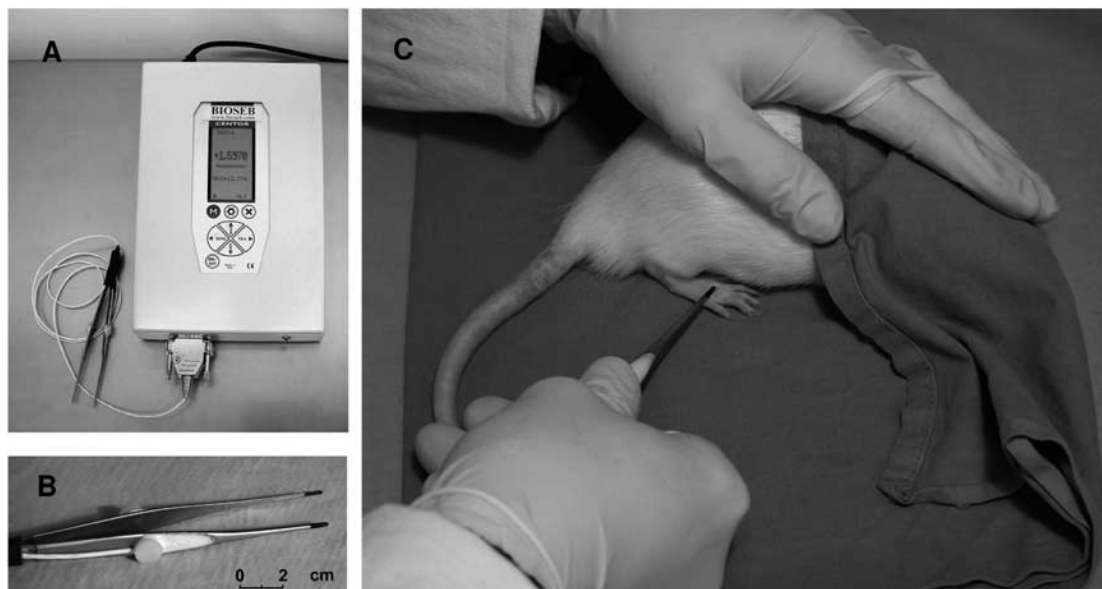
- Le THDOC est préparé comme dans notre étude *in vitro* et conservé à 4 °C pendant une période maximale d'un mois. Pour son application, 100 µL de la solution mère sont ajoutés extemporanément dans 100 mL de liquide physiologique (0,9 % NaCl) permettant une application à une concentration de 1 µM.

- La CORT a été préparée dans une solution mère de 2 mL à 1 mM puis des aliquots de 100 µL sont conservés à -20 °C. Ces aliquots sont utilisée extemporanément dans 100 mL de liquide physiologique permettant une concentration appliquée de 1 µM sur la moelle épinière.

## IV. TESTS COMPORTEMENTAUX

Afin d'évaluer les effets comportementaux des différents taux de GC circulants chez les souches de rats LEW, FIS et SD, ainsi qu'une application exogène de CORT chez les SD, nous avons choisi de mesurer le seuil de retrait de la patte suite à l'application d'un stimulus mécanique nociceptif. La détection de seuils nociceptifs mécaniques a été effectuée à l'aide d'une pince calibrée (Bioseb, Chaville, France). Cette technique ne nécessite qu'une légère rétention de l'animal qui reste dans une position naturelle, la tête sous une serviette afin d'éviter les stimulations sensorielles externes, réduisant ainsi le stress (Figure 22). Les animaux ont été manipulés et habitués pendant environ une semaine avant le test comportemental. Ce dernier consiste en l'application d'une force croissante sur une patte postérieure avec la pince calibrée. La pression sur la patte postérieure est stoppée lorsque l'animal effectue un réflexe de retrait ou vocalise. La sensibilité mécanique de chaque patte postérieure est mesurée par le dispositif électronique relié à la pince calibrée qui affiche la valeur de la force appliquée en grammes (Figure 22). Les mesures sont répétées trois fois pour chaque patte. Une augmentation de la valeur de seuil nécessaire au retrait de la patte dans une condition donnée par rapport à la condition contrôle sera interprétée comme la mise en place d'un effet analgésique ou anti-nociceptif (Luis-Delgado *et al.*, 2006).

Pour observer un effet de l'injection i.p. de CORT, ces mesures ont été répétées toutes les heures pendant cinq heures après l'injection sous cutanée de CORT. Les mesures ont été effectuées trois fois sur chaque patte postérieure (droite et gauche). En l'absence de différence entre les résultats obtenus de chaque côté de la patte, les résultats exprimés en grammes correspondent à la moyenne des trois pressions exercées sur les deux pattes (moyenne de six valeurs).



**Figure 22** : Présentation de la pince calibrée

*La photographie en A. représente le dispositif expérimental comprenant la pince calibrée (B et C) et le moniteur d'acquisition affichant la force appliquée avec la pince. C. Le rat ne subit qu'une légère constriction, une serviette lui couvrant la partie antérieure du corps pendant le déroulement du test (d'après Luis-Delgado et al., 2006).*



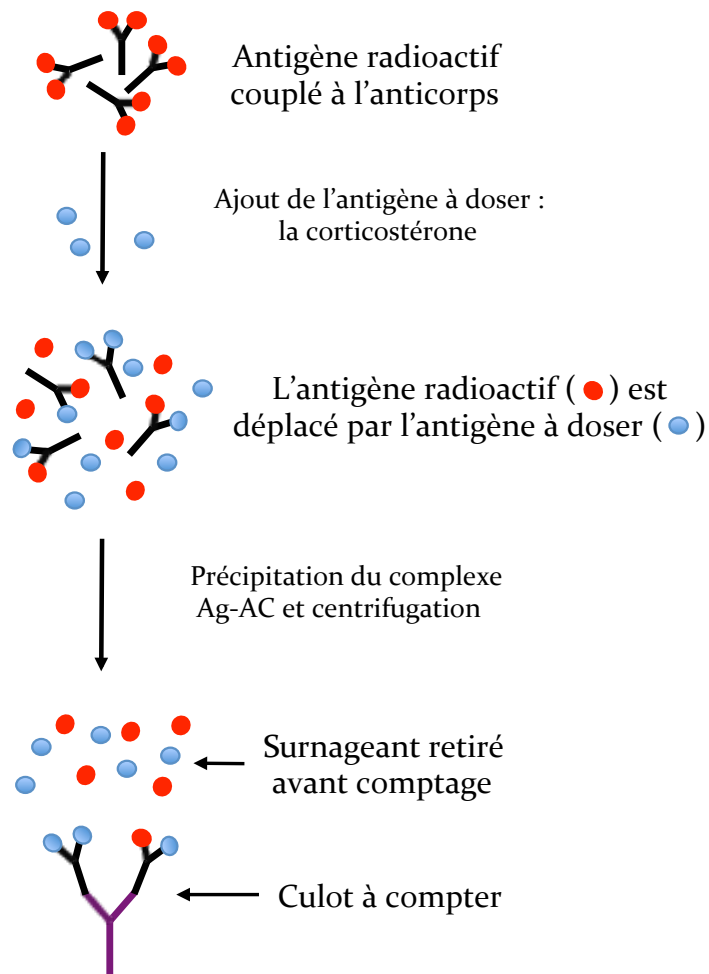
## V. DOSAGE RADIO-IMMUNOLOGIQUE

### V. 1. Prélèvements sanguins et préparation du plasma

Les prélèvements ont été effectués sur des rats des souches SD, FIS et LEW à P8, P14, P21 et P28. Le prélèvement sanguin est effectué après décapitation de l'animal. Un volume d'environ 1 mL de sang est collecté dans des tubes dont les parois internes sont recouvertes avec de l'EDTA (acide éthylène diamine tétraacétique) afin d'éviter la coagulation et sont placés directement dans la glace. Le sang est ensuite centrifugé à 2500 r.p.m. à 4 °C pendant 15 minutes. Le surnageant (le plasma) est récolté dans un tube Eppendorf de 500 µL et placé directement à -20 °C. Dans ces conditions, le plasma peut être conservé plusieurs mois.

### V.2. Dosage radio-immunologique

La technique de dosage radio-immunologique (ou RIA pour radio-immuno assay) se base sur l'inhibition compétitive avec la CORT à doser (ou substance froide) et de la CORT marquée à par l'iode 125 radioactive ( $^{125}\text{I}$ -CORT, substance chaude) permettant de la doser de manière très précise grâce à l'utilisation d'un anticorps (Ac) spécifique (Figure 23). Un complexe anticorps-antigène se forme, dans notre cas  $[\text{Ac}-^{125}\text{I}\text{-CORT}]$  et  $[\text{Ac}\text{-CORT}]$ . Plus la concentration de CORT à doser est élevée, moins la  $^{125}\text{I}\text{-CORT}$  peut lier l'Ac selon la loi d'action de masse, et la radioactivité liée à l'Ac diminue. En d'autres termes, plus la radioactivité mesurée est faible, plus la concentration de CORT à doser est élevée. Les mesures ont été réalisées en duplicat et la lecture de la radioactivité de chaque échantillon s'effectue grâce à un compteur gamma (Packard). La concentration de CORT est évaluée grâce à une gamme étalon dont la limite de linéarité s'étend de 5 à 1000 ng/mL.



**Figure 23** : Principe général du dosage radio-immunologique (RIA)

*La technique RIA se base sur l'inhibition compétitive avec la CORT à doser et de la CORT marquée à par l'iode 125 radioactive. Ces deux antigènes (CORT et  $^{125}\text{I}$ -CORT) sont mis en présence du même anticorps (Ac) spécifique. Un complexe anticorps-antigène se forme. Une étape de précipitation suivie d'une étape de centrifugation permet de sélectionner le culot, et plus la concentration de CORT à doser est élevée, moins la  $^{125}\text{I}$ -CORT peut lier l'Ac et par conséquent la radioactivité liée à l'Ac diminue.*

Le kit de dosage utilisé (Corticosterone <sup>125</sup>I RIA Kit, MP Biomedicals, LLC, NY, USA) comprend :

- Un diluant (tampon phosphosaline gelatine, pH 7,0 ± 0,1) permettant la dilution au 1/200<sup>ème</sup> des échantillons de plasma contenant la CORT à doser
- Les calibrateurs qui contiennent une concentration connue de CORT : 25, 50, 100, 250, 500 et 1000 ng/mL. Ils permettent de faire la gamme étalon
- La CORT\* couplée à la <sup>125</sup>I
- L'Ac spécifique de la CORT. Il reconnaît la CORT avec une très grande spécificité : le pourcentage de réaction croisée avec d'autres composés stéroïdiens comme la testostérone, la déoxycorticostérone, l'aldostérone ou la progestérone est inférieure à 1 %, et inférieure à 0,1 % avec les composés stéroïdiens réduits comme le THDOC.
- La solution précipitante qui permet la formation du culot contenant les complexes [Ac-Ag] à compter.

La préparation des solutions s'effectue dans des tubes Eppendorf de 1 mL. Les échantillons de plasma contenant la CORT à doser (100 µL) dilués au 1/200<sup>ème</sup> sont ajoutés dans les tubes. Ensuite, la CORT marquée avec le composé <sup>125</sup>I radioactif est ajouté dans les tubes (200 µL). À partir de cette étape les manipulations s'effectuent sous une hotte ventilée prévue pour les manipulations de produits radioactifs. L'étape suivante consiste à ajouter l'Ac dans les tubes (200 µL) puis à vortexer l'ensemble des tubes et laisser incuber à température ambiante pendant deux heures. Le précipitant (500 µL) est ensuite ajouté aux tubes qui ont un volume final de 1 mL. Ces tubes sont ensuite centrifugés à 2500 r.p.m. pendant 15 minutes. Le surnageant est aspiré et le culot est compté dans le compteur gamma qui donne directement les valeurs de concentration de CORT en ng/mL.

## VI. MARQUAGES IMMUNOHISTOCHIMIQUES

### VI. 1. Préparation des tranches

La moelle épinière de rats âgés de 8 et 21 jours est retirée par extrusion hydraulique avec une solution de LCSAs puis coupée en blocs de 1 mm. Ces blocs sont disposés dans des puits contenant du paraformaldéhyde 4 % (PAF 4 %) préparé extemporanément et incubés pendant 24h. Le jour précédent les coupes au cryostat, les blocs subissent plusieurs lavages successifs avec une solution de PBS (phosphate buffer saline) 0,12 M pH 7,4 contenant 30 % de saccharose. Juste avant d'effectuer les coupes, les blocs de tissus sont inclus dans une colle spéciale (medium tissue freezing, Jung) et fixés sur une base métallique. Les coupes au cryostat ont été réalisées à une température de -20 °C afin d'obtenir des tranches de moelle épinière de 50 ou 30 µm d'épaisseur. Les sections sont récupérées dans une solution de PB 0,1 M (phosphate buffer) contenant 30 % de saccharose.

### VI. 2. Immunofluorescence et montage des coupes

Les tranches sont rincées trois fois dans le milieu PB 0,1 M, 30 % saccharose avant d'être placées dans un milieu PBS+ contenant du PBS, 0,5 % de triton, 1 % de NS (normal goat serum), 0,2 % de BSA (bovine serum albumine) pendant 30 minutes à température ambiante et sous agitation constante. Cette étape permet de saturer les sites aspécifiques en vue de l'incubation avec l'anticorps primaire. Ce dernier est dirigé contre la partie N-terminale de la sous-unité  $\delta$  des GABA<sub>A</sub>R (Anti-GABA<sub>A</sub> Receptor,  $\delta$ -Subunit, N-Terminus, PhosphoSolutions, USA, CO). Il est incubé une nuit à différentes concentrations (en ng/mL) : 3 ; 1,5 ; 0,3 et 0,15. Plusieurs rinçages au PBS sont

effectués le lendemain et l'incubation avec l'Ac secondaire couplé à de la FITC (fluorescein isothiocyanate ; FITC-IgG(H+L), goat  $\alpha$  rabbit, Jackson ImmunoResearch Laboratories, USA) est réalisée durant deux heures à température ambiante sous agitation constante. Plusieurs rinçages au PBS et un dernier à l'eau distillée sont réalisés avant le montage des coupes.

Les coupes sont disposées sur des lames de montage à l'aide d'un pinceau fin permettant de les étaler en prenant soin d'éviter toute formation de bulles. Un milieu Vectashield (Vector Laboratories, US) est déposé sur les coupes et la lamelle est ajoutée ici aussi en évitant la formation de bulles d'air afin d'obtenir un montage optimal. Les lames sont conservées à 4 °C à l'obscurité.

# LE TRANSFERT DE TECHNOLOGIE : MONTAGE D'UN LABORATOIRE DE PATCH CLAMP

La technique du patch clamp nécessite la mise en place et l'optimisation d'un matériel spécifique mais aussi la mise en place d'une reproduction de rat qui est indispensable pour utiliser ces animaux à des âges précis nécessaires dans nos expériences. Dans ce chapitre seront traités les différents points de mise en place et d'optimisation du matériel prenant part au transfert de technologie ainsi que les difficultés rencontrées.

## I. MISE EN PLACE D'UNE REPRODUCTION DE RAT

La technique du patch clamp sur des animaux jeunes nécessite leur disponibilité au laboratoire suite à une reproduction sur place.

Les animaux utilisés avant la mise au point du patch clamp au sein de l'Université du Luxembourg étaient commandés au moins deux semaines avant leur utilisation, période nécessaire à leur adaptation afin d'éviter toute influence du stress sur les expériences. Dans notre cas, utilisant les animaux dès le huitième jour postnatal, il est impossible de les commander. Une solution consistait à commander systématiquement des femelles gestantes mais cela

s'avère onéreux et compliqué puisque le transport est stressant pour les animaux et son impact sur la gestation important. Nous avons donc mis en place une reproduction de rats SD au sein de l'animalerie du Luxembourg.

Cette mise en place délimitante pour les expériences de patch clamp s'est avérée fastidieuse. Les animaux commandés (Harlan) nécessitent avant d'être placés en reproduction un temps d'adaptation de deux à trois semaines. Après la période d'adaptation, les femelles étaient placées avec deux mâles pendant quelques jours. Le temps de gestation étant de trois semaines chez le rat, cela implique une période de quatre à six semaines avant la disponibilité respective d'animaux P8 à P21. Au début de la reproduction, peu de femelles ont donné naissance, si bien que nous nous sommes retournés vers le distributeur afin d'avoir des informations quant à leur fertilité. La reproduction aura mis deux à trois mois avant d'être stable et d'avoir des rats disponibles au bon âge.

Cependant, une telle reproduction nécessite un renouvellement des reproducteurs (si bien femelles que mâles) qui vieillissent et perdent leur fertilité avec l'âge et le nombre de mises bas diminue chez les femelles. Il fallait éviter tout croisement inter-descendant pour avoir des rats viables, signifiant de commander ponctuellement de nouveaux rats environ tous les six mois. Plusieurs problèmes nous ont freiné dans la mise en place d'une reproduction stable comme une infection bactérienne au sein de notre distributeur européen, Harlan. L'évaluation d'une infection par la bactérie *Streptococcus agalactiae* s'est avérée positive chez l'ensemble des distributeurs européens. Nos rats ont donc dû être commandés chez le fournisseur américain, retardant leur arrivée et posant des difficultés pour la continuité de la reproduction.

## II. MATERIEL ET OPTIMISATION

Le patch clamp nécessite un matériel spécifique afin de mener à bien des enregistrements. La mise en place d'un stand de patch clamp englobe le poste en lui-même comprenant la table, la cage de Faraday et les éléments permettant l'approche des neurones en tranche, le matériel d'acquisition électronique, mais aussi les éléments indispensables à la préparation de l'expérience (tranches, pipettes).

Dans notre cas, ce laboratoire comprend désormais :

- L'étireuse de pipettes
- Le vibratome
- Le poste de patch clamp
  - o La table anti-vibration et cage de Faraday
  - o Les appareils d'acquisition

### II. 1) L'étireuse de pipettes

La mise au point de l'étireuse (P-1000, Sutter Instruments) permet d'optimiser la qualité des pipettes d'enregistrement utilisées quotidiennement. Ces dernières doivent avoir une résistance et une forme optimales mais leur production doit aussi rester stable et répétitive.

Les paramètres d'étirement des pipettes sont la température de chauffe du filament, la vitesse à laquelle le filament atteint sa température, le temps de chauffe et le nombre de cycles de chauffe. Ce dernier paramètre est très important puisqu'il confère la répétabilité de production des pipettes, le nombre de cycles doit être constant. Après optimisation, le nombre de cycles adéquat est de trois. Les deux premiers permettent d'effiler la pipette et le dernier donne la longueur de la pointe et le diamètre d'ouverture à la pipette. Le diamètre d'ouverture donne sa valeur à la résistance de la pipette qui est



capital pour l'approche des neurones en tranche : plus le diamètre est grand, plus la résistance sera petite. Ce sont principalement les paramètres de temps de chauffe et de température du troisième cycle qui permettent de l'ajuster de manière précise. En effet plus la température et / ou le temps de chauffe sont grands, plus le borosilicate composant la pipette mettra du temps à refroidir, temps au cours duquel le borosilicate se rétracte et la valeur de résistance augmente.

La mise au point du protocole d'étirement des pipettes nécessite un réajustement quotidien pendant les premiers mois d'utilisation du matériel neuf. Tout au long de l'optimisation, l'ensemble des pipettes étirées tend vers une valeur de résistance optimale, aux alentours de 5 M $\Omega$  dans notre cas et qui doit toujours être compris entre 4 et 8 M $\Omega$  pour avoir des pipettes utilisables.

## II. 2) Plateforme et stabilité

La manipulation de pipettes en vue d'enregistrer des neurones sur des préparations microscopiques requiert une grande stabilité de la plateforme. La première considération à cet égard est l'emplacement du poste de patch clamp lui-même. Plusieurs endroits préférentiels peuvent être pris en considération car limitant considérablement les vibrations : ceux proches des murs porteurs, des murs externes, mais aussi proches des cages d'ascenseur qui sont généralement une partie renforcée d'un bâtiment et le plus proche possible du rez-de-chaussée. Au laboratoire du Luxembourg le poste a été monté au niveau le plus inférieur (sous-sol), contre un mur externe porteur.

Ces considérations n'étant pas suffisantes pour limiter les vibrations, il est nécessaire d'utiliser une table anti-vibrations. Son principe repose sur les propriétés d'absorption des vibrations par l'air. Elle est constamment sous le contrôle d'un compresseur à air qui surélève le plateau en l'isolant ainsi des vibrations. Le plateau est relié au compresseur par des capteurs à niveau

formant un système asservi compensant les pertes de pression automatiquement.

### **II. 3) Chambre d'enregistrement et approche de la tranche**

La chambre d'enregistrement est une pièce de plexiglas usinée en forme de puits peu profond (environ 1 cm). Le rôle principal de la chambre est d'accueillir la tranche de moelle épinière afin de pouvoir y effectuer les enregistrements. Elle doit aussi être accessible par les électrodes d'enregistrement et une électrode de référence doit pouvoir atteindre le bain. Cette chambre à interface est fixée sur un socle qui doit être très stable et surélevé pour permettre de récupérer le LCSA s'écoulant par gravité. Le niveau de LCSA de la chambre est régulé par capillarité avec un papier absorbant qui crée un flux du liquide, ce dernier est récupéré dans un bécher placé en dessous de la chambre.

Notre technique de patch clamp en aveugle utilise une approche verticale de la tranche de moelle épinière située dans la chambre. Cependant, le manipulateur utilisé ne permet qu'une approche suivant un angle inférieur à  $90^\circ$  avec les pièces fournies. Nous avons donc conçu une pièce en plexiglas sur laquelle nous avons fixé solidement une barre sortante en métal à  $90^\circ$ . De cette manière, la barre permet une forte accroche au micro manipulateur et la pièce en plexiglas permet de maintenir fortement le préamplificateur qui comprend le holder maintenant la pipette verticalement à la chambre d'enregistrement.

### **II. 4) Gestion du bruit et mise à la masse**

La chambre d'enregistrement doit être comprise dans une cage de Faraday reliée à la masse permettant un isolement des bruits électriques et de

rayonnement ambiants pouvant être facilement captés par l'électrode d'enregistrement.

L'ensemble des éléments électroniques est intégré à un rack unique qui comprend aussi l'ordinateur et son écran. Puisque l'amplification est très importante, et tout le système conducteur, il est nécessaire de relier les différents composants du poste d'enregistrement à une masse afin de minimiser les interférences qui influent la qualité des enregistrements.

Le principe est de relier les éléments à une masse spécifique (différente de la masse du circuit électrique) par un câblage conducteur et de faible résistance pour ramener les ondes perturbatrices vers la masse (ou « terre »). Dans le cas où plusieurs éléments sont liés à une seule et unique masse il est impératif d'éviter les boucles de masse qui peuvent générer du bruit supplémentaire : il faut que chaque composant soit relié indépendamment au même point de masse appelé nœud de masse. De cette manière le nœud relie de manière directe le rack comprenant les éléments électroniques, la cage de Faraday, la loupe binoculaire, le micromanipulateur, la source de lumière et le système de perfusion.

La minimisation du bruit est un processus empirique que l'on doit adapter et réguler sur chaque poste d'électrophysiologie. Il peut s'avérer parfois difficile de supprimer les bruits électriques afin d'obtenir les enregistrements les plus « propres » possibles. Cette étape, bien que relativement simple en théorie peut prendre beaucoup de temps car il s'agit d'une optimisation quotidienne qui peut s'avérer délicate que l'on nomme « trouble shooting ».

## **Conclusion**

Le transfert de technologie depuis l'Université de Strasbourg vers l'Université du Luxembourg a été mené à bien puisque les enregistrements effectués sur ce poste font l'objet d'une première publication conjointement aux données récoltées à Strasbourg. La mise au point des différents composants du laboratoire (étireuse, vibratome, poste d'enregistrement) est désormais optimale permettant une constance dans les enregistrements électrophysiologiques quotidiens.

# RESULTATS

## I. CARACTERISATION DES TRANSMISSIONS INHIBITRICES

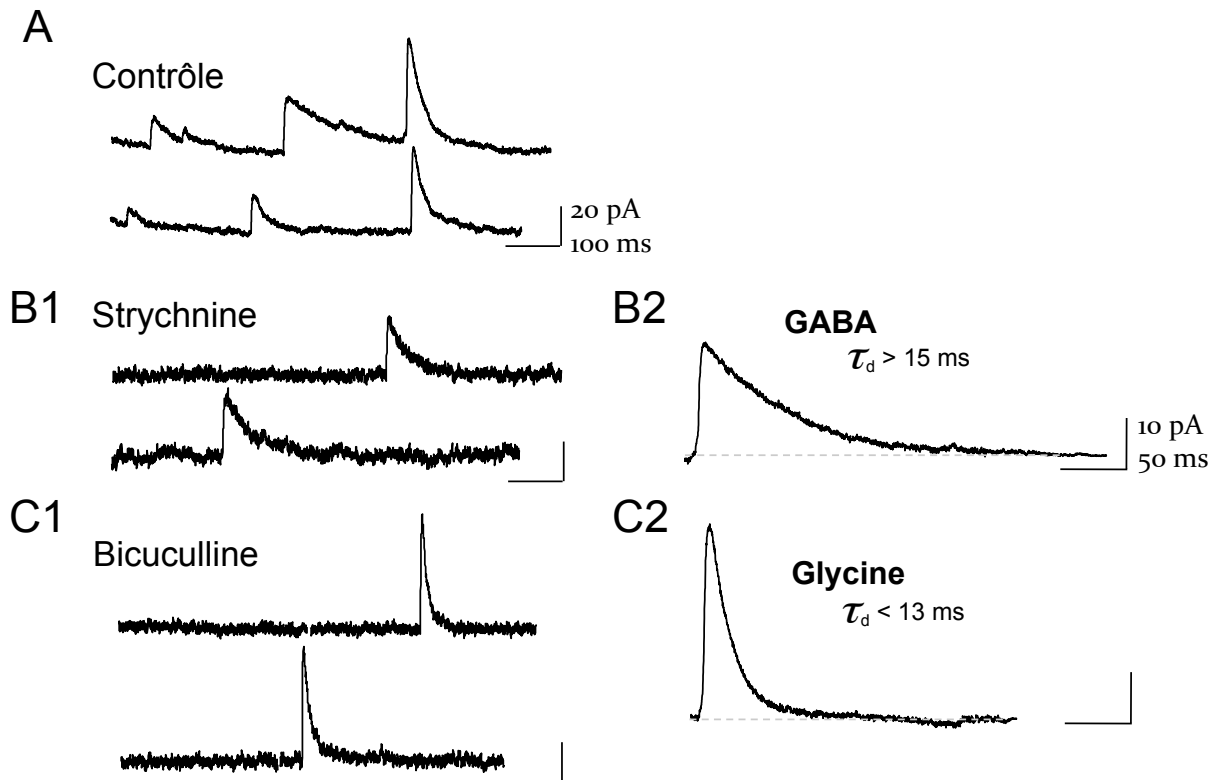
La technique *in vitro* du patch clamp dans sa configuration cellule entière sur tranches de moelle épinière nous permet d'enregistrer les courants issus des neurotransmissions inhibitrices et excitatrices. Avec notre potentiel d'inversion du courant chlorure (fixé par nos solutions intra- et extracellulaires) à -60 mV et celui des cations à 0 mV, nos enregistrements à un potentiel de maintien de 0 mV nous permettent de ne sélectionner que les transmissions inhibitrices. Nous avons choisi de travailler sur la transmission inhibitrice spontanée.

### I. 1 Les transmissions synaptiques GABA et glycine

Dans la lamina II la transmission synaptique inhibitrice est portée par les deux neurotransmetteurs que sont le GABA et la glycine. Afin de les isoler pharmacologiquement, nous avons utilisé les antagonistes spécifiques des GlyR (strychnine, STR) et des GABA<sub>A</sub>R (bicuculline, BIC ou gabazine, GBZ). Les enregistrements électrophysiologiques en présence de 10  $\mu$ M strychnine permettent de ne sélectionner que les CPSI GABAergiques caractérisés par une constante de désactivation ( $\tau_D$ ) lente, qui est strictement supérieure à 15 ms (Figure 24). Les enregistrements en présence de 10  $\mu$ M de BIC ou de 10  $\mu$ M de GBZ présentent des CPSI ayant un  $\tau_D$  plus rapide et strictement inférieur à 13 ms, caractéristique des CPSI glycinergiques de la lamina II. Aucune différence n'a été observée entre les effets de la BIC et de la GBZ sur les CPSI.

Ces observations corroborent les résultats d'études antérieures de la lamina II dans les mêmes conditions pharmacologiques (Keller *et al.*, 2001, 2004; Mitchell *et al.*, 2007) et nous permettent de séparer les événements GABAergiques des glycinergiques uniquement sur la base de leurs propriétés cinétiques sans utiliser leurs antagonistes spécifiques.

Nous avons comparé les paramètres des CPSI GABAergiques et glycinergiques des neurones de la lamina II mature (P21 – P28) entre les SD, FIS et LEW. Aucune différence significative entre les trois souches de rats n'a été observée sur l'amplitude, la fréquence et les constantes de désactivation ( $\tau_D$ ) des CPSI glycinergiques ; ni sur l'amplitude et la fréquence des CPSI GABAergiques (Tableau 4). Cependant, la constante de désactivation des CPSI GABAergiques enregistrés dans la lamina II chez les FIS après P21 est significativement plus élevée par rapport aux SD et LEW qui ne présentent aucune différence significative ( $p < 0,001$  ; Tableau 4).



**Figure 24** : Caractéristiques pharmacologique des CPSI GABAergiques et glycinergiques

A. En condition contrôle, les enregistrements électrophysiologiques des neurones de la lamina II à un potentiel de maintien de 0 mV présentent deux types de courant synaptique inhibiteur : glycinergique et GABAergique.

B1. L'ajout de strychnine (10  $\mu$ M) dans la chambre d'enregistrement nous permet de ne sélectionner que les CPSI GABAergiques qui sont caractérisés par une constante de désactivation lente, systématiquement supérieure à 15 ms (B2).

C1. L'ajout de bicuculline (10  $\mu$ M) nous permet de sélectionner uniquement les CPSI glycinergiques caractérisés par une constante de désactivation rapide, inférieure à 13 ms (C2).

**Tableau 4:** Caractéristiques des CPSI de la lamina II mature ( $\geq$  P21).

Souche	Glycine		
	Amplitude (pA $\pm$ SEM)	Fréquence (Hz $\pm$ SEM)	$\tau_D$ (ms $\pm$ SEM)
Fischer (n = 11)	16,35 $\pm$ 1,90	0,65 $\pm$ 0,26	8,72 $\pm$ 0,56
Sprague-Dawley (n = 8)	18,23 $\pm$ 2,97	0,44 $\pm$ 0,13	8,96 $\pm$ 0,62
Lewis (n = 16)	15,00 $\pm$ 1,74	0,65 $\pm$ 0,27	9,32 $\pm$ 0,39

Souche	GABA		
	Amplitude (pA $\pm$ SEM)	Fréquence (Hz $\pm$ SEM)	$\tau_D$ (ms $\pm$ SEM)
Fischer (n = 13)	18,28 $\pm$ 1,36	0,99 $\pm$ 0,47	<b>27,30 <math>\pm</math> 1,23 ***</b>
Sprague-Dawley (n = 12)	19,43 $\pm$ 4,18	0,51 $\pm$ 0,13	21,20 $\pm$ 1,24
Lewis (n = 17)	15,88 $\pm$ 1,19	0,62 $\pm$ 0,19	20,64 $\pm$ 0,67

*Le FIS présente un  $\tau_D$  GABAergique significativement supérieur de celui des SD et des LEW ( $p < 0,001$  \*\*\*).*

## I. 2 La transmission synaptique mixte GABA/glycine

Tous les neurones enregistrés dans la lamina II ne présentent pas systématiquement des CPSI mixtes. Ces derniers sont présents en proportions variables chez nos trois souches de rat après P21 : chez le FIS, 100 % des neurones enregistrés (n = 16) présentent des CPSI mixtes, chez le SD : 54,55 % (6/11) et chez le LEW : 42,00 % (8/19).

Les CPSI mixtes ont une fréquence faible (Tableau 5), moins élevée que les CPSI GABA et glycine purs, et ce dernier paramètre ne présente aucune différence significative entre les trois souches de rat. Ces événements ont une amplitude plus importante que les CPSI GABA et glycine.



**Tableau 5** : Caractéristiques des CPSI mixtes dans la lamina II mature ( $\geq$  P21)

Souche	Mixte glycine / GABA				
	Amplitude (pA $\pm$ SEM)	Fréquence (Hz $\pm$ SEM)	$\tau_{\text{glycine}}$ (ms $\pm$ SEM)	$\tau_{\text{GABA}}$ (ms $\pm$ SEM)	$A_{\text{GABA}}/A_{\text{glycine}}$ $\pm$ SEM
Fischer (n = 16)	41,42 $\pm$ 6,86	0,10 $\pm$ 0,05	6,63 $\pm$ 0,57	<b>70,41 <math>\pm</math> 9,17 *</b>	1,17 $\pm$ 0,12
Sprague-Dawley (n = 6)	54,87 $\pm$ 20,58	0,07 $\pm$ 0,02	7,57 $\pm$ 2,11	52,87 $\pm$ 9,89	0,96 $\pm$ 0,33
Lewis (n = 8)	28,99 $\pm$ 2,61	0,39 $\pm$ 0,18	6,67 $\pm$ 0,78	51,07 $\pm$ 10,33	0,92 $\pm$ 0,15

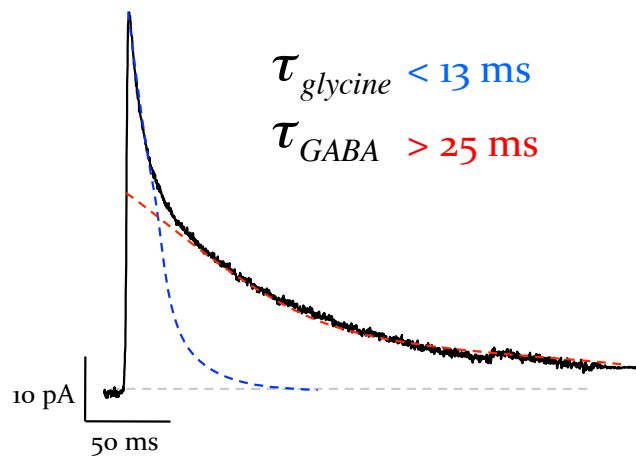
Le FIS présente un  $\tau_{\text{GABA}}$  significativement supérieur de celui des LEW ( $p < 0,05$  \*).

Ces CPSI mixtes sont caractérisés par deux constantes de désactivation notées  $\tau_{\text{glycine}}$  et  $\tau_{\text{GABA}}$  qui correspondent respectivement à la composante rapide glycinergique et plus lente GABAergique (Figure 25). Le  $\tau_{\text{GABA}}$  est significativement plus élevé chez le FIS que chez le LEW ( $p < 0,05$ ) mais ne montre pas de différence significative avec celui du SD tandis qu'il n'y a pas de différence du  $\tau_{\text{glycine}}$  entre les trois souches de rat (Tableau 5).

Les amplitudes relatives des composantes glycine et GABA des CPSI mixtes sont notées  $A_{\text{glycine}}$  et  $A_{\text{GABA}}$ . Le rapport  $A_{\text{GABA}}/A_{\text{glycine}}$  met en avant la contribution GABAergique relative au sein des événements mixtes. Il possède une valeur très proche de 1 signifiant que dans la lamina II mature, les composantes GABAergique et glycinergique ont une importance égale au sein des CPSI mixtes. Ce rapport ne présente ici aucune différence significative entre FIS, SD et LEW (Tableau 5).

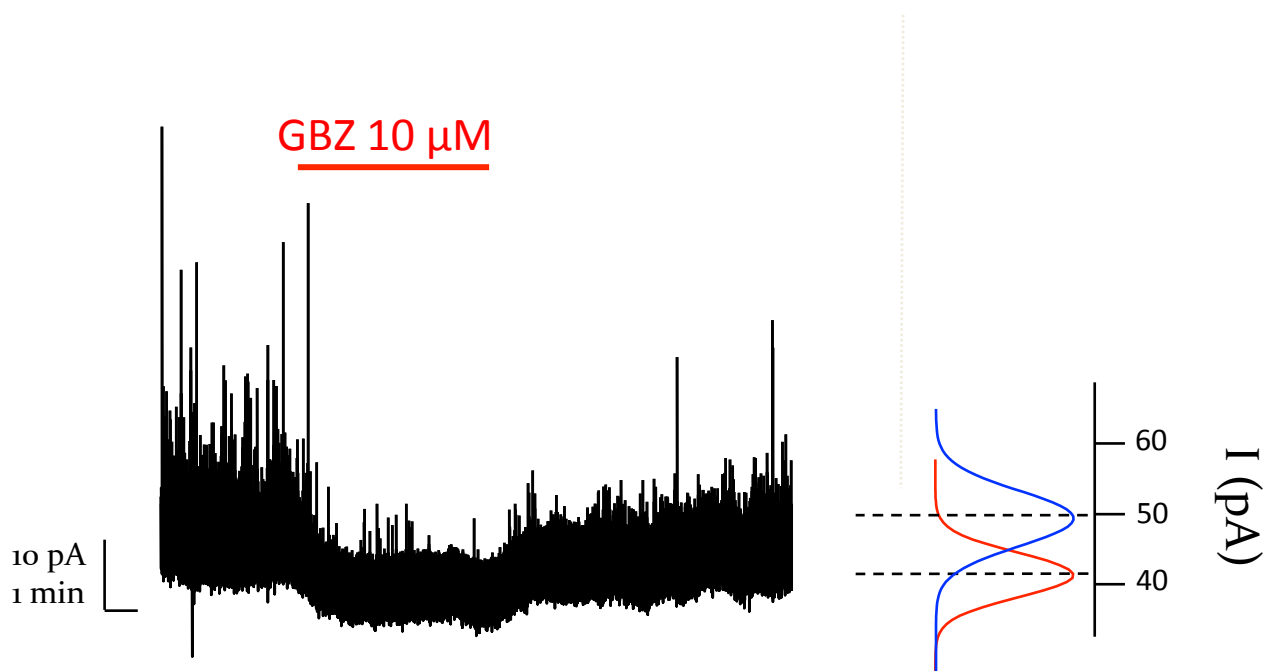
### I. 3 La transmission extra-synaptique GABA

Dans les mêmes conditions expérimentales, en plus d'inhiber la transmission synaptique GABAergique les antagonistes sélectifs des GABA<sub>A</sub>R produisent systématiquement une déflexion de la ligne de base de courant vers le bas (Figure 26). Dans nos conditions d'enregistrement (maintien du potentiel à 0 mV, et potentiel d'inversion des ions chlorures fixé à -60 mV) cette variation



**Figure 25 :** Caractéristiques cinétiques des événements mixtes GABA/glycine

Les événements synaptiques mixtes de la lamina II sont caractérisés par une constante de désactivation ajustée par une fonction biexponentielle, de laquelle sont extraites deux valeurs de  $\tau$ . Le  $\tau_{glycine}$  est strictement inférieur à 13 ms tandis que le  $\tau_{GABA}$  est tout le temps supérieur à 25 ms.



**Figure 26 :** Illustration du courant GABAergique extra-synaptique

L'application de gabazine (10  $\mu\text{M}$ ) ou de bicuculline (10  $\mu\text{M}$ ) révèle la présence d'un courant tonique. L'amplitude du courant est mesurée en soustrayant la valeur du courant de base à la valeur du courant en présence de l'antagoniste. La valeur moyenne de courant dans chaque condition est déterminée en effectuant un ajustement Gaussien sur un histogramme de distribution des points de la trace dans chaque condition. La valeur moyenne de cet ajustement nous donne la valeur moyenne du courant dans la condition donnée.

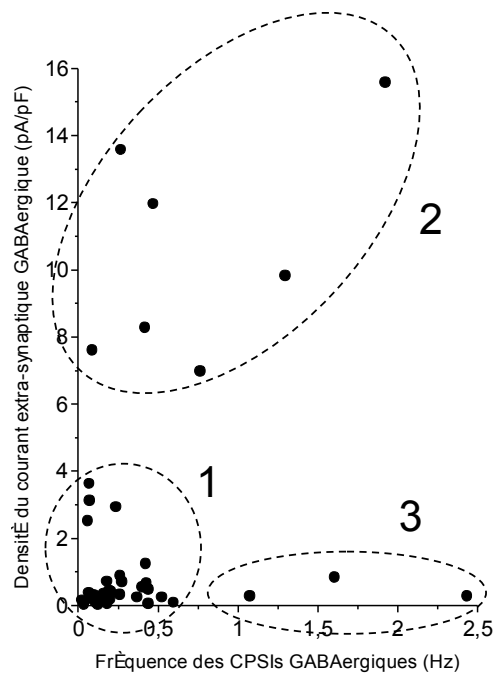
du courant basal signifie la présence d'un courant sortant. Elle s'explique par le blocage de canaux GABAergiques extra-synaptiques, bloquant des conductances chlorures membranaires actives. Ce courant tonique GABAergique est retrouvé sur tous les neurones enregistrés dans la lamina II (70/70) après l'application de GBZ (10  $\mu$ M) indifféremment chez les trois souches de rats. En effet, la densité de ce courant ne présente pas de différence significative entre les FIS, SD et LEW dans la lamina II à P21 (en pA/pF) : SD :  $10,29 \pm 3,34$ ; FIS :  $9,56 \pm 2,47$ ; LEW :  $11,85 \pm 2,49$ .

L'amplitude du courant extra-synaptique n'est pas différente en fonction de l'antagoniste des GABA<sub>A</sub>R utilisé (GBZ ou BIC).

#### **I. 4 Caractéristiques du courant extra-synaptique GABAergique**

La fréquence des CPSI GABAergiques peut influencer la concentration extracellulaire de GABA par un mécanisme de spillover : une grande fréquence produit un débordement de GABA de la fente synaptique qui va augmenter sa concentration extracellulaire. Ce GABA de l'espace extracellulaire va atteindre les récepteurs extra-synaptiques et ainsi augmenter l'amplitude de ce courant.

Nous avons exprimé la valeur de la densité de ce courant GABAergique extra-synaptique en fonction de la fréquence des CPSI GABAergiques pour tenter de mettre en évidence une potentielle interaction des deux facteurs. Nos études de corrélation permettent de ne mettre en avant que des tendances. Lorsque la fréquence est très faible, nous pouvons observer un nuage de point diffus (Figure 27, groupe 1) permettant de montrer que dans des conditions où cette fréquence est trop faible, elle n'a pas d'influence sur la densité du courant extra-synaptique. Seulement, lorsque la fréquence augmente, nous pouvons voir apparaître deux autres populations. Une population semble montrer une tendance de corrélation positive avec la fréquence des CPSI GABAergiques



**Figure 27 :** Relation entre le courant GABAergique extra-synaptique et la fréquence des CPSI GABAergiques

*L'expression du courant extra-synaptique GABAergique enregistré sur les neurones de la lamina II en fonction de la fréquence des CPSI GABAergiques ne montre pas de corrélation absolue. Cependant, ces neurones peuvent être regroupés en trois groupes montrant une différence d'interrelation entre des deux paramètres.*

*1. Ce groupe de neurones possède une fréquence de CPSI GABAergique très faible n'induisant aucune influence sur la densité du courant extra-synaptique.*

*2. Ce groupe de neurones montre une corrélation positive entre les deux paramètres indiquant un spillover*

*3. Ces neurones constituent un groupe dont la libération synaptique de GABA n'a pas d'impact sur la densité du courant extra-synaptique quelle que soit la fréquence.*

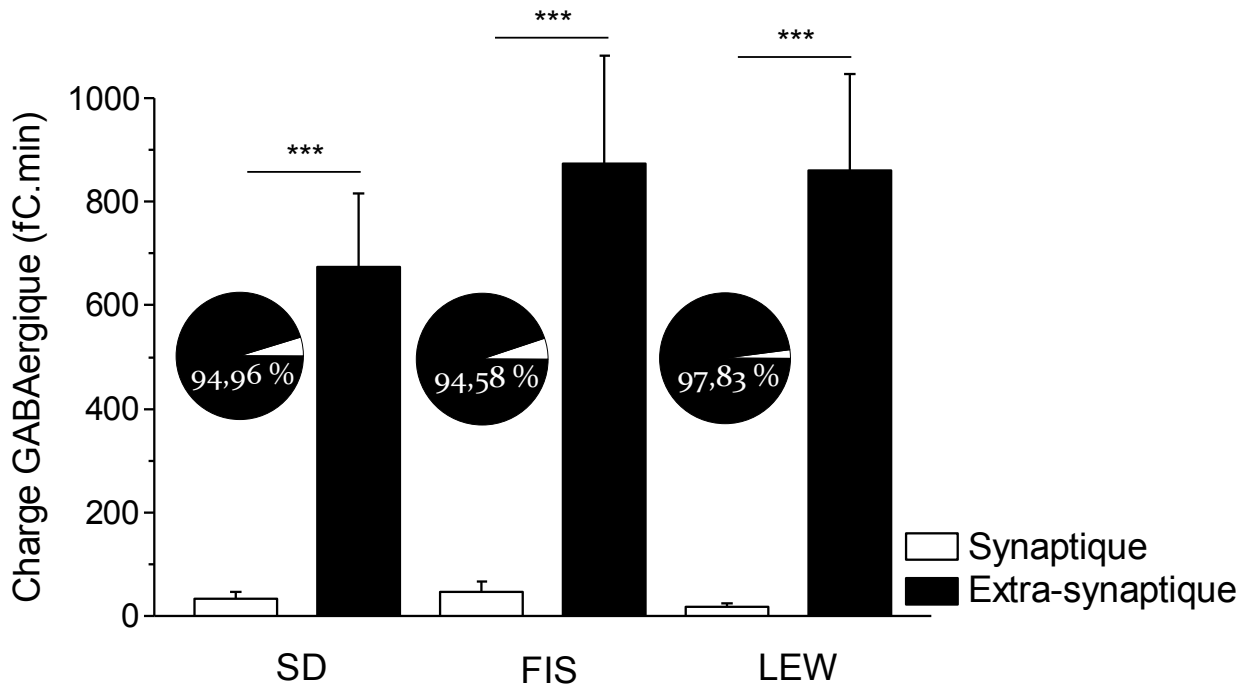
(Figure 27, groupe 2). Il est possible que cette population soit sous l'influence d'un spillover provoqué par une augmentation de la fréquence des CPSI GABAergiques. Une troisième population de neurones enregistrés montre une densité de courant extra-synaptique qui reste faible malgré une augmentation de la fréquence des CPSI GABAergiques (Figure 27, groupe 3), suggérant qu'elle n'est pas influencée par un potentiel spillover.

### I. 5 Comparaison des transmissions synaptiques et extra-synaptiques GABAergiques

Pour comparer les transmissions GABAergiques synaptiques et extra-synaptiques retrouvées dans la lamina II, nous avons calculé leur charge inhibitrice (fC) sur une minute d'enregistrement.

La charge inhibitrice portée par le courant GABAergique synaptique représente chez le FIS  $47,37 \pm 20,89$  fC (n = 12) ; chez le SD  $33,92 \pm 13,69$  fC (n = 11) et chez le LEW  $18,69 \pm 5,95$  fC (n = 16). Le courant extra-synaptique révélé après application de GBZ est en moyenne de  $873,51 \pm 208,78$  fC chez le FIS (n = 5) ;  $673,42 \pm 142,69$  fC chez le SD (n = 8) et  $860,76 \pm 185,43$  fC chez le LEW (n = 5 ; Figure 28). La charge portée par le courant extra-synaptique est significativement plus élevée (environ 20 fois) que la charge portée par les courants synaptiques sur les neurones de la lamina II des trois souches de rat (p < 0,001).

Cette comparaison montre que le courant phasique chez le rat mature représente respectivement chez les FIS, SD et LEW : 5,42 % ; 5,04 % et 2,17 % de la totalité de l'inhibition GABAergique (Figure 28). Le courant extra-synaptique porte donc la très grande majorité des charges inhibitrices GABAergiques de la lamina II quelle que soit la souche de rat, ce qui lui confère une inhibition beaucoup plus importante que le courant phasique.



**Figure 28 :** Comparaison des charges inhibitrices synaptiques et extra-synaptiques

*Dans la lamina II, la charge inhibitrice portée par la transmission extra-synaptique GABAergique est significativement plus importante que la charge inhibitrice portée par le courant synaptique chez les trois souches de rats ( $p < 0,001$ ). La charge portée par l'inhibition extra-synaptique n'est pas significativement différente entre les souches. Les diagrammes circulaires montrent que la charge portée par le courant GABAergique extra-synaptique et elle représente plus de 90% de la charge inhibitrice totale.*

L'enregistrement des neurones de la lamina II avec un potentiel de maintien de -60 mV et un potentiel d'inversion du courant cationique à 0 mV nous permet d'enregistrer les CPSE. L'analyse de ces enregistrements n'a montré aucune différence ni au cours de la maturation durant les quatre premières semaines postnatales, ni entre les souches sur les mêmes paramètres de cinétique, de fréquence et d'amplitude des CPSE.

## II. MATURATION DES TRANSMISSIONS INHIBITRICES

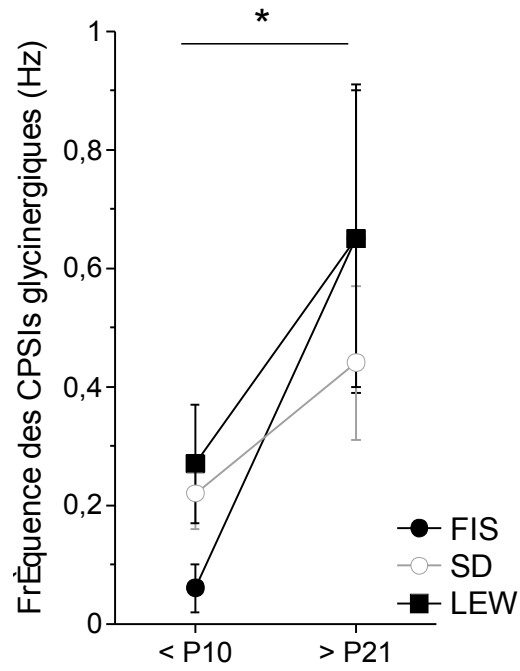
### II. 1. Maturation de la transmission synaptique glycinergique

Nous avons mesuré la transmission synaptique glycinergique entre P8 et P28 sur les SD, FIS et LEW en utilisant la technique du patch clamp dans les mêmes conditions que précédemment. Nos enregistrements ont montré que la fréquence des événements glycinergiques est moins importante chez les rats nouveau nés ( $\leq P10$ ) FIS, SD et LEW. Chez chacune de ces souches, il y a une augmentation de la fréquence des CPSI glycinergiques entre P8 et P28 qui n'est significative que pour le FIS ( $p < 0,05$ ;  $n = 21$ ; Tableau 6; Figure 29). Cependant, aucune différence de la fréquence, de l'amplitude ou de la cinétique des CPSI glycinergiques n'est observée entre les trois souches de rats avant P10.

**Tableau 6** : Caractéristiques des CPSI glycinergiques de la lamina II immature ( $\leq P10$ )

Souche	Glycine		
	Amplitude (pA $\pm$ SEM)	Fréquence (Hz $\pm$ SEM)	$\tau_D$ (ms $\pm$ SEM)
Fischer (n = 5)	15,40 $\pm$ 1,25	<b>0,06 <math>\pm</math> 0,04</b>	7,66 $\pm$ 0,34
Sprague-Dawley (n = 6)	15,22 $\pm$ 2,41	<b>0,22 <math>\pm</math> 0,06</b>	9,10 $\pm$ 0,49
Lewis (n = 6)	14,99 $\pm$ 3,01	<b>0,27 <math>\pm</math> 0,10</b>	10,87 $\pm$ 0,58





**Figure 29 :** Évolution postnatale de la fréquence des CPSI glycinergiques

*La fréquence des évènements glycinergiques montre une tendance à l'augmentation au cours de la maturation du système spinal. Cette augmentation n'est significative que chez le FIS ( $p < 0,05$ ).*

## II. 2. Maturation de la transmission synaptique GABAergique

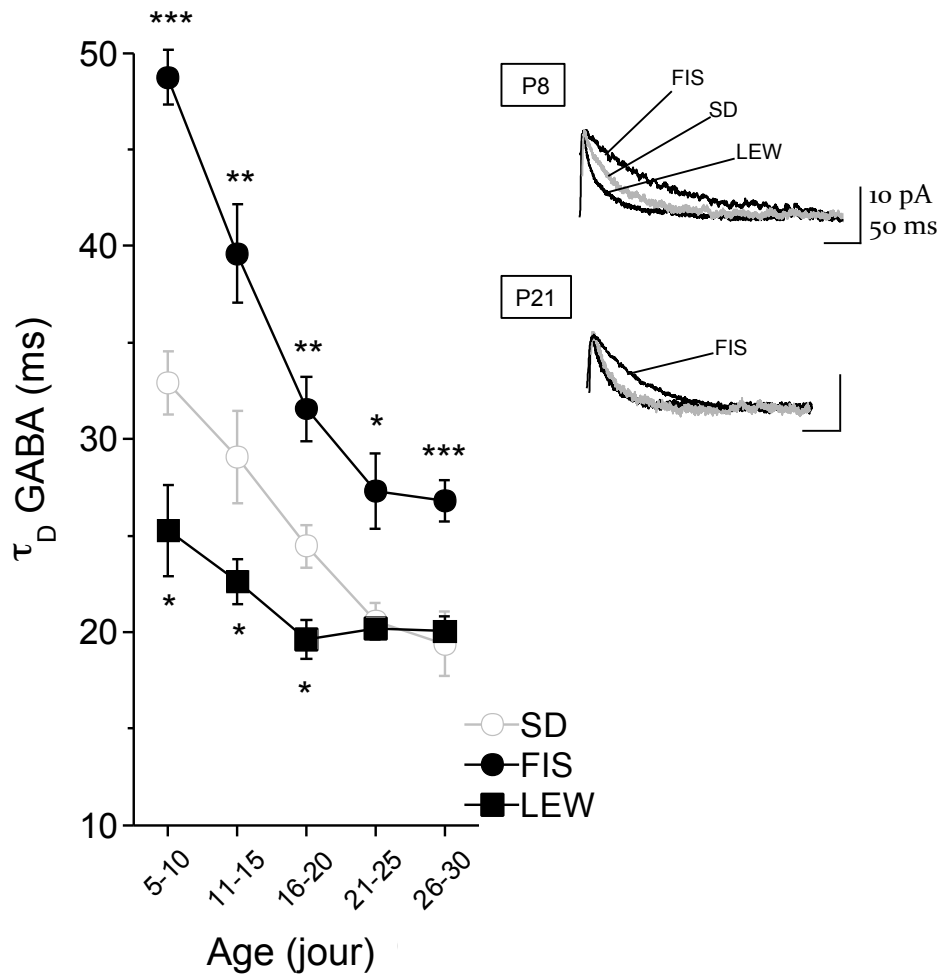
Aucune différence significative de l'amplitude ou de la fréquence des CPSI GABAergiques n'a été observée, ni au cours de la maturation du système spinal ni entre les trois souches de rats (Tableau 7).

Cependant, la constante de désactivation des CPSI GABAergique est significativement plus élevée dès les premiers jours postnatals chez les FIS, SD et LEW. Toutefois, chacune des souches de rat montre une diminution significative du  $\tau_D$  GABAergique au cours de la maturation du système spinal entre P8 et P28 (FIS :  $p < 0,001$  ; SD :  $p < 0,001$  ; LEW :  $p < 0,01$ ). De plus pendant cette période périnatale ( $\leq P10$ ), le  $\tau_D$  GABAergique du FIS est significativement plus élevé que chez le LEW et SD ( $p < 0,001$  ; Tableau 7) et celui du LEW est significativement plus faible que chez le SD ( $p < 0,05$ ). Cela signifie qu'il existe une maturation différentielle des événements GABAergiques au cours de développement postnatal entre les trois souches de rat (Figure 30). Tout au long de la maturation du système spinal, la constante de désactivation des CPSI GABAergiques reste significativement plus élevée chez le FIS par rapport au SD et LEW. Le LEW présente une constante de désactivation des CPSI GABAergiques qui est significativement inférieure au SD uniquement pendant les 20 premiers jours postnatals, après lesquels SD et LEW ne sont pas différents. (Pour chaque mesure :  $6 \leq n \leq 18$ ).

**Tableau 7** : Caractéristiques des CPSI GABAergiques de la lamina II immature ( $\leq P10$ ).

Souche	GABA		
	Amplitude (pA $\pm$ SEM)	Fréquence (Hz $\pm$ SEM)	$\tau_D$ (ms $\pm$ SEM)
Fischer (n = 14)	22,20 $\pm$ 2,78	0,88 $\pm$ 0,13	48,74 $\pm$ 1,43 ***
Sprague-Dawley (n = 18)	22,11 $\pm$ 2,84	0,85 $\pm$ 0,28	32,90 $\pm$ 1,62
Lewis (n = 7)	12,48 $\pm$ 1,74	0,80 $\pm$ 0,41	25,27 $\pm$ 2,36 #

*Pendant la période périnatale ( $\leq P10$ ), le  $\tau_D$  GABAergique du FIS est significativement plus élevé que chez le LEW et SD ( $p < 0,001$  ; \*\*\*) et celui du LEW est significativement plus faible que chez le SD ( $p < 0,05$  ; #).*



**Figure 30** : Évolution postnatale des cinétiques des CPSI GABAergiques chez les SD, FIS et LEW

Le graphique montre une réduction de la constante de désactivation des CPSI GABAergiques pendant les trois premières semaines postnatales chez les SD, FIS et LEW. Le  $\tau_D$  GABAergique est significativement plus élevé chez le FIS tout au long du développement en regard du SD. Le  $\tau_D$  GABAergique chez le LEW est significativement plus faible que celui du SD pendant les trois premières semaines postnatales puis n'est pas significativement différent à partir de P21.

Les traces à droite représentent des superpositions de traces moyennées de CPSI GABAergiques des trois souches de rat à P8 et P21. Significativité statistique : \*  $p < 0,05$  ; \*\*  $p < 0,01$  ; \*\*\*  $p < 0,001$ .

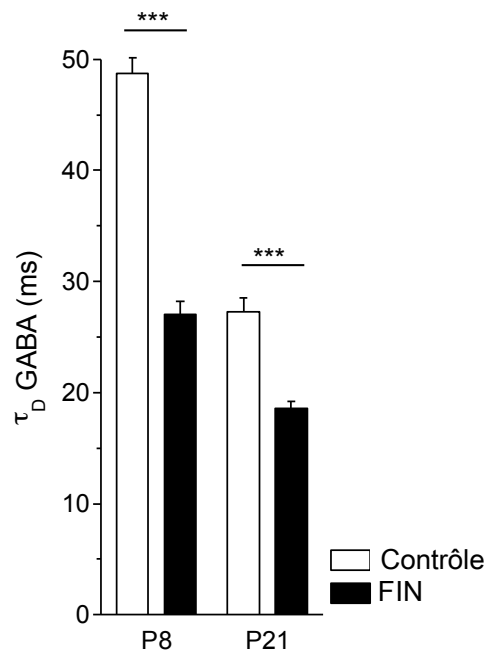
Notre hypothèse est que l'altération de la constante de désactivation des CPSI GABAergiques au cours du développement est due à la présence d'un tonus spinal en stéroïdes réduits plus important chez le FIS. Nous avons donc incubé nos tranches de moelle épinière avec du finastéride (FIN, inhibiteur de la 5 $\alpha$ -réductase, 50  $\mu$ M) durant trois heures avant d'enregistrer les neurones de la lamina II. Les neurones enregistrés chez le FIS dans ces conditions montrent une réduction significative de la constante de désactivation GABAergique à P8 : contrôle :  $48,74 \pm 1,43$  ms (n=14) ; FIN :  $27,06 \pm 1,14$  ms (n=9 ; p < 0,001) et à P21 : contrôle :  $27,30 \pm 1,23$  ms (n=13) ; FIN :  $18,55 \pm 0,68$  ms (n=9 ; p < 0,001 ; Figure 31). L'incubation avec le FIN n'a produit aucune différence significative sur les caractéristiques des CPSI glycinergiques (amplitude, fréquence et constante de désactivation).

Chez le FIS il y a un donc tonus spinal de stéroïdes 5 $\alpha$ -réduits à P8 comme à P21 qui est suffisant pour moduler la transmission synaptique GABAergique en augmentant leur constante de désactivation.

### II.3. Maturation de la transmission synaptique mixte

Les neurones de la lamina II présentent aussi des courants inhibiteurs mixtes au cours du développement. Ces CPSI mixtes sont présents à P8 chez les FIS, SD et les LEW dans différentes proportions. Chez le FIS cette proportion est la plus élevée au cours de la période néonatale ( $\leq$  P10 ; en %) : FIS :  $22,58 \pm 4,18$  (n = 9) ; SD :  $11,89 \pm 2,58$  (n = 12 ; p < 0,05) et LEW :  $5,75 \pm 2,87$  (n = 6 ; p < 0,05). L'évolution de cette proportion au cours de la maturation présente une diminution significative chez les FIS et les SD uniquement : FIS : de  $22,58 \pm 4,18$  à  $11,57 \pm 1,83$  (n = 21 ; p < 0,01) ; SD : de  $11,89 \pm 2,58$  à  $4,22 \pm 1,55$  (n = 17 ; p < 0,01 ; Figure 32).

La fréquence de ces événements ne montre aucune différence significative au cours de la maturation du système spinal.



**Figure 31** : Effet du finastéride sur le  $\tau_D$  GABAergique à P8 et P21 chez le FIS

*L'incubation préalable des tranches de moelle épinière avec un inhibiteur de l'enzyme de réduction des stéroïdes : le finastéride induit une diminution significative de la constante de désactivation des CPSI GABAergiques à P8 ( $p < 0,001$ ) et à P21 ( $p < 0,001$ ) chez le FIS.*

Aucune différence significative de la fréquence, de l'amplitude des CPSI mixtes ni de la constante de désactivation propre à la composante glycinergique ( $\tau_{\text{glycine}}$ ) n'a été observée entre les souches au cours de la période néonatale (Tableau 8). Ces paramètres ne présentent pas non plus de variation au cours de la maturation de l'animal. Nous nous sommes donc concentrés sur la composante GABAergique des CPSI mixtes et avons observés une diminution significative de la constante de désactivation ( $\tau_{\text{GABA}}$ ) chez le FIS et le LEW : (de P8 à P21-28, en ms) FIS : de  $107,45 \pm 13,06$  à  $73,11 \pm 9,81$  ( $n = 21$  ;  $p < 0,05$ ) ; LEW : de  $62,31 \pm 7,91$  à  $37,14 \pm 4,54$  ( $n = 12$  ;  $p < 0,05$  ; Tableaux 5 et 8, Figure 32). Le  $\tau_{\text{GABA}}$  est plus important chez le FIS à tous les stades de la maturation ( $p < 0,05$ ). Cette maturation différentielle du  $\tau_{\text{GABA}}$  entre FIS et LEW est la même que celle du  $\tau_{\text{D}}$  des CPSI GABAergiques.

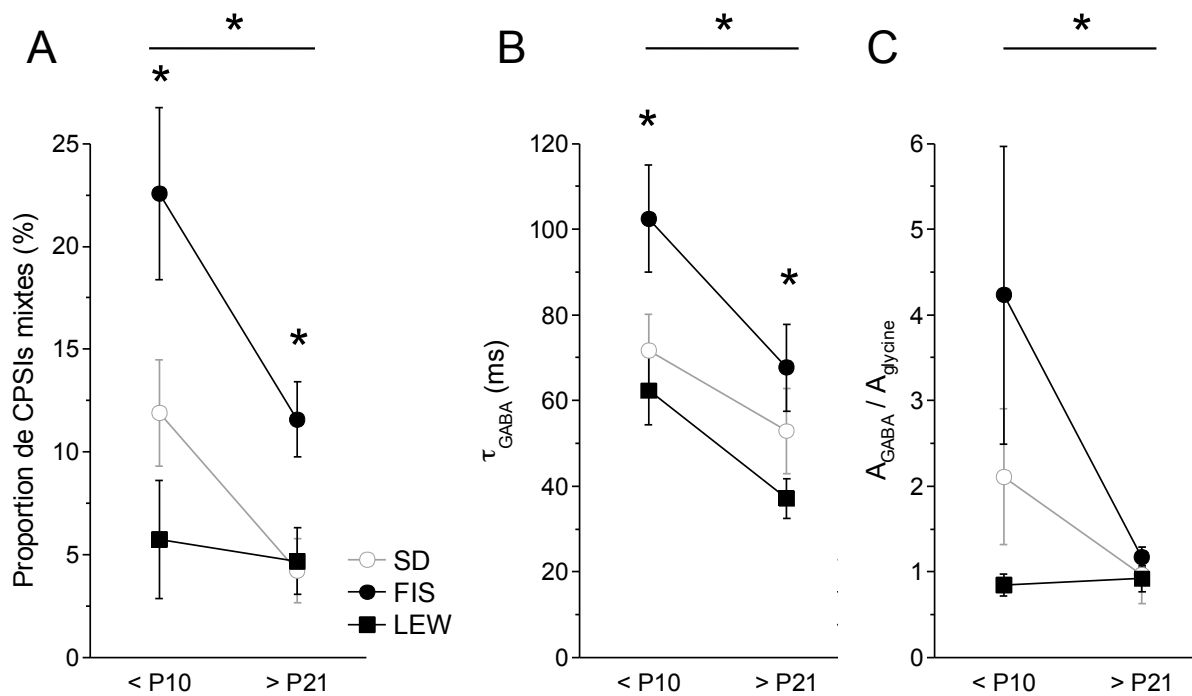
**Tableau 8** : Caractéristiques des CPSI mixtes dans la lamina II immature ( $\leq P10$ )

Souche	Mixte glycine / GABA				
	Amplitude (pA $\pm$ SEM)	Fréquence (Hz $\pm$ SEM)	$\tau_{\text{glycine}}$ (ms $\pm$ SEM)	$\tau_{\text{GABA}}$ (ms $\pm$ SEM)	$A_{\text{GABA}}/A_{\text{glycine}}$ $\pm$ SEM
Fischer (n = 9)	$41,07 \pm 10,15$	$0,24 \pm 0,13$	$6,71 \pm 0,92$	<b><math>102,48 \pm 12,54</math> *</b>	<b><math>4,23 \pm 1,74</math></b>
Sprague-Dawley (n = 12)	$51,92 \pm 8,15$	$0,65 \pm 0,24$	$7,36 \pm 0,69$	<b><math>71,58 \pm 8,57</math></b>	<b><math>2,11 \pm 0,79</math></b>
Lewis (n = 5)	$30,73 \pm 4,35$	$0,24 \pm 0,11$	$7,77 \pm 1,8$	<b><math>62,31 \pm 7,91</math></b>	<b><math>0,85 \pm 0,13</math></b>

*Pendant la période périnatale ( $\leq P10$ ), le  $\tau_{\text{GABA}}$  des CPSI mixtes du FIS est significativement plus élevé que chez le LEW et SD ( $p < 0,05$  ; \*).*

Les amplitudes normalisées ( $A_{\text{GABA}}/A_{\text{glycine}}$ ) montrent une diminution significative chez le FIS (de  $4,23 \pm 1,74$  à  $1,17 \pm 0,12$ ;  $p < 0,05$ ) ; mais pas chez le SD (de  $2,11 \pm 0,79$  à  $0,96 \pm 0,33$ ) et le LEW (de  $0,85 \pm 0,13$  à  $0,92 \pm 0,15$ ) entre le rat nouveau-né et mature (Tableaux 5 et 8, Figure 32).

Comme la constante de désactivation, l'amplitude relative de la composante GABAergique des CPSI mixtes montre une tendance à diminuer avec la maturation postnatale du système spinal. De plus, la composante GABAergique reste plus élevée chez le FIS (en terme de  $\tau_{\text{GABA}}$ ), chez les rats nouveau-nés comme dans le système spinal mature.



**Figure 32** : Évolution postnatale des paramètres des CPSI mixtes chez les SD, FIS et LEW

A. Les FIS et les SD montrent une diminution significative de la proportion de CPSI mixtes au cours de la maturation spinale ( $p < 0,05$ ). Les LEW ne montrent aucune maturation significative de cette proportion de CPSI mixtes. Cette proportion est significativement plus élevée chez le FIS tout au long de la maturation spinale ( $p < 0,05$  à <P10 et >P21).

B. Les FIS et les LEW montrent une diminution significative du  $\tau_{GABA}$  au cours de la maturation postnatale ( $p < 0,05$ ). Le  $\tau_{GABA}$  est plus grand chez le FIS avant P10 ( $p < 0,05$ ) et après P21 ( $p < 0,05$ ).

C. Les amplitudes normalisées ( $A_{GABA}/A_{glycine}$ ) diminuent de manière significative chez les FIS ( $p < 0,05$ ) mais pas chez les SD ou les LEW au cours de la maturation spinale. La légende du panel A est la même pour les trois graphiques.

## II. 4. Maturation de la transmission extra-synaptique GABAergique

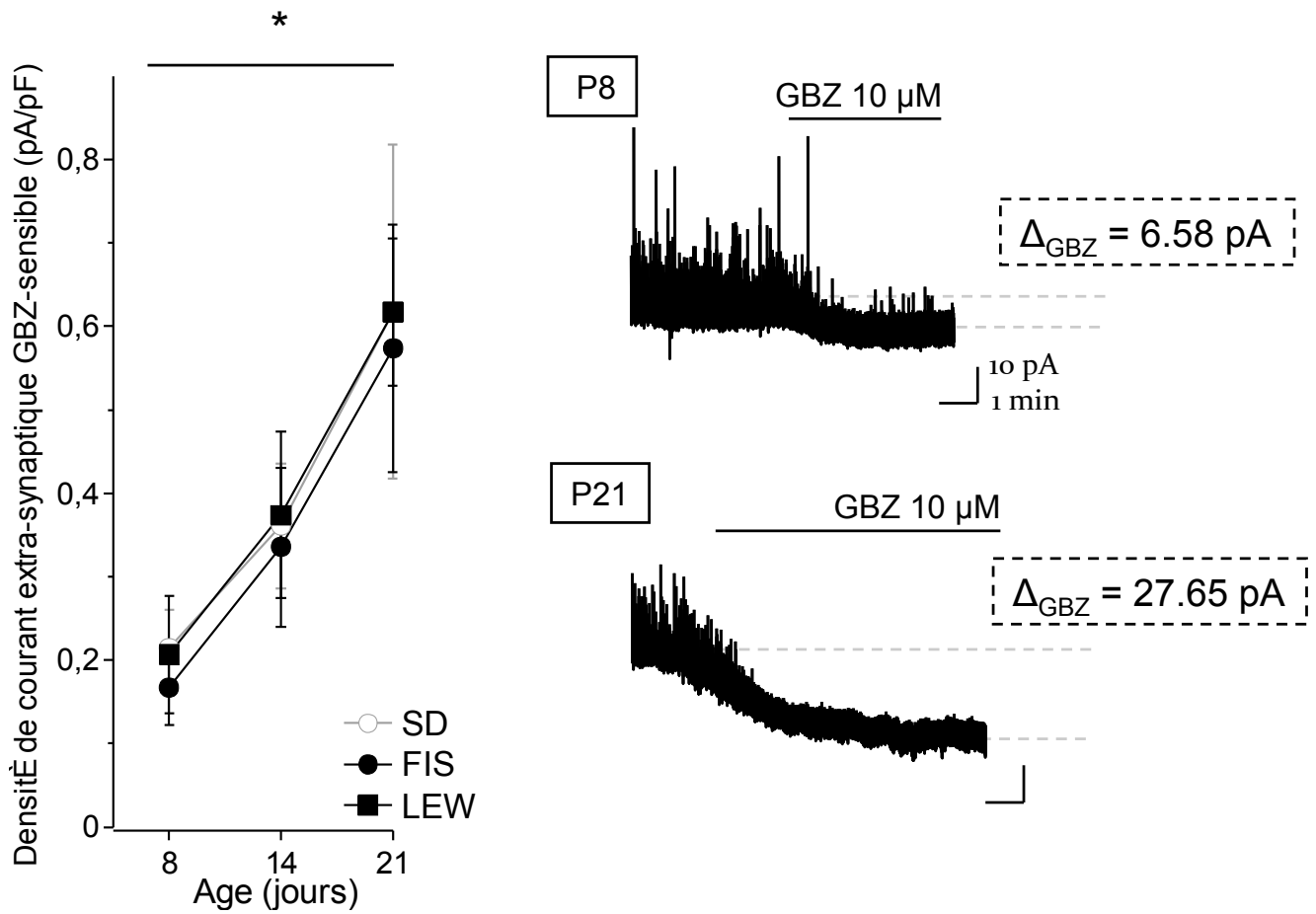
Le courant extra-synaptique GABAergique subit une maturation postnatale. En effet, sa densité augmente de manière significative au cours des trois premières semaines postnatales chez les trois souches de rat (en pA/pF) : FIS : de  $0,17 \pm 0,04$  à  $0,57 \pm 0,15$  ( $n = 16$ ,  $p < 0,05$ ) ; SD : de  $0,22 \pm 0,04$  à  $0,62 \pm 0,20$  ( $n = 25$ ,  $p < 0,05$ ) ; LEW : de  $0,21 \pm 0,07$  à  $0,62 \pm 0,09$  ( $n = 18$  ;  $p < 0,05$  ; Figure 33). Ces résultats reflètent une hausse significative de l'activité basale des récepteurs extra-synaptiques au cours du développement postnatal.

Nous n'avons observé aucune différence significative entre les souches de rat à P8, P14 ou à P21.

Nous avons ensuite voulu quantifier la réponse maximale de ces récepteurs extra-synaptiques afin de savoir si l'augmentation de la densité de courant tonique était corrélée à une augmentation du nombre de récepteurs extra-synaptiques. Pour cela nous avons utilisé leur agoniste spécifique, le THIP. Utilisé à faible concentration le THIP est sélectif des  $\delta$ GABA<sub>A</sub>R, mais dans notre cas son application à 100  $\mu$ M permet d'activer l'ensemble des récepteurs extra-synaptiques. Ce courant est dû à l'ouverture des conductances GABAergiques extra-synaptiques exclusivement car aucune augmentation significative de la fréquence des CPSI GABAergiques n'a pu être observée après l'ajout de THIP sur nos tranches.

La densité de courant GABAergique extra-synaptique observée après application de THIP ne montre aucune différence significative entre P8 et P21 ni entre les souches FIS, SD et LEW (en pA/pF) ; FIS : de  $1,41 \pm 0,20$  à  $1,71 \pm 0,21$  ( $n = 16$ ) ; SD : de  $1,22 \pm 0,24$  à  $2,18 \pm 1,34$  ( $n = 25$ ) et LEW : de  $1,37 \pm 0,32$  à  $2,09 \pm 0,50$  ( $n = 18$  ; Figure 34).

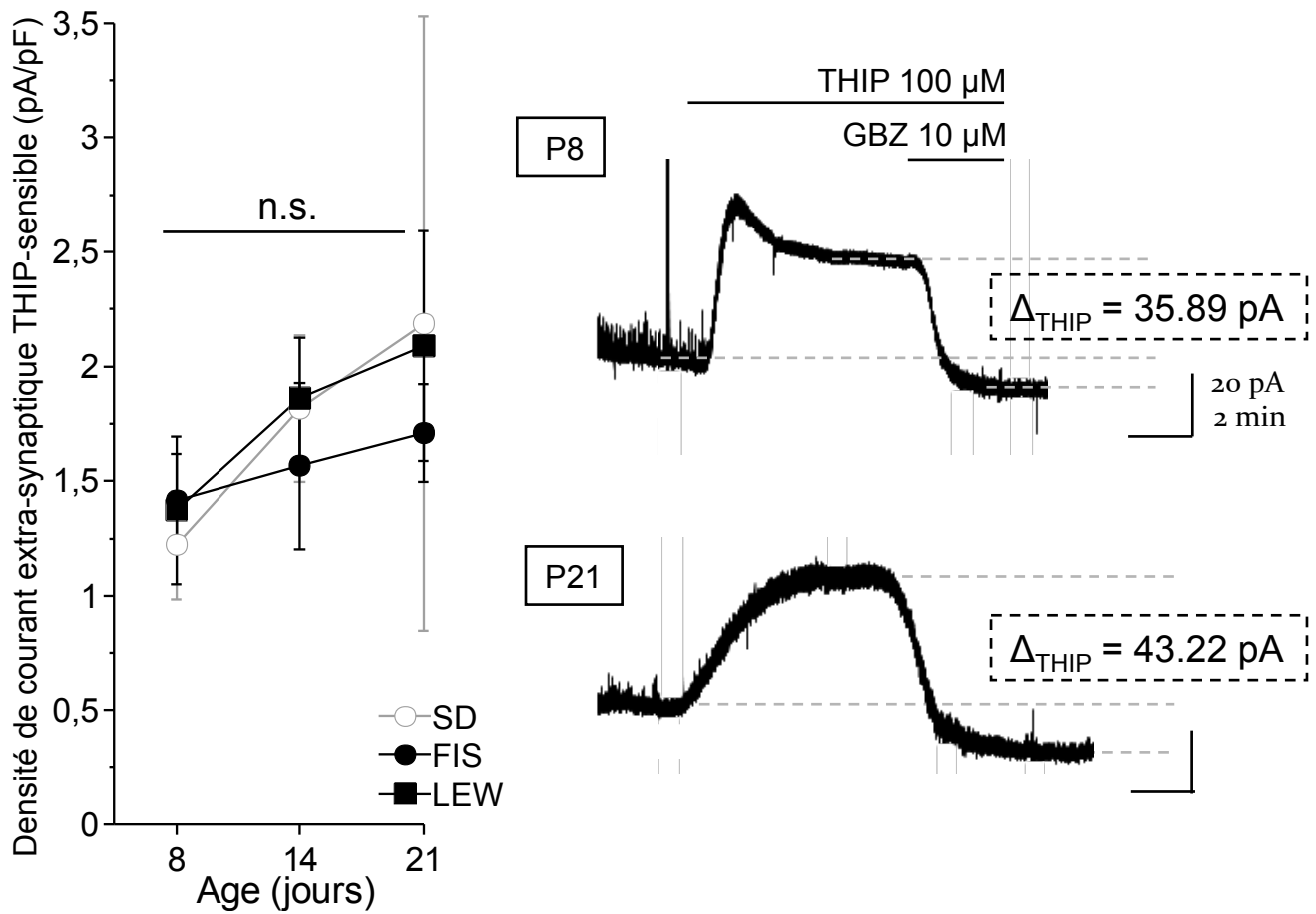




**Figure 33** : Évolution postnatale de la densité de courant extra-synaptique GABAergique basale chez les SD, FIS et LEW

*Le graphique montre que toutes les souches de rat présentent une augmentation significative de la densité de courant extra-synaptique GABAergique entre P8 et P21 sans différence inter-souche ( $p < 0,05$ ). Les traces à droite montrent des enregistrements représentatifs de courants extra-synaptiques GBZ-sensibles à P8 et P21.*

L'augmentation de la conductance inhibitrice induite par l'application de THIP atteste de la présence des récepteurs extra-synaptiques fonctionnels dès P8 et jusque dans le système spinal mature : à P21. Ces récepteurs ont une activité basale (mise en évidence par l'application de GBZ) mais cette dernière peut être augmentée drastiquement en présence d'agonistes, suggérant une grande capacité de modulation car l'application de THIP induit une conductance du courant GABAergique plus élevée que sa conductance basale. Le courant maximal induit par le THIP étant indépendant de la maturation, l'augmentation de courant tonique GBZ-sensible reflète une augmentation du nombre de récepteurs extra-synaptiques activés en condition basale.



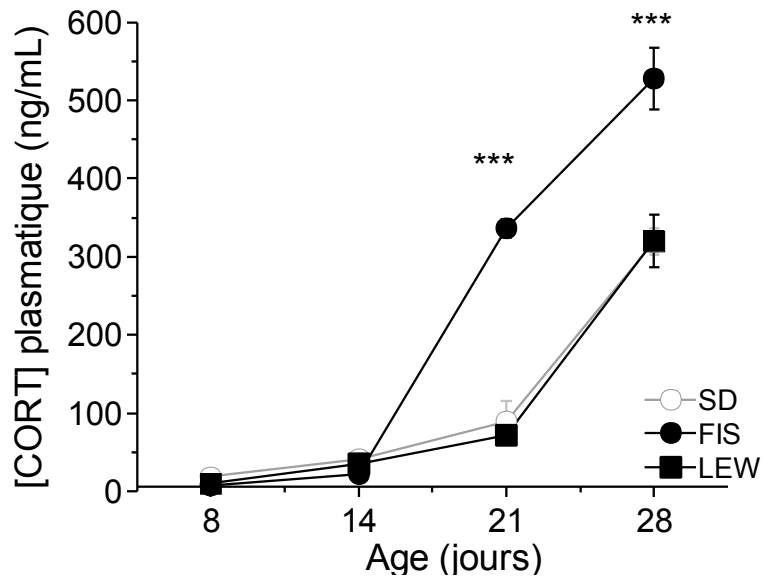
**Figure 34 :** Évolution postnatale de la densité de courant extra-synaptique GABAergique maximale révélée par application de THIP chez les SD, FIS et LEW

*L'application de THIP (100 µM) provoque une augmentation de la densité de courant extra-synaptique sur l'ensemble des neurones de la lamina II chez les SD, FIS et LEW. Aucune différence significative de l'effet du THIP n'a été observée au cours de la maturation ou entre les souches de rat. Les traces à droite montrent des enregistrements représentatifs de courants extra-synaptiques THIP-sensibles à P8 et P21. Une application de GBZ reverse complètement l'augmentation du courant extra-synaptique induite par l'application du THIP.*

### III. CONCENTRATION PLASMATIQUE DE CORT

Cette étude a été effectuée sur un ensemble de 72 animaux. La quantification de la concentration plasmatique de CORT chez les rats FIS, SD et LEW a été effectuée sur des groupes de six animaux à P8, P14, P21 et P28 pour chaque souche de rat. Les résultats présentés dans la Figure 35 montrent que les taux plasmatiques de CORT suivent la même évolution générale au cours des deux premières semaines pour les trois souches de rats. Jusqu'à P14 la concentration plasmatique de CORT est très faible chez les FIS, SD et LEW ne présentant aucune différence significative entre les souches au même âge (en ng/mL) : P8 FIS :  $7,39 \pm 1,31$  ; SD :  $18,05 \pm 4,92$  ; LEW :  $9,87 \pm 3,23$  ; P14 FIS :  $21,88 \pm 3,55$  ; SD :  $40,17 \pm 6,70$  ; LEW :  $35,04 \pm 9,88$ . Ces résultats sont en adéquation avec la littérature décrivant cette période de SHRP comme une hypo-réponse de l'axe HPA au cours de laquelle les rats présentent un très faible taux circulant de CORT.

Les quantifications à P21 et P28 montrent une hausse significative de la concentration de CORT mesurée sur les trois souches de rats. Cependant la concentration est significativement plus élevée chez le FIS ( $p < 0,001$ ) en regard des SD et LEW qui ne présentent aucune différence significative (en ng/mL) : FIS P21 :  $336,32 \pm 11,48$  ; P28 :  $527,84 \pm 39,68$  ; SD P21 :  $88,27 \pm 27,71$  ; P28 :  $318,81 \pm 16,92$  ; LEW P21 :  $71,84 \pm 11,20$  ; P28 :  $319,68 \pm 33,69$ . La souche FIS présente donc un fort taux de CORT plasmatique après la maturation de l'axe HPA, en sortie de la période SHRP par rapport aux SD et LEW.



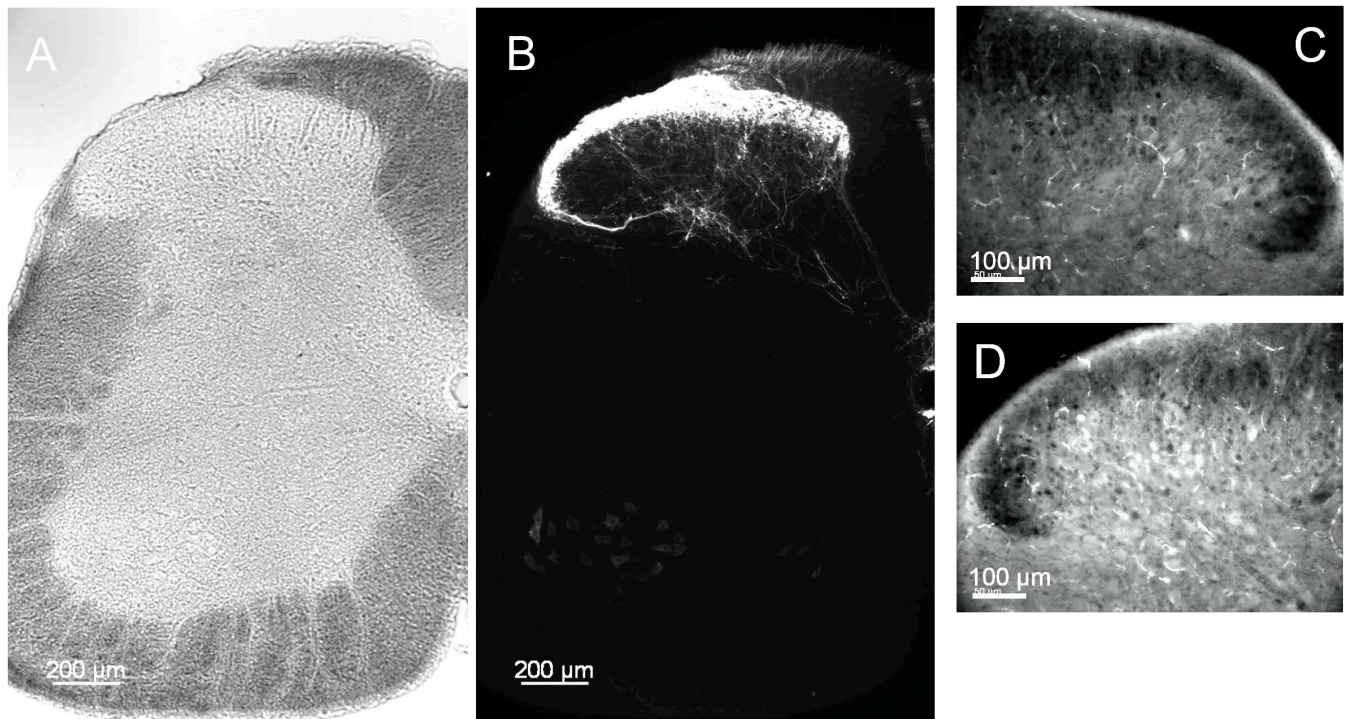
**Figure 35** : Évolution postnatale de la concentration plasmatique de CORT.

*Le graphique montre qu'il n'y a aucune différence de concentration plasmatique de CORT à P8 et P14 entre les souches de rat, et que pendant ces deux premières semaines postnatales cette concentration est très faible. À partir de P21 et jusqu'à P28, les FIS ont une concentration plasmatique de CORT significativement plus élevée que les SD et LEW qui ne présentent aucune différence significative ( $p < 0,001$ ).*

## IV. MARQUAGE DES $\delta$ GABA<sub>A</sub>R DANS LA LAMINA II

Puisqu'une conductance extra-synaptique GABAergique est présente, fonctionnelle et modulable sur une large population des neurones de la lamina II, nous avons voulu observer la présence de récepteur contenant la sous-unité  $\delta$  (sous-unité spécifique des récepteurs GABAergiques retrouvés hors des synapses). En effet des expériences ont décelé la présence d'ARNm codant pour cette sous-unité dans les cornes dorsales. De plus la présence de ces récepteurs a été corrélée à un courant tonique GABAergique dans l'hippocampe. Nous avons donc cherché à mettre en évidence la présence de la sous-unité  $\delta$  des GABA<sub>A</sub>R grâce à un anticorps spécifique.

Les photos des marquages immunohistochimiques (Figure 36) montrent un marquage très diffus de l'ensemble de la moelle épinière. Ce marquage n'est pas spécifique des neurones puisque même la substance blanche présente un marquage diffus. Malgré plusieurs essais en optimisant l'épaisseur des tranches de moelle épinière (50 et 30  $\mu$ m) et les concentrations d'anticorps utilisés (de 0,15 à 3  $\mu$ g/mL) le marquage dirigé contre les  $\delta$ GABA<sub>A</sub>R apparaît non spécifique. Notre contrôle positif avec un anticorps dirigé contre le peptide CGRP (Figure 36) démontre un marquage optimal et valide donc le protocole de marquage utilisé.



**Figure 36** : Marquage immunohistochimique des  $\delta$ GABA<sub>A</sub>R dans les cornes dorsales de la moelle épinière.

*A. Image de la moelle épinière en lumière transmise.*

*B. Le marquage dirigé contre le peptide CGRP est très dense dans les couches superficielles des cornes dorsales de la moelle épinière, et plus faibles dans les couches profondes des cornes dorsales.*

*C. Le marquage avec l'anticorps primaire dirigé contre la sous-unité  $\delta$  des GABA<sub>A</sub>R utilisé à une concentration de 0,6  $\mu$ g/mL montre un marquage diffus dans les cornes dorsales qui semble non spécifique.*

*D. Le même marquage diffus est retrouvé avec une concentration d'anticorps primaire plus élevé (1,5  $\mu$ g/mL).*

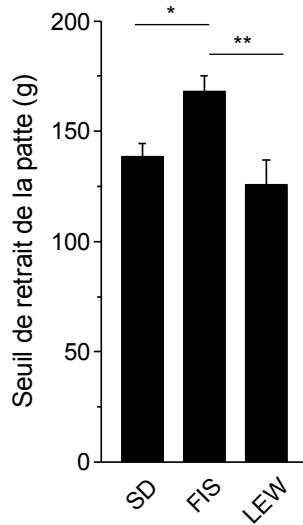
## V. IMPACT DE LA CORTICOSTERONE PLASMATIQUE SUR LA SENSIBILITE MECANIQUE

Pour mesurer l'impact des taux plasmatiques de CORT sur la sensibilité nociceptive nous avons utilisé le test de la pince calibrée sur les FIS, SD et LEW après P<sub>21</sub>, lorsque l'axe HPA est mature et les différences inter-souches sont marquées. Les FIS montrent un seuil mécanique de retrait de la patte significativement plus important que les SD et LEW qui ne montrent aucune différence significative (en g) : FIS :  $167,94 \pm 7,01$  (n = 10) ; SD :  $138,53 \pm 5,85$  (n = 12 ; p < 0,05) ; et LEW :  $125,89 \pm 11,24$  (n = 7 ; p < 0,01 ; Figure 37).

La souche FIS qui possède la concentration plasmatique de CORT la plus importante après P<sub>21</sub>, montre une sensibilité moindre aux stimuli nociceptifs mécaniques induits par la pince calibrée.

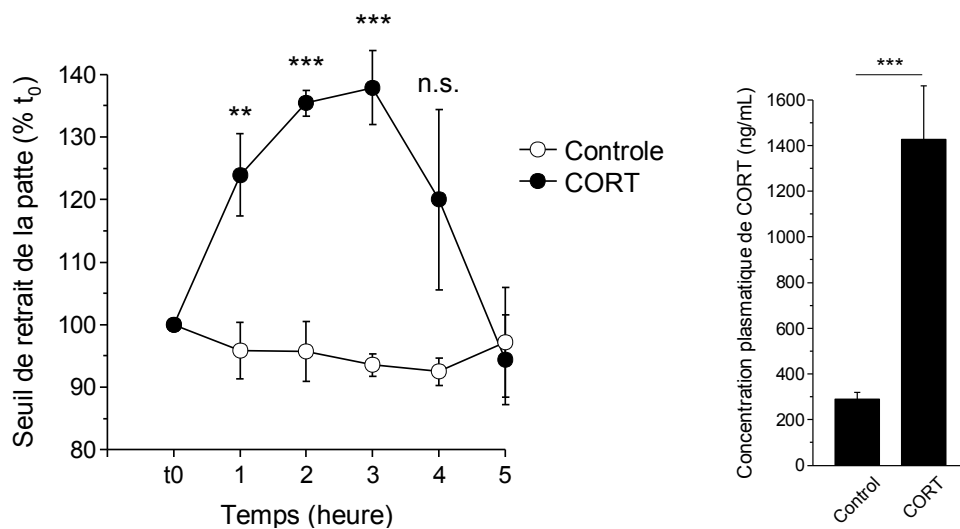
Afin de renforcer cette étude, nous avons injectés des rats SD matures (> P<sub>21</sub>) avec de la CORT par voie sous-cutanée (s.c., 30 mg/kg) et nous avons testé leur sensibilité mécanique avec la pince calibrée toutes les heures. Nous avons voulu nous assurer que l'injection de CORT provoque bien une augmentation de sa concentration plasmatique. Pour cela nous avons utilisé la technique RIA afin de doser sa concentration plasmatique trois heures après l'injection sous-cutanée de CORT ou après l'injection avec du véhicule (groupe contrôle). Les rats SD de 28 jours injectés avec de la CORT montrent un taux plasmatique de  $1427,28 \pm 233,84$  ng/mL (n = 6) alors que le groupe contrôle présente un taux plasmatique beaucoup plus faible :  $288,78 \pm 30,48$  (n = 6 ; p < 0,001 ; Figure 38). La concentration plasmatique du groupe SD contrôle n'est pas significativement différente de celle mesurée sur les rats SD à P<sub>28</sub> sans traitement (Figure 35). L'injection sous-cutanée de CORT (30 mg/kg) provoque une augmentation significative de sa concentration plasmatique chez le rat SD mature.





**Figure 37** : Différence de sensibilité mécanique entre SD, FIS et LEW

*L'utilisation de la pince calibrée met en évidence un seuil de retrait de la patte significativement plus important chez les FIS que chez les SD ( $p < 0,05$ ) et LEW ( $p < 0,01$ ) qui ne montrent aucune significative.*



**Figure 38** : Mesure de la sensibilité mécanique des SD après injection de CORT

*Le groupe SD injecté avec la CORT en s.c. montre une augmentation significative du seuil mécanique de retrait de la patte dès la première heure après l'injection par rapport au groupe contrôle injecté avec du véhicule. Cet effet présente un maximum aux alentours de la troisième heure après l'injection ( $p < 0,001$ ).*

*Les dosages radio-immunologiques présentés à droite montrent que les injections s.c. de CORT augmentent significativement sa concentration plasmatique.*

Les SD injectés avec de la CORT ont été comparés à un groupe contrôle (injecté avec le véhicule). Le groupe SD contrôle (n = 6) ne présente aucune variation significative du seuil de retrait de la patte au cours des cinq heures suivant l'injection (Figure 38). Le groupe SD injecté avec la CORT (n = 7) présente une augmentation significative de ce seuil dès la première heure après l'injection, et qui se maintient pendant trois heures. À partir de la quatrième heure, les valeurs des seuils ne sont plus significativement différentes de celles du groupe contrôle. Les valeurs brutes (en g) sont retrouvées dans le Tableau 9.

**Tableau 9 :** Valeurs de seuils de retrait de la patte suite à une stimulation nociceptive mécanique avec la pince calibrée chez les rats SD P21

	Seuil de retrait de la patte (g)					
	t <sub>0</sub>	t <sub>1h</sub>	t <sub>2h</sub>	t <sub>3h</sub>	t <sub>4h</sub>	t <sub>5h</sub>
Contrôle	182,02 ± 22,69	197,02 ± 24,11	220,83 ± 20,26	229,00 ± 18,19	202,33 ± 20,14	155,07 ± 11,95
CORT	162,11 ± 19,16	158,31 ± 24,25	154,89 ± 21,88	151,39 ± 19,24	149,06 ± 17,02	130,42 ± 13,73

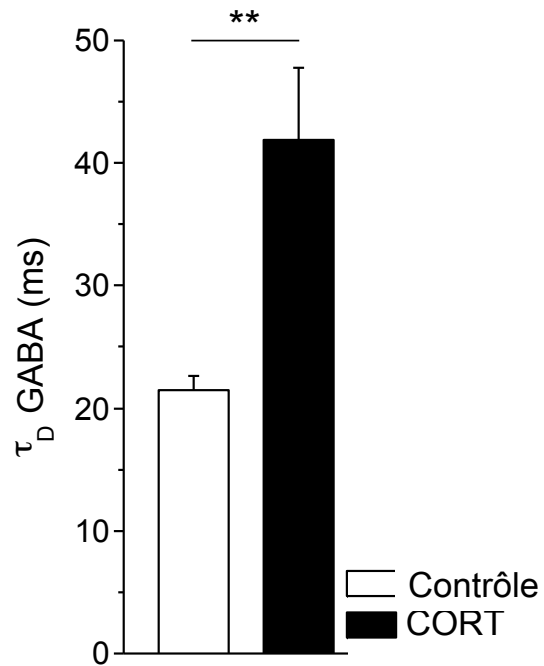
L'injection sous-cutanée de CORT produit une analgésie à court terme se maintenant pendant plus de trois heures sur le souche SD.

## VI. IMPACT DE L'APPLICATION DE CORTICOSTERONE SUR LA TRANSMISSION INHIBITRICE SPINALE ET LE TRAITEMENT DE L'INFORMATION NOCICEPTIVE

Nous avons aussi voulu vérifier les effets d'une application locale de CORT (1  $\mu$ M) sur nos tranches de moelle épinière. En enregistrant les neurones avec la technique du patch clamp dans les conditions expérimentales nous permettant d'enregistrer les CPSI de la lamina II, aucune variation des paramètres de fréquence, d'amplitude ni de cinétique n'est observée durant les 30 premières minutes d'enregistrement.

Nous avons donc incubé les tranches de moelle épinière avec de la CORT (1  $\mu$ M) pendant au moins une heure avant d'enregistrer les neurones de la lamina II. Dans ces conditions, la CORT augmente significativement la constante de désactivation des CPSI GABAergiques de  $21,48 \pm 1,15$  ms à  $41,86 \pm 5,91$  ms ( $p < 0,01$ ;  $n = 6$ ; Figure 39). Aucune modification significative de l'amplitude ou de la fréquence n'a été observée, bien que la fréquence des CPSI GABAergiques montre une tendance à la baisse après incubation avec la CORT (de  $0,51 \pm 0,13$  Hz à  $0,18 \pm 0,07$  Hz).

De même, les enregistrements électrophysiologiques *in vivo* sur le rat anesthésié n'ont démontré aucune variation de seuil de détection des fibres, du nombre de PA suite à des stimulations isolées, des paramètres du wind-up ni du nombre de PA suite à une stimulation mécanique nociceptive dans un délai de 30 minutes après l'application locale de 1  $\mu$ M de CORT sur la moelle épinière pendant l'enregistrement.



**Figure 39** : Effet d'une incubation des tranches de moelle épinière dans la CORT sur la cinétique des CPSI GABAergiques des rats SD

*L'incubation préalable des tranches de moelle épinière avec de la CORT pendant une heure provoque une augmentation significative de la constante de désactivation des CPSI GABAergiques dans la lamina II ( $p < 0,01$ ).*

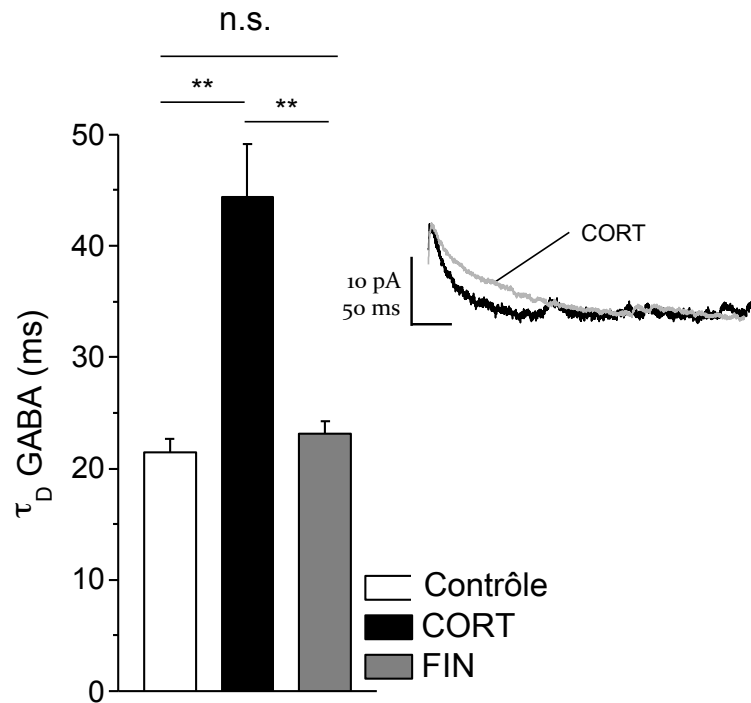
## VII. IMPACT DE L'INJECTION DE CORTICOSTERONE SUR LA TRANSMISSION INHIBITRICE SPINALE ET LE TRAITEMENT DE L'INFORMATION NOCICEPTIVE

### VII. 1. Modulation de la transmission synaptique

Afin de mesurer l'impact de la CORT sur la transmission synaptique, les rats injectés avec de la CORT (30 mg/kg) ont été sacrifiés au temps où la CORT induit son effet maximal sur l'analgésie : trois heures après l'injection. Des tranches de moelle épinière ont été effectuées afin d'enregistrer les neurones de la lamina II avec la technique d'enregistrement *in vitro* du patch clamp et dans les mêmes conditions expérimentales que précédemment, nous permettant d'enregistrer les CPSI.

L'injection s.c. de CORT ne provoque aucune variation des paramètres cinétiques, d'amplitude et de fréquence des CPSI glycinergiques. Cependant, cette même injection provoque une augmentation significative de la constante de désactivation des CPSI GABAergiques chez le SD après P<sub>21</sub> : de  $21,48 \pm 1,15$  ms à  $44,39 \pm 4,72$  ms ( $n = 6$  ;  $p < 0,01$ , Figure 40). Aucun changement significatif n'a pu être observé sur l'amplitude ou la fréquence des CPSI GABAergiques dans ces conditions.

Les effets de cette injection sous-cutanée de CORT sur la constante de désactivation des CPSI GABAergiques sont similaires aux effets bien décrits des stéroïdes 5 $\alpha$ -réduits qui peuvent être synthétisés à partir de la CORT. Nous avons donc réalisé les mêmes expériences d'enregistrement en patch clamp suite à la même injection s.c. de CORT, mais avec une incubation de trois heures des tranches dans le FIN (inhibiteur de l'activité enzymatique de la 5 $\alpha$ -réductase) avant l'enregistrement des neurones de la lamina II.



**Figure 40** : Effet de l'injection de CORT sur la cinétique des CPSI GABAergiques chez les rats SD

*L'injection de CORT provoque une augmentation significative de la constante de désactivation des CPSI GABAergiques dans la lamina II ( $p < 0,01$ ). L'incubation des tranches dans le finastéride (inhibiteur de la 5 $\alpha$ -réductase) abolit l'effet de la CORT injectée sur la cinétique des événements GABAergiques ( $p < 0,01$ ) : dans ces conditions la valeur du  $\tau_D$  GABAergique n'est pas différente de la valeur contrôle.*

Après incubation avec le FIN, les neurones de la lamina II des rats injectés avec de la CORT montrent une diminution significative du  $\tau_D$  GABAergique ( $23,11 \pm 1,16$  ms ;  $n = 6$  ;  $p < 0,01$ ) qui n'est pas significativement différent des valeurs en condition contrôle (Figure 40).

## VII. 2. Modulation de la réponse à une stimulation du champ récepteur sensoriel

Nous avons ensuite voulu voir l'impact de cette même injection de CORT (30 mg/kg) sur l'activité de l'ensemble du réseau des cornes dorsales de la moelle épinière en réponse à une stimulation périphérique en utilisant une technique électrophysiologique d'enregistrement extracellulaire *in vivo* sur nos rats SD anesthésiés. Les enregistrements extracellulaires en réponse à des stimulations mécaniques ou électriques de leur champ récepteur sensoriel sont effectués trois heures après l'injection sous-cutanée de CORT.

Dans ces conditions, la stimulation mécanique nociceptive de la patte postérieure et l'enregistrement de la réponse dans les cornes dorsales nous donne des informations sur l'intégration spinale d'une stimulation physiologique. Les stimulations électriques isolées périphériques consistent en des stimulations brèves qui mettent en jeu l'ensemble de la voie nociceptive et nous permettent de différencier les fibres de type C des fibres de type A. L'utilisation d'une stimulation répétée à 1 Hz consiste en une stimulation longue qui implique fortement l'activation importante du réseau traitant l'information nociceptive dans les cornes dorsales.

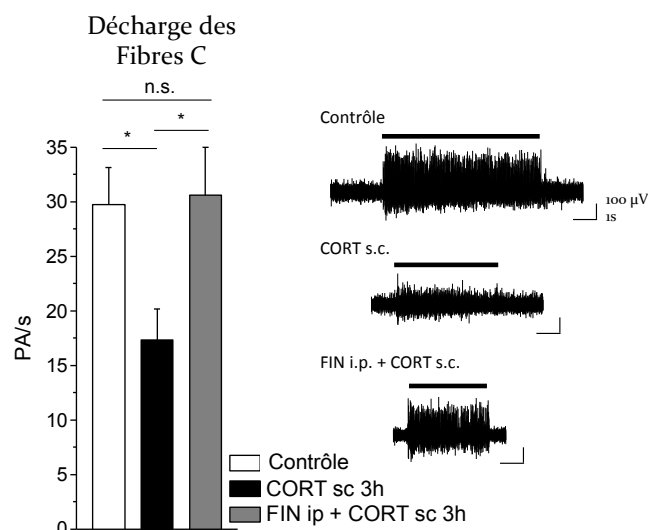
**VII. 2. a. Modulation de la décharge des fibres C dans la lamina II**

Nous avons appliqué une stimulation mécanique nociceptive (d'une force d'environ 600 grammes pendant 10 secondes) sur la patte postérieure de l'animal et mesuré le nombre de PA induits dans la lamina II tout au long de la stimulation périphérique. Cette stimulation mécanique induit une décharge des fibres C de  $29,76 \pm 3,37$  PA/s en condition contrôle. Un traitement sous-cutané de l'animal avec de la CORT réduit significativement le nombre de PA induits par cette même stimulation :  $17,31 \pm 2,87$  PA/s ( $n = 7$  ;  $p < 0,05$  ; Figure 41).

Comme lors de nos études d'enregistrements sur tranche avec la technique du patch clamp, l'ensemble de nos enregistrements extracellulaires *in vivo* montre une différence entre l'absence d'effet immédiat d'une application locale de CORT à court terme et ceux induits par une injection s.c. trois heures au préalable sur l'excitabilité des neurones de la lamina II ; laissant penser que la CORT doit être réduite pour agir. Pour cela nous avons choisi de rajouter un groupe d'étude composé par des rats SD prétraités avec une injection i.p. de FIN (30 mg/kg) 24 heures avant l'injection sous-cutanée de CORT. Le prétraitement du rat avec une injection i.p. de FIN montre une augmentation significative du nombre de PA induits par la stimulation mécanique :  $30,61 \pm 4,37$  PA/s ( $n = 6$  ;  $p < 0,05$  ; Figure 41).

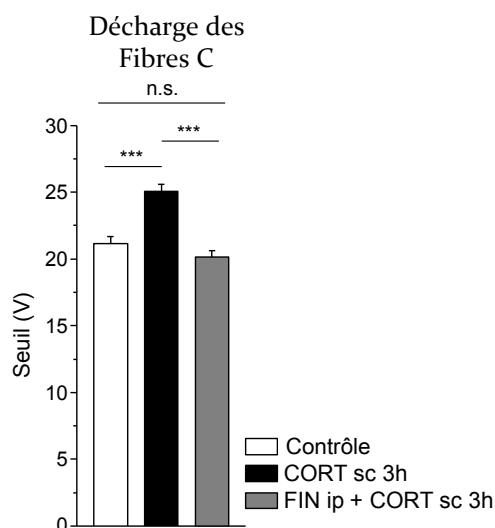
La stimulation électrique du champ récepteur sensoriel de la patte postérieure ipsilatérale en condition contrôle produit une décharge de PA des afférences primaires de type C à un seuil d'activation de  $21,17 \pm 0,54$  V. Les rats traités avec de la CORT présentent une augmentation significative de ces seuils permettant la détection des fibres de type C à  $25,04 \pm 0,53$  V ( $n = 6$  ;  $p < 0,001$ , Figure 41). Le prétraitement du rat avec une injection i.p. de FIN suivi d'une injection de CORT montre une diminution significative du seuil des fibres C :





**Figure 41** : Effet d'une injection de CORT sur la fréquence de décharge de PA dans la lamina II suite à une stimulation mécanique nociceptive du champ récepteur sensoriel

*La stimulation mécanique nociceptive de la patte postérieure provoque une décharge de PA des neurones dans la lamina II. L'injection de CORT provoque une diminution significative des PA suite à la stimulation mécanique ( $p < 0,05$ ). Le prétraitement des rats avec du finastéride (FIN) produit une augmentation significative de cette fréquence de décharge suite à la stimulation mécanique nociceptive ( $p < 0,05$ ). Les tracés électrophysiologiques situés à droite montrent trois traces représentatives d'une réponse spinale à une stimulation mécanique nociceptive en condition contrôle, après injection s.c. de CORT et après un prétraitement i.p. de FIN.*



**Figure 42** : Effet d'une injection de CORT sur les seuils de déclenchement des fibres C dans la lamina II

*L'injection sous-cutanée de CORT provoque une augmentation significative du seuil de stimulation électrique nécessaire à évoquer une réponse des fibres de type C ( $p < 0,001$ ). Le prétraitement des rats avec une injection i.p. de finastéride abolit les effets de la CORT injectée en diminuant cette valeur de seuil qui n'est pas différente de celle du seuil en condition contrôle ( $p < 0,001$ ).*

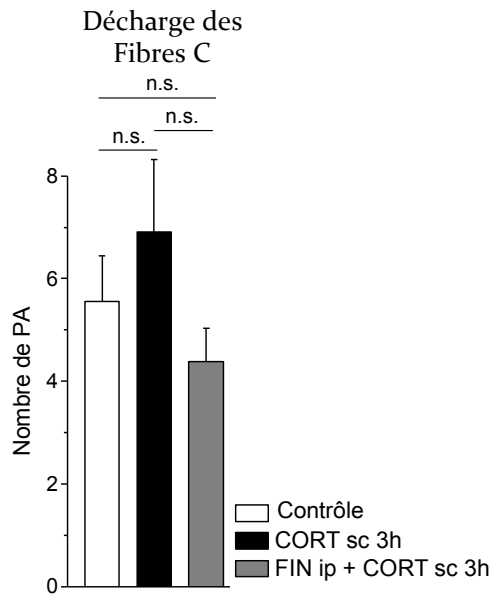
20,16 ± 0,47 V (n = 6 ; p < 0,001) qui n'est pas différent de la valeur de seuil en condition contrôle (Figure 42).

En condition contrôle, une stimulation électrique isolée de la patte à trois fois la valeur du seuil de détection provoque au total une décharge moyenne des fibres de type C de 5,55 ± 0,89 PA (n = 6). Après injection de CORT, aucune différence significative du nombre de PA induits par cette stimulation n'est observée : 6,91 ± 1,41 PA (n = 6). Le prétraitement du rat avec une injection i.p. de FIN montre une diminution non significative du nombre de PA induits par les stimulations isolées : 4,38 ± 0,64 mV (n = 6 ; Figure 43).

En condition contrôle, l'application d'un train de stimulation électrique au niveau du champ récepteur de la patte à trois fois la valeur du seuil des fibres C et à basse fréquence (1 Hz) provoque une augmentation de la décharge moyenne suite à une stimulation (phénomène de wind-up) : 193,33 ± 22,00 PA (n = 6). L'injection de CORT ne provoque pas de différence significative du nombre de PA provoqué par ce même train de stimulation : 153,86 ± 20,11 PA (n = 6 ; Figure 44). Le prétraitement du rat avec une injection i.p. de FIN montre une diminution non significative du nombre de PA induits par cette même stimulation : 103,67 ± 10,86 mV (n = 6).

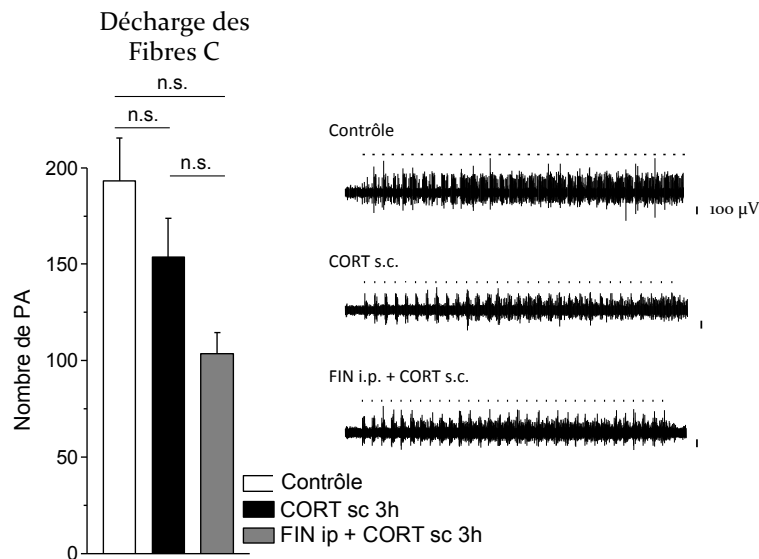
#### **VII. 2. b. Modulation de la décharge des fibres A et C dans la lamina V**

La stimulation mécanique nociceptive provoque une décharge à une fréquence moyenne de 23,97 ± 4,30 PA/s en condition contrôle (n = 5). Un traitement sous-cutané de l'animal avec de la CORT réduit la fréquence provoquée par cette même stimulation de manière non significative : 16,87 ± 2,15 PA/s (n = 7 ; Figure 45). Le prétraitement du rat avec une injection i.p. de



**Figure 43 :** Effet d'une injection de CORT sur la décharge des fibres C dans la lamina II suite à une stimulation électrique isolée du champ récepteur sensoriel

*Une injection de CORT comme le prétraitement i.p. avec du finastéride ne provoquent aucune différence significative du nombre de PA induits par une stimulation électrique isolée.*



**Figure 44 :** Effet d'une injection de CORT sur la décharge des fibres C dans la lamina II suite à une stimulation électrique du champ récepteur sensoriel à 1 Hz

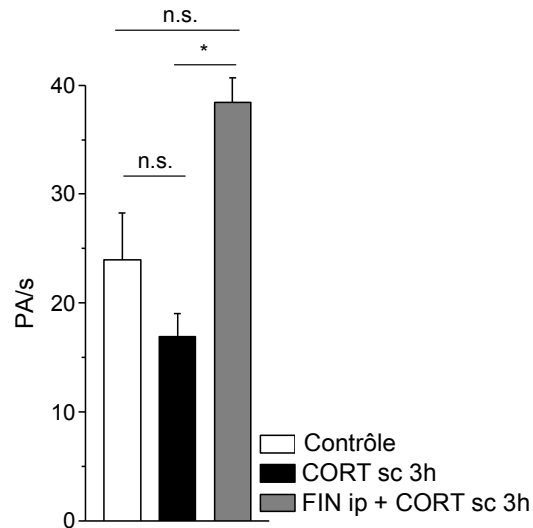
*En condition contrôle, le train de stimulations à basse fréquence provoque un wind-up. L'injection de CORT diminue non significativement le nombre de PA provoqué par ce même train de stimulation et un prétraitement des rats avec du finastéride montre aussi une diminution non significative du nombre de PA induit par cette même stimulation. Les tracés électrophysiologiques situés à droite montrent trois traces représentatives. Le wind-up caractérisé par une augmentation de fréquence de décharge des fibres C pendant le train de stimulation est particulièrement visible en condition contrôle.*

FIN montre une augmentation significative de la fréquence de décharge provoquée par la stimulation mécanique nociceptive :  $38,42 \pm 2,25$  PA/s ( $n = 6$  ;  $p < 0,05$ ).

Dans les couches profondes, les stimulations électriques du champ récepteur sensoriel induisent une réponse des fibres A à un seuil de  $4,60 \pm 0,68$  V et des fibres C à un seuil de  $19,60 \pm 0,24$  V ( $n = 6$ ). Les rats traités avec de la CORT présentent une augmentation significative des seuils des fibres A :  $6,57 \pm 0,3$  V ( $p < 0,05$ ) et des fibres de type C à  $26,4 \pm 0,75$  V ( $n = 7$  ;  $p < 0,001$ , Figure 46). Le prétraitement du rat avec une injection i.p. de FIN suivi d'une injection de CORT montre une diminution du seuil qui n'est pas significative pour les fibres C :  $23,67 \pm 1,33$  V ( $n = 6$ ), ni pour les fibres A :  $5,50 \pm 0,43$  V ( $n = 6$ ).

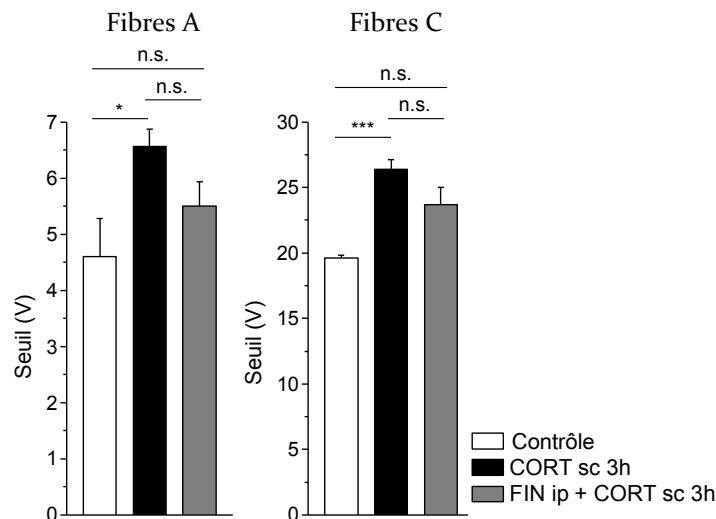
En condition contrôle, une stimulation électrique isolée du champ récepteur sensoriel à trois fois la valeur du seuil de détection provoque une décharge moyenne de  $4,70 \pm 0,91$  PA pour les fibres de type A et de  $7,70 \pm 1,01$  PA pour les fibres de type C ( $n = 6$ ). Après l'injection de CORT, une diminution non significative du nombre de PA induits par les stimulations isolées est observée pour les fibres A :  $2,64 \pm 0,45$  PA ( $n = 7$ ) et pour les fibres C :  $5,33 \pm 0,56$  PA ( $n = 7$  ; Figure 47). Le prétraitement du rat avec une injection i.p. de FIN montre une augmentation significative du nombre de PA pour les fibres A :  $4,78 \pm 0,52$  mV ( $n = 6$ ), et non significative pour les fibres C :  $6,60 \pm 0,71$  mV ( $n = 6$  ; Figure 47). Le prétraitement avec le FIN annule ici l'effet produit par l'injection s.c. de CORT.

En condition contrôle, un train de stimulation électrique du champ récepteur sensoriel à une fréquence de 1 Hz provoque un wind-up qui comprend une décharge moyenne de  $89,20 \pm 9,78$  PA pour les fibres de type A et de  $164,20 \pm 33,22$  PA pour les fibres C ( $n = 6$ ). L'injection de CORT ne provoque aucune différence significative du nombre de PA provoqués par la



**Figure 45 :** Effet d'une injection de CORT sur la fréquence de décharge de PA dans la lamina V suite à une stimulation mécanique nociceptive du champ récepteur sensoriel

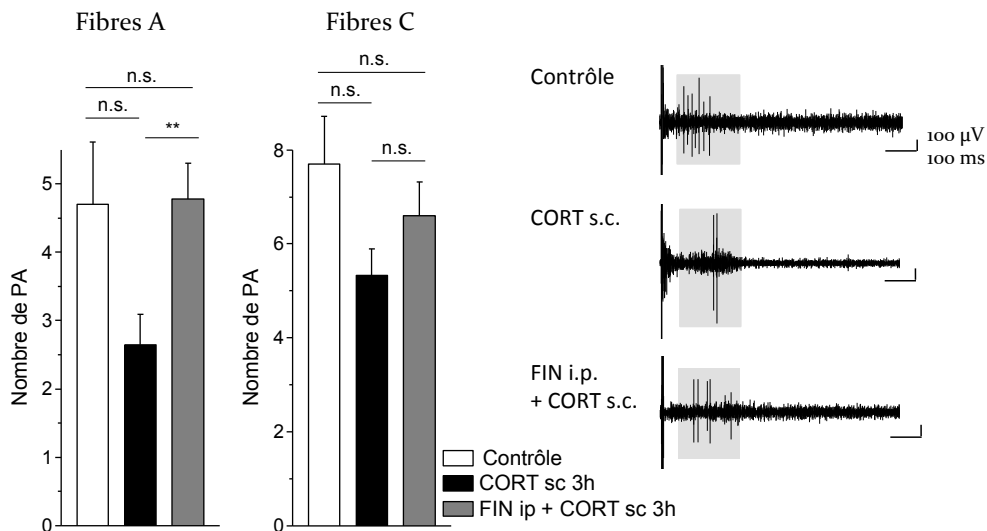
*La stimulation mécanique nociceptive de la patte postérieure provoque une décharge de PA des neurones dans le couches superficielles. L'injection de CORT provoque une diminution non significative des PA tandis que le prétraitement des rats avec du finastéride produit une augmentation significative du nombre de PA ( $p < 0,05$ ).*



**Figure 46 :** Effet d'une injection de CORT sur les seuils de déclenchement des fibres A et C dans la lamina V

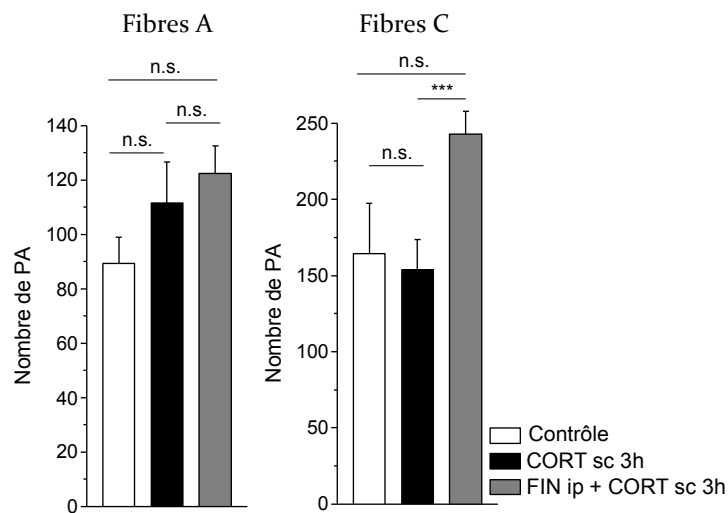
*L'injection de CORT provoque une augmentation significative du seuil de stimulation de la patte postérieure nécessaire à évoquer une réponse des fibres de type A ( $p < 0,05$ ) et de type C ( $p < 0,001$ ). Le prétraitement des rats avec une injection i.p. de finastéride provoque une diminution non significative du seuil qui n'est pas différente du seuil en condition contrôle.*

stimulation pour les fibres A :  $111,43 \pm 15,12$  PA (n = 7) PA ni pour les fibres C :  $153,57 \pm 20,11$  PA (n = 7 ; Figure 48). Le prétraitement du rat avec une injection i.p. de FIN ne montre aucune différence significative du nombre de PA induits par la stimulation pour les fibres A :  $122,5 \pm 10,03$  PA (n = 6) tandis qu'il augmente significativement le nombre de PA pour les fibres C :  $242,83 \pm 14,77$  mV (n = 6 ;  $p < 0,001$  ; Figure 48).



**Figure 47 :** Effet d'une injection de CORT sur la décharge des fibres A et C dans la lamina V suite à une stimulation électrique isolée du champ récepteur sensoriel

Une injection de CORT provoque une diminution non significative du nombre de PA provoqués par une stimulation isolée pour les fibres A et C. Uniquement pour les fibres A, le prétraitement avec du finastéride (FIN) induit une augmentation significative du nombre de ces PA ( $p < 0,01$ ). À droite, les tracés montrent des traces représentatives d'une réponse des fibres C (dans le cadre gris) à une stimulation électrique isolée en condition contrôle, après injection de CORT et après un prétraitement avec le FIN.



**Figure 48 :** Effet d'une injection de CORT sur décharge des fibres A et C dans la lamina V suite à une stimulation électrique du champ récepteur sensoriel à 1 Hz

En condition contrôle, l'induction d'un train de stimulations à basse fréquence provoque un wind-up uniquement chez les fibres C. L'injection de CORT diminue non significativement le nombre de PA provoqués par ce même train de stimulation et un prétraitement des rats avec du finastéride (FIN) montre une augmentation significative du nombre de PA induit par cette même stimulation ( $p < 0,001$ ).

Aucune différence significative du nombre de PA générés par cette stimulation à basse fréquence n'est observée après injection de CORT ou traitement avec du FIN pour les fibres de type A.

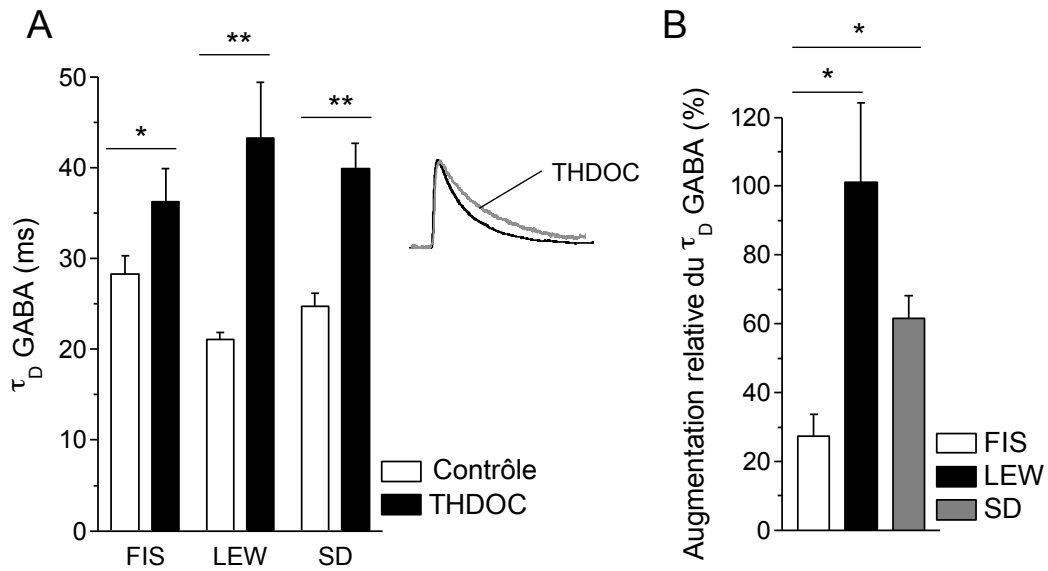
## VIII. IMPACT DE L'APPLICATION DE THDOC SUR LA TRANSMISSION INHIBITRICE SPINALE ET LE TRAITEMENT DE L'INFORMATION NOCICEPTIVE

### VIII. 1. Modulation de la transmission synaptique

Le THDOC qui est un composé glucocorticoïde réduit en  $5\alpha$  a été appliqué dans le bain ( $1 \mu\text{M}$ ), directement sur nos tranches de moelle au cours de l'enregistrement des neurones de la lamina II avec la technique du patch clamp et dans les mêmes conditions expérimentales que précédemment nous permettant d'enregistrer les CPSI. Dans ces conditions, le THDOC provoque une augmentation significative de la constante de désactivation des CPSI GABAergiques sur l'ensemble des neurones enregistrés chez les FIS : de  $28,26 \pm 2,07$  ms à  $36,23 \pm 3,68$  ms ( $n = 8$  ;  $p < 0,05$ ) ; les SD : de  $24,72 \pm 1,48$  ms à  $39,91 \pm 2,76$  ms ( $n = 5$  ;  $p < 0,01$ ) et les LEW : de  $21,04 \pm 0,81$  ms à  $43,28 \pm 6,09$  ms ( $n = 8$  ;  $p < 0,01$  ; Figure 49). La valeur des  $\tau_D$  GABAergiques en présence de THDOC n'est pas différente entre les souches de rats. En effet, l'application de THDOC augmente les  $\tau_D$  GABAergiques des neurones de la lamina II à une valeur maximale qui n'est pas significativement différente entre les SD, FIS et LEW.

L'augmentation relative de cette constante de désactivation est significativement plus faible chez le FIS :  $27,29 \pm 6,37$  % par rapport aux LEW qui présentent l'augmentation relative la plus prononcée ( $101,42 \pm 23,07$  % ;  $p < 0,05$ ) et par rapport aux SD où l'application de THDOC provoque une augmentation intermédiaire de  $61,52 \pm 6,52$  % ( $p < 0,05$  ; Figure 49). Aucune différence significative n'a été observée entre les SD et les LEW. Ces observations s'expliquent simplement par le fait que, en condition basale, le  $\tau_D$  GABAergique des FIS est le plus élevé dans la lamina II, minimisant ainsi l'effet de l'application exogène de THDOC.





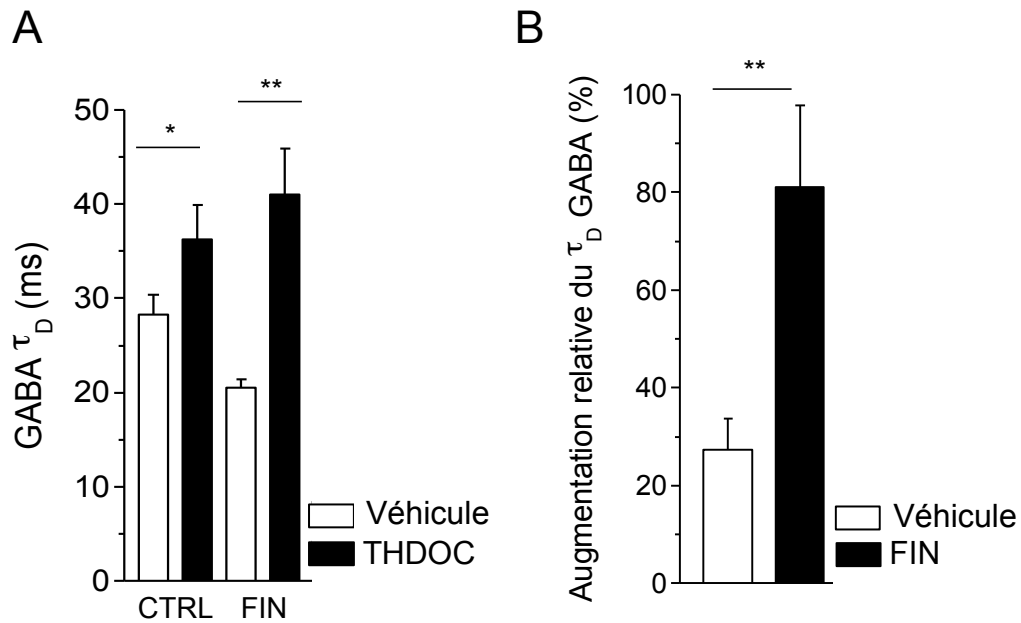
**Figure 49** : Effet du THDOC sur la cinétique des CPSI GABAergiques chez les SD, FIS et LEW

A. Le THDOC provoque une augmentation significative du  $\tau_D$  GABAergique sur les neurones de la lamina II chez les FIS ( $p < 0,05$ ), les SD ( $p < 0,01$ ) et les LEW ( $p < 0,01$ ). La trace montre deux séries représentatives d'évènements moyennés en condition contrôle (noir) et après application de THDOC (gris).

B. L'augmentation relative du  $\tau_D$  GABAergique est significativement plus faible chez le FIS par rapport aux LEW ( $p < 0,05$ ) et aux SD ( $p < 0,05$ ) qui ne sont pas significativement différents.

Aucune variation significative de l'amplitude ni de la fréquence des CPSI GABAergiques n'a été observée après application de THDOC.

Nous avons voulu vérifier si l'augmentation différentielle la constante de désactivation des CPSI GABAergiques est due à la présence d'un tonus de stéroïdes 5 $\alpha$  chez le FIS. Pour cela, nous avons pré-incubé les tranches issues des animaux FIS dans du FIN (50  $\mu$ M, 3 h). Dans ces conditions, le FIN diminue significativement la valeur du  $\tau_D$  GABAergique de  $27,30 \pm 1,23$  ms (n = 13) à  $20,48 \pm 0,91$  ms (n = 8 ; p < 0,001 ; Figure 50). Après incubation dans le FIN, l'application de THDOC (1  $\mu$ M) provoque une augmentation significative du  $\tau_D$  GABAergique :  $41,04 \pm 4,79$  ms (n = 7 ; p < 0,01). Cette augmentation relative est de  $81,08 \pm 16,7$  % (n = 7) et elle est significativement plus importante que l'augmentation relative du  $\tau_D$  GABAergique en condition contrôle suite à l'application de THDOC (p < 0,01 ; Figure 50). Ces observations nous laissent penser qu'en condition contrôle il existe un tonus spinal de composés stéroïdes 5 $\alpha$ -réduits chez le FIS qui module les cinétiques des événements GABAergiques.



**Figure 50** : Effet du THDOC sur les cinétiques des CPSI GABAergiques dans la lamina II chez le FIS après une incubation des tranches dans le finastéride

A. Le THDOC augmente significativement la valeur du  $\tau_D$  GABAergique sur les neurones de la lamina II ( $p < 0,05$ ). L'application de THDOC après une incubation préalable des tranches dans du finastéride (FIN) augmente le  $\tau_D$  GABAergique de manière plus importante ( $p < 0,01$ ).

B. L'incubation préalable des tranches dans le FIN provoque ainsi une augmentation relative par le THDOC significativement plus importante sur les neurones de la lamina II ( $p < 0,01$ ).

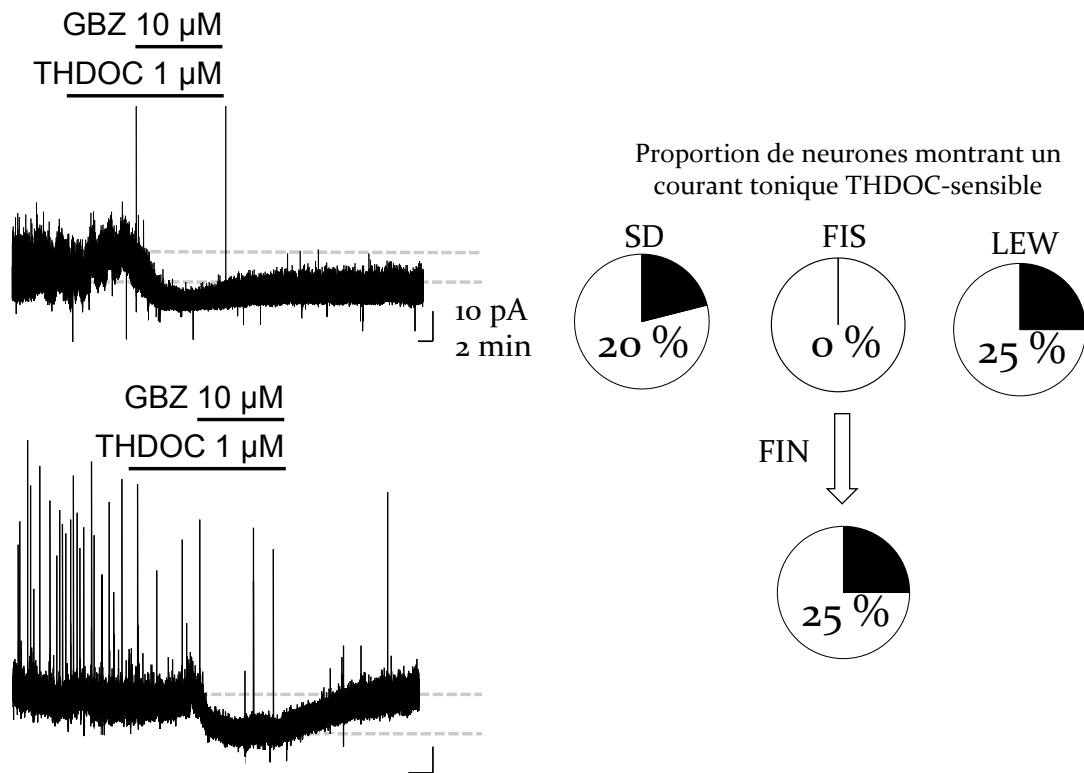
## VIII. 2. Modulation de la transmission extra-synaptique

Pour mesurer la transmission extra-synaptique, nous avons utilisé la technique du patch clamp dans les mêmes conditions expérimentales que précédemment. L'application de THDOC (1  $\mu$ M) sur nos tranches de moelle épinière provoque sur quelques neurones de la lamina II une augmentation de la ligne de base de courant. Cette variation est interprétée dans nos conditions expérimentales comme un courant sortant qui est du à la potentialisation d'une conductance chlorure GABAergique par le THDOC, qui est un modulateur allostérique puissant des GABA<sub>A</sub>R.

Certains neurones enregistrés présentent donc une augmentation du courant tonique GABAergique suite à l'application de THDOC dans des proportions variables. Chez le FIS, aucun neurone ne présente une augmentation significative du courant extra-synaptique après application de THDOC (0/10). Chez les LEW, 25 % des neurones répondent à une application de THDOC par une augmentation du courant extra-synaptique (2/8) tandis que chez les SD une proportion de neurones intermédiaire répond : la proportion étant de 20 % (1/5 ; Figure 51). La valeur moyenne de l'amplitude de ce courant est de  $8,91 \pm 3,42$  pA chez les LEW et le neurone ayant montré une augmentation du courant tonique chez le SD présente une amplitude de 6,24 pA.

*Cette étude nécessite une augmentation du nombre de neurones enregistrés afin d'affiner son analyse.*

L'absence de neurone répondant à une application de THDOC dans la lamina II chez le FIS nous laisse penser que le tonus spinal en stéroïdes 5 $\alpha$ -réduits module déjà l'activité des récepteurs GABAergiques extra-synaptiques de façon à ce qu'un ajout exogène de tels composés réduits (THDOC) n'induisse pas de modulation supplémentaire.



**Figure 51** : Effet du THDOC sur le courant extra-synaptique GABAergique chez les SD, FIS et LEW

*L'application de THDOC provoque une augmentation du courant extra-synaptique sur les neurones de la lamina II en proportion variable entre les différentes souches de rat.*

*L'incubation préalable des tranches dans du finastéride augmente cette proportion chez le FIS, la rapprochant de celles des SD et LEW.*

Nous avons voulu voir si la proportion de neurones montrant un courant tonique THDOC-sensible était dû à la présence d'un tonus de stéroïdes 5 $\alpha$  chez le FIS. Pour cela, nous avons pré-incubé les tranches issues des animaux FIS dans du FIN (50  $\mu$ M, 3h). Dans ces conditions, l'application de THDOC sur les neurones de la lamina II active un courant tonique inhibiteur sur 25% des neurones enregistrés au lieu de 0% en condition contrôle (2/8 ; Figure 51) et la valeur de l'amplitude de courant est de  $9,11 \pm 6,48$  pA.

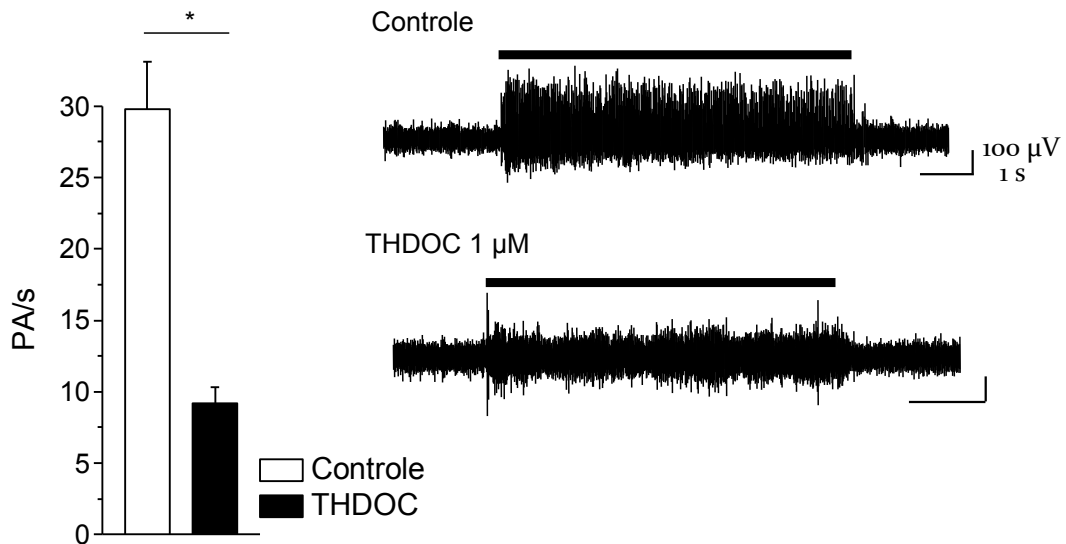
Ainsi l'absence de modulation des récepteurs GABAergiques extra-synaptiques suite à l'application de THDOC chez le FIS est dû à un effet de modulation maximale intrinsèque par le tonus spinal en stéroïdes 5 $\alpha$ -réduits.

### **VIII. 3. Modulation de la réponse à une stimulation du champ récepteur sensoriel**

#### **VIII.3. a. Lamina II**

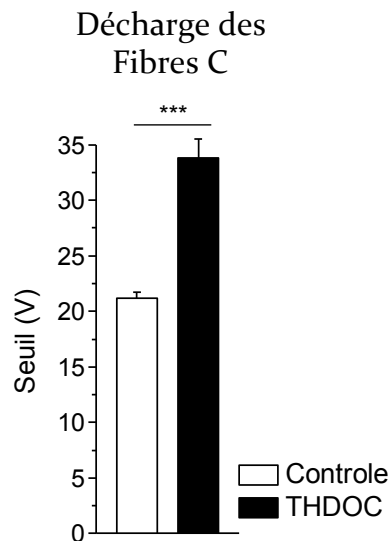
Afin de mesurer la modulation par le THDOC de l'intégration spinale d'une information périphérique, nous avons utilisé la technique électrophysiologique d'enregistrement extracellulaire *in vivo* sur les rats SD anesthésiés dans les mêmes conditions expérimentales que précédemment. Dans ces conditions, une réduction significative de la fréquence de décharge de PA suite à une stimulation mécanique nociceptive du champ récepteur sensoriel est observée suite à l'application locale de THDOC : de  $29,76 \pm 3,37$  PA/s à  $9,21 \pm 1,12$  (n = 6 ; p < 0,05 ; Figure 52).

L'application de THDOC (1  $\mu$ M) directement sur la moelle épinière provoque une augmentation significative des seuils de stimulation électrique de



**Figure 52 :** Effet du THDOC sur la fréquence de décharge de PA dans la lamina II suite à une stimulation mécanique nociceptive du champ récepteur sensoriel

*La stimulation mécanique nociceptive de la patte postérieure provoque une décharge de PA des neurones dans le couches superficielles. Le nombre de PA est significativement diminué en présence de THDOC ( $p < 0,05$ ).*



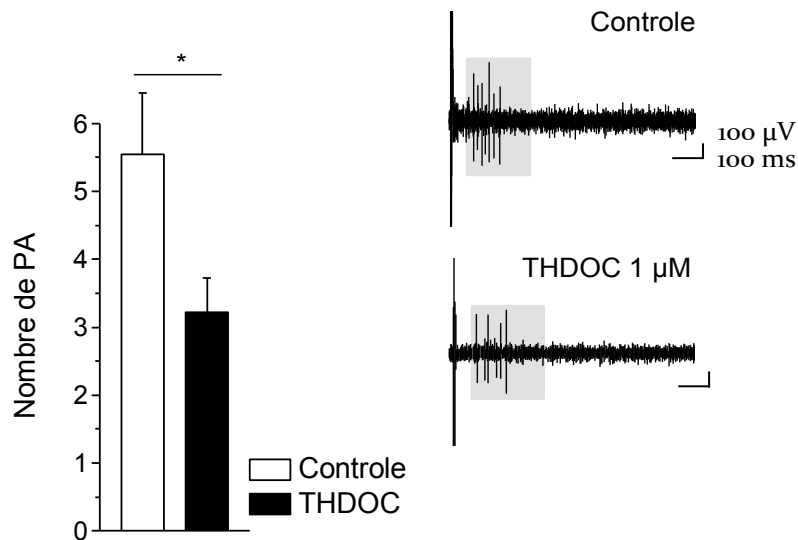
**Figure 53 :** Effet du THDOC sur les seuils de déclenchement des fibres C dans la lamina II

*L'application locale de THDOC (1 μM) provoque une augmentation significative du seuil de stimulation de la patte postérieure nécessaire à évoquer une réponse des fibres C ( $p < 0,001$ ).*

la patte nécessaire à induire un PA par les afférences primaires de type C : de  $21,17 \pm 0,54$  V à  $33,38 \pm 1,66$  V ( $n = 6$  ;  $p < 0,01$  ; Figure 53).

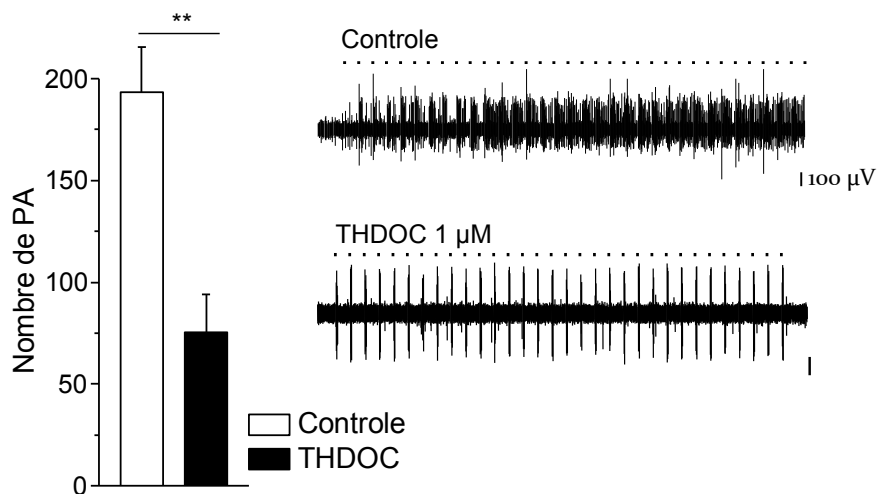
L'application de THDOC provoque une diminution significative de nombre de PA induits par une stimulation isolée à trois fois le seuil des fibres C : de  $5,55 \pm 0,89$  PA en condition contrôle à  $3,22 \pm 0,51$  PA après application de THDOC ( $n = 6$  ;  $p < 0,05$  ; Figure 54). De plus, cette même application provoque une diminution significative du wind-up déclenché par un train de stimulation à 1 Hz : de  $193,33 \pm 22,00$  PA en condition contrôle à  $75,50 \pm 18,70$  PA après application de THDOC ( $n = 6$  ;  $p < 0,01$  ; Figure 55).





**Figure 54** : Effet du THDOC sur la décharge des fibres C dans la lamina II suite à une stimulation électrique isolée du champ récepteur sensoriel

*L'application de THDOC provoque une diminution significative du nombre de PA provoqués par une stimulation électrique isolée ( $p < 0,05$ ). À droite, les tracés montrent des traces représentatives de réponse des fibres C (dans le cadre gris) en condition contrôle et en présence de THDOC.*



**Figure 55** : Effet du THDOC sur la décharge des fibres C dans la lamina II suite à une stimulation électrique du champ récepteur sensoriel à 1 Hz

*Une application locale de THDOC diminue significativement le nombre de PA provoqués par le train de stimulation ( $p < 0,01$ ). Les tracés sur la droite montrent un exemple caractéristique d'une cellule enregistrée qui répond par un wind-up suite à la stimulation à basse en condition contrôle, mais pas après application de THDOC sur la moelle épinière.*

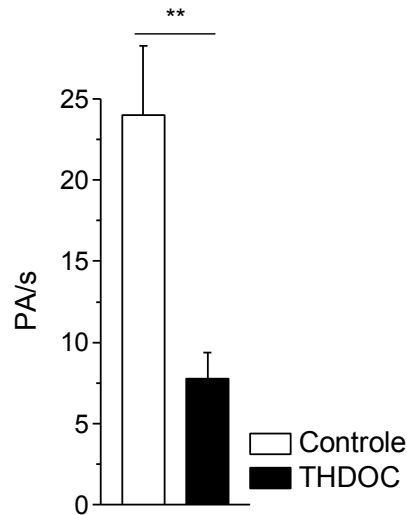
### VIII.3. b. Lamina V

L'application de THDOC sur la moelle épinière lors de nos enregistrements provoque une réduction significative de la fréquence de décharge de PA suite à une stimulation mécanique nociceptive du champ récepteur sensoriel : de  $23,97 \pm 4,30$  PA/s à  $7,75 \pm 1,63$  ( $n = 5$  ;  $p < 0,01$  ; Figure 56).

Une augmentation non significative des valeurs de seuil de stimulation nécessaire à induire un PA par les fibres de type A est observée suite à l'application de THDOC : de  $4,60 \pm 0,68$  mV à  $5,80 \pm 0,66$  mV ( $n = 5$ ). Cependant, cette même application provoque une augmentation significative des valeurs de seuil pour les afférences primaires de type C : de  $19,60 \pm 0,24$  mV à  $31,00 \pm 0,45$  mV ( $n = 5$  ;  $p < 0,01$  ; Figure 57).

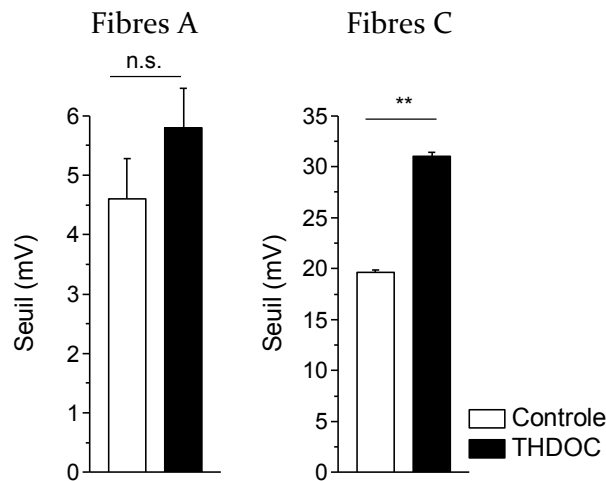
L'application de THDOC provoque une diminution non significative de nombre de PA induits par une stimulation isolée des fibres A : de  $4,70 \pm 0,98$  PA en condition contrôle à  $3,18 \pm 0,60$  PA ; et une diminution significative du nombre de PA des fibres C : de  $7,70 \pm 1,01$  PA à  $2,38 \pm 0,31$  PA ( $n = 5$  ;  $p < 0,01$  ; Figure 58).

Le THDOC provoque aussi une diminution significative du wind-up déclenché par un train de stimulation à 1 Hz pour les fibres de type C : de  $164,20 \pm 33,22$  PA en condition contrôle à  $74,00 \pm 11,60$  PA après application de THDOC ( $n = 5$  ;  $p < 0,05$  ; Figure 59). En condition contrôle, aucun phénomène de wind-up n'est observable pour les fibres A :  $89,20 \pm 9,78$  PA, et le THDOC ne modifie pas la réponse induite par la stimulation :  $75,00 \pm 18,50$  PA ( $n = 5$ ).



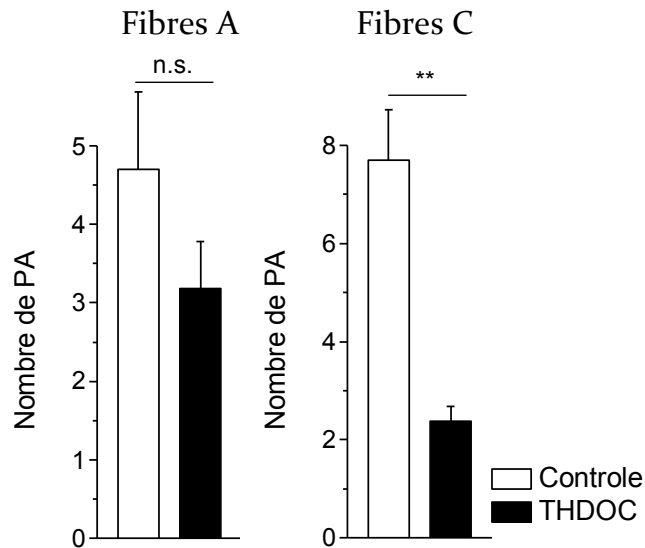
**Figure 56 :** Effet du THDOC sur la fréquence de décharge de PA dans la lamina V suite à une stimulation mécanique nociceptive du champ récepteur sensoriel

*L'application de THDOC provoque une diminution significative du nombre de PA provoqués dans la lamina V par une stimulation mécanique nociceptive de la patte postérieure ( $p < 0,01$ ).*



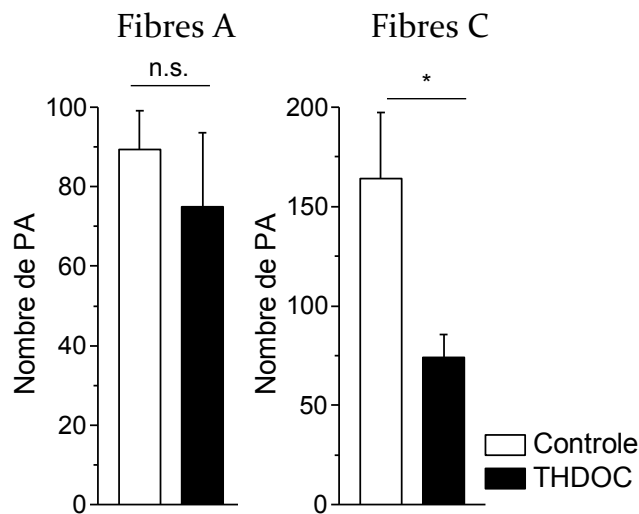
**Figure 57 :** Effet du THDOC sur les seuils de déclenchement des fibres A et C dans la lamina V

*Une application de THDOC provoque une augmentation significative du seuil de stimulation de la patte nécessaire à évoquer une réponse des fibres C ( $p < 0,01$ ). Une augmentation non significative est observée pour les fibres A.*



**Figure 58 :** Effet du THDOC sur la décharge des fibres A et C dans la lamina V suite à une stimulation électrique isolée du champ récepteur sensoriel

*Une application de THDOC provoque une diminution significative du nombre de PA provoqués par une stimulation électrique isolée du champ récepteur des fibres C ( $p < 0,01$ ). Une augmentation non significative est observée pour les fibres A.*



**Figure 59 :** Effet du THDOC sur la décharge des fibres A et C dans la lamina V suite à une stimulation électrique du champ récepteur sensoriel à 1 Hz

*L'application de THDOC diminue significativement le nombre de PA provoqués par le train de stimulation ( $p < 0,05$ ) et empêche le phénomène de wind-up sur les fibres C. Les fibres A ne montrent aucune différence significative du nombre de PA générés par la stimulation basse fréquence après application de THDOC.*

# DISCUSSION

## IDENTIFICATION *IN VITRO* DE L'INHIBITION GABAERGIQUE SPINALE ET CONSIDERATIONS METHODOLOGIQUES

La glycine et le GABA sont les deux neurotransmetteurs inhibiteurs de la lamina II de la moelle épinière. Ils prennent tous deux part à la première modulation des informations nociceptives arrivant de la périphérie et participent à leur intégration avant leur transmission aux centres supraspinaux (Woolf & Salter, 2000). La modification de l'équilibre entre excitation et inhibition dans les cornes dorsales aura une conséquence sur la transmission des informations nociceptives et cela peut avoir une importance toute particulière dans le cadre de douleurs chroniques inflammatoires ou neuropathiques (Yaksh, 1989; Sorkin & Puig, 1996).

## Inhibition synaptique dans la lamina II

Nous avons dans un premier temps caractérisé pharmacologiquement les transmissions synaptiques GABAergiques et glycinergiques en utilisant les antagonistes spécifiques des récepteurs impliqués. Une application de STR permettait de ne révéler que les CPSI GABAergiques et une application de GBZ ou de BIC révélait les CPSI glycinergiques uniquement. Cette sélection nous a permis de caractériser chacune de ces transmissions inhibitrices et de corroborer les études antérieures montrant qu'il est possible de les différencier par leurs propriétés cinétiques. En effet, la constante de désactivation ( $\tau_D$ ) des CPSI glycinergiques est inférieure à celle des CPSI GABAergiques (Chéry & De Koninck, 1999; Keller et al., 2004; Mitchell et al., 2007).

Il nous est donc possible lors de l'analyse des enregistrements électrophysiologiques de classer l'ensemble des événements en fonction de ce paramètre. Nous avons sélectionné les CPSI en fonction de leur  $\tau_D$  : les CPSI glycinergiques ayant un  $\tau_D$  inférieur à 12 ms et les CPSI GABAergiques supérieur à 15 ms. Par précaution, nous avons gardé une marge de 3 ms pour avoir le moins possible d'événements glycinergiques lents pris en compte dans nos CPSI GABAergiques, et inversement.

La transmission synaptique inhibitrice mixte GABA/glycine est détectée *de visu* dans un premier temps puis confirmée à l'analyse des enregistrements. Puisqu'elle est la conséquence d'une activation concomitante des GlyR et des GABA<sub>A</sub>R, l'application d'antagoniste de l'un ou de l'autre type de récepteur ne permet pas d'observer de transmission mixte. En effet, l'utilisation d'un antagoniste va systématiquement inhiber les récepteurs d'une composante de la transmission mixte la modifiant en transmission glycinergique par ajout de BIC ou GBZ et en transmission GABAergique par ajout de STR. Afin de conserver cette neurotransmission mixte, nous avons choisi de ne pas utiliser l'outil pharmacologique pour sélectionner les CPSI GABAergiques et glycinergiques.

L'ensemble des résultats extraits de l'analyse des constantes de désactivation de nos événements biexponentiels montrent un  $\tau_{\text{glycine}}$  qui est très proche de la valeur du  $\tau_D$  des CPSI glycinergiques, et un  $\tau_{\text{GABA}}$  qui est systématiquement plus important que le  $\tau_D$  GABAergique : supérieur à 20 ms.

Certains auteurs comme Mitchell et collaborateurs (2007) ont pu mettre en évidence l'existence de courants GABAergiques et glycinergiques « purs » pouvant être ajustés par une fonction biexponentielle. Cependant, leurs conditions expérimentales n'étaient pas exactement les mêmes : ils enregistraient des CPSI miniatures (en présence de TTX, bloqueur des canaux sodiques permettant la genèse de PA).

Bien que l'étude de la transmission en tranche conserve les propriétés post-synaptiques des CPSI et CPSE (cinétique et amplitude), le travail sur ce système isolé pose une limite quant à l'étude de la fréquence des événements synaptiques. En effet, la tranche est fortement déafférentée puisque la modulation du réseau d'interneurones par les contrôles descendants et les afférences primaires s'effectue uniquement par les terminaisons spinales conservées dans la tranche. On peut donc raisonnablement supposer que leur activation est plus faible que dans des conditions *in vivo* où leur intégrité est conservée. Cela a un impact sur la fréquence de libération de neurotransmetteurs à l'étage spinal, et donc sur l'excitabilité du réseau se traduisant par une baisse de la fréquence des interneurones. De la même manière, cette baisse de fréquence influence le courant extra-synaptique spillover-dépendant et cela pourrait expliquer les divergences de la littérature quant à leur présence dans une étude d'un système en tranche.

## Inhibition extra-synaptique dans la lamina II

L'application des antagonistes des GABA<sub>A</sub>R provoque aussi une baisse significative du courant basal, révélant un courant tonique GABAergique. Ce courant tonique (ou extra-synaptique) a été observé sur l'ensemble des neurones de la lamina II enregistrés lui suggérant un rôle important dans l'inhibition au sein du réseau des cornes dorsales.

Dans nos enregistrements, aucune transmission extra-synaptique glycinergique n'a pu être observée sur les neurones des rats SD. Takazawa et MacDermott (2010) ainsi que Mitchell et collaborateurs (2007) ont cependant observé une transmission extra-synaptique glycinergique dans la lamina II. Nos observations rejoignent cependant les études de Ataka et Gu (2006) ainsi que celles de Takahashi et collaborateurs (2006) qui n'observent pas non plus de courant tonique inhibiteur glycinergique dans la lamina II de la moelle épinière.

Nous avons choisi d'exprimer le courant extra-synaptique GABAergique en terme de densité de courant, c'est-à-dire rapporté à la capacitance neuronale. La capacitance dépend directement de la surface membranaire du neurone. L'expression de l'activité des GABA<sub>A</sub>R extra-synaptiques en densité de courant nous permet ainsi de comparer des populations de neurones ayant des surfaces membranaires différentes. Cela s'avère particulièrement utile dans notre étude afin de pouvoir comparer les courants extra-synaptiques entre les neurones de la lamina II à P8 et à P21 en s'affranchissant des variations morphologiques que les neurones subissent pendant cette période de maturation.

De plus, les études morphologiques des neurones dans la lamina II (Grudt & Perl, 2002; Maxwell *et al.*, 2007) montrent que les interneurons de cette structure ont une conformation morphologique très variable (taille, arborescence dendritique). Ces paramètres peuvent aussi influencer nos enregistrements : par exemple, l'enregistrement d'un neurone avec un arbre



dendritique très développé ne permettra peut-être pas d'imposer le potentiel à l'ensemble des dendrites, et donc le courant tonique enregistré ne sera représentatif que du soma et des parties accessibles électriquement. L'enregistrement d'un petit neurone qui ne possède qu'un faible arbre dendritique peu développé sera beaucoup plus accessible électriquement. Il s'agit bien là d'une limite à la technique de patch clamp en aveugle, car nous n'avons aucun visuel du neurone enregistré, et cela renforce l'intérêt d'exprimer nos résultats en terme de densité de courant.

Nous avons aussi étudié l'impact de la fréquence des événements GABAergiques sur le courant extra-synaptique. Des études ont montré que lors de grandes fréquences de libération synaptiques, le GABA peut atteindre des concentrations millimolaires dans la fente synaptique ce qui provoque la saturation des transporteurs de recapture neuronaux et gliaux GAT pouvant induire un débordement du GABA dans l'espace extra-synaptique : le spillover (Isaacson, 2000; Mitchell & Silver, 2000; Glykys & Mody, 2007). Bien que nous n'ayons pas observé d'augmentation de la fréquence des CPSI GABAergiques au cours de la maturation, il est peu probable que cette dernière soit responsable de l'augmentation de l'activité des GABA<sub>A</sub>R extra-synaptiques. De plus, notre étude de corrélation entre ces deux paramètres ne permet pas de mettre en évidence une interrelation absolue entre la densité de notre courant extra-synaptique et la fréquence des CPSI GABAergiques suggérant que le spillover n'est pas le seul facteur impliqué dans la genèse de ce courant extra-synaptique. Cela permet d'imaginer que d'autres modes de libération du GABA peuvent être mis en place dans la lamina II comme une libération vésiculaire non synaptique, une libération *via* l'inversion des transporteurs de recapture (Attwell *et al.*, 1993), ou encore une libération astrocytaire de neurotransmetteur (Evanko *et al.*, 2004 ; Muller *et al.*, 2008).

L'augmentation de courant tonique peut être mise en parallèle avec le développement morphologique qui est très important dans la lamina II de la moelle épinière encore durant les trois premières semaines postnatales

puisqu'il s'agit de la lamina qui possède la maturation la plus tardive dans les cornes dorsales (Lorenzo *et al.*, 2008). Bien que l'étendue dorso-ventrale de la lamina II ne change que très peu, une croissance axo-dendritique importante des interneurons spinaux a lieu au cours des premières semaines postnatales ainsi que la mise en place tardive des afférences sensorielles primaires de type C (Fitzgerald, 2005). La spécialisation des types neuronaux (mais aussi des astrocytes) et leurs croissances intrinsèques provoquent des changements de l'espace extra-synaptique pendant la maturation postnatale de la moelle épinière dorsale, donc de l'espace de diffusion du GABA. Avec la maturation morphologique de ce système, il est donc possible qu'un phénomène de concentration du GABA par compression de l'espace extra-synaptique ait lieu.

Cette maturation postnatale du courant GABAergique extra-synaptique suggère des conséquences fonctionnelles. Fitzgerald décrit en 2005 que les neurones des cornes dorsales des rats nouveau-nés sont beaucoup plus excitables que des rats plus âgés. Chez ces rats nouveau-nés les champs récepteurs sont plus larges et désorganisés (Pettersson *et al.*, 2003), et les seuils nociceptifs mécaniques sont plus faibles (Fitzgerald & Jennings, 1999). Ces seuils mécaniques augmentent graduellement avec la maturation du système spinal sous l'influence d'une diminution de l'excitabilité neuronale spinale (Fitzgerald, 1985, 2005). Bien que les propriétés intrinsèques de décharge en PA des neurones de la lamina II ne changent pas pendant les trois premières semaines postnatales (Baccei & Fitzgerald, 2005), des études sur l'hippocampe (Stell *et al.*, 2003; Semyanov *et al.*, 2004) mais aussi dans la moelle épinière dorsale (Takazawa & MacDermott, 2010; Bonin *et al.*, 2011) montrent que le courant tonique inhibiteur diminue significativement l'excitabilité neuronale. L'augmentation postnatale de la densité de courant extra-synaptique GABAergique peut expliquer la diminution d'excitabilité du réseau spinal et son impact sur la sensibilité nociceptive en fixant un niveau plus élevé d'inhibition générale dans les cornes dorsales. Dans ces conditions, les informations nociceptives doivent être plus importantes et / ou plus organisées

temporellement (synchronisées) pour compenser cette augmentation de l'inhibition afin d'être transmises. Ce mécanisme possède un intérêt clinique tout particulier dans les cornes dorsales qui constituent une cible pour les douleurs pathologiques

### **Comparaison de l'inhibition synaptique et extra-synaptique**

La comparaison des transmissions inhibitrices GABAergiques montre que la charge inhibitrice portée par le courant extra-synaptique est beaucoup plus importante que la charge inhibitrice synaptique. En effet, près de 95% de la charge inhibitrice GABAergique totale est portée par le courant extra-synaptique, les CPSI ne portant que 5% environ de cette inhibition dans la lamina II de la moelle épinière. Cette analyse est en accord avec les observations effectuées dans la substance gélatineuse du système trigeminal, où le courant tonique représente aussi plus de 95% de l'ensemble de la charge inhibitrice (Han & Youn, 2008).

Cependant, la transmission extra-synaptique a une moins bonne résolution temporelle que la transmission synaptique. En fonction de la distance du récepteur par rapport à la source de neurotransmetteur, de l'arrangement de l'espace extra-synaptique et de la présence de systèmes de recapture GAT, le temps d'action du GABA sur son récepteur peut énormément varier. Une autre particularité de ce type de transmission est sa définition spatiale diffuse puisque le domaine d'action des neurotransmetteurs sur leurs récepteurs est beaucoup plus vaste et variable. Ces paramètres à prendre en compte soulignent une activation qui peut être paracrine ou peut-être même autocrine en fonction de la disposition des récepteurs. En plus de cela, en fonction de la localisation subcellulaire des récepteurs, l'inhibition peut être somatique, dendritique ou axonale. En effet, le GABA présent dans l'espace

extra-synaptique n'a pas de cible cellulaire ou subcellulaire privilégiée, et c'est donc la localisation des récepteurs extra-synaptiques qui fixe la cible.

Par ailleurs, il a été montré que les récepteurs extra-synaptiques ayant une composition différente en sous-unité leur confère une affinité différente pour le GABA (Semyanov *et al.*, 2004). En effet, pour détecter les faibles concentrations de GABA dans l'espace extra-synaptique, l'affinité de ces récepteurs doit être très grande en regard de leurs contreparties synaptiques. Par exemple les  $\delta$ GABA<sub>A</sub>R ont une affinité beaucoup plus forte pour le GABA que les récepteurs synaptiques (Stell *et al.*, 2003).

La transmission synaptique quant à elle est très bien définie spatialement, confinée à la fente synaptique elle même fermée par les astrocytes mais aussi temporellement puisque l'action des neurotransmetteurs sur les récepteurs synaptiques est limitée par les systèmes de recapture opérant une clairance rapide de la fente synaptique. La précision spatio-temporelle de la transmission synaptique lui permet de moduler l'information dans la moelle épinière. La transmission de l'information nociceptive est véhiculée par la transmission glutamatergique et par les propriétés actives des neurones spinaux. Les événements synaptiques inhibiteurs permettent de moduler cette information afin de mettre en forme ses paramètres de début, de durée, de fréquence mais aussi d'intensité. La transmission synaptique inhibitrice permet aussi d'augmenter le contraste d'une information, notamment en inhibant les informations superflues qui peuvent générer un bruit de fond, augmentant ainsi son intensité relative et facilitant son intégration.

Ces modes de fonctionnement différents signifient que ces deux transmissions inhibitrices n'ont sans doute pas la même fonction dans les cornes dorsales de la moelle épinière. En effet, la transmission extra-synaptique est une inhibition générale, diminuant massivement l'excitabilité du réseau (Glykys & Mody, 2007; Bonin *et al.*, 2011). Cette inhibition massive peut être comparée à un filtre à informations. Ainsi les informations qui sont codées par

les propriétés actives des neurones pré-synaptiques doivent dépasser le seuil fixé par l'inhibition extra-synaptique afin d'atteindre les neurones de projection pour être relayées aux centres supra-spinaux, et être, *in fine* intégrées et interprétées.

## GLUCOCORTICOÏDES ET MATURATION DE L'INHIBITION

### **Influence des glucocorticoïdes sur la maturation de l'inhibition synaptique**

Plusieurs auteurs ont mis en évidence une maturation des CPSI GABAergiques au cours des trois premières semaines postnatales dans la lamina II chez le rat (Keller *et al.*, 2001 ; 2004) ou chez la souris (Rajalu *et al.*, 2009). Nos résultats corroborent ces études précédentes puisque dans la lamina II, la constante de désactivation des CPSI GABAergiques diminue et se stabilise vers la troisième semaine postnatale.

Notre étude est à notre connaissance la première à mettre en relation un dosage du taux plasmatiques de GC au cours du développement avec une mesure de la maturation de la transmission synaptique et extra-synaptique dans la lamina II de la moelle épinière. Cette étude nous présente l'existence d'un découplage entre la production de stéroïdes périphériques et centraux pendant les quatre premières semaines postnatales. En effet, en périphérie durant les deux premières semaines la production de GC est inexistante alors que notre étude démontre la présence d'un tonus spinal en stéroïdes 5 $\alpha$ -réduits. Ces composés 5 $\alpha$ -réduits (comme le THDOC) augmentent la probabilité d'ouverture du GABA<sub>A</sub>R par un mécanisme de potentialisation allostérique qui se traduit par l'augmentation de la constante de désactivation des CPSI GABAergiques (Zhu & Vicini, 1997). Cette action allostérique s'effectue sur deux sites transmembranaires du GABA<sub>A</sub>R (Hosie *et al.*, 2006, 2007) et leur action de potentialisation se traduit par une inhibition GABAergique plus forte. Ces sites d'action semblent être les mêmes quelque soit la composition en sous-unité du GABA<sub>A</sub>R (Hosie *et al.*, 2009). Il s'agit d'un site présent sur la sous-unité  $\alpha$  et d'un site présent à la jonction entre les sous-unités  $\alpha$  et  $\beta$ . L'activation

simultanée des deux sites serait nécessaire pour que les neurostéroïdes induisent la potentialisation allostérique du GABA<sub>A</sub>R.

Après P<sub>14</sub>, les taux périphériques de CORT augmentent alors que les taux centraux de stéroïdes diminuent. Cette différence de maturation n'explique pas une influence des stéroïdes plasmatiques sur l'inhibition centrale. Au contraire, ce découplage souligne une production de stéroïdes spinaux qui est indépendante de la périphérie. Patte-Mensah et collaborateurs (2004) ont montré que toutes les enzymes nécessaires à la synthèse et à la réduction des stéroïdes sont présentes dans les cornes dorsales de la moelle épinière. De plus, d'autres études démontrent qu'une production endogène de stéroïdes 5 $\alpha$ -réduits se met en place dans la moelle épinière en condition de douleur inflammatoire (Poisbeau *et al.*, 2005). L'ensemble de ces observations suggère donc que la moelle épinière peut produire ses propres stéroïdes *de novo*. Cette neurostéroïdogenèse spinale explique le découplage que l'on observe entre l'absence de production périphérique de GC et la présence du tonus de 5 $\alpha$ -stéroïdes spinaux.

Keller et collaborateurs (2001) ont par ailleurs montré que le tonus spinal en stéroïdes 5 $\alpha$ -réduits diminuait pendant les premières semaines postnatales, jusqu'à disparaître après la troisième semaine. Or, dans notre étude avec la FIN, le FIS qui a un taux beaucoup plus important de CORT plasmatique possède encore un tonus spinal en stéroïdes réduits après P<sub>21</sub>. Keller et collaborateurs (2001) ont montré que l'application de FIN n'altérait plus la constante de désactivation des CPSI GABAergiques à P<sub>21</sub> chez le SD, et que par conséquent il ne possédaient plus de stéroïdes 5 $\alpha$ -réduits dans la moelle épinière dorsale à P<sub>21</sub>. Ainsi le FIS, après la troisième semaine postnatale, en raison de forts taux de CORT plasmatiques atteignant la moelle épinière, présente une altération de l'inhibition synaptique GABAergique spinale. Ces précurseurs stéroïdiens franchissent la BHE et sont réduits localement en composés neuroactifs spinaux.

Dans notre caractérisation périnatale nous avons mis en évidence une maturation différentielle entre les FIS qui ont un  $\tau_D$  GABAergique significativement plus élevé que les SD et LEW. Puisque l'influence périphérique est inexistante durant les deux premières semaines postnatales, un mécanisme de régulation de la neurostéroïdogenèse intrinsèque dans la moelle épinière dorsale pourrait expliquer les différences inter-souches pendant cette période. Agnello et collaborateurs (2000) ont montré que l'induction d'une inflammation provoque une surexpression du TSPO (anciennement nommé PBR). Ainsi une expression ou une régulation différente du TSPO pourrait expliquer les différences entre les FIS les SD et les LEW. En effet, la surexpression du TSPO chez le FIS, ou l'augmentation de son affinité pour le cholestérol permettrait un import plus important de ce dernier dans la mitochondrie et permettrait une plus grande production spinale de neurostéroïdes pouvant moduler la transmission inhibitrice GABAergique de manière plus importante que chez les SD ou les LEW.

D'autres mécanismes enzymatiques clés impliqués dans la synthèse et la réduction des stéroïdes pourraient aussi être régulés de manière différentielle entre les souches, expliquant la différence de maturation de l'inhibition GABAergique spinale observée. En effet, Dexter et collaborateurs ont montré que L'ACTH augmente la disponibilité du cholestérol (Dexter et al., 1967). L'ACTH stimule aussi l'import du cholestérol dans la matrice mitochondriale (Clark & Weber, 1998). L'ACTH qui est hyper-sécrété chez le FIS (suivant l'hyper-expression de son précurseur le POMC ; Moncek et al., 2001) pourrait aussi contribuer à la mise en place d'une neurostéroïdogenèse spinale grâce à son action de modulation des enzymes de synthèse des GC.

Nos expériences de patch clamp sur des tranches incubées avec du FIN à P21 suggèrent aussi l'existence de ce tonus au delà de la troisième semaine postnatale chez le FIS. Ces données vont à l'encontre des résultats obtenus précédemment sur le SD (Keller et al., 2004). Cependant nous mettons en évidence une différence significative des taux plasmatiques de CORT inter-



souches à P<sub>21</sub> qui pourrait expliquer les différences d'inhibition spinale mesurées entre le FIS et les autres souches de rats. Lorsque l'axe HPA est mature, la production de GC plasmatiques serait suffisante à influencer le système spinal mature chez le FIS. Bien qu'il ait été montré que la neurostéroïdogénèse est inexistante après P<sub>21</sub> (Keller *et al.*, 2001, 2004; Poisbeau *et al.*, 2005) aucune étude ne portait sur le FIS. Si la neurostéroïdogénèse est toujours présente chez le FIS, l'apport de précurseurs plasmatiques renforcerait l'inhibition spinale GABAergique. Mais si la neurostéroïdogénèse spinale a bien disparue après P<sub>21</sub> chez le FIS, l'apport de précurseurs plasmatiques (réduits au niveau spinal) compenserait cette disparition et maintiendrait une inhibition GABAergique plus forte. Par ailleurs, cette neurostéroïdogénèse peut être réactivée dans des conditions pathologiques comme l'inflammation. Dans l'étude de Poisbeau et collaborateurs (2005) qui montrent une augmentation du  $\tau_D$  GABAergique en condition de douleur inflammatoire, il serait donc possible que l'induction de l'inflammation active l'axe HPA et la production de GC en périphérie. Ces derniers pourraient avoir une influence spinale *via* les composés 5 $\alpha$ -réduits qui modulent la transmission synaptique GABAergique. Cette étape de réduction peut avoir lieu dans la moelle épinière si les précurseurs sont amenés de la périphérie ou avoir lieu en périphérie et dans ce cas ce sont les composés 5 $\alpha$ -réduits qui traversent la BHE pour agir au niveau central. Nos études sur tranches en présence de FIN démontrent que la réduction en 5 $\alpha$  s'effectue au niveau spinal. L'application de FIN sur nos tranches de moelle empêche la modulation des CPSI GABAergiques chez le FIS à P<sub>8</sub> comme à P<sub>21</sub> attestant ainsi d'une étape de réduction spinale.

Il est néanmoins possible que chez le FIS, le tonus spinal en neurostéroïdes soit dû non pas à une influence périphérique de CORT mais à des effets spinaux intrinsèques de régulation enzymatique différentiels. En effet, il est possible que chez le FIS il y ait une hyperactivité d'une ou de plusieurs enzymes de la voie de synthèse des composés réduits afin que la

neurostéroïdogénèse *de novo* soit accentuée. Cependant une manière simple de répondre à cette question reste d'utiliser le bloqueur sélectif du TSPO : le PK11195. Si l'incubation de tranches dans le PK1195 provoque une diminution de la constante de désactivation des CPSI GABAergiques, cela signifierait qu'une neurostéroïdogénèse est toujours active chez le FIS mature, et que le tonus spinal en neurostéroïdes réduits n'est pas influencé par les taux plasmatiques de CORT. Toutefois cette hypothèse est réfutée par l'effet de l'injection sous-cutanée de CORT observé chez le SD que nous discuterons plus loin (au cours du chapitre suivant).

Par ailleurs, les CPSI mixtes constituent une autre mesure d'une maturation différentielle entre les FIS, SD et LEW. Les FIS montrent une proportion d'évènements mixtes significativement plus importante tout au long de la maturation du système spinal en regard des SD et des LEW. À P21 l'ensemble des neurones enregistrés chez le FIS présentent des CPSI mixtes alors que chez les SD et les LEW, ils ne sont retrouvés que dans environ la moitié des neurones enregistrés. En parallèle, il a été démontré que la proportion de neurones exhibant ce type d'évènement dans la lamina II est aussi dépendante du taux de stéroïdes 5 $\alpha$ -réduits : elle se réduit avec le temps jusqu'à devenir nulle après P30 (Keller *et al.*, 2001; Poisbeau *et al.*, 2005). Nos résultats confirment ces précédentes observations.

La cinétique de ces évènements montre aussi des différences intersouches. Nous avons mis en évidence que le  $\tau_{\text{GABA}}$  est beaucoup plus important chez le FIS tout au long de la maturation du système spinal. De plus, ce paramètre suit la même accélération pendant les trois premières semaines postnatales que le  $\tau_{\text{D}}$  des CPSI GABAergiques. Ces observations supportent fortement l'hypothèse d'une influence de la CORT plasmatique sur l'inhibition mixte spinale. Cette CORT, réduite au niveau spinal augmenterait la proportion de ces évènements en les maintenant dans la lamina II mature de la même manière qu'elle agit sur la transmission synaptique GABAergique en maintenant une cinétique ( $\tau_{\text{D}}$ ) plus lente. Il s'agit donc bien d'une action

allostérique des composés  $5\alpha$ -réduits sur les  $GABA_A$ R synaptiques prenant part à la cotransmission. Cela signifie que la maturation de la cotransmission GABA/glycine subit une maturation post-synaptique. Si une modulation des  $GABA_A$ R permet de rétablir une cotransmission, la terminaison pré-synaptique libère toujours les deux types de neurotransmetteurs. C'est ce qu'observent Poisbeau et collaborateurs (2005) lors de l'induction d'une inflammation : les événements mixtes réapparaissent sous l'influence de l'inflammation et sont modulés par la neurostéroïdogénèse qui réapparaît aussi. La diminution de leur proportion au cours de la maturation de la transmission mixte peut donc s'expliquer par la disparition des  $GABA_A$ R de la localisation post-synaptique. Il est donc toujours possible que les deux neurotransmetteurs GABA et glycine sont toujours colibérés, mais en l'absence de  $GABA_A$ R, uniquement les GlyR seront activés et la transmission sera glycinergique 'pure'.

En résumé, dans notre modèle de maturation de l'inhibition spinale GABAergique, l'influence des GC périphériques est absente au cours des deux premières semaines, pendant la SHRP. Pendant cette période, il y a une neurostéroïdogénèse spinale produisant *de novo* des stéroïdes  $5\alpha$ -réduits. Ces derniers modulent la transmission synaptique GABAergique dans les cornes dorsales, mais cette production endogène diminue jusqu'à disparaître aux alentours de la troisième semaine postnatale. À ce stade du développement de l'animal, l'axe HPA est mature et la production de GC en périphérie est effective. Lorsqu'ils sont présents en quantité suffisante (chez le FIS par exemple), ces GC peuvent diffuser dans le système nerveux central au niveau de la moelle épinière où ils sont réduits en métabolites neuroactifs et modulent la transmission synaptique GABAergique. Chez le SD et le LEW l'absence d'influence des GC périphériques peut s'expliquer par le fait que nos expériences sont systématiquement conduites au nadir de la production de GC : à 09h00. Cependant, nous ne pouvons pas exclure une telle influence lorsque la production de CORT périphérique est suffisante.

Dans nos expériences, nous n'étudions que les effets non-génomiques allostériques des GC mais nous ne pouvons toutefois pas exclure des effets génomiques passant par les récepteurs cytosoliques de type MR et GR, car ces derniers sont présents dans la moelle épinière (Marlier *et al.*, 1995, 1997). Nous ne pouvons pas non plus exclure des effets non-génomiques passant par les mGR / mMR dont la localisation spinale n'est encore que trop peu documentée à ce jour. Une étude a pu mettre en évidence une localisation astrocytaire de ces récepteurs dans les cornes dorsales de la moelle épinière (Zeng *et al.*, 2013). La CORT produit une élévation de calcium dans les astrocytes spinaux en culture, un effet bloqué par la toxine pertrussique (inhibiteur de l'activation des protéines G) et inaltéré par la cycloheximide (inhibiteur de la machinerie transcriptionnelle). Toutefois, une localisation spinale neuronale de ces récepteurs ne fait l'objet d'aucune étude dans la littérature.

Nous ne pouvons pas non plus exclure des effets organisationnels fonctionnels différentiels des GC maternels pendant le développement anténatal entre les trois souches de rat. Peut être que les différences génétiques entre les FIS, LEW et SD induisent une maturation *in utero* différente entre ces trois souches, conditionnant le développement postnatal en affectant des facteurs centraux auquel nous n'avons pas pensé.

### **Influence des glucocorticoïdes sur la maturation de l'inhibition extra-synaptique**

Le courant GABAergique extra-synaptique montre une augmentation en terme de densité de courant pendant les trois premières semaines postnatales. Cette observation constitue la première de la maturation postnatale du courant GABAergique extra-synaptique dans la lamina II chez le rat. Ces résultats sont en accord avec une précédente étude utilisant un modèle de rat juvénile et qui

observait un courant extra-synaptique GABAergique déjà à P15 (Mitchell *et al.*, 2007).

Cette augmentation pourrait être expliquée par l'augmentation du nombre de récepteurs et / ou de leur affinité pour le GABA. Cependant, le courant extra-synaptique GABAergique évoqué par l'application de THIP ne montre aucune variation au cours de la maturation du système spinal. Cette observation va à l'encontre d'une augmentation de l'expression du nombre de récepteurs, ou de l'augmentation de leur affinité qui auraient modifié la réponse maximale au THIP appliqué sur les neurones.

La comparaison du courant extra-synaptique entre les trois souches de rat ne montre aucune différence significative entre les FIS, SD et LEW au cours de la maturation du système spinal. Le tonus spinal de 5 $\alpha$ -stéroïdes qui est important dans les trois premières semaines postnatales ne semble pas affecter les récepteurs extra-synaptiques. De plus, dans le système spinal mature nous avons pu mettre en évidence que le FIS possède un tonus spinal en stéroïdes 5 $\alpha$ -réduits suffisant pour moduler la transmission synaptique GABAergique. Ce tonus chez le FIS ne semble pas non plus avoir d'influence sur le courant extra-synaptique du réseau spinal mature puisque sa valeur de densité de courant n'est pas différente de celle mesurée chez les SD ou les LEW.

Nos résultats immunohistochimiques ne nous ont d'ailleurs pas permis de mettre en évidence la présence de la sous-unité  $\delta$  (possédant une localisation exclusivement extra-synaptique) qui est la sous-unité ciblée préférentiellement par le THIP. Cependant, l'anticorps utilisé étant l'un des seuls sur le marché actuel, il est possible que sa spécificité ne soit pas optimale pour le système que nous étudions. Nous avons choisi de cibler cette sous-unité car elle a été montré comme préférentiellement (mais pas exclusivement) activée par le THIP. Or dans nos études électrophysiologiques, l'application de THIP produit une augmentation significative de la densité de courant tonique sur l'ensemble des neurones enregistrés de P8 à P21 et dans les trois souches de rat. À notre

concentration de 100  $\mu\text{M}$ , le THIP n'est pas spécifique de cette sous-unité en particulier. Par contre, dans des expériences complémentaires, le THIP appliqué à 10 ou 1  $\mu\text{M}$  augmente le courant extra-synaptique inhibiteur. Même si ces résultats ne nous permettent pas d'exclure l'implication d'autres sous-unités des récepteurs extra-synaptiques, ce sont ces dernières séries d'expériences qui nous ont poussé à effectuer cette expérience de marquage immunohistochimique ciblant la sous-unité  $\delta$ .

Plusieurs auteurs ont pu mettre en évidence une potentialisation des  $\delta\text{GABA}_A\text{R}$  par les  $5\alpha$ -stéroïdes dans d'autres structures du SNC : l'hippocampe (Mihalek *et al.*, 1999), le cervelet (Stell *et al.*, 2003) ou encore le thalamus (Herd *et al.*, 2009). Nos observations ne semblent pas être en accordance avec ces études puisque le FIS (qui possède un tonus spinal de  $5\alpha$ -stéroïdes après P21) ne montre aucune différence de densité de courant extra-synaptique dans la lamina II en regard des SD et LEW.

Cependant, dans le système mature, nos applications exogènes de THDOC montrent une activation du courant extra-synaptique inversement proportionnelle au taux de CORT plasmatique laissant penser que l'activation du courant extra-synaptique est déjà maximale chez le FIS. Cette interprétation est d'ailleurs renforcée par les résultats de la même application de THDOC mais après incubation des tranches dans le FIN, démontrant chez le FIS une potentialisation de l'activité extra-synaptique par le THDOC. Potentialisation que nous n'avons pas observé après la même application de THDOC mais en laissant le tonus spinal de  $5\alpha$ -stéroïdes (en absence de FIN). Cela suggère que chez le FIS, ce tonus spinal de stéroïdes module déjà les récepteurs extra-synaptique au maximum de manière intrinsèque. Or ces résultats ne sont pas en accord avec notre mesure à P21 de la densité de courant extra-synaptique GBZ-sensible qui n'est pas différente entre le FIS et les souches SD et LEW (Figure 33). Cette divergence pourrait être expliquée par l'état de phosphorylation du récepteur. En effet, l'état de phosphorylation du  $\text{GABA}_A\text{R}$  est un paramètre important pour la modulation du récepteur par les stéroïdes

5 $\alpha$ -réduits. Il a été montré que la phosphorylation du GABA<sub>A</sub>R empêche l'action de modulation de composés réduits en 5 $\alpha$  comme THDOC par un mécanisme dépendant de la PKC (Vergnano *et al.*, 2007). Ainsi, les récepteurs extra-synaptiques peuvent être dans un état de phosphorylation différent des récepteurs confinés à la synapse. Cette interprétation pourrait expliquer pourquoi le tonus spinal de 5 $\alpha$ -stéroïdes présent chez le FIS module les GABA<sub>A</sub>R synaptiques et pas les GABA<sub>A</sub>R extra-synaptiques. Mais aussi expliquer l'absence de différence inter-souche. Les SD et LEW auraient des récepteurs extra-synaptiques différemment phosphorylés que les FIS.

D'autres auteurs observent comme nous une modulation du courant extra-synaptique GABAergique par les 5 $\alpha$ -stéroïdes qui n'est pas systématique. Cette étude a été réalisée par Han et Youn (2008) dans un système très proche : la substance gélatineuse du système trigéminal. Cette structure possède le même rôle de modulation de l'information nociceptive mais pour les afférences sensorielles périphériques de la face et de la tête ainsi que la même organisation neuronale. Ces auteurs n'observent un courant tonique induit par le THDOC que sur 2/6 neurones enregistrés (Han & Youn, 2008). Ces résultats sont similaires à ceux que nous avons obtenus car pour les SD comme les LEW après application exogène de THDOC qui provoque une augmentation du courant GABA extra-synaptique dans 20 % des neurones enregistrés. Cela suggère que le type de sous-unité du GABA<sub>A</sub>R impliqué dans le courant extra-synaptique spinal n'est pas le même sur l'ensemble de la population de la lamina II, ou alors que leur affinité pour le GABA peut varier d'un neurone à l'autre.

Il est fort probable que d'autres sous-unités spécifiques des GABA<sub>A</sub>R extra-synaptiques soient beaucoup plus exprimées permettant d'expliquer l'importance de ce courant tonique dans le système spinal mature. Les sous-unités des GABA<sub>A</sub>R extra-synaptiques qui ont été démontrées comme fonctionnelles dans différentes parties du SNC sont les  $\alpha_4$ ,  $\alpha_5$  et  $\alpha_6$  (Farrant & Nusser, 2005). D'autres caractérisations restent nécessaires afin de pouvoir

savoir quelles sous-unités portent la majorité de la charge inhibitrice dans la lamina II de la moelle épinière.

De plus, une expression différente de ces sous-unités en fonction de la souche pourrait expliquer les différences que nous observons entre l'application de GBZ et l'application de THDOC. En effet, entre nos trois souches de rat, l'application de GBZ ne montre aucune différence de l'activité basale des récepteurs extra-synaptiques. Or, l'application de THDOC module ce même courant chez les SD et LEW uniquement. Il serait donc envisageable que le FIS exprime une autre sous-unité spécifiquement extra-synaptique du GABA<sub>A</sub>R.

Cependant, nos études démontrent tout de même qu'une activité extra-synaptique GABAergique est présente à P8, P14 et P21, et que cette dernière possède une très grande marge de modulation. En effet, l'augmentation de la densité de courant induite par le THIP est beaucoup plus importante que l'activité basale de ces récepteurs conférant au courant tonique une très grande marge de potentialisation et donc un intérêt tout particulier vu son importance relative par rapport au courant synaptique.



## INFLUENCE DES GLUCOCORTICOÏDES PLASMATIQUES SUR LA TRANSMISSION INHIBITRICE SPINALE MATURE

La première étude comportementale que nous nous sommes proposés d'effectuer était de vérifier si, à l'état basal, nos trois souches de rats présentent une différence de leur sensibilité mécanique nociceptive concomitante avec leurs taux respectifs de CORT plasmatiques. Nous avons utilisé la pince calibrée et démontré que les seuils mécaniques de retrait de la patte sont significativement plus élevés chez le FIS par rapport aux SD et LEW. Nos résultats sont en accord avec plusieurs observations précédentes qui montrent que les LEW présentent une plus grande sensibilité mécanique et thermique que les FIS (Webb *et al.*, 2003; Vit *et al.*, 2006).

Nous avons voulu compléter cette étude en injectant les rats SD en sous-cutané avec de la CORT (30 mg/kg) afin de procéder à la mesure de l'évolution de la sensibilité mécanique suite à l'augmentation induite du taux de CORT plasmatique. Les rats SD présentent une augmentation maximale du seuil de retrait de la patte suite à une stimulation mécanique trois heures après l'injection. Après cinq heures, les rats SD injectés ne présentent plus de différence significative avec les rats contrôles. L'injection aigue de CORT a donc une action anti-nociceptive qui se maintient trois heures, confirmant l'étude de Pinto-Ribeiro et collaborateurs (2009) montrant une action anti-nociceptive de la CORT.

Afin d'étudier l'impact de cette injection de CORT sur l'inhibition spinale, nous avons prélevé la moelle épinière et enregistré les CPSI sur les neurones de la lamina II trois heures après l'injection : au pic de l'effet anti-nociceptif produit par la CORT.

Les enregistrements en patch clamp des neurones de la lamina II (trois heures après l'injection de CORT) montrent une augmentation significative de la constante de désactivation des CPSI GABAergiques. En trois heures, les effets

de la CORT peuvent être multiples. En effet, il est possible que la CORT ait induit des effets génomiques d'expression ou de répression de différents facteurs par activation des récepteurs cytosoliques de type GR et MR.

Mais cet effet expliquerait difficilement une variation de la constante de désactivation qui reflète une action de modulation du récepteur GABA<sub>A</sub> synaptique. Il est néanmoins possible que la CORT agisse sur les mGR membranaires et que la cascade d'effecteurs intracellulaires induite mène à une altération de l'état de phosphorylation du GABA<sub>A</sub>R. En effet, Vergnano et collaborateurs (2007) ont mis en évidence que la levée de cette phosphorylation sur les neurones de la lamina II augmente significativement la constante de désactivation des CPSI GABAergiques (Vergnano *et al.*, 2007).

Une dernière possibilité est que, en trois heures, la CORT soit acheminée dans les cornes dorsales de la moelle épinière où elle est réduite en composés stéroïdes neuroactifs qui ont un fort pouvoir de modulation allostérique sur le GABA<sub>A</sub>R. Les résultats que nous avons obtenus précédemment avec l'étude *in vitro* de la transmission GABAergique spinale du FIS nous ont montré que la CORT plasmatique peut lorsqu'elle est présente en quantité suffisante atteindre la lamina II de la moelle épinière où elle est réduite en composés neuroactifs réduits en 5 $\alpha$ .

Afin de vérifier cette hypothèse nous avons incubé les tranches de moelle épinière (extraites trois heures après l'injection sous-cutanée de CORT) dans du FIN. L'enregistrement des neurones de la lamina II après incubation dans le FIN et injection de CORT montre que les CPSI GABAergiques ont une constante de désactivation qui est significativement moins importante que chez les SD ayant subi uniquement l'injection de CORT. La valeur de cette constante n'est pas différente de celle retrouvée chez les rats en condition contrôle et démontre que le FIN abolit totalement les effets induits par la CORT injectée. Ces résultats démontrent que la CORT injectée en périphérie est réduite au niveau spinal et potentialise la transmission synaptique GABAergique dans la lamina II. Son action allostérique s'effectue sous forme de composés stéroïdes 5 $\alpha$ -réduits neuroactifs (Zhu & Vicini, 1997).

Afin de vérifier notre hypothèse concernant une potentielle activation de récepteurs membranaires mGR par les GC au niveau spinal nous avons tout de même procédé à l'application de CORT à court terme sur nos tranches en cours d'enregistrement. Dans ces conditions aucune variation des paramètres de la transmission synaptique GABAergique n'a été observée au cours des 30 premières minutes d'enregistrement. Or, les études précédentes (dans l'hippocampe et l'amygdale) mettant en avant un rôle de mGR montraient une action de la CORT dans les premières minutes après l'application (De Kloet *et al.*, 1998; Karst *et al.*, 2005, 2010; Olijslagers *et al.*, 2008). Il est donc peu probable que dans notre préparation la CORT ait un rôle de modulation de la transmission inhibitrice dans la moelle épinière *via* ses récepteurs membranaires. Pour ces raisons, nous avons donc procédé à des incubation de nos tranches dans de la CORT puis enregistré les neurones de la lamina II au moins une heure après. Dans ces conditions nos résultats ont montré que la CORT augmente significativement la constante de désactivation des CPSI GABAergiques.

Afin de vérifier l'impact de stéroïdes réduits en  $5\alpha$  sur l'inhibition spinale, nous avons appliqué le THDOC sur nos tranches pendant l'enregistrement de neurones de la lamina II sur nos trois souches de rats. Les effets de potentialisation de transmission GABAergique par le THDOC sont bien décrits dans la littérature (Zhu & Vicini, 1997; Lambert *et al.*, 2003a; Strömberg *et al.*, 2005). Nos résultats corroborent ces précédentes études car sur l'ensemble des neurones enregistrés, le THDOC provoque une augmentation significative de la constante de désactivation des CPSI GABAergiques de la lamina II chez les SD, FIS et LEW. Cependant, nous avons observé une potentialisation différentielle de ce  $\tau_D$  GABAergique entre les différentes souches de rat. Cette augmentation relative est significativement moins importante chez le FIS que chez les SD et LEW. Cela peut s'expliquer par l'existence d'un tonus spinal important de stéroïdes réduits chez le FIS alors qu'il serait absent chez les deux autres

souches. En effet, ces deniers modulent déjà la transmission synaptique inhibitrice de la lamina II puisque nous avons démontré précédemment que le  $\tau_D$  GABAergique du FIS est significativement plus élevé que celui des SD et LEW après P21. Cela est fort probable dans la mesure où les valeurs de  $\tau_D$  GABAergique ne sont pas différentes entre les souches en présence de  $1 \mu\text{M}$  de THDOC. Cette concentration relativement élevée de stéroïdes nous permet raisonnablement de penser que la modulation des  $\text{GABA}_A\text{R}$  est maximale chez les trois souches de rats. Ainsi, chez le FIS, une application exogène supplémentaire de stéroïdes  $5\alpha$  produirait un effet moindre car le  $\tau_D$  GABAergique est déjà modulé par leur forte présence dans la lamina II.

Afin de vérifier cette hypothèse nous avons incubé nos tranches de moelle épinière prélevées chez le FIS dans le FIN avant les enregistrements. Dans ces conditions non seulement le  $\tau_D$  GABAergique présente une valeur significativement moins importante, mais l'application de THDOC provoque une augmentation relative de ce même paramètre beaucoup plus prononcée qui se rapproche des LEW et SD. Chez le FIS donc, le tonus de  $5\alpha$ -stéroïdes qui est présent dans le système spinal mature est suffisant pour potentialiser la transmission GABAergique et limite l'action d'une application exogène de stéroïdes réduits.

Les mêmes observations générales ont été effectuées pour l'analyse du courant GABAergique extra-synaptique entre les trois souches de rats. Ces observations ont été discutées précédemment et nous amènent aux mêmes interprétations que celles du courant synaptique : le tonus spinal de  $5\alpha$ -stéroïdes présent chez le FIS module déjà la transmission GABAergique extra-synaptique au maximum, et la transmission synaptique de manière significative. L'application exogène de THDOC sur notre préparation provoque donc un effet moindre sur la constante de désactivation des CPSI GABAergiques, et aucun effet sur la transmission extra-synaptique.

L'ensemble de cette étude *in vitro* sur les tranches de moelle épinière démontre que les GC périphériques lorsqu'ils sont présents en quantité suffisante comme chez le FIS peuvent traverser la BHE et être réduits en composés 5 $\alpha$ -réduits par les enzymes spécifiques présentes au niveau spinal. Ces composés potentialisent la transmission inhibitrice synaptique par une action allostérique sur le GABA<sub>A</sub>R dans la lamina II ce qui a pour effet d'accroître l'inhibition dans les cornes dorsales. Cette augmentation de l'inhibition dans les cornes dorsales peut diminuer l'excitabilité neuronale ce qui limitera la transmission de l'information nociceptive. Ces mécanismes de modulation de la transmission GABAergique spinale peuvent être mis en place au sein de l'organisme lorsque les taux de stéroïdes plasmatiques atteignent une concentration suffisante, et moduler les seuils nociceptifs réduisant la perception de la douleur.

## INFLUENCE DES GLUCOCORTICOÏDES PLASMATIQUES SUR INTEGRATION *IN VIVO* DE L'INFORMATION NOCICEPTIVE

Afin d'observer les conséquences de la potentialisation de l'inhibition GABAergique sur l'intégration des informations nociceptives par le réseau spinal dans sa configuration native intégrale, nous avons réalisé des enregistrements extracellulaires *in vivo* sur l'animal anesthésié en réponse à une stimulation du champ récepteur sensoriel. Nos études sur tranches démontrent bien l'influence de la CORT périphérique sur l'inhibition GABAergique dans la lamina II, mais l'intérêt de reproduire cette étude sur l'animal anesthésié est que nous pourrions voir l'influence de la CORT et du THDOC sur l'intégration et le traitement d'une stimulation périphérique et son intégration dans les cornes dorsales.

L'excitabilité neuronale dans la lamina II est un paramètre important, car elle est sous l'influence directe de l'équilibre entre les transmissions excitatrices et inhibitrices spinales. En effet l'administration intratécale d'antagonistes de la transmission inhibitrice (STR et BIC) provoquent une hyperexcitabilité du réseau neuronal de la corne dorsale de la moelle épinière induisant des symptômes caractéristiques des douleurs neuropathiques comme le phénomène d'allodynie (Yaksh, 1989; Sorkin & Puig, 1996; Charlet *et al.*, 2008). Nos enregistrements de l'activité unitaire de neurone répondant à une stimulation physiologique de son champ récepteur sensoriel périphérique nous permettent d'apprécier les conséquences d'une modulation *in vivo* de l'équilibre excitation / inhibition du réseau spinal sur l'intégration du message nociceptif par un interneurone qui transmettra le signal ainsi traité à un neurone de projection.

Dans les expériences électrophysiologiques *in vivo* que nous avons conduites, nous nous sommes intéressés à l'influence de la CORT et du THDOC sur le traitement de l'information nociceptive au niveau de la lamina II, mais aussi dans les couches profondes des cornes dorsales (lamina V). Ces deux

niveaux spinaux intègrent respectivement des informations nociceptives spécifiques et des informations convergentes. Au niveau de la lamina II ainsi nous nous sommes donc exclusivement concentrés sur l'impact de la CORT et du THDOC sur la modulation centrale des informations véhiculées par les fibres C nociceptives. Fibres que l'on retrouve aussi dans la lamina V mais conjointement aux fibres nociceptives A $\delta$ , et non-nociceptives de type A $\beta$ . Notons que nous ne pouvons pas différencier les différents types fibres de type A dans nos conditions, les rats étant trop jeunes.

Notre stratégie d'approche pour caractériser un tel impact consistait en l'application de différents modes de stimulations périphériques. La stimulation mécanique nous renseigne sur la réponse spinale d'une stimulation physiologique. Ces observations peuvent être mises en relation avec notre étude comportementale utilisant la pince calibrée, à la différence que cette dernière étude s'effectue sur l'animal éveillé et dans ces conditions la stimulation mécanique implique tout le système intégré de la nociception et de la douleur. Dans nos expériences *in vivo* sur l'animal anesthésié nous ne pouvons raisonner que sur la nociception pure. La modulation de la réponse spinale à la stimulation périphérique mécanique nous renseigne ainsi sur l'intégration de l'information nociceptive. Afin de caractériser cette influence nous avons utilisé la stimulation électrique isolée et la stimulation électrique répétée à une fréquence de 1 Hz. Ce dernier mode de stimulation nous permet de raisonner sur la modulation du réseau spinal qui est fortement activé par cette stimulation répétée. La stimulation électrique répétée peut induire un wind-up qui reflète une activité qui s'étend largement dans réseau des cornes dorsales. Une diminution de la réponse spinale induite est due à une diminution de l'excitabilité qui peut dans notre cas s'expliquer par l'altération de l'équilibre excitation / inhibition en faveur de cette dernière.

La même stratégie que précédemment a été adoptée pour évaluer l'impact d'une injection de CORT : nous avons effectué nos enregistrements trois heures après l'injection sous-cutanée de CORT, au maximum de son effet anti-nociceptif et nous avons comparé les enregistrements obtenus dans ces conditions à ceux de rats contrôles ayant subis une injection de véhicule. Une diminution significative de la fréquence de décharge en PA suite à une stimulation mécanique nociceptive de la patte postérieure a été observée suite à l'injection de CORT. Cette observation montre bien que la CORT provoque une modulation de l'intégration des informations nociceptives, qui en s'appuyant sur nos résultats *in vitro* pourrait être la conséquence d'une augmentation de l'inhibition GABAergique spinale. Par ailleurs, les neurones enregistrés dans la lamina II montrent une augmentation significative du seuil de stimulation électrique périphérique nécessaire à induire une réponse des fibres de type C. Mais aucune différence significative n'a été observée sur le nombre de PA induits par une stimulation isolée ou par une stimulation répétitive à basse fréquence induisant un wind-up.

Un délai de trois heures est suffisant à l'activation de mécanismes transcriptionnels faisant intervenir les récepteurs cytoplasmiques des GC. Il a été notamment montré que les GC peuvent être responsables de l'expression de canaux voltage dépendants potassiques qui peuvent influencer l'excitabilité neuronale (Levitan *et al.*, 1991; Takimoto *et al.*, 1993). Cependant, ces résultats peuvent aussi être expliqués par la potentialisation spinale de la transmission GABAergique produite par la CORT réduite en THDOC ainsi que nous l'avons déjà mis en évidence dans nos expériences *in vitro*.

Pour apporter des éléments de réponse, nous avons prétraités les rats 24 heures avant avec une injection i.p. de FIN puis nous avons enregistré les neurones de la lamina II trois heures après l'injection de CORT. Le prétraitement avec le FIN provoque une décharge de PA d'une fréquence significativement plus élevée suite à l'application d'une stimulation mécanique nociceptive pouvant traduire une réduction de l'inhibition et / ou une



augmentation de l'excitation au niveau du réseau neuronal de la lamina II. De plus, le prétraitement avec le FIN réduit significativement le seuil de la stimulation électrique périphérique nécessaire pour induire une réponse des fibres de type C. Cependant, dans ces conditions nous n'avons pas pu mettre en évidence un effet sur le nombre de PA induits par une stimulation isolée, ni par une stimulation répétitive à basse fréquence induisant un wind-up en sachant que le wind-up est très peu marqué dans la lamina II.

Il apparaît donc que les effets de l'injection de CORT sur la transmission de l'information nociceptive soient abolis par le FIN démontrant une action *via* les composés stéroïdes 5 $\alpha$ -réduits qui accroîtrait l'inhibition GABAergique et réduirait l'excitabilité du réseau neuronal. Ces résultats sont très similaires à ceux que nous avons obtenus au cours de notre étude *in vitro* effectuée sur les tranches de moelle épinière. Cependant, nous ne pouvons pas exclure une influence supraspinale ou même périphérique de l'injection de CORT. De plus, la provenance des effets peut aussi faire intervenir la régulation de l'expression de gènes à ces deux niveaux.

Afin de nous intéresser exclusivement à l'impact spinal des composés 5 $\alpha$ -réduits nous avons appliqué localement du THDOC sur la moelle épinière et caractérisé son influence sur la réponse spinale à une stimulation physiologique des champs récepteurs sensoriels. Cette application reste très locale, confinée au segment lombaire de la moelle épinière même après 20 minutes et ne remonte que très rarement jusqu'au DRG (observations non publiées de Juif et collaborateurs). L'effet d'une telle application est donc strictement spinal et à court terme permet de ne pas influencer les systèmes supraspinaux ou périphériques et permet d'écarter les effets génomiques.

Le THDOC appliqué sur la moelle épinière produit à très court terme (5 minutes environ) une diminution significative de la fréquence des PA suite à une stimulation mécanique nociceptive dans la lamina II. De plus, son application provoque une augmentation drastique du seuil de stimulation électrique de la patte nécessaire à provoquer une réponse des fibres C. Le

THDOC provoque aussi une diminution significative du nombre de PA générés par une stimulation isolée ainsi que du nombre de PA générés par une stimulation répétée à basse fréquence induisant un wind-up en condition contrôle.

L'ensemble de cette étude dans la lamina II démontre que le THDOC, par l'augmentation de la transmission inhibitrice démontrée dans l'étude précédente, déséquilibre la balance excitation / inhibition au profit de l'inhibition dans la lamina II et réduit l'excitabilité des neurones intégrant les informations nociceptives qu'ils transmettent aux neurones de projection.

Pour aller plus loin, nous avons réalisé les mêmes expériences en électrophysiologie *in vivo* sur les rats SD mais en enregistrant les neurones dans les couches profondes des cornes dorsales : dans la lamina V, où l'intégration des informations nociceptives s'effectue par une population d'interneurones de convergence intégrant aussi les informations somatosensorielles : les wide dynamic range.

Les WDR enregistrés trois heures après l'injection de CORT montrent une tendance à la diminution de la décharge de PA induite par stimulation mécanique nociceptive du champ récepteur sensoriel. Les fibres de type A et de type C montrent une augmentation significative des seuils de stimulation nécessaires à induire une décharge de PA, ainsi qu'une diminution non significative de leur décharge suite à une stimulation électrique du champ récepteur sensoriel et finalement, aucune variation suite à une stimulation électrique du champ récepteur sensoriel à 1 Hz.

Dans la lamina V, l'injection de CORT ne provoque donc aucun changement sur l'intégration des informations périphériques véhiculées par les fibres de type A, tandis qu'elle provoque une diminution de la transmission nociceptive spinal de l'information véhiculée par les fibres de type C.

Les neurones WDR enregistrés suite au prétraitement préalable (24 heures avant) des rats avec une injection i.p. de FIN présentent une augmentation significative de la décharge spinale suite à l'application d'une stimulation mécanique nociceptive du champ récepteur sensoriel. Les valeurs de stimulations seuils nécessaires à induire une réponse spinale des fibres C et des fibres A ne présente qu'une faible diminution non significative. Uniquement les réponses spinales des fibres de type A montrent une augmentation significative du nombre de PA suite à une stimulation électrique isolée, et uniquement les fibres C présentent une augmentation significative de la décharge de PA suite à une stimulation électrique du champ récepteur sensoriel à 1 Hz.

Cette étude se base (pour le groupe des rats traités par une injection de CORT) sur une population de 5 neurones uniquement, elle devra être complétée afin de vérifier que les différentes tendances observées suite à l'injection de CORT se voient validées.

Puisqu'en plus de certaines tendances, l'injection de CORT ainsi que le prétraitement des rats avec le FIN montrent des effets significatifs de modulation de l'intégration de l'information suite à une stimulation physiologique (mécanique) périphérique, nous avons voulu étudier l'effet de l'application du stéroïde  $5\alpha$ -réduit THDOC avant d'interpréter nos résultats.

L'application de THDOC provoque les mêmes effets sur l'intégration des informations des fibres C que ceux observés dans la lamina II : une diminution significative de la fréquence de décharge suite à l'application d'une stimulation mécanique nociceptive du champ récepteur sensoriel, une augmentation des valeurs de stimulations seuils nécessaires à induire une réponse des fibres C, une diminution du nombre de PA suite à une stimulation isolée ainsi que suite à une stimulation électrique du champ récepteur sensoriel à 1 Hz. Néanmoins, l'application de THDOC ne provoque aucun effet significatif sur l'intégration des informations des fibres de type A mesurées au travers des trois types de stimulations électriques appliquées dans notre protocole. Il y a donc une

différence de l'effet de modulation du THDOC sur l'intégration de l'information entre fibres de type A et C. En effet, cette modulation par le THDOC n'a été observée que sur l'intégration des informations relatives aux fibres de types C, donc nociceptive. Cela nous amène à penser que les réseaux d'interneurons inhibiteurs spinaux s'agencent de façon à exercer une modulation différente de l'information émanant de chacun des types de fibres. Bien que cette information soit intégrée par des neurones WDR dans la lamina V, en amont l'impact des stéroïdes réduits n'est pas le même. Cette influence stéroïdienne s'effectue sur la potentialisation de l'inhibition GABAergique qui semble fortement impliquée dans la modulation de l'intégration des informations nociceptives acheminées depuis la périphérie par les fibres C. Dans ce cas, il est fort probable que la modulation de l'information tactile soit portée par d'autres systèmes de neurotransmissions. En effet, l'inhibition glycinergique peut être responsable de la modulation de l'excitabilité neuronale spinale induite par l'arrivée des informations sensorielles. En effet, ces résultats vont dans le sens d'études antérieures de Inquimbert et collaborateurs (2007) montrant une distribution différentielle des deux types de neurotransmissions dans les cornes dorsales. Leur résultats montrent que dans la lamina II la transmission inhibitrice principale est GABAergique, mais dans les couches plus profondes la transmission inhibitrice principale est glycinergique. D'autres études démontrent que la transmission glycinergique bien que présente dans l'ensemble des cornes dorsale est beaucoup plus concentrée dans les couches profondes des cornes dorsales (Todd, 1990, 1991; Zeilhofer *et al.*, 2012).

Nos résultats montrent que le THDOC ne module pas les informations portées par les fibres de type A. De plus, il ne modifie pas la constante de désactivation des CPSI glycinergiques et nous n'avons observé aucune modification de ces paramètres dans notre étude *in vitro*. Ces observations peuvent être mises en parallèle avec l'étude de Mitchell et collaborateurs (2007) qui montre que la transmission glycinergique est insensible à l'application de THDOC. Nous pouvons ainsi imaginer une ségrégation anatomo-fonctionnelle des neurotransmissions spinales dans laquelle les GABA<sub>A</sub>R sont très présents

dans les couches superficielles, modulant les informations nociceptives spécifiques et pouvant être modulées par les stéroïdes  $5\alpha$ , tandis que les GlyR se trouvent majoritairement dans les couches plus profondes afin de moduler l'information non nociceptive reçue par les WDR, en restant insensibles à la modulation par les stéroïdes  $5\alpha$ .

Les informations nociceptives intégrées dans la lamina V peuvent provenir directement par un contingent d'afférences primaires de type A $\delta$  et C, mais peuvent aussi provenir des couches superficielles. En effet, les études de Petitjean et collaborateurs (2012) montrent l'existence d'une communication spinale inter-laminaire qui part de la lamina II et amène des informations jusque dans la lamina V.

L'interprétation de nos résultats nous amène à penser cependant à une implication préférentielle de la neurotransmission GABAergique dans la modulation de l'information nociceptive spécifique dans les couches superficielles. Cette transmission GABAergique ne semble pas impliquée dans la modulation des informations véhiculées par les fibres de type A sur les WDR puisqu'aucune influence du THDOC n'a été observée. Ces informations seraient essentiellement sous une influence glycinergique dans les couches les plus profondes des cornes dorsales. Cette interprétation de nos expériences électrophysiologiques *in vivo* corroborent fortement les interprétations qu'ont formulé Takazawa et MacDermott (2010). En effet, les auteurs observent une ségrégation des transmissions GABAergiques superficielles (lamina II) et glycinergiques dans les laminae III – IV ainsi que leurs conséquences potentielles sur la modulation de l'intégration des informations (respectivement) nociceptives et non-nociceptives.

Notons toutefois que nos résultats concernant les fibres de types A ne sont pas exclusivement somato-sensorielles, mais aussi nociceptives. En effet, ces fibres comprennent les fibres A $\beta$  ainsi que les fibres A $\delta$ . Ces dernières ne sont dans notre cas pas différenciables par leur propriétés électrophysiologiques (temps de latence) car les animaux sont encore trop jeunes.

La ségrégation de la neurotransmission glycinergique a aussi été observée dans la lamina I. En effet, des études électrophysiologiques montrent que sur l'ensemble des neurones de la lamina I, 39/40 reçoivent des entrées glycinergiques (Chéry & De Koninck, 1999). De manière intéressante il s'avère que la localisation préférentielle de la transmission glycinergique se situe dans les laminae ayant une population forte de neurones de projection : dans les laminae I et V. De ce fait, la glycine pourrait présenter une modulation finale et plus intégrée juste avant la transmission de l'information aux neurones de projection. Cette même information pourrait être déjà modulée par la transmission GABAergique en amont. Nous observons une augmentation de la transmission extra-synaptique GABAergique au cours de la maturation. Il est possible qu'il y ait une maturation de la neurotransmission GABAergique qui serait tout d'abord portée majoritairement par la composante synaptique dans les premières semaines postnatales, puis deviendrait majoritairement extra-synaptique dans la lamina II mature. Cette inhibition extra-synaptique agirait comme un premier filtre de l'information transmise aux cornes dorsales de la moelle épinière mature : une modulation générale de l'information entrante qui n'est pas spatialement et temporellement discriminative. Cette information serait dans un second temps modulée par la neurotransmission synaptique glycinergique, confinée dans les laminae qui comprennent les neurones de projection. Ces derniers intègrent l'information ainsi modulée puis la transmettent aux centres supraspinaux *via* les grandes voies ascendantes.

Finalement, afin d'étudier une potentielle activation de récepteurs membranaires mGR par les GC au niveau spinal et son impact sur l'excitabilité neuronale, nous avons procédé à l'application de CORT dans le bain pendant l'enregistrement. Aucune variation des paramètres mesurés (seuils, stimulation isolée, wind-up et stimulation mécanique nociceptive) n'a pu être observé pendant les 30 premières minutes. La littérature ne fait pas encore état de la présence des mGR ou mMR au niveau des cornes dorsales de la moelle épinière,

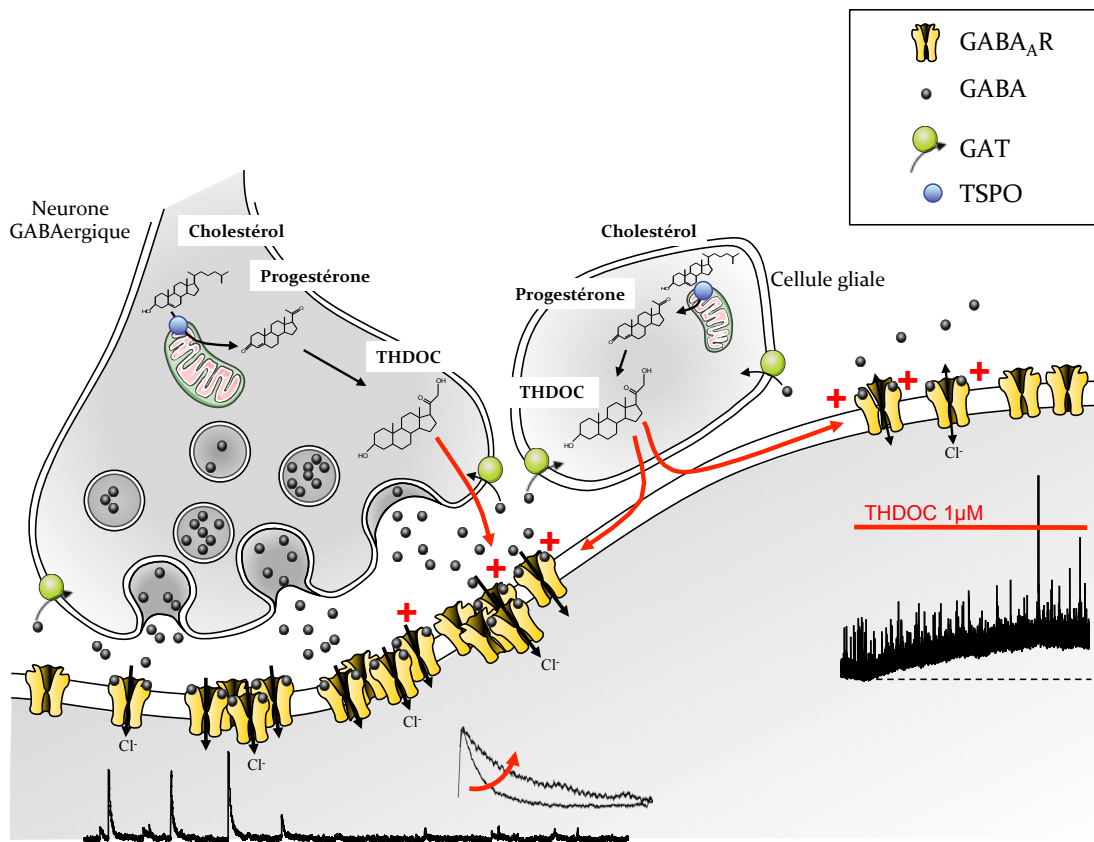
mais s'ils sont présents, ils n'ont pas d'influence sur la transmission synaptique inhibitrice ni sur les propriétés d'intégration de l'information à l'étage spinal.

## CONCLUSION GENERALE

Notre étude de la maturation postnatale de l'inhibition dans la lamina II de la moelle épinière mis en parallèle avec le suivi de la concentration plasmatique de corticostérone, nous a permis de démontrer que le tonus de stéroïdes 5 $\alpha$ -réduits qui module la transmission GABAergique durant la SHRP (en absence de glucocorticoïdes périphériques) possède une origine spinale pour les trois souches de rat étudiées (Figure 6o). Toutefois nos études sur les FIS et LEW, en regard du SD démontrent que cette modulation est elle-même régulée durant cette période. Cela suggère un contrôle différentiel d'un ou de plusieurs acteurs de la production de ces neurostéroïdes dans les cornes dorsales. Notre étude confirme ces résultats pour la souche SD et l'étend aux deux autres souches étudiées (FIS et LEW) qui nous ont permis de mettre en évidence cette activité différentielle de la neurostéroïdogenèse spinale qui est régulée par des facteurs intrinsèques au cours de cette période.

Notre étude à partir de la troisième semaine postnatale nous a permis de mettre en évidence une influence périphérique des glucocorticoïdes comme la corticostérone sur cette neurostéroïdogenèse et donc le tonus spinal en stéroïdes réduits chez le FIS dont les taux plasmatiques de CORT sont très élevés. De plus, nos études d'injection de CORT permettent de mimer la production endogène d'un bolus de CORT comme il arrive en condition de stress par exemple. Nous avons montré que lorsque ces glucocorticoïdes





**Figure 60** : Influence de la neurostéroïdogenèse sur la transmission GABAergique

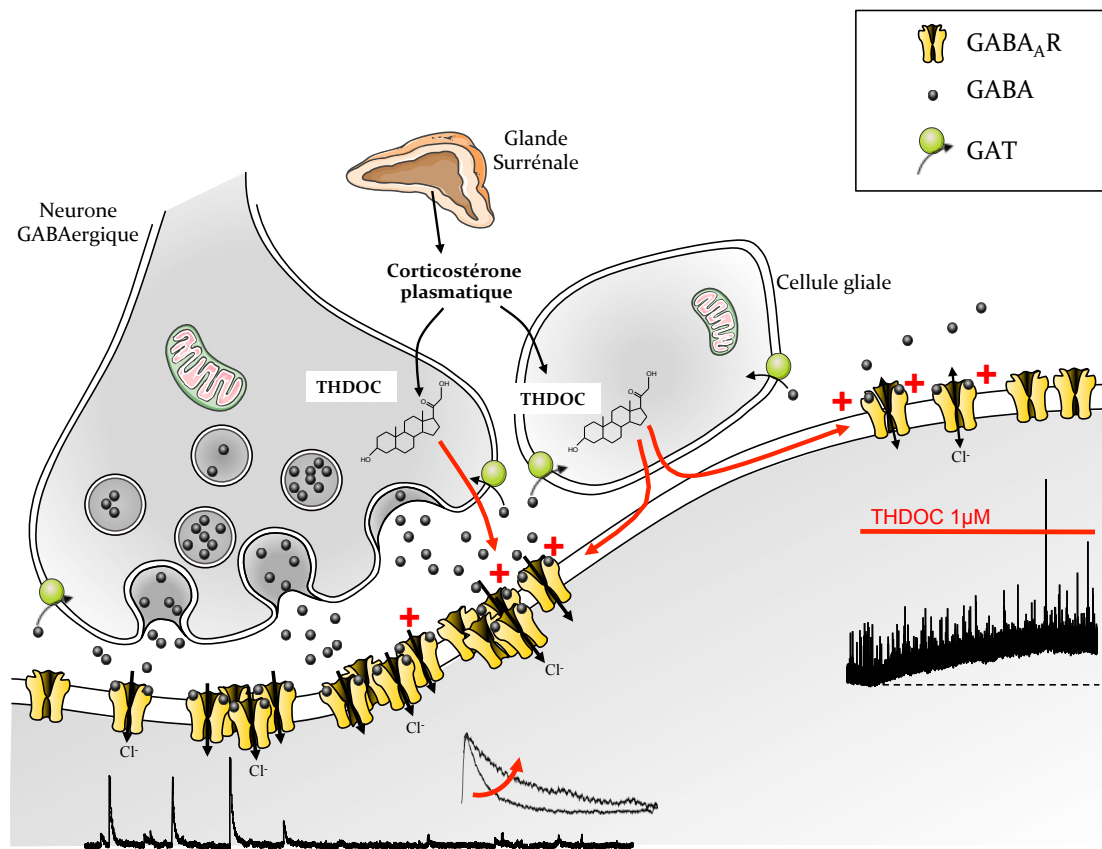
*La neurostéroïdogenèse peut prendre place dans les neurones ou les cellules gliales des cornes dorsales de la moelle épinière. Le cholestérol est importé dans la matrice mitochondriale par le TSPO, et clivé en précurseur stéroïdien : la progestérone. Cette dernière va subir plusieurs réactions enzymatiques pour être transformé en composé neuroactif 5 $\alpha$ -réduit qui va moduler les GABA<sub>A</sub>R synaptiques et extra-synaptiques de manière allostérique.*

plasmatiques sont présents en assez grande quantité en périphérie, ils peuvent atteindre le système nerveux central pour y être réduits et moduler la transmission synaptique GABAergique (Figure 61). Cet effet provoque des changements significatifs du traitement des informations nociceptives par le réseau neuronal des cornes dorsales qui se traduisent *in fine* par un effet anti-nociceptif.

Les glucocorticoïdes plasmatiques peuvent ainsi agir directement au niveau du premier centre intégrateur de l'information nociceptive : les cornes dorsales de la moelle épinière. Certes ce phénomène nécessite l'import du précurseur dans le système nerveux central, sa réduction par les enzymes spécifiques et l'action du composé réduit sur le récepteur GABAergique. Sa mise en place est lente mais son action est durable, car les effets anti-nociceptifs perdurent près de quatre heures après une injection unique de CORT. Ces mécanismes spinaux peuvent ainsi prendre part à la mise en place d'un contrôle de l'inhibition spinale par les effecteurs stéroïdiens de l'axe HPA mais aussi à la réponse de l'organisme au stress.

Notre travail a aussi permis de caractériser pour la première fois la maturation de l'inhibition GABAergique extra-synaptique dans la lamina II. Nous avons montré que l'importance de ce courant tonique augmente au cours de la maturation du système spinal. Dans le système mature, le courant extra-synaptique est modulé par les stéroïdes réduits tels que le THDOC et l'importance de cette modulation est sous l'influence des taux plasmatiques de CORT.

Les comparaisons relatives des transmissions synaptiques et extra-synaptiques attestent de l'importance prépondérante de l'action de fond extra-synaptique qui porte la majorité de la charge inhibitrice GABAergique. Bien que les acteurs en terme de sous-unités du GABA<sub>A</sub>R soient encore méconnus dans la lamina II, ce travail offre des perspectives nouvelles non seulement quant à la compréhension des différents aspects développementaux du système spinal,



**Figure 61** : Influence des GC circulants sur la transmission GABAergique

*Les GC plasmatiques synthétisés dans les glandes surrénales suite à l'activation de l'axe HPA vont traverser la barrière hémato-encéphalique et arriver dans les cornes dorsales de la moelle épinière. À ce niveau, ces composés vont subir plusieurs réactions enzymatiques pour être transformés en composés neuroactifs 5 $\alpha$ -réduits qui vont moduler les GABA<sub>A</sub>R synaptiques et extra-synaptiques de manière allostérique.*

mais aussi dans les applications potentielles sur le système mature. En effet, ces résultats peuvent s'avérer utiles afin de cibler l'inhibition spinale pour limiter l'influx nociceptif dans des conditions de douleurs pathologiques.

Notre étude *in vivo* a pu montrer une action de modulation différentielle des stéroïdes sur l'intégration des informations acheminées par les afférences primaires de type C et de type A. En effet, la transmission GABAergique semble plus impliquée dans la modulation des informations nociceptives véhiculées par les fibres de type C dans les couches superficielles. Ces observations corroborent les études antérieures *in vitro* de Takazawa et MacDermott (2010) renforçant les bases de la compréhension de l'organisation des interneurons dans les cornes dorsales. Cela ouvre aussi des axes de recherches sur l'organisation anatomo-fonctionnelle des réseaux de modulation des cornes dorsales de la moelle épinière qui sont encore peu caractérisés dans leur ensemble.

L'ensemble de ces résultats montre que les glucocorticoïdes plasmatiques peuvent potentialiser l'inhibition GABAergique spinale et par conséquent la modulation de l'intégration de l'information nociceptive dans les cornes dorsales et *in fine* produire une action anti-nociceptive.

## PERSPECTIVES

Ces travaux nécessitent dans un premier temps d'être renforcés, notamment pour les études *in vivo* qui ne comprennent pour le moment qu'une population relativement faible de neurones étudiés. Cela s'avère important puisque nos interprétations approfondissent les bases de la compréhension de l'organisation anatomo-fonctionnelle du réseau d'interneurones des cornes dorsales.

En effet, bien que le transfert de l'information nociceptive de la périphérie aux neurones de projection soit connu, le cheminement de cette information au sein du réseau d'interneurones l'est beaucoup moins. Plusieurs études pourtant ont cherché à mettre en évidence un patron d'organisation de ce réseau, en essayant de caractériser les populations d'interneurones sur des critères morphologiques, électrophysiologiques et neurochimiques. Nos études *in vivo* permettent de conforter certaines bases qui ont commencé à être décryptées, proposant une ségrégation anatomo-fonctionnelle des différentes neurotransmissions inhibitrices. Cette caractérisation nécessite un approfondissement, par exemple des différentes sous-unités du GABA<sub>A</sub>R soutenant le courant extra-synaptique dans les cornes dorsales. Cela permettra de les cibler préférentiellement vu l'importance de la charge inhibitrice qu'ils portent afin d'avoir une action sur l'équilibre entre excitation et inhibition. Toutes les compositions en sous-unité des GABA<sub>A</sub>R n'ont pas d'agonistes spécifiques permettant une étude pharmacologique. Il est donc nécessaire dans

ce cas de multiplier les approches comme par exemple l'utilisation de modèles murins transgéniques qui n'expriment pas une certaine sous-unité du GABA<sub>A</sub>R. Ce modèle d'étude couplé par exemple à une étude électrophysiologique *in vitro* permettrait de confirmer ou d'exclure l'implication de sous-unités composant les GABA<sub>A</sub>R extra-synaptique dans un premier temps, puis de caractériser leur pharmacologie propre afin de pouvoir les cibler préférentiellement.

L'utilisation de la souche Fischer s'est avérée être un outil très utile pour mettre en évidence qu'en l'absence de glucocorticoïdes plasmatiques (pendant la SHRP), la neurostéroïdogénèse est plus active que chez les SD, suggérant un contrôle de cette dernière par des facteurs encore inconnus. Une de nos hypothèses serait que chez le FIS, le TSPO est plus actif que chez les SD ou les LEW. Ce transporteur est un acteur indispensable à la stéroïdogénèse qui se situe en amont de toute la voie de synthèse de neurostéroïdes. Ainsi, bloquer son activité chez le FIS et chez le SD à P8 avec son antagoniste : le PK11195 puis appliquer de la CORT afin comparer dans ces conditions la transmission GABAergique de la lamina II apporterait de premiers éléments de réponse. Si la transmission GABAergique est toujours plus importante chez le FIS, un autre mécanisme en aval de l'import du cholestérol serait impliqué.

L'existence d'une possibilité d'augmenter la neurostéroïdogénèse et donc l'effet anti-nociceptif qu'elle provoque ouvre des perspectives de recherche. L'idée sous-jacente est ici de trouver une cible spinale permettant de relancer la neurostéroïdogénèse chez l'adulte, sachant que cette dernière possède des vertus anti-nociceptives mais aussi et surtout analgésiques (Poisbeau et al., 2005). Cette stratégie consiste en effet à potentialiser un mécanisme existant, endogène, plutôt que de chercher à le compenser avec des applications exogènes. La neurostéroïdogénèse pourrait être une cible de choix afin de cibler spécifiquement le système spinal pour relancer un contrôle stéroïdien local de la douleur et éviter ainsi tous les effets cliniques secondaires importants des traitements aux glucocorticoïdes.

L'utilisation de la souche Fischer s'est avérée aussi très utile pour mettre en évidence l'influence de forts taux plasmatiques de glucocorticoïdes sur la transmission inhibitrice spinale et les effets anti-nociceptifs induits. Une prochaine étape serait d'adapter l'interprétation de nos résultats en vue de montrer une action analgésique de la stéroïdogenèse en condition douloureuse chronique. De plus, le contrôle pharmacologique de la neurostéroïdogenèse serait un moyen de renforcer l'inhibition de manière intrinsèque. Ces composés stéroïdes une fois réduits sont de puissants neuromodulateurs ciblant la transmission GABAergique tant synaptique qu'extra-synaptique, qui sont toutes deux préférentiellement impliquées dans la modulation de la transmission nociceptive dans la moelle épinière.

Dans des conditions de douleurs pathologiques, le réseau spinal d'interneurones ainsi que les autres acteurs que sont les afférences primaires et les terminaisons des contrôles descendants subissent des changements fonctionnels importants. L'équilibre spinal entre excitation et inhibition est altéré provoquant une hyperexcitabilité responsable des symptômes d'hyperalgésie et d'allodynie retrouvés dans des états pathologiques de la douleur. Dans ces conditions étudier l'impact des glucocorticoïdes notamment sur le courant extra-synaptique permettrait de lui conférer un rôle analgésique

Dans nos interprétations nous proposons un modèle où l'inhibition GABAergique module préférentiellement les entrées nociceptives, et la glycine les entrées somato-sensorielles. Dans le cas de douleurs chroniques des modifications centrales se mettent en place comme le phénomène de sensibilisation centrale. Comprendre ces modifications de manière plus fine à l'étage spinal permettrait de trouver une cible préférentielle pour rétablir l'équilibre entre excitation et inhibition afin de limiter l'hyperexcitabilité spinale contre ces états pathologiques.

Dans la lamina II il existe une complémentarité des deux modes d'inhibition GABAergiques. L'inhibition extra-synaptique qui possède une faible définition spatiale et temporelle mais qui porte la majorité de la charge inhibitrice, et l'inhibition synaptique est beaucoup plus ciblée et mieux définie temporellement. Ces deux modes de transmission ont donc un rôle de modulation différent dans les cornes dorsales. En caractérisant leurs rôles et leur place dans le réseau d'interneurones de manière précise il serait alors possible de cibler l'une, l'autre ou les deux modes de transmission afin d'agir de façon plus précise à l'étage spinal dans le cas de douleurs chroniques.

La caractérisation de l'ensemble du réseau d'interneurones des cornes dorsales nécessitera encore beaucoup d'études mais sa compréhension est fondamentale afin de diminuer la transmission de l'information nociceptive en conditions pathologiques.



# BIBLIOGRAPHIE

- Agnello D, Carvelli L, Muzio V, Villa P, Bottazzi B, Polentarutti N, Mennini T, Mantovani A & Ghezzi P (2000). Increased peripheral benzodiazepine binding sites and pentraxin 3 expression in the spinal cord during EAE: relation to inflammatory cytokines and modulation by dexamethasone and rolipram. *Journal of neuroimmunology* **109**, 105–111.
- Ahmadi S, Lippross S, Neuhuber WL & Zeilhofer HU (2002). PGE(2) selectively blocks inhibitory glycinergic neurotransmission onto rat superficial dorsal horn neurons. *Nature neuroscience* **5**, 34–40.
- Almeida TF, Roizenblatt S & Tufik S (2004). Afferent pain pathways: a neuroanatomical review. *Brain research* **1000**, 40–56.
- Alonso G, Phan V, Guillemain I, Saunier M, Legrand A, Anoaï M & Maurice T (2000). Immunocytochemical localization of the sigma(1) receptor in the adult rat central nervous system. *Neuroscience* **97**, 155–170.
- Alvarez FJ & Fyffe RE (2000). Nociceptors for the 21st century. *Current review of pain* **4**, 451–458.
- Alvarez FJ, Villalba RM, Carr PA, Grandes P & Somohano PM (2000). Differential distribution of metabotropic glutamate receptors 1a, 1b, and 5 in the rat spinal cord. *The Journal of comparative neurology* **422**, 464–487.
- Antal M, Petkó M, Polgár E, Heizmann CW & Storm-Mathisen J (1996). Direct evidence of an extensive GABAergic innervation of the spinal dorsal horn by fibres descending from the rostral ventromedial medulla. *Neuroscience* **73**, 509–518.
- Ataka T & Gu JG (2006). Relationship between tonic inhibitory currents and phasic inhibitory activity in the spinal cord lamina II region of adult mice. *Molecular Pain* **2**, 36.
- Attwell D, Barbour B & Szatkowski M (1993). Nonvesicular release of neurotransmitter. *Neuron* **11**, 401–407.
- Axelrod J & Reisine TD (1984). Stress hormones: their interaction and regulation. *Science (New York, NY)* **224**, 452–459.
- Baccei ML & Fitzgerald M (2004). Development of GABAergic and glycinergic transmission in the neonatal rat dorsal horn. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience* **24**, 4749–4757.

- Baccei ML & Fitzgerald M (2005). Intrinsic firing properties of developing rat superficial dorsal horn neurons. *Neuroreport* **16**, 1325–1328.
- Bale TL & Vale WW (2004). CRF and CRF receptors: role in stress responsivity and other behaviors. *Annual review of pharmacology and toxicology* **44**, 525–557.
- Barker JL, Harrison NL, Lange GD & Owen DG (1987). Potentiation of gamma-aminobutyric-acid-activated chloride conductance by a steroid anaesthetic in cultured rat spinal neurones. *The Journal of physiology* **386**, 485–501.
- Le Bars D, Villanueva L, Bouhassira D & Willer JC (n.d.). Diffuse noxious inhibitory controls (DNIC) in animals and in man. *Patologicheskaja fiziologija i eksperimental'naja terapija* 55–65.
- Belelli D & Lambert JJ (2005). Neurosteroids: endogenous regulators of the GABA(A) receptor. *Nature reviews Neuroscience* **6**, 565–575.
- Bergeron R, de Montigny C & Debonnel G (1996). Potentiation of neuronal NMDA response induced by dehydroepiandrosterone and its suppression by progesterone: effects mediated via sigma receptors. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **16**, 1193–1202.
- Berthele A, Boxall SJ, Urban A, Anneser JM, Zieglgänsberger W, Urban L & Tölle TR (1999). Distribution and developmental changes in metabotropic glutamate receptor messenger RNA expression in the rat lumbar spinal cord. *Brain research Developmental brain research* **112**, 39–53.
- Bettler B, Kaupmann K, Mosbacher J & Gassmann M (2004). Molecular structure and physiological functions of GABA(B) receptors. *Physiological reviews* **84**, 835–867.
- Bohlhalter S, Mohler H & Fritschy J-M (1994). Inhibitory neurotransmission in rat spinal cord: co-localization of glycine- and GABAA-receptors at GABAergic synaptic contacts demonstrated by triple immunofluorescence staining. *Brain Research* **642**, 59–69.
- Bohlhalter S, Weinmann O, Mohler H & Fritschy JM (1996). Laminar compartmentalization of GABAA-receptor subtypes in the spinal cord: an immunohistochemical study. *Journal of Neuroscience* **16**, 283–297.
- Bonanno G, Fassio A, Sala R, Schmid G & Raiteri M (1998). GABA(B) receptors as potential targets for drugs able to prevent excessive excitatory amino acid transmission in the spinal cord. *European journal of pharmacology* **362**, 143–148.
- Bonin RP, Labrakakis C, Eng DG, Whissell PD, De Koninck Y & Orser B a (2011). Pharmacological enhancement of  $\delta$ -subunit-containing GABA(A) receptors that generate a tonic inhibitory conductance in spinal neurons attenuates acute nociception in mice. *Pain* **152**, 1317–1326.
- Breton J-D, Veinante P, Uhl-Bronner S, Vergnano AM, Freund-Mercier MJ, Schlichter R & Poisbeau P (2008). Oxytocin-induced antinociception in the spinal cord is mediated by a subpopulation of glutamatergic neurons in lamina I-II which amplify GABAergic inhibition. *Molecular pain* **4**, 19.

- Brickley SG, Cull-Candy SG & Farrant M (1996). Development of a tonic form of synaptic inhibition in rat cerebellar granule cells resulting from persistent activation of GABAA receptors. *The Journal of physiology* **497 ( Pt 3)**, 753–759.
- Broman J (1994). Neurotransmitters in subcortical somatosensory pathways. *Anatomy and Embryology* **189**, 181–214.
- Brown N, Kerby J, Bonnert TP, Whiting PJ & Wafford KA (2002). Pharmacological characterization of a novel cell line expressing human alpha(4)beta(3)delta GABA(A) receptors. *British journal of pharmacology* **136**, 965–974.
- Butler RK & Finn DP (2009). Stress-induced analgesia. *Progress in neurobiology* **88**, 184–202.
- Buttgereit F, Straub RH, Wehling M & Burmester G-R (2004). Glucocorticoids in the treatment of rheumatic diseases: an update on the mechanisms of action. *Arthritis and rheumatism* **50**, 3408–3417.
- Cameron K, Bartle E, Roark R, Fanelli D, Pham M, Pollard B, Borkowski B, Rhoads S, Kim J, Rocha M, Kahlson M, Kangala M & Gentile L (2012). Neurosteroid binding to the amino terminal and glutamate binding domains of ionotropic glutamate receptors. *Steroids* **77**, 774–779.
- Cashin MF & Moravsek V (1927). The Physiological Action Of Cholesterol. *Am J Physiol -- Legacy Content* **82**, 294–298.
- Ceccon M, Rumbaugh G & Vicini S (2001). Distinct effect of pregnenolone sulfate on NMDA receptor subtypes. *Neuropharmacology* **40**, 491–500.
- Charlet A, Lasbennes F, Darbon P & Poisbeau P (2008). Fast non-genomic effects of progesterone-derived neurosteroids on nociceptive thresholds and pain symptoms. *Pain* **139**, 603–609.
- Chatterton JE, Awobuluyi M, Premkumar LS, Takahashi H, Talantova M, Shin Y, Cui J, Tu S, Sevarino KA, Nakanishi N, Tong G, Lipton SA & Zhang D (2002). Excitatory glycine receptors containing the NR3 family of NMDA receptor subunits. *Nature* **415**, 793–798.
- Chéry N & De Koninck Y (1999). Junctional versus extrajunctional glycine and GABA(A) receptor-mediated IPSCs in identified lamina I neurons of the adult rat spinal cord. *Journal of Neuroscience* **19**, 7342–7355.
- Chéry N & de Koninck Y (1999). Junctional versus extrajunctional glycine and GABA(A) receptor-mediated IPSCs in identified lamina I neurons of the adult rat spinal cord. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **19**, 7342–7355.
- Cheung J & Smith DF (2000). Molecular Chaperone Interactions with Steroid Receptors : an Update Assembly Of Steroid Receptor-Chaperone Complexes : The Basics. **40**, 939–946.

- Clark AJ & Weber A (1998). Adrenocorticotropin insensitivity syndromes. *Endocrine reviews* **19**, 828–843.
- Clark WC, Yang JC & Janal MN (1986). Altered pain and visual sensitivity in humans: the effects of acute and chronic stress. *Annals of the New York Academy of Sciences* **467**, 116–129.
- Coirini H, Gouézou M, Liere P, Delespierre B, Pianos A, Eychenne B, Schumacher M & Guennoun R (2002). 3 $\beta$ -Hydroxysteroid dehydrogenase expression in rat spinal cord. *Neuroscience* **113**, 883–891.
- Compagnone N a & Mellon SH (2000). Neurosteroids: biosynthesis and function of these novel neuromodulators. *Frontiers in neuroendocrinology* **21**, 1–56.
- Compagnone NA, Bulfone A, Rubenstein JL & Mellon SH (1995). Expression of the steroidogenic enzyme P450scc in the central and peripheral nervous systems during rodent embryogenesis. *Endocrinology* **136**, 2689–2696.
- Coveñas R, DeLeón M, Chadi G, Cintra A, Gustafsson JA, Narvaez JA & Fuxe K (1994). Adrenalectomy increases the number of substance P and somatostatin immunoreactive nerve cells in the rat lumbar dorsal root ganglia. *Brain research* **640**, 352–356.
- Cui S, Du P, Zhou X & Wang H (2012). Developmental expression patterns of kainate receptors in the mouse spinal cord. *Neuroreport* **23**, 1012–1016.
- Cunha FQ, Poole S, Lorenzetti BB & Ferreira SH (1992). The pivotal role of tumour necrosis factor alpha in the development of inflammatory hyperalgesia. *British journal of pharmacology* **107**, 660–664.
- DeLeón M, Coveñas R, Chadi G, Narváz JA, Fuxe K & Cintra A (1994). Subpopulations of primary sensory neurons show coexistence of neuropeptides and glucocorticoid receptors in the rat spinal and trigeminal ganglia. *Brain research* **636**, 338–342.
- Demarque M, Represa A, Becq H, Khalilov I, Ben-Ari Y & Aniksztejn L (2002). Paracrine intercellular communication by a Ca<sup>2+</sup>- and SNARE-independent release of GABA and glutamate prior to synapse formation. *Neuron* **36**, 1051–1061.
- Devor M, Govrin-Lippmann R & Raber P (1985). Corticosteroids suppress ectopic neural discharge originating in experimental neuromas. *Pain* **22**, 127–137.
- Dexter RN, Fishman LM, Ney RL & Liddle GW (1967). An Effect of Adrenocorticotrophic Hormone on Adrenal Cholesterol Accumulation. *Endocrinology* **81**, 1185–1187.
- Dhabhar FS, McEwen BS & Spencer RL (1997). Adaptation to prolonged or repeated stress--comparison between rat strains showing intrinsic differences in reactivity to acute stress. *Neuroendocrinology* **65**, 360–368.
- Dhaka A, Viswanath V & Patapoutian A (2006). Trp ion channels and temperature sensation. *Annual review of neuroscience* **29**, 135–161.

- Di S, Malcher-Lopes R, Halmos KC & Tasker JG (2003). Nongenomic glucocorticoid inhibition via endocannabinoid release in the hypothalamus: a fast feedback mechanism. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience* **23**, 4850–4857.
- Di S, Malcher-Lopes R, Marcheselli VL, Bazan NG & Tasker JG (2005). Rapid glucocorticoid-mediated endocannabinoid release and opposing regulation of glutamate and gamma-aminobutyric acid inputs to hypothalamic magnocellular neurons. *Endocrinology* **146**, 4292–4301.
- Diamond DM, Bennett MC, Fleshner M & Rose GM (1992). Inverted-U relationship between the level of peripheral corticosterone and the magnitude of hippocampal primed burst potentiation. *Hippocampus* **2**, 421–430.
- Dickenson a H (1995). Spinal cord pharmacology of pain. *British journal of anaesthesia* **75**, 193–200.
- Dickenson AH & Sullivan AF (1987). Evidence for a role of the NMDA receptor in the frequency dependent potentiation of deep rat dorsal horn nociceptive neurones following C fibre stimulation. *Neuropharmacology* **26**, 1235–1238.
- Djoughri L & Lawson SN (2004). Abeta-fiber nociceptive primary afferent neurons: a review of incidence and properties in relation to other afferent A-fiber neurons in mammals. *Brain research Brain research reviews* **46**, 131–145.
- Duvarci S & Paré D (2007). Glucocorticoids enhance the excitability of principal basolateral amygdala neurons. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience* **27**, 4482–4491.
- Essrich C, Lorez M, Benson JA, Fritschy JM & Lüscher B (1998). Postsynaptic clustering of major GABAA receptor subtypes requires the gamma 2 subunit and gephyrin. *Nature Neuroscience* **1**, 563–571.
- Evanko DS, Zhang Q, Zorec R & Haydon PG (2004). Defining pathways of loss and secretion of chemical messengers from astrocytes. *Glia* **47**, 233–240.
- Farrant M & Nusser Z (2005). Variations on an inhibitory theme: phasic and tonic activation of GABA(A) receptors. *Nature reviews Neuroscience* **6**, 215–229.
- Ferando I & Mody I (2012). GABAA receptor modulation by neurosteroids in models of temporal lobe epilepsies. *Epilepsia* **53 Suppl 9**, 89–101.
- French-Mullen JM, Danks P & Spence KT (1994). Neurosteroids modulate calcium currents in hippocampal CA1 neurons via a pertussis toxin-sensitive G-protein-coupled mechanism. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience* **14**, 1963–1977.
- Fields HL, Basbaum AI, Clanton CH & Anderson SD (1977). Nucleus raphe magnus inhibition of spinal cord dorsal horn neurons. *Brain Research* **126**, 441–453.

- Fitzgerald M (1985). The post-natal development of cutaneous afferent fibre input and receptive field organization in the rat dorsal horn. *The Journal of physiology* **364**, 1–18.
- Fitzgerald M (2005). The development of nociceptive circuits. *Nature reviews Neuroscience* **6**, 507–520.
- Fitzgerald M & Jennings E (1999). The postnatal development of spinal sensory processing. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **96**, 7719–7722.
- Gamaro GD, Xavier MH, Denardin JD, Pilger JA, Ely DR, Ferreira MB & Dalmaz C (1998). The effects of acute and repeated restraint stress on the nociceptive response in rats. *Physiology & behavior* **63**, 693–697.
- Gauriau C & Bernard J-F (2004). A comparative reappraisal of projections from the superficial laminae of the dorsal horn in the rat: the forebrain. *The Journal of comparative neurology* **468**, 24–56.
- Glykys J & Mody I (2007). Activation of GABAA receptors: views from outside the synaptic cleft. *Neuron* **56**, 763–770.
- González S, Moses DF & De Nicola AF (1990). Glucocorticoid receptors and enzyme induction in the spinal cord of rats: effects of acute transection. *Journal of neurochemistry* **54**, 834–840.
- GRAY TS (1993). Amygdaloid CRF Pathways: Role in Autonomic, Neuroendocrine, and Behavioral Responses to Stress. *Annals of the New York Academy of Sciences* **697**, 53–60.
- Grudt TJ & Perl ER (2002). Correlations between neuronal morphology and electrophysiological features in the rodent superficial dorsal horn. *The Journal of Physiology* **540**, 189–207.
- Hammond GL (1990). Molecular properties of corticosteroid binding globulin and the sex-steroid binding proteins. *Endocrine reviews* **11**, 65–79.
- Han S-M & Youn D-H (2008). GABAA receptor-mediated tonic currents in substantia gelatinosa neurons of rat spinal trigeminal nucleus pars caudalis. *Neuroscience letters* **441**, 296–301.
- Harvey RJ, Depner UB, Wassle H, Ahmadi S, Heindl C, Reinold H, Smart TG, Harvey K, Schutz B, Abo-Salem OM, Zimmer A, Poisbeau P, Welzl H, Wolfer DP, Betz H, Zeilhofer HU & Muller U (2004). GlyR alpha 3: An essential target for spinal PGE(2)-mediated inflammatory pain sensitization. *Science* **304**, 884–887.
- Heijdra YF (2007). [Inhaled corticosteroids in patients with COPD: maintain current guidelines]. *Nederlands tijdschrift voor geneeskunde* **151**, 2195–2197.
- Heja L, Nyitrai G, Kekesi O, Dobolyi A, Szabo P, Fiath R, Ulbert I, Pal-Szenthe B, Palkovits M & Kardos J (2012). Astrocytes convert network excitation to tonic inhibition of neurons. *BMC Biology* **10**, 26.

- Herd MB, Belelli D & Lambert JJ (2007). Neurosteroid modulation of synaptic and extrasynaptic GABA(A) receptors. *Pharmacology & therapeutics* **116**, 20–34.
- Herd MB, Foister N, Chandra D, Peden DR, Homanics GE, Brown VJ, Balfour DJK, Lambert JJ & Belelli D (2009). Inhibition of thalamic excitability by 4,5,6,7-tetrahydroisoxazolo[4,5-c]pyridine-3-ol: a selective role for delta-GABA(A) receptors. *The European journal of neuroscience* **29**, 1177–1187.
- Hinz B & Hirschelmann R (2000). Rapid non-genomic feedback effects of glucocorticoids on CRF-induced ACTH secretion in rats. *Pharmaceutical research* **17**, 1273–1277.
- Hökfelt T, Zhang X & Wiesenfeld-Hallin Z (1994). Messenger plasticity in primary sensory neurons following axotomy and its functional implications. *Trends in Neurosciences* **17**, 22–30.
- Hosie AM, Clarke L, da Silva H & Smart TG (2009). Conserved site for neurosteroid modulation of GABA A receptors. *Neuropharmacology* **56**, 149–154.
- Hosie AM, Wilkins ME, da Silva HMA & Smart TG (2006). Endogenous neurosteroids regulate GABAA receptors through two discrete transmembrane sites. *Nature* **444**, 486–489.
- Hosie AM, Wilkins ME & Smart TG (2007). Neurosteroid binding sites on GABA(A) receptors. *Pharmacology & therapeutics* **116**, 7–19.
- 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**, 2940–2949.
- Isaacson JS (2000). Synaptic transmission: Spillover in the spotlight. *Current Biology* **10**, R475–R477.
- Jakowec MW, Fox AJ, Martin LJ & Kalb RG (1995). Quantitative and qualitative changes in AMPA receptor expression during spinal cord development. *Neuroscience* **67**, 893–907.
- Jiang P, Yang C-X, Wang Y-T & Xu T-L (2006). Mechanisms of modulation of pregnanolone on glycinergic response in cultured spinal dorsal horn neurons of rat. *Neuroscience* **141**, 2041–2050.
- Johnson LR, Farb C, Morrison JH, McEwen BS & LeDoux JE (2005). Localization of glucocorticoid receptors at postsynaptic membranes in the lateral amygdala. *Neuroscience* **136**, 289–299.
- Jones MT, Hillhouse EW & Burden J (1976). Proceedings: Mechanism of action of fast and delayed corticosteroid feedback at the hypothalamus. *The Journal of endocrinology* **69**, 34P–35P.
- Karst H, Berger S, Erdmann G, Schütz G & Joëls M (2010). Metaplasticity of amygdalar responses to the stress hormone corticosterone. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **107**, 14449–14454.

- Karst H, Berger S, Turiault M, Tronche F, Schütz G & Joëls M (2005). Mineralocorticoid receptors are indispensable for nongenomic modulation of hippocampal glutamate transmission by corticosterone. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **102**, 19204–19207.
- Keller a.-F & Poisbeau P (2009). Neurostéroïdes et douleur. *Douleur et Analgésie* **22**, 157–168.
- Keller AF, Breton J-D, Schlichter R & Poisbeau P (2004). Production of 5alpha-reduced neurosteroids is developmentally regulated and shapes GABA(A) miniature IPSCs in lamina II of the spinal cord. *Journal of Neuroscience* **24**, 907–915.
- Keller AF, Coull JAM, Chery N, Poisbeau P & De Koninck Y (2001). Region-Specific Developmental Specialization of GABA-Glycine Cosynapses in Laminas I-II of the Rat Spinal Dorsal Horn. *J Neurosci* **21**, 7871–7880.
- De Kloet ER, Karst H & Joëls M (2008). Corticosteroid hormones in the central stress response: quick-and-slow. *Frontiers in neuroendocrinology* **29**, 268–272.
- De Kloet ER, Vreugdenhil E, Oitzl MS & Joëls M (1998). Brain corticosteroid receptor balance in health and disease. *Endocrine reviews* **19**, 269–301.
- Kneussel M (2002). Dynamic regulation of GABA(A) receptors at synaptic sites. *Brain research Brain research reviews* **39**, 74–83.
- Koch SC, Tochiki KK, Hirschberg S & Fitzgerald M (2012). C-fiber activity-dependent maturation of glycinergic inhibition in the spinal dorsal horn of the postnatal rat. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **109**, 12201–12206.
- Lambert JJ, Belelli D, Peden DR, Vardy AW & Peters J a. (2003a). Neurosteroid modulation of GABAA receptors. *Progress in Neurobiology* **71**, 67–80.
- Lambert JJ, Belelli D, Peden DR, Vardy AW & Peters JA (2003b). Neurosteroid modulation of GABAA receptors. *Progress in neurobiology* **71**, 67–80.
- Latorre R, Brauchi S, Orta G, Zaelzer C & Vargas G (2007). ThermoTRP channels as modular proteins with allosteric gating. *Cell calcium* **42**, 427–438.
- Legendre P (2001). The glycinergic inhibitory synapse. *Cellular and Molecular Life Sciences* **58**, 760–793.
- Lehmann J, Colpaert F & Canton H (1991). Glutamate and glycine co-activate while polyamines merely modulate the NMDA receptor complex. *Progress in neuropsychopharmacology biological psychiatry* **15**, 183–190.
- Levine S (2001). Primary social relationships influence the development of the hypothalamic--pituitary--adrenal axis in the rat. *Physiology & behavior* **73**, 255–260.



- LEVINE S (2006). The Ontogeny of the Hypothalamic-Pituitary-Adrenal Axis. The Influence of Maternal Factors. *Annals of the New York Academy of Sciences* **746**, 275–288.
- Levine S, Glick D & Nakane PK (1967). Adrenal and plasma corticosterone and vitamin A in rat adrenal glands during postnatal development. *Endocrinology* **80**, 910–914.
- Levine S, Huchton DM, Wiener SG & Rosenfeld P (1991). Time course of the effect of maternal deprivation on the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in the infant rat. *Developmental psychobiology* **24**, 547–558.
- Levitan ES, Hemmick LM, Birnberg NC & Kaczmarek LK (1991). Dexamethasone increases potassium channel messenger RNA and activity in clonal pituitary cells. *Molecular endocrinology (Baltimore, Md)* **5**, 1903–1908.
- Lorenzo L-E, Ramien M, St Louis M, De Koninck Y & Ribeiro-da-Silva A (2008). Postnatal changes in the Rexed lamination and markers of nociceptive afferents in the superficial dorsal horn of the rat. *The Journal of comparative neurology* **508**, 592–604.
- LoTurco JJ, Mody I & Kriegstein AR (1990). Differential activation of glutamate receptors by spontaneously released transmitter in slices of neocortex. *Neuroscience Letters* **114**, 265–271.
- Löwenberg M, Stahn C, Hommes DW & Buttgereit F (2008). Novel insights into mechanisms of glucocorticoid action and the development of new glucocorticoid receptor ligands. *Steroids* **73**, 1025–1029.
- Luis-Delgado OE, Barrot M, Rodeau J-L, Schott G, Benbouzid M, Poisbeau P, Freund-Mercier M-J & Lasbennes F (2006). Calibrated forceps: a sensitive and reliable tool for pain and analgesia studies. *The journal of pain : official journal of the American Pain Society* **7**, 32–39.
- Madden J, Akil H, Patrick RL & Barchas JD (1977). Stress-induced parallel changes in central opioid levels and pain responsiveness in the rat. *Nature* **265**, 358–360.
- Maeda A, Katafuchi T, Oba Y, Shiokawa H & Yoshimura M (2010). Enhancement of GABAergic tonic currents by midazolam and noradrenaline in rat substantia gelatinosa neurons in vitro. *Anesthesiology* **113**, 429–437.
- Maguire J & Mody I (2009). Steroid hormone fluctuations and GABA(A)R plasticity. *Psychoneuroendocrinology* **34 Suppl 1**, S84–90.
- Makara GB & Haller J (2001). Non-genomic effects of glucocorticoids in the neural system. Evidence, mechanisms and implications. *Progress in neurobiology* **65**, 367–390.
- Malcangio M & Bowery NG (1993). Gamma-aminobutyric acidB, but not gamma-aminobutyric acidA receptor activation, inhibits electrically evoked substance P-like immunoreactivity release from the rat spinal cord in vitro. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* **266**, 1490–1496.

- Malcher-Lopes R, Di S, Marcheselli VS, Weng F-J, Stuart CT, Bazan NG & Tasker JG (2006). Opposing crosstalk between leptin and glucocorticoids rapidly modulates synaptic excitation via endocannabinoid release. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **26**, 6643–6650.
- Marlier LN, Csikós T, Rebaudengo N, Borboni P, Patacchioli FR, Angelucci L, Privat A & Lauro R (1995). Distribution of glucocorticoid receptor mRNA in the rat spinal cord. *Neuroreport* **6**, 2245–2249.
- Marlier LN, Patacchioli FR, Porzio O, Chiusaroli R, Borboni P, Lauro R & Angelucci L (1997). Distribution of adrenocorticoid receptors in the rat CNS measured by competitive PCR and cytosolic binding. *Journal of molecular neuroscience : MN* **9**, 1–12.
- Mason BL, Pariante CM, Jamel S & Thomas SA (2010). Central nervous system (CNS) delivery of glucocorticoids is fine-tuned by saturable transporters at the blood-CNS barriers and nonbarrier regions. *Endocrinology* **151**, 5294–5305.
- Maxwell DJ, Belle MD, Cheunsuang O, Stewart A & Morris R (2007). Morphology of inhibitory and excitatory interneurons in superficial laminae of the rat dorsal horn. *The Journal of physiology* **584**, 521–533.
- McGowan MK & Hammond DL (1993). Antinociception produced by microinjection of glutamate into the ventromedial medulla of the rat: mediation by spinal GABA<sub>A</sub> receptors. *Brain Research* **620**, 86–96.
- Mellon SH, Griffin LD & Compagnone N a (2001). Biosynthesis and action of neurosteroids. *Brain research Brain research reviews* **37**, 3–12.
- Mihalek RM, Banerjee PK, Korpi ER, Quinlan JJ, Firestone LL, Mi ZP, Lagenaur C, Tretter V, Sieghart W, Anagnostaras SG, Sage JR, Fanselow MS, Guidotti A, Spigelman I, Li Z, DeLorey TM, Olsen RW & Homanics GE (1999). Attenuated sensitivity to neuroactive steroids in gamma-aminobutyrate type A receptor delta subunit knockout mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 12905–12910.
- Millan MJ (1999). The induction of pain: an integrative review. *Progress in neurobiology* **57**, 1–164.
- Millan MJ (2002). Descending control of pain. *Progress in Neurobiology* **66**, 355–474.
- Mitchell E a, Gentet LJ, Dempster J & Belelli D (2007). GABA<sub>A</sub> and glycine receptor-mediated transmission in rat lamina II neurones: relevance to the analgesic actions of neuroactive steroids. *The Journal of physiology* **583**, 1021–1040.
- Mitchell SJ & Silver RA (2000). GABA spillover from single inhibitory axons suppresses low-frequency excitatory transmission at the cerebellar glomerulus. *Journal of Neuroscience* **20**, 8651–8658.
- Moncek F, Kvetnansky R & Jezova D (2001). Differential responses to stress stimuli of Lewis and Fischer rats at the pituitary and adrenocortical level. *Endocrine regulations* **35**, 35–41.

- Muller E, Le-Corronc H & Legendre P (2008). Extrasynaptic and postsynaptic receptors in glycinergic and GABAergic neurotransmission: a division of labor? *Frontiers in molecular neuroscience* **1**, 3.
- Nusser Z & Mody I (2002). Selective modulation of tonic and phasic inhibitions in dentate gyrus granule cells. *Journal of neurophysiology* **87**, 2624–2628.
- Olijslagers JE, de Kloet ER, Elgersma Y, van Woerden GM, Joëls M & Karst H (2008). Rapid changes in hippocampal CA1 pyramidal cell function via pre- as well as postsynaptic membrane mineralocorticoid receptors. *The European journal of neuroscience* **27**, 2542–2550.
- Papadopoulos V, Baraldi M, Guilarte TR, Knudsen TB, Lacapère J-J, Lindemann P, Norenberg MD, Nutt D, Weizman A, Zhang M-R & Gavish M (2006). Translocator protein (18kDa): new nomenclature for the peripheral-type benzodiazepine receptor based on its structure and molecular function. *Trends in pharmacological sciences* **27**, 402–409.
- Paris JM, Lorens S a, Van de Kar LD, Urban JH, Richardson-Morton KD & Bethea CL (1987). A comparison of acute stress paradigms: hormonal responses and hypothalamic serotonin. *Physiology & behavior* **39**, 33–43.
- Pasricha N, Joëls M & Karst H (2011). Rapid effects of corticosterone in the mouse dentate gyrus via a nongenomic pathway. *Journal of neuroendocrinology* **23**, 143–147.
- Patte-mensah C, Kibaly C, Boudard D, Schaeffer V, Béglé A, Saredi S, Meyer L & Mensah-Nyagan AG (2006). Neurogenic Pain and Steroid Synthesis in the Spinal Cord. ; DOI: 10.1385/JMN/28.
- Patte-Mensah C, Penning TM & Mensah-Nyagan AG (2004). Anatomical and cellular localization of neuroactive 5 alpha/3 alpha-reduced steroid-synthesizing enzymes in the spinal cord. *The Journal of comparative neurology* **477**, 286–299.
- Peng H-Y, Chen G-D, Lee S-D, Lai C-Y, Chiu C-H, Cheng C-L, Chang Y-S, Hsieh M-C, Tung K-C & Lin T-B (2009). Neuroactive steroids inhibit spinal reflex potentiation by selectively enhancing specific spinal GABA(A) receptor subtypes. *Pain* **143**, 12–20.
- Petersson P, Waldenström A, Fåhraeus C & Schouenborg J (2003). Spontaneous muscle twitches during sleep guide spinal self-organization. *Nature* **424**, 72–75.
- 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**, 3500–3508.
- Pinto-Ribeiro F, Almeida A, Pêgo JM, Cerqueira J & Sousa N (2004). Chronic unpredictable stress inhibits nociception in male rats. *Neuroscience letters* **359**, 73–76.
- Pinto-Ribeiro F, Moreira V, Pêgo JM, Leão P, Almeida A & Sousa N (2009). Antinociception induced by chronic glucocorticoid treatment is correlated to local modulation of spinal neurotransmitter content. *Molecular pain* **5**, 41.

- Poisbeau P, Patte-Mensah C, Keller AF, Barrot M, Breton J-D, Luis-Delgado OE, Freund-Mercier MJ, Mensah-Nyagan AG & Schlichter R (2005). Inflammatory pain upregulates spinal inhibition via endogenous neurosteroid production. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience* **25**, 11768–11776.
- Prager EM, Brielmaier J, Bergstrom HC, McGuire J & Johnson LR (2010). Localization of mineralocorticoid receptors at mammalian synapses. *PLoS one* **5**, e14344.
- Prager EM & Johnson LR (2009). Stress at the synapse: signal transduction mechanisms of adrenal steroids at neuronal membranes. *Science signaling* **2**, re5.
- Price TJ, Cervero F & Koninck Y De (2006). NIH Public Access. **5**, 547–555.
- Rajalu M, Müller UC, Caley A, Harvey RJ & Poisbeau P (2009). Plasticity of synaptic inhibition in mouse spinal cord lamina II neurons during early postnatal development and after inactivation of the glycine receptor alpha3 subunit gene. *The European journal of neuroscience* **30**, 2284–2292.
- Rajalu M & Poisbeau P (2006). Plasticité de l'inhibition spinale et symptômes douloureux chez l'animal. *Douleurs: Evaluation - Diagnostic - Traitement* **7**, 187–193.
- Ramos A, Kangerski AL, Basso PF, Da Silva Santos JE, Assreuy J, Vendruscolo LF & Takahashi RN (2002). Evaluation of Lewis and SHR rat strains as a genetic model for the study of anxiety and pain. *Behavioural brain research* **129**, 113–123.
- Rexed B (1952). The cytoarchitectonic organization of the spinal cord in the cat. *Journal of Comparative Neurology* **96**, 414–495.
- Roh D-H, Kim H-W, Yoon S-Y, Seo H-S, Kwon Y-B, Kim K-W, Han H-J, Beitz AJ & Lee J-H (2008). Intrathecal administration of sigma-1 receptor agonists facilitates nociception: involvement of a protein kinase C-dependent pathway. *Journal of neuroscience research* **86**, 3644–3654.
- Rosecrans JA, Robinson SE, Johnson JH, Mokler DJ & Hong JS (1986). Neuroendocrine, biogenic amine and behavioral responsiveness to a repeated foot-shock-induced analgesia (FSIA) stressor in Sprague-Dawley (CD) and Fischer-344 (CDF) rats. *Brain research* **382**, 71–80.
- Rozzo A, Armellin M, Franzot J, Chiaruttini C, Nistri A & Tongiorgi E (2002). Expression and dendritic mRNA localization of GABAC receptor rho1 and rho2 subunits in developing rat brain and spinal cord. *The European journal of neuroscience* **15**, 1747–1758.
- Rupprecht R, Papadopoulos V, Rammes G, Baghai TC, Fan J, Akula N, Groyer G, Adams D & Schumacher M (2010). Translocator protein (18 kDa) (TSPO) as a therapeutic target for neurological and psychiatric disorders. *Nature reviews Drug discovery* **9**, 971–988.
- Sah P, Hestrin S & Nicoll RA (1989). Tonic activation of NMDA receptors by ambient glutamate enhances excitability of neurons. *Science* **246**, 815–818.

- Schäcke H, Döcke WD & Asadullah K (2002). Mechanisms involved in the side effects of glucocorticoids. *Pharmacology & therapeutics* **96**, 23–43.
- Schlichter R, Keller AF, 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. *Journal of Molecular Neuroscience* **28**, 33–52.
- Selye H & Masson G (1942). Additional Steroids With Luteoid Activity. *Science (New York, NY)* **96**, 358.
- Semyanov A, Walker MC, Kullmann DM & Silver RA (2004). Tonicly active GABA A receptors: modulating gain and maintaining the tone. *Trends in neurosciences* **27**, 262–269.
- Shiokawa H, Kaftan EJ, MacDermott AB & Tong C-K (2010). NR2 subunits and NMDA receptors on lamina II inhibitory and excitatory interneurons of the mouse dorsal horn. *Molecular pain* **6**, 26.
- Smith GW, Aubry JM, Dellu F, Contarino A, Bilezikjian LM, Gold LH, Chen R, Marchuk Y, Hauser C, Bentley CA, Sawchenko PE, Koob GF, Vale W & Lee KF (1998). Corticotropin releasing factor receptor 1-deficient mice display decreased anxiety, impaired stress response, and aberrant neuroendocrine development. *Neuron* **20**, 1093–1102.
- Sorkin LS, McAdoo DJ & Willis WD (1993). Raphe magnus stimulation-induced antinociception in the cat is associated with release of amino acids as well as serotonin in the lumbar dorsal horn. *Brain Research* **618**, 95–108.
- Sorkin LS & Puig S (1996). Neuronal model of tactile allodynia produced by spinal strychnine: effects of excitatory amino acid receptor antagonists and a mu-opiate receptor agonist. *Pain* **68**, 283–292.
- Sorrells SF & Sapolsky RM (2007). An inflammatory review of glucocorticoid actions in the CNS. *Brain, behavior, and immunity* **21**, 259–272.
- Stahn C, Löwenberg M, Hommes DW & Buttgerit F (2007). Molecular mechanisms of glucocorticoid action and selective glucocorticoid receptor agonists. *Molecular and cellular endocrinology* **275**, 71–78.
- Stanton ME, Wallstrom J & Levine S (1987). Maternal contact inhibits pituitary-adrenal stress responses in preweanling rats. *Developmental psychobiology* **20**, 131–145.
- Stell BM, Brickley SG, Tang CY, Farrant M & Mody I (2003). Neuroactive steroids reduce neuronal excitability by selectively enhancing tonic inhibition mediated by delta subunit-containing GABAA receptors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **100**, 14439–14444.
- Sternberg EM, Glowa JR, Smith M a, Calogero a E, Listwak SJ, Aksentijevich S, Chrousos GP, Wilder RL & Gold PW (1992). Corticotropin releasing hormone related behavioral and neuroendocrine responses to stress in Lewis and Fischer rats. *Brain research* **570**, 54–60.

- Sternberg EM, Hill JM, Chrousos GP, Kamilaris T, Listwak SJ, Gold PW & Wilder RL (1989). Inflammatory mediator-induced hypothalamic-pituitary-adrenal axis activation is defective in streptococcal cell wall arthritis-susceptible Lewis rats. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **86**, 2374–2378.
- Strömberg J, Bäckström T & Lundgren P (2005). Rapid non-genomic effect of glucocorticoid metabolites and neurosteroids on the gamma-aminobutyric acid-A receptor. *The European journal of neuroscience* **21**, 2083–2088.
- Takahashi A, Mashimo T & Uchida I (2006). GABAergic tonic inhibition of substantia gelatinosa neurons in mouse spinal cord. *NeuroReport* **17**, 1331–1335.
- Takazawa T & MacDermott AB (2010). Glycinergic and GABAergic tonic inhibition fine tune inhibitory control in regionally distinct subpopulations of dorsal horn neurons. *The Journal of physiology* **588**, 2571–2587.
- Takimoto K, Fomina AF, Gealy R, Trimmer JS & Levitan ES (1993). Dexamethasone rapidly induces Kv1.5 K<sup>+</sup> channel gene transcription and expression in clonal pituitary cells. *Neuron* **11**, 359–369.
- Thiele K, Buttgereit F, Huscher D & Zink A (2005). Current Use of Glucocorticoids in Patients With Rheumatoid Arthritis in Germany. *Arthritis & rheumatism* **53**, 740–747.
- Todd A & Sullivan A (1990). Light microscope study of the coexistence of GABA-like and glycine-like immunoreactivities in the spinal cord of the rat. *Journal of Comparative Neurology* **296**, 496–505.
- Todd AJ (1990). An electron microscope study of glycine-like immunoreactivity in laminae I-III of the spinal dorsal horn of the rat. *Neuroscience* **39**, 387–394.
- Todd AJ (1991). Immunohistochemical evidence that acetylcholine and glycine exist in different populations of GABAergic neurons in lamina III of rat spinal dorsal horn. *Neuroscience* **44**, 741–746.
- Todd AJ (2012). Neuronal circuitry for pain processing in the dorsal horn. *Nature Reviews Neuroscience* **11**, 823–836.
- Todd AJ & McKenzie J (1989). GABA-immunoreactive neurons in the dorsal horn of the rat spinal cord. *Neuroscience* **31**, 799–806.
- Todd AJ, Watt C, Spike RC, Sieghart W, Sciences L, Glasgow G & Biolabs NE (1996). Colocalization of GABA, Glycine, and their Receptors Synapses in the Rat Spinal Cord. **16**, 974–982.
- Tolle TR, Berthele A, Zieglgansberger W, Seeburg PH & Wisden W (1993). The differential expression of 16 NMDA and non-NMDA receptor subunits in the rat spinal cord and in periaqueductal gray. *Journal of Neuroscience* **13**, 5009–5028.

- Twyman RE & Macdonald RL (1992). Neurosteroid regulation of GABAA receptor single-channel kinetic properties of mouse spinal cord neurons in culture. *The Journal of physiology* **456**, 215–245.
- Uçeyler N, Biko L & Sommer C (2010). MDL-28170 has no analgesic effect on CCI induced neuropathic pain in mice. *Molecules (Basel, Switzerland)* **15**, 3038–3047.
- Urch CE & Dickenson AH (2003). In vivo single unit extracellular recordings from spinal cord neurones of rats. *Brain research Brain research protocols* **12**, 26–34.
- Vandevyver S, Dejager L, Tuckermann J & Libert C (2013). New insights into the anti-inflammatory mechanisms of glucocorticoids: an emerging role for glucocorticoid-receptor-mediated transactivation. *Endocrinology* **154**, 993–1007.
- Van der Velden VH (1998). Glucocorticoids: mechanisms of action and anti-inflammatory potential in asthma. *Mediators of inflammation* **7**, 229–237.
- Vergnano AM, Schlichter R & Poisbeau P (2007). PKC activation sets an upper limit to the functional plasticity of GABAergic transmission induced by endogenous neurosteroids. *The European journal of neuroscience* **26**, 1173–1182.
- Vicini S, Losi G & Homanics GE (2002). GABA(A) receptor delta subunit deletion prevents neurosteroid modulation of inhibitory synaptic currents in cerebellar neurons. *Neuropharmacology* **43**, 646–650.
- Vit J-P, Clauw DJ, Moallem T, Boudah A, Ohara PT & Jasmin L (2006). Analgesia and hyperalgesia from CRF receptor modulation in the central nervous system of Fischer and Lewis rats. *Pain* **121**, 241–260.
- Walker CD, Perrin M, Vale W & Rivier C (1986). Ontogeny of the stress response in the rat: role of the pituitary and the hypothalamus. *Endocrinology* **118**, 1445–1451.
- Wang Q, Verweij EWE, Krugers HJ, Joels M, Swaab DF & Lucassen PJ (2013). Distribution of the glucocorticoid receptor in the human amygdala; changes in mood disorder patients. *Brain structure & function*; DOI: 10.1007/s00429-013-0589-4.
- Wang S, Lim G, Yang L, Sung B & Mao J (2006). Downregulation of spinal glutamate transporter EAAC1 following nerve injury is regulated by central glucocorticoid receptors in rats. *Pain* **120**, 78–85.
- Webb A a, Gowribai K & Muir GD (2003). Fischer (F-344) rats have different morphology, sensorimotor and locomotor abilities compared to Lewis, Long-Evans, Sprague-Dawley and Wistar rats. *Behavioural Brain Research* **144**, 143–156.
- Wei W, Zhang N, Peng Z, Houser CR & Mody I (2003). Perisynaptic localization of delta subunit-containing GABA(A) receptors and their activation by GABA spillover in the mouse dentate gyrus. *Journal of Neuroscience* **23**, 10650–10661.
- Werkman TR, Van der Linden S & Joëls M (1997). Corticosteroid effects on sodium and calcium currents in acutely dissociated rat CA1 hippocampal neurons. *Neuroscience* **78**, 663–672.

- Widmaier EP & Dallman MF (1984). The effects of corticotropin-releasing factor on adrenocorticotropin secretion from perfused pituitaries in vitro: rapid inhibition by glucocorticoids. *Endocrinology* **115**, 2368–2374.
- Willer JC, Dehen H & Cambier J (1981). Stress-induced analgesia in humans: endogenous opioids and naloxone-reversible depression of pain reflexes. *Science (New York, NY)* **212**, 689–691.
- Woolf CJ & Salter MW (2000). Neuronal plasticity: increasing the gain in pain. *Science (New York, NY)* **288**, 1765–1769.
- Wu FS, Gibbs TT & Farb DH (1990). Inverse modulation of gamma-aminobutyric acid- and glycine-induced currents by progesterone. *Molecular pharmacology* **37**, 597–602.
- Wu FS, Gibbs TT & Farb DH (1991). Pregnenolone sulfate: a positive allosteric modulator at the N-methyl-D-aspartate receptor. *Molecular pharmacology* **40**, 333–336.
- Yaksh TL (1989). Behavioral and autonomic correlates of the tactile evoked allodynia produced by spinal glycine inhibition: effects of modulatory receptor systems and excitatory amino acid antagonists. *Pain* **37**, 111–123.
- Yamada J, Furukawa T, Ueno S, Yamamoto S & Fukuda A (2007). Molecular basis for the GABAA receptor-mediated tonic inhibition in rat somatosensory cortex. *Cerebral Cortex* **17**, 1782–1787.
- Yang K, Wang D & Li YQ (2001). Distribution and depression of the GABA(B) receptor in the spinal dorsal horn of adult rat. *Brain research bulletin* **55**, 479–485.
- Yarushkina NI, Bagaeva TR & Filaretova LP (2011). Central corticotropin-releasing factor (CRF) may attenuate somatic pain sensitivity through involvement of glucocorticoids. *Journal of physiology and pharmacology : an official journal of the Polish Physiological Society* **62**, 541–548.
- Yasaka T, Tiong SYX, Hughes DI, Riddell JS & Todd AJ (2010). Populations of inhibitory and excitatory interneurons in lamina II of the adult rat spinal dorsal horn revealed by a combined electrophysiological and anatomical approach. *Pain* **151**, 475–488.
- Yilmaz P, Diers M, Diener S, Rance M, Wessa M & Flor H (2010). Brain correlates of stress-induced analgesia. *Pain* **151**, 522–529.
- Yu L, Romero DG, Gomez-Sanchez CE & Gomez-Sanchez EP (2002). Steroidogenic enzyme gene expression in the human brain. *Molecular and cellular endocrinology* **190**, 9–17.
- Yu XH, Ribeiro-da-Silva A, Ribeiro Da Silva A & De Koninck Y (2005). Morphology and neurokinin 1 receptor expression of spinothalamic lamina I neurons in the rat spinal cord. *The Journal of comparative neurology* **491**, 56–68.



- Yuen EY, Liu W, Karatsoreos IN, Ren Y, Feng J, McEwen BS & Yan Z (2011). Mechanisms for acute stress-induced enhancement of glutamatergic transmission and working memory. *Molecular psychiatry* **16**, 156–170.
- Zeilhofer HU, Wildner H & Yévenes GE (2012). Fast synaptic inhibition in spinal sensory processing and pain control. *Physiological reviews* **92**, 193–235.
- Zeng J, Li M, Xiao Z, Chen Y, Chang Q, Tian H, Jin H & Liu X (2013). Rapid elevation of calcium concentration in cultured dorsal spinal cord astrocytes by corticosterone. *Neurochemical research* **38**, 382–388.
- Zhu WJ & Vicini S (1997). Neurosteroid prolongs GABAA channel deactivation by altering kinetics of desensitized states. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience* **17**, 4022–4031.