

THESE

**Présentée à
L'université Louis Pasteur – Strasbourg I
Laboratoire de Neurophysiologie Cellulaire et Intégrée, UMR 7519 CNRS / ULP**

Pour obtenir le grade de

**DOCTEUR DE L'UNIVERSITE LOUIS PASTEUR
Discipline : Sciences du Vivant
Spécialité : Neurosciences**

Présentée par

Mathias DE ROO

**Effets modulateurs des neurostéroïdes sur les récepteurs
ionotropiques du GABA et de l'ATP dans les neurones sensoriels
primaires de rat**

Membres du Jury :

Rapporteur interne : M. Bernard POULAIN, Directeur de recherche CNRS

Rapporteur externe : M. François RASSENDREN, chargé de recherche CNRS

Rapporteur externe : M. Radhouane DALLEL, Professeur, praticien hospitalier INSERM

Directeur de thèse : M. Rémy Schlichter, Professeur ULP/IUF

REMERCIEMENTS

J'aimerais tout d'abord exprimer ma grande reconnaissance au Professeur Rémy Schlichter pour son encadrement exemplaire et ses grandes qualités humaines et scientifiques. Je me sens très privilégié d'avoir pu effectuer ma thèse sous sa direction.

Je remercie également Monsieur le Professeur Radhouane Dallel, Monsieur le Docteur François Rassendren et Monsieur le Docteur Bernard Poulain d'avoir accepté d'être les membres du jury de cette étude. J'aimerais avoir réussi à leur rendre agréable la lecture de cette thèse.

Je tiens ensuite à remercier Francine Herzog, Catherine Moreau et Madeleine Roth pour leur aide technique irréprochable, leur gentillesse et leur grande disponibilité.

Je remercie également les membres de l'UMR 7519 que j'ai eu le plaisir de connaître pendant ma thèse. Madame le professeur Marie-José Freund-Mercier, pour m'avoir accueilli au sein de l'unité, Jérôme Trouslard, Pierrick Poisbeau, et Jean-luc Rodeau pour tous leurs conseils. Chaque membre de notre équipe s'est montré en permanence disponible pour répondre à mes questions, ce que j'ai beaucoup apprécié.

Au cours de ma thèse, j'ai assisté à l'arrivée du Professeur Guy Mensah-Nyagan et à l'émergence de son équipe. Je tiens à le remercier tout particulièrement pour ses nombreux encouragements et pour les discussions scientifiques que nous avons pu avoir sur un sujet que nous avons en commun : les neurostéroïdes. Je remercie également les membres de son équipe pour leur efficacité dans leur travail sur les enzymes de biosynthèse des neurostéroïdes.

Enfin, je remercie chaleureusement les thésards avec lesquels j'ai eu la joie de partager l'apprentissage du métier de chercheur. Jean-didier Breton, Riad Seddik, Laurianne Ulmann, Maysa Sarhan, Cherka Kibaly, Sarah Potez, Sandra Uhl et Sylvain Hugel. Merci pour votre amitié.

Ce travail est dédié à,

Ma famille,
Mes amis,
Mon épouse.

Résumé

Les neurones du ganglion rachidien véhiculant les informations nociceptives effectuent leur premier relais synaptique dans la corne dorsale de la moelle épinière. Ces synapses sensori-spinales sont excitatrices et utilisent comme neurotransmetteur rapide le glutamate. Présynaptiquement, cette transmission glutamatergique peut être respectivement inhibée ou facilitée par l'activation de récepteurs ionotropiques du GABA (GABA_A), ou de l'ATP (P2X).

Par ailleurs, les neurones du ganglion rachidien, les neurones de la corne dorsale de la moelle épinière et les cellules gliales environnantes possèdent l'équipement enzymatique leur permettant de synthétiser des neurostéroïdes. Certains de ces neurostéroïdes ont été décrits dans d'autres modèles comme des modulateurs allostériques des récepteurs GABA_A.

L'objectif de notre travail était de déterminer si les neurostéroïdes peuvent moduler les récepteurs GABA_A et P2X exprimés par les neurones sensoriels primaires.

Nos résultats démontrent que la DHEA et le sulfate de prégénolone inhibent l'activité des récepteurs GABA_A tandis que l'allopregnanolone potentialise l'activité de ces récepteurs. Ces deux derniers neurostéroïdes ne semblent pas moduler les récepteurs P2X. En revanche, la DHEA peut soit être sans effet, soit potentialiser, soit inhiber l'activité des récepteurs P2X selon les neurones testés. Des arguments pharmacologiques nous ont permis de montrer que la composition en sous-unités des récepteurs P2X détermine le sens de la modulation qu'exerce la DHEA. Les récepteurs P2X₃ homomériques semblent être inhibés par la DHEA (mais pas systématiquement), tandis que les récepteurs P2X incluant la sous-unité P2X₂ sont potentialisés par la DHEA. Nos résultats suggèrent également que la potentialisation des réponses P2X par la DHEA est très fortement augmentée en conditions de pH extracellulaire acide dans une fraction des neurones.

D'autre part, nous avons montré que la progestérone potentialise sélectivement l'activité des récepteurs P2X₂ homomériques. Nous avons également observé une potentialisation des réponses P2X par la DHEA et la progestérone dans des cellules HEK transfectées exprimant de façon stable la sous-unité P2X₂. Or, de façon intéressante, les différents sous-types de récepteurs P2X semblent être exprimés dans des catégories différentes de neurones sensoriels primaires.

Ainsi, notre travail de thèse a permis de mettre en évidence pour la première fois une modulation des récepteurs P2X par des neurostéroïdes. Nos résultats nous permettent de supposer l'existence d'une modulation différente du message nociceptif par des récepteurs GABA_A et P2X, selon le type de neurostéroïde synthétisé localement et le type de récepteur P2X exprimé sur les terminaisons intraspinales des nocicepteurs. Cette modulation par les neurostéroïdes pourrait être accentuée lors d'une acidification du milieu extracellulaire observée dans des conditions inflammatoires, étant donné que le pH acide potentialise également les récepteurs P2X incluant la sous-unité P2X₂.

Nos résultats suggèrent également que la DHEA et la progestérone pourraient s'avérer être de nouveaux outils pharmacologiques très utiles pour identifier dans les cellules natives la présence de récepteurs hétéromériques et homomériques exprimant la sous-unité P2X₂.

Enfin, il est connu que les récepteurs GABA_A et P2X jouent un rôle important dans la modulation du message nociceptif dans la corne dorsale de la moelle épinière. Par conséquent, les neurostéroïdes tels que la DHEA ou la progestérone, ou la manipulation de leur biosynthèse dans la moelle épinière pourraient constituer des cibles intéressantes dans le traitement de la douleur.

Table des matières

Résumé	1
Table des matières	2
Introduction	7
I. La nociception - définitions	7
II. Les neurones sensoriels primaires et la nociception.	9
A. Caractéristiques générales des neurones sensoriels primaires	9
B. Initiation d'un message nociceptif en périphérie	16
C. Transmission du message nociceptif vers le système nerveux central	23
III. L'ATP extracellulaire et la nociception.	26
1) Structure des sous-unités P2X	29
2) localisation des récepteurs P2X	32
3) Propriétés fonctionnelles des récepteurs P2X recombinants	35
4) Rôles des récepteurs P2X dans la nociception	49
B. Les récepteurs P2Y	62
1) Voies de transduction des récepteurs P2Y	63
2) Localisation des récepteurs P2Y	64
3) Rôles des récepteurs P2Y dans la nociception	65
C. Les récepteurs de l'adénosine	66
2) Localisation des récepteurs P1	67
3) Rôles des récepteurs P1 dans la nociception	70
IV. Les neurostéroïdes.	73
A. Définitions	73
B. Biosynthèse des neurostéroïdes	75
C. Modes d'action des neurostéroïdes	77
D. Localisation des enzymes de biosynthèse de neurostéroïdes	79
E. Les stéroïdes/neurostéroïdes et la nociception	80
Matériels et méthodes	84
1. Mise en culture des neurones sensoriels des ganglions rachidiens de rat.	84
<i>a) Boîtes et milieu de culture</i>	<i>84</i>
<i>b) Prélèvement des ganglions</i>	<i>84</i>
<i>c) Dissociation enzymatique</i>	<i>85</i>
<i>d) Dissociation mécanique</i>	<i>85</i>
2. Mise en culture et entretien des lignées HEK-293.	85
<i>a) Décongélation des cellules</i>	<i>86</i>
<i>b) repiquage des cellules</i>	<i>86</i>
<i>c) Sélection des HEK-293 possédant le plasmide contenant l'ADNc de la sous-unité P2X2 pour les enregistrements électrophysiologiques</i>	<i>87</i>
<i>d) Congélation des cellules</i>	<i>87</i>
<i>a) Principe</i>	<i>88</i>
<i>b) Etablissement de la configuration "patch-perforé"</i>	<i>89</i>
4. Solutions.	90

a) <i>Solution extracellulaire</i>	90
b) <i>Solutions intracellulaires</i>	90
5. Substances pharmacologiques.	91
a) <i>Substances utilisées</i>	91
b) <i>Préparation des solutions stock des substances à appliquer</i>	92
6. Matériels.	92
a) <i>Electrodes</i>	92
b) <i>Dispositif expérimental</i>	92
7. Quantification des effets des neurostéroïdes sur les réponses GABAA et P2X.	93
8. tests statistiques.	96
a) <i>Statistiques descriptives</i>	96
b) <i>Tests paramétriques</i>	96
c) <i>Tests non paramétriques</i>	96
Résultats	97
I. Caractérisation des réponses ionotropiques au GABA et à l'ATP dans les neurones sensoriels du ganglion rachidien.	97
A. Identification des neurones des ganglions rachidiens.	97
B. Relation diamètre – capacité membranaire.	98
D. Caractéristiques de la réponse GABAA .	102
1) <i>Choix de l'agoniste et de sa concentration.</i>	102
2) <i>Effets de l'agoniste.</i>	102
3) <i>Effet d'un antagoniste du récepteur GABAA.</i>	102
4) <i>Relation courant-potentiel des réponses GABAA.</i>	104
E. Description des réponses membranaires à l'ATP.	106
1) <i>Choix de l'agoniste et de sa concentration.</i>	106
2) <i>Effet de l'ATP.</i>	106
3) <i>Effets des antagonistes des récepteurs P2X sur les réponses à l'ATP.</i>	109
4) <i>Relation courant-potentiel des réponses à l'ATP.</i>	111
5) <i>Relation « type de courant P2X » — Diamètre des neurones.</i>	113
6) <i>Relation « type du courant P2X » - Sensibilité à la capsïcine.</i>	114
II. Modulation différentielle des réponses GABAA et P2X par les neurostéroïdes.	115
A. <i>Effets du sulfate de prégénolone.</i>	116
B. <i>Effets de l'allopregnanolone.</i>	118
C. <i>Effets de la DHEA.</i>	120
III. Modulation sélective et différentielle par la DHEA des récepteurs P2X en fonction de leur composition en sous-unités	125
A. Effets de la DHEA sur le pic des réponses P2X.	124
1) <i>Description de l'effet.</i>	124
2) <i>Sélectivité de l'effet.</i>	124
B. Effets de la DHEA sur le plateau des réponses P2X.	125
1) <i>Description de l'effet.</i>	125
2) <i>Dose-dépendance de l'effet.</i>	129
3) <i>Sélectivité de l'effet.</i>	131
4) <i>Mécanisme d'action de l'effet facilitateur de la DHEA sur les réponses P2X.</i>	147
C. Interaction entre l'effet de la DHEA et l'effet du pH extracellulaire acide sur le plateau des réponses P2X.	150

IV. Modulation sélective par la progestérone des récepteurs homomériques P2X2.	153
A. Modulation des réponses P2X par la progestérone dans les neurones sensoriels primaires.	153
1) Description de l'effet.	153
2) Sélectivité de l'effet.	153
3) Persistance de l'effet facilitateur de la progestérone sur les réponses P2X en conditions « cellule-entière » et lors du blocage des protéines Gi/o.	157
B. Potentialisation par la progestérone de l'activité les récepteurs homomériques P2X2 recombinants exprimés dans une lignée de cellules HEK-293.	158
Discussion	161
1. Types de neurones sensoriels enregistrés.	162
2. Caractéristiques des réponses P2X.	162
3. Hypothèse spéculative sur la composition en sous-unités des récepteurs P2X natifs exprimés par les neurones de DRG.	164
4. Mécanisme d'action des neurostéroïdes sur les récepteurs P2X.	166
4.1. <i>Effet inhibiteur de la DHEA sur le pic des réponses P2X :</i>	<i>166</i>
4.2. <i>Effet potentialisateur de la DHEA et de la progestérone sur le plateau des réponses P2X :</i>	<i>167</i>
5. Sources possibles de DHEA et de progestérone.	171
5.1. <i>Sources endocrines :</i>	<i>172</i>
5.2. <i>Sources nerveuses :</i>	<i>173</i>
6. Rôle éventuel de la DHEA et de la progestérone dans les mécanismes de la nociception.	173
6.1. <i>Détection du message sensoriel :</i>	<i>174</i>
6.2. <i>Corps cellulaire des DRG :</i>	<i>176</i>
6.3. <i>Transmission du message sensoriel :</i>	<i>177</i>
Conclusions & Perspectives :	180
Références bibliographiques :	184

Table des illustrations et tableaux

<u>Figure I- 1 : Organisation anatomique et fonctionnelle de la sensibilité tactile.</u>	10
<u>Tableau I- 1 : Différents types de neurones sensoriels primaires.</u>	11
<u>Figure I- 2 : L'activation de différents types de fibres sensorielles primaires correspond à différentes phases de douleur.</u>	12
<u>Figure I- 3 : Différents types de récepteurs exprimés par les nocicepteurs.</u>	17
<u>Figure I- 4 : Les canaux TRP thermosensibles.</u>	20
<u>Figure I- 5 : Mise en place de l'inflammation neurogène suite à une lésion tissulaire.</u>	22
<u>Figure I- 6 : Schéma de l'organisation qualitative des entrées des afférences primaires cutanées dans la corne dorsale de la moelle épinière.</u>	24
<u>Figure I- 7 : Voies intracellulaires et extracellulaires pour la formation et le métabolisme de l'ATP, de l'AMP, et de l'adénosine.</u>	27
<u>Tableau I- 2 : co-assemblage des sous-unités P2X déterminé par co-immunoprécipitation.</u>	29
<u>Figure I- 8 : Représentation schématique d'une sous-unité P2X et de ses sites de glycosylation, de phosphorylation, et de formation possible de ponts dissulfure.</u>	31
<u>Tableau I- 3 : Principale distribution des sous-unités P2X, détectées par hybridation <i>in situ</i> et par immunocytochimie.</u>	32
<u>Figure I- 9 : Enregistrement de <i>patch-clamp</i> en configuration « cellule-entière » des réponses membranaires à l'ATP dans des cellules HEK exprimant les différents récepteurs homomériques P2X fonctionnels de rat.</u>	37
<u>Tableau I- 4 : Tableau récapitulatif des propriétés cinétiques et pharmacologiques des récepteurs P2X recombinants.</u>	39
<u>Tableau I- 5 : Distribution des ARN messagers et de l'immunoréactivité des sous-unités P2X dans les neurones sensoriels de rat.</u>	51
<u>Figure I- 10 : Réponses membranaires de neurones sensoriels de rat néonataux à l'ATP et à α,β-méthylène-ATP.</u>	52
<u>Tableau I- 6 : Rôles suggérés des récepteurs P2X dans différents types de douleurs.</u>	63
<u>Tableau I- 7 : Voies de signalisation intracellulaires et agonistes naturels des récepteurs P2Y.</u>	63
<u>Tableau I- 8 : Distribution tissulaire des ARNm des récepteurs P2Y chez l'humain et le rat.</u>	64
<u>Tableau I- 9 : Couplage et seconds messagers impliqués dans les voies de transduction des récepteurs de l'adénosine.</u>	67
<u>Tableau I- 10 : Distribution des ARNm des récepteurs de l'adénosine.</u>	69
<u>Tableau I- 11 : Résumé des rôles pro- et anti-nociceptifs des récepteurs de l'adénosine dans la moelle épinière.</u>	71
<u>Tableau I- 12 : Résumé des effets des récepteurs de l'adénosine en périphéries concernant la nociception et l'inflammation.</u>	72
<u>Figure I-11: Effets non génomiques et génomiques des principaux composés stéroïdes.</u>	74
<u>Figure I- 12 : voies de biosynthèse des neurostéroïdes.</u>	76
<u>Figure I- 13 : Les récepteurs GABA_A et leur modulation allostérique par les neurostéroïdes.</u>	78
<u>Figure M- 1 : Représentation schématique du protocole d'application de l'isoguvacine, de l'ATP, et des neurostéroïdes.</u>	94
<u>Tableau R- 1 : Statistiques descriptives des courants membranaires en réponse à l'ATP.</u>	107
<u>Tableau R- 2 : Diamètre moyen du corps cellulaire des neurones en fonction du type de la réponse membranaire à l'ATP (1 μM).</u>	113
<u>Tableau R- 3 : Pourcentage de neurones sensibles à la capsaïcine (1 μM) en fonction du type de la réponse membranaire à l'ATP (1 μM).</u>	114
<u>Tableau R- 4 : Effets de la DHEA (10 μM) sur les réponses à l'ATP (1 μM et 0,5 μM).</u>	126
<u>Tableau R- 5 : Caractéristiques des courants membranaires en réponse à l'$\alpha\beta$meATP (1 μM).</u>	131
<u>Tableau R- 6 : Caractéristiques des courants membranaires induits par l'$\alpha\beta$meATP (5 μM).</u>	133
<u>Tableau R- 7 : Pourcentage de potentialisation par la DHEA du plateau des réponses à l'ATP et à l'$\alpha\beta$meATP.</u>	136

Table des abréviations

2-meS ATP : 2-méthylthioadénosine 5'-triphosphate
 $\alpha\beta$ me ATP : α,β -méthylène-adénosine 5'-triphosphate
 $\beta\gamma$ me ATP : β,γ -méthylène-adénosine 5'-triphosphate
AC : adénylate cyclase
ADP : adénosine 5'-diphosphate
ADNc : acide désoxyribonucléique complémentaire
AMP : adénosine 5'-monophosphate
ARNm : acide ribonucléique messenger
ASIC : *acid sensing ion channel*
ATP : adénosine 5'-triphosphate
ATP γ S : adénosine 5'-O-(3-thiotriphosphate)
BNC : *Brain sodium channel*
BzATP : 3'-benzoylbenzoyl adénosine 5'-triphosphate
GABA: acide γ aminobutyrique
CGRP : *calcitonin gene related peptide*
DEG/ENaC : *degenerin/epithelial Na channel*
DMSO : diméthyl sulfoxyde
DRG : *dorsal root ganglion* (ganglion rachidien)
HEK-293 : *human embryonic kidney 293*
HP : potentiel de maintien
IP $_5$ I : diinosine pentaphosphate
IVM : ivermectine
LTM : *low threshold mecanoreceptors*
MDEG : *mammalian degenerin*
NADA : N-arachidonoyldopamine
NF023 : 3'-urée symétrique de l'acide 8-(benzamido)naphtalène-1,3,5-trisulfonique
NGF : *nerve growth factor*
NMDA : N-méthyl-D-aspartate
HEPES : acide N-2-hydroxyéthylpiperazine-n'-2-éthanesulfonique
OLDA : N-oleoyldopamine
PCR : *polymerase chain reaction*
PPADS : acide pyridoxal phosphate-6-azophényl-2',4'-disulphonique
PPNDS : acide pyridoxal-5'-phosphate-6-(2'-naphthylazo-6'-nitro-4',8'-disulfonique
TNP-ATP : 2',3'-O-trinitrophényl-adénosine triphosphate
TRP : *transient receptor potential*
VR : vanilloid receptor

Introduction

I. La nociception - définitions

Le mot « **nociception** » vient du latin *nocere* qui signifie « nuire », et la nociception peut être définie comme la détection par l'organisme d'un stimulus susceptible de porter atteinte à son intégrité. Ce stimulus peut être externe (coupure, brûlure, pression intense,...) ou interne (distension exagérée d'un viscère, ischémie, problème articulaire). Les **nocicepteurs** sont des neurones sensoriels primaires activables par ces stimulus. Leurs terminaisons périphériques sont libres et possèdent des récepteurs spécialisés permettant de détecter les différentes modalités sensorielles nociceptives (thermique, mécanique, ou chimique) (voir Chapitre II).

Lorsque le message nociceptif est traité par le système cortical et/ou limbique, il peut conduire à la sensation de **douleur** qui sera perçue de manière consciente. Cette sensation douloureuse se décline généralement en une **phase aiguë**, et une **phase prolongée**.

La phase de douleur aiguë s'accompagne d'un réflexe de retrait si le stimulus est d'origine externe, ou d'une réaction de repli si le stimulus est d'origine interne. Lorsque le stimulus nociceptif est externe, la douleur aiguë qu'il provoque permet à l'individu de localiser précisément la zone stimulée, d'associer le stimulus nociceptif à la sensation désagréable de douleur, et de s'en éloigner. Elle s'accompagne dans certaines conditions d'une réponse endocrine (sécrétion de corticostérone) et d'une activation du système sympathique, induisant une augmentation de la pression artérielle et du débit cardiaque. Toutes ces composantes autonomes favorisent un éveil comportemental généralisé, parfois accompagné d'une **analgésie** transitoire (réduction de la sensation de douleur associée à un stimulus nociceptif) permettant à l'organisme de fuir une situation dangereuse (Millan, 1986; Wiertelak *et al.*, 1994; Traub, 1997). On parle alors « d'analgésie induite par le stress ».

La phase de douleur prolongée qui s'ensuit va durer tout le temps de la réparation du tissu ou de l'organe lésé. Elle s'accompagne d'une **inflammation**, qui a pour effet d'augmenter les défenses immunitaires de l'organisme aux alentours du tissu lésé, et qui favorise sa réparation, tout en maintenant et en intensifiant l'activité du système nociceptif. Cette phase

de douleur prolongée est également maintenue par le biais de l'activation antidromique des fibres nociceptives, qui vont-elles-mêmes libérer des médiateurs de l'inflammation sur le site du stimulus. Le maintien de la sensation douloureuse au niveau de la lésion permet à l'individu d'éviter l'exposition du tissu endommagé à d'autres stimulus. À cette fin, la phase de douleur prolongée s'accompagne d'une **hyperalgésie**, et d'une **allodynie**. L'hyperalgésie se caractérise par l'augmentation de la sensation douloureuse induite par un stimulus nociceptif. On parle d'**hyperalgésie primaire** lorsqu'elle concerne le lieu de la lésion, et d'**hyperalgésie secondaire** lorsqu'elle s'étend autour de la zone lésée (ces deux types d'hyperalgésies sont assurés par des mécanismes différents). L'**allodynie** est une douleur provoquée par un stimulus normalement non nociceptif. Lorsque la cause de la douleur correspond au dysfonctionnement d'un organe interne (principalement les muscles ou le tractus intestinal et la vessie ; le foie et les poumons étant exempts de nocicepteurs), la composante autonome qui l'accompagne (hypothermie, bradycardie) induit tout d'abord le repli sur soi de l'individu, (accompagné d'une contraction de la ceinture abdominale), puis son maintien dans un état de repos pendant le temps de la récupération.

La douleur peut aussi être ressentie lors d'une pathologie qui touche les fibres sensorielles, on parle alors de **douleur neuropathique**.

Lorsque la douleur accompagne les syndromes d'une maladie chronique (arthrite, dégénérescence d'un tissu) ou d'un cancer, l'excitation prolongée des fibres nociceptives peut avoir des conséquences délétères sur l'organisme. Le stress continu engendré par la persistance d'une sensation de douleur pendant plusieurs semaines entraîne un état dépressif. Dans ce cas, la douleur n'exerce plus de rôle protecteur ou homéostatique sur l'organisme, au contraire elle devient néfaste et elle est qualifiée de **douleur pathologique**.

II. Les neurones sensoriels primaires et la nociception.

A. Caractéristiques générales des neurones sensoriels primaires

Les neurones sensoriels primaires, dont les corps cellulaires se trouvent dans les ganglions rachidiens (pour les informations concernant le tronc et les membres) et dans les ganglions sensoriels crâniens (pour les informations concernant la tête), ont pour fonction de détecter, de transduire et de transmettre l'information sensorielle depuis la périphérie et les viscères (peau, muscles, articulations, organes internes) vers le système nerveux central.

L'existence de nocicepteurs, c'est-à-dire de neurones sensoriels primaires pouvant être activés lors d'une détérioration tissulaire ou par un stimulus susceptible d'être préjudiciable à l'organisme, a été proposée par Sherrington au début du siècle dernier (Sherrington, 1906). Des études électrophysiologiques ont depuis permis d'établir que certains neurones sensoriels primaires étaient effectivement excités par des températures dommageables pour les tissus, par des pressions intenses ou des composés chimiques irritants, sans être excités par des stimulus sensoriels non dommageables (Burgess & Perl, 1967). D'autres neurones sensoriels primaires ne détectent que des stimulus externes non nociceptifs d'origine thermique (thermorécepteurs) ou mécanique (mécanorécepteurs à bas seuil ou LTM pour *low threshold mechanoreceptors*). Ces neurones, ainsi que ceux qui innervent les muscles squelettiques, présentent des terminaisons périphériques spécialisées (concernant la peau : disques de Merkel, corpuscules de Meissner, corpuscules de Paccini, corpuscules de Ruffini,... Et concernant les muscles squelettiques : fuseaux neuro-musculaires). Les fibres nociceptives en revanche, possèdent des terminaisons périphériques dites « libres » (figure I-1). Les neurones sensoriels primaires peuvent donc se distinguer par les différentes modalités sensorielles qu'ils véhiculent, et ils peuvent être identifiés par différents critères : la vitesse de conduction des potentiels d'action ainsi que le diamètre et le degré de myélinisation de leur axone, l'expression de certains récepteurs ou leur contenu en neuropeptides (bien que ces deux derniers critères varient lors de conditions inflammatoires) sont étroitement associés au type de stimulus qu'ils détectent (cf. tableau p. 12, qui ne tient compte que des afférences cutanées).

A. Peau

B. Moelle épinière et ganglion rachidien

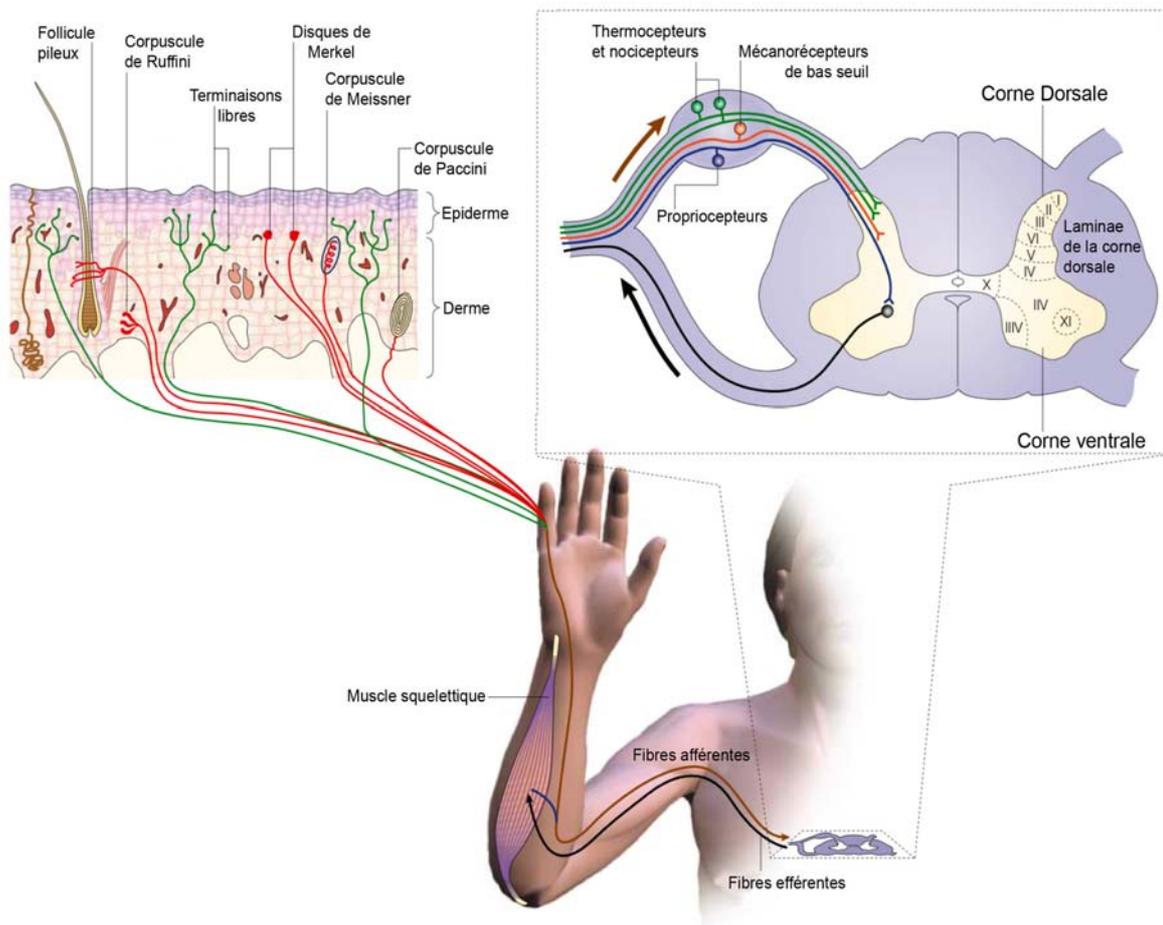


Figure I- 1 : Organisation anatomique et fonctionnelle de la sensibilité tactile.
 (Modifié d'après Patapoutian et al., 2003).

Type de neurone	Fonction	Vitesse de conduction	Degré de myélinisation de l'axone	Taille du corps cellulaire (chez l'adulte)
A β	Mécanorécepteur bas seuil (LTM)/ Nocicepteur	Elevée (36-72 m/s)	Elevé	> 50 μm
A δ	Thermocepteur, Nocicepteur/ LTM	Moyenne (4-36 m/s)	Moyen	25-50 μm
C	Nocicepteur/ LTM	Faible (0,4-2 m/s)	Non myélinisé	< 25 μm

Tableau I- 1 : Différents types de neurones sensoriels primaires.
(Modifié d'après Kandel et al., *Principles of Neural Science*, 4th edition, 2000, MacGraw-Hill eds. ; Lawson, 2002).

Les fibres nociceptives proviennent principalement de neurones sensoriels primaires ayant des corps cellulaires de moyen et faible diamètre : compris entre 25 et 50 μm pour les fibres A δ , faiblement myélinisées, et inférieur à 25 μm pour les fibres C non myélinisées.

☞ Dans notre étude, nous avons systématiquement mesuré le diamètre des neurones que nous avons enregistré, et nous avons généralement sélectionné les neurones ayant des corps cellulaires d'un diamètre inférieur à 50 μm afin d'enregistrer essentiellement des neurones de type A δ ou C.

Lors d'une blessure superficielle (cutanée, et éventuellement musculaire), on peut ressentir deux types de douleur espacés dans le temps (figure I-2): la première sensation ressentie est une douleur aiguë et l'on peut précisément localiser son origine. Elle est attribuée aux fibres A δ car leur vitesse de conduction est rapide. Quelques instants plus tard, une seconde douleur, diffuse et plus sourde, est ressentie. Ce type de douleur est transmis par les fibres C, dont la vitesse de conduction n'excède pas 2 m.s⁻¹ chez l'humain (Torebjork & Hallin, 1973; Handwerker & Kobal, 1993). Ces deux types de réponse permettent à

l'organisme de mettre en jeu des mécanismes visant à rétablir son homéostasie après une stimulation nociceptive. Le rôle des fibres A δ serait donc de permettre le retrait rapide de la zone stimulée par rapport au stimulus nociceptif, tandis que celui des fibres C serait d'induire des changements neuro-végétatifs (autonomes), par exemple cardio-vasculaires et respiratoires (Clark *et al.*, 1935)

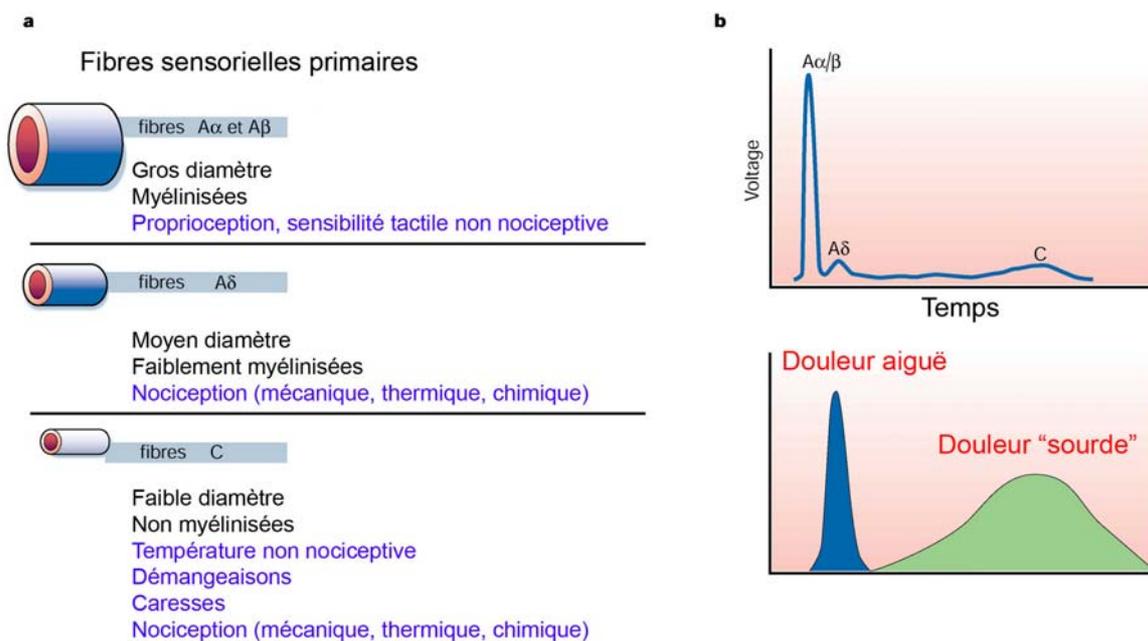


Figure I- 2 : L'activation de différents types de fibres sensorielles primaires correspond à différentes phases de douleur.

a. Les neurones sensoriels primaires incluent les fibres myélinisées de gros et moyen diamètre (respectivement A α/β et A δ), et non myélinisées, de faible diamètre (type C).

b. En haut : enregistrement des potentiels extracellulaires d'un nerf périphérique et type de fibre sensorielle primaire correspondant (établi selon les vitesses de conduction des différentes fibres). En bas, type de douleur ressentie à la même échelle de temps.

(Modifié d'après Julius & Basbaum, 2001).

- Neurones de type A :

Les neurones ayant des fibres de type A δ , A β ou A α (ces dernières innervant les muscles) se caractérisent cytologiquement par un soma clair, riche en neurofilaments, et de diamètre important (25-50 μ m). (Lawson, 1979; Lawson *et al.*, 1984; Lawson & Waddell, 1991). Concernant les fibres innervant la peau, la majorité des fibres A β -mais pas toutes- (Djoughri *et al.*, 1998; Lawson *et al.*, 2002) détectent des stimulus non nociceptifs de nature mécanique sur des tissus non lésés. Elles sont fortement myélinisées et innervent la peau et les articulations. Leur corps cellulaire est de gros diamètre (> 50 μ m chez le rat adulte). Les fibres A β représentent 20 % des afférences cutanées (Millan, 1999). Elles peuvent jouer un rôle dans les mécanismes de la nociception puisque leur activation permet d'atténuer une sensation de douleur transmise par des fibres nociceptives innervant les mêmes territoires cutanés par un mécanisme d'inhibition qui a lieu en partie dans la corne dorsale de la moelle épinière (Basbaum & Woolf, 1999). Elles jouent également un rôle dans l'allodynie mécanique (Millan, 1999).

Les fibres nociceptives A δ répondent toutes aux stimulus mécaniques suffisamment intenses pour léser les tissus. On peut distinguer deux types de nocicepteurs A δ selon leur réponse à la chaleur : les fibres A δ de type I répondent à des stimulus mécaniques intenses capables d'endommager les tissus. Elles répondent aussi (mais plus faiblement) au froid et à la chaleur à partir d'environ de 52 °C et sont insensibles à la capsaïcine (Handwerker & Kobal, 1993; Simone & Kajander, 1997; Kirschstein *et al.*, 1999; Nagy & Rang, 1999). Lors d'une stimulation répétée ou d'une lésion tissulaire, ces fibres peuvent être sensibilisées notamment à la chaleur. Les fibres A δ de type II ont été principalement observées dans la peau poilue des primates. Elles sont moins nombreuses que les fibres A δ de type I, et leur vitesse de conduction est plus faible. Elles sont activées par la chaleur à partir de 45 °C, ainsi que par la capsaïcine (Treede *et al.*, 1990; Raja, 1999). Un autre type de fibres A δ répondant au froid nociceptif et codant son intensité a aussi été décrit (Simone & Kajander, 1997).

L'un des enjeux de la recherche actuelle dans le domaine de la nociception est de relier les différences neurochimiques des nocicepteurs (synthèse de substance P, de *calcitonin gene related peptide* (CGRP), expression des récepteurs TRP sensibles à la température ou récepteur P2X d'un sous-type spécifique...) à leurs rôles fonctionnels (détection de modalités spécifiques, sensibilisation, exagération ou maintien de la douleur). Il est bien établi par

exemple, que la substance P (SP) et le CGRP (qui ont des fonctions nociceptives) sont exprimés en plus grande quantité dans les neurones nociceptifs. La SP est détectée seulement dans les neurones nociceptifs, alors que le CGRP est également détecté (mais en faible quantité) dans les mécanorécepteurs à bas seuil de type A α et A β (Lawson *et al.*, 1997; Lawson *et al.*, 2002). Dans les neurones nociceptifs, ces deux peptides sont détectés en plus grande proportion dans les neurones C, puis A δ , puis A α /A β . (Lawson, 2002). Cependant, la corrélation entre caractéristiques histochimiques et fonction est rendue très complexe par le fait que les propriétés histochimiques des nocicepteurs varient selon le type de tissus innervés (De Groat, 1986; McMahon *et al.*, 1994; Lawson *et al.*, 1997) et sont considérablement modifiées lors d'une altération des tissus, dans le cas d'une inflammation ou d'une neuropathie (Hökfelt *et al.*, 1994; Woolf & Salter, 2000).

- Neurones de type C :

Les fibres C sont les plus nombreuses parmi les afférences cutanées : elles représentent 70 % des neurones sensoriels primaires (Millan, 1999). La plupart des fibres C sont des nocicepteurs polymodaux : elles sont activées par des stimulus nocifs thermiques, mécaniques et chimiques (Raja, 1999). D'autres sont activées seulement par la chaleur, à des températures proches de celles capables de détériorer les tissus (c'est-à-dire au delà de 42 °C), ces fibres étant surtout présentes chez les primates (Schmidt *et al.*, 1995). La majorité des fibres C est dépolarisée/excitée par une acidification extracellulaire et par la capsaïcine, qui est le principe actif du piment (voir § B).

☞ Nous avons testé les effets de la capsaïcine dans la plupart des neurones que nous avons enregistrés, afin de mettre éventuellement en relation la présence des récepteurs de la capsaïcine et le caractère modulable des réponses membranaires au GABA et à l'ATP par les neurostéroïdes.

En termes cytologiques, les neurones ayant des fibres de type C se caractérisent par un soma sombre, de faible diamètre et pauvre en neurofilaments (Lawson, 1979; Lawson *et al.*, 1984; Lawson & Waddell, 1991). Des études histochimiques réalisées sur des neurones du ganglion rachidien adultes ont permis de différencier deux grandes classes de fibres C sensibles à la capsaïcine (Molliver *et al.*, 1997; Snider & McMahon, 1998).

- Une population dite « peptidergique » synthétise le neurotransmetteur substance P (SP), le CGRP, et exprime TrkA, le récepteur tyrosine kinase de haute affinité pour le *nerve growth factor* (NGF) dont ils dépendent lors du développement. Cette population est également sensible à la capsaïcine.
- La seconde classe (dite « non peptidergique ») n'exprime ni la substance P, ni TrkA, mais peut être marquée sélectivement par l' α -D-galactosyl-binding lectin IB₄ et exprime la sous-unité P2X₃ du récepteur ionotrope de l'ATP. Elle est dépendante du *glial derived neurotrophic growth factor* (GDNF).

Chacune de ces sous-populations semble avoir un rôle distinct dans la nociception, et peut elle-même être divisée en d'autres sous-classes sur des critères neurochimiques/pharmacologiques (Dirajlal *et al.*, 2003). Cependant, cette classification est loin d'être absolue (Molliver *et al.*, 1997; Petruska *et al.*, 2000a; Petruska *et al.*, 2000b).

Il est important de noter que toutes les fibres C innervant des territoires cutanés ne sont pas des nocicepteurs : certaines fibres C sont des mécanorécepteurs à bas seuil, détectant des stimulus glissant doucement sur la peau, (Bessou *et al.*, 1971). Leur activation produit chez l'humain une sensation agréable et les images obtenues par résonance magnétique fonctionnelle (IRMf) suite à la stimulation de ces fibres indiquent une activation de l'insula uniquement (et pas des aires somato-sensorielles S1 et S2, comme observé avec les autres types de fibres sensorielles). Ces fibres appelées CT (fibres C tactiles) reliées au système limbique pourraient sous-tendre les réponses hormonales et émotionnelles aux caresses (Olausson *et al.*, 2002).

D'autre part, des expériences réalisées chez l'humain ont permis de découvrir une catégorie de fibres C très fines insensibles à la chaleur et aux stimulus mécaniques, mais sensibles à l'histamine (une molécule du système immunitaire intervenant dans l'inflammation et l'allergie). Ces fibres, dont les ramifications sont très développées, seraient spécifiques de la médiation des démangeaisons (Schmelz *et al.*, 1997). D'après des expériences réalisées chez le chat, cette catégorie de neurones serait connectée à une classe spécifique de neurones de second ordre dans la lamina I de la corne dorsale de la moelle épinière (Andrew & Craig, 2001). La démangeaison impliquerait donc une voie neuronale spécifique chez certaines espèces (Schmelz, 2001).

Certaines fibres C nociceptives cutanées ne peuvent pas être activées par des stimulus externes à l'organisme sans avoir été au préalable sensibilisées par des médiateurs libérés lors d'une lésion tissulaire. C'est pour cette raison que ces nocicepteurs sont qualifiés de « silencieux » ou « dormants » (Lynn, 1991), Cette classe de nocicepteurs a aussi été identifiée chez l'humain (Schmidt *et al.*, 1995). Par exemple, les fibres C nociceptives « dormantes » innervant les viscères ne sont activées par des distensions mécaniques non dommageables que lors d'une stimulation inflammatoire (Cervero, 1995). Ces fibres nociceptives dormantes représenteraient chez l'humain 10 à 20 % des fibres C innervant la peau, les articulations et les viscères (Cervero *et al.*, 1994). Leur recrutement lors d'une inflammation ou de différents états pathologiques pourrait contribuer à la sommation spatiale et temporelle du message nociceptif et considérablement augmenter son intensité. Ce mécanisme pourrait participer à l'hyperalgésie primaire observée lors d'une inflammation. D'autres fibres, non nociceptives dans des conditions physiologiques normales, ont une « modalité dormante » et sont qualifiées de « partiellement silencieuses ». Ainsi, certains mécanorécepteurs à haut seuil (fibres A δ) répondent à des stimulus thermiques s'ils sont sensibilisés par des médiateurs de l'inflammation (Treede, 1995).

B. Initiation d'un message nociceptif en périphérie

Chaque nocicepteur possède un nombre important de récepteurs ionotropiques et métabotropiques différents, ainsi que d'autres types de canaux (mécanosensibles et thermosensibles) leur permettant de détecter et d'intégrer des stimulus de nature physique ou chimique, et d'adapter leur sensibilité à ces stimulus lors d'une lésion ou d'une inflammation (Figure I-3) (Burgess & Perl, 1967).

Des canaux ioniques responsables de la détection directe de stimulus mécaniques ont été identifiés chez la drosophile et chez *C.elegans*. L'ARN messager de l'un de ces canaux est aussi exprimé dans les neurones sensoriels de mammifère (Garcia-Anoveros *et al.*, 2001). Il s'agit du *Brain sodium channel 1* (BNC1) ou *acid sensing ion channel 2* (ASIC2) (Lingueglia *et al.*, 1997), ou *mammalian degenerin* (MDEG). Cette protéine est structurellement apparentée aux canaux sodiques épithéliaux, et aux canaux ioniques activés par l'étirement (*stretch activated channels*) et par le neuropeptide FMRFamide (Lingueglia *et al.*, 1995;

Waldmann & Lazdunski, 1998; Mano & Driscoll, 1999). Cette superfamille de canaux ioniques incluant les ASICs est appelée *degenerin/epithelial Na channel* (DEG/ENaC) en raison de la dégénération neuronale observée chez *C. elegans* lors d'une mutation de ces canaux mécanosensibles (Driscoll & Chalfie, 1991).

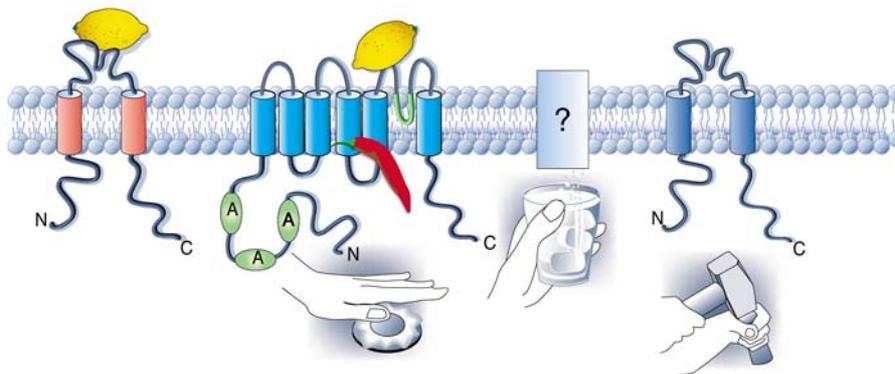


Figure I- 3 : Différents types de récepteurs exprimés par les nocicepteurs.

Les nocicepteurs utilisent des voies de transduction différentes pour détecter les stimulus physiques et chimiques. Les récepteurs ASIC détectent les variations de pH qui peuvent être consécutives à une inflammation. Il semble que certains récepteurs vanilloïdes de la famille des TRP détectent la chaleur nociceptive (et également le pH acide), et que des canaux ioniques de la famille ENaC/DEG détectent les stimulus mécaniques nociceptifs. Le mécanisme moléculaire de transduction pour le froid nociceptif n'a pas encore été identifié.

(Modifié d'après Julius & Basbaum, 2001).

Des expériences d'inactivation des gènes ASIC2 ou ASIC3 (un autre sous-type de canal ASIC) permettent de suggérer que ces canaux seraient des mécanorécepteurs impliqués dans certains aspects de la sensibilité tactile (Price *et al.*, 2000; Price *et al.*, 2001).

Les stimulus mécaniques peuvent aussi être détectés de manière indirecte, grâce au fait qu'une distension tissulaire peut mener à la libération par le tissu de messagers chimiques. Nakamura et Strittmatter (1996) ont montré que des stimulus mécaniques pouvaient provoquer une libération d'ATP, permettant une activation autocrine et paracrine de récepteurs métatropiques des purines, les récepteurs P2Y. Plus récemment, Cook et McCleskey (2002) ont montré dans un modèle de co-culture que l'ATP libérée suite à la lyse de neurones sensoriels primaires et de kératinocytes excite les neurones sensoriels primaires, et que cette excitation est presque entièrement due à l'activation des récepteurs P2X exprimés par ces neurones. D'autre part, Krishtal et Pidoplichko (1980) ont montré que l'ATP extracellulaire activait des canaux cationiques dans les neurones sensoriels de rat. Un stimulus mécanique pourrait donc provoquer *in vivo* la libération d'ATP par un ou plusieurs types cellulaires en périphérie, où elle pourrait activer des récepteurs purinergiques (P2X et P2Y) sur les terminaisons de nocicepteurs avoisinants, ou éventuellement de neurones sensoriels non nociceptifs, comme des mécanorécepteurs à bas seuil. La sous-unité P2X₃ des récepteurs ionotropiques de l'ATP, qui est très fortement exprimée dans les neurones sensoriels primaires de petit diamètre (Bradbury *et al.*, 1998) pourrait être un bon candidat pour intervenir dans la détection des stimulus mécaniques nocifs. Ce point est abordé en détail dans le chapitre III.A.4)c) ainsi que dans la revue de North (2004).

Dans le cas de la nociception en réponse à un stimulus thermique nociceptif chaud d'intensité faible à moyenne (42-45 °C) par les afférences C et A δ de type II, la cible moléculaire semble être chez le rat le récepteur vanilloïde de type 1 (VR1 ou *transient receptor potential-V1*, TRP-V1). Ce récepteur, qui a été cloné en 1997 (Caterina *et al.*, 1997) est un canal cationique non sélectif, formé par des sous-unités à six domaines transmembranaires, et exprimé principalement dans les fibres C non myélinisées (Julius & Basbaum, 2001). Il est activé par la chaleur nociceptive modérée, la capsaïcine, et les composés vanilliques (Caterina *et al.*, 1997). Récemment, deux ligands endogènes de ce récepteur ont été découverts : la N-arachidonoyldopamine (NADA) et la N-oleoyldopamine (OLDA) (Chu *et al.*, 2003). Ces composés sont synthétisés dans le cerveau. La dépendance des réponses membranaires du TRP-V1 à la température et son seuil d'activation (aux alentours de 43 °C) sont comparables à ceux des courants évoqués par la chaleur nociceptive

dans les neurones sensoriels natifs (Tominaga *et al.*, 1998; Welch *et al.*, 2000). D'autre part, les neurones du ganglion rachidien de souris déficientes pour le gène du récepteur TRP-V1 ne répondent ni à la chaleur nociceptive modérée (contrairement aux neurones du ganglion rachidien de souris sauvages), ni à la capsaïcine, mais ils répondent à la chaleur intense (>52 °C) (Caterina *et al.*, 2000; Davis *et al.*, 2000). Ce stimulus est codé spécifiquement par un autre membre de la famille des TRP-V1, le TRP-V2 (ou VRL-1) (Caterina *et al.*, 1999). Deux autres récepteurs de la famille de TRP-V et sensibles à la chaleur ont été identifiés depuis, et nommés TRP-V3 (Peier *et al.*, 2002b; Smith *et al.*, 2002; Xu *et al.*, 2002) et TRP-V4 (ou VRL-2, ou VR-OAC, ou OTRPC4, ou TRP12), d'abord identifié comme un osmorécepteur (Liedtke *et al.*, 2000; Strotmann *et al.*, 2000; Wissenbach *et al.*, 2000; Delany *et al.*, 2001; Guler *et al.*, 2002). Les mécanismes de la thermoception impliquant les canaux TRP sont décrits dans la revue de Patapoutian et coll. (2003). Les différents récepteurs concernés et leur seuil d'activation sont illustrés dans la figure I-4.

Dans le cas de la nociception au froid, les récepteurs TRP-V1 ne sont pas impliqués, comme le montrent des études comportementales réalisées sur des souris déficientes pour le gène de ce récepteur (Caterina *et al.*, 2000). Le récepteur TRP-M8 (ou *cold and menthol sensitive receptor 1* : CMR1) est impliqué dans la thermo-réception au froid : il est activé par des températures inférieures à 25 °C, et est exprimé dans une fraction de neurones thermosensibles du ganglion rachidien (Peier *et al.*, 2002a; Reid *et al.*, 2002) et du ganglion trijumeau (Nealen *et al.*, 2003). Cependant, ce récepteur n'est pas impliqué dans la nociception au froid (McKemy *et al.*, 2002; Peier *et al.*, 2002a). Un autre récepteur au froid a été identifié récemment. Il s'agit du récepteur-canal ANKTM1, un parent éloigné de la famille des TRP, perméable au calcium, activé par des températures inférieures à 20 °C et par l'iciline, mais non par le menthol. Il est co-localisé avec TRP-V1 et le CGRP dans une sous-population de nocicepteurs, mais non avec le TRP-M8 (Story *et al.*, 2003).

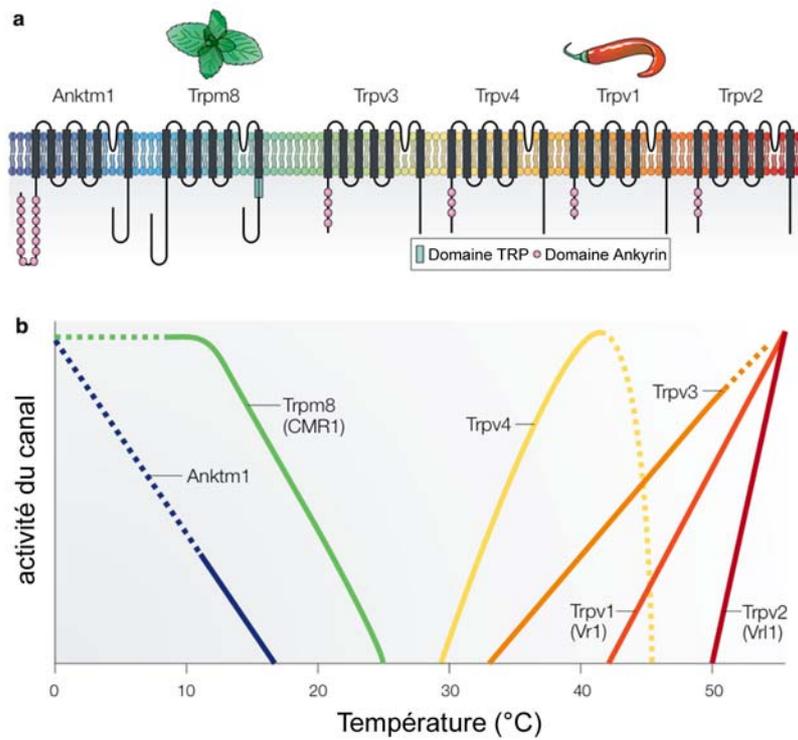


Figure I- 4 : Les canaux TRP thermosensibles.

a. Les canaux TRP sont composés de 6 segments transmembranaires. Ils possèdent un nombre variable de domaines ankyrine et de domaines TRP. Leurs extrémités N- et C- terminales sont situées en intracellulaire. Le menthol et la capsaïcine activent respectivement les récepteurs TRP-M8 et TRP-V1.

b. Seuils de températures d'activation des différents canaux TRP thermosensibles.

(Modifié d'après Patapoutian et al., 2003).

Lors d'une blessure, le système nociceptif va dans un premier temps permettre à l'organisme de détecter le stimulus nociceptif (piqûre, brûlure, gelure, attaque acide). En fonction de l'importance de la lésion, de nombreux médiateurs chimiques (appelés **médiateurs de l'inflammation**) vont être libérés par les nocicepteurs eux-mêmes et par les cellules non neuronales avoisinantes (mastocytes, granulocytes neutrophiles, cellules endothéliales, fibroblastes, plaquettes sanguines...) (Julius & Basbaum, 2001). Parmi ces médiateurs, on compte par exemple les protons extracellulaires, l'acide arachidonique et d'autres métabolites des lipides, la sérotonine, la bradykinine, le NGF, la substance P, le CGRP, des enzymes comme la trypsine et la tryptase, ainsi que l'ATP et ses métabolites. Ces molécules, vont activer des récepteurs ionotropiques et métabotropiques situés sur les fibres afférentes primaires au voisinage de la blessure (Lembeck & Gamse, 1982). Certaines vont activer directement les nocicepteurs en les dépolarisant, d'autres vont augmenter la sensibilité des nocicepteurs aux stimulus nociceptifs, voire les sensibiliser à des stimulus non nociceptifs en abaissant leurs seuils d'activation (Hökfelt *et al.*, 1994; Schmidt *et al.*, 1995; Gebhart, 1996; Snider & McMahon, 1998; Basbaum & Woolf, 1999; Raja, 1999; Basbaum & Jessell, 2000; Woolf & Salter, 2000). Ce phénomène, appelé **sensibilisation périphérique**, est responsable de l'hyperalgésie et participe à l'allodynie (cf. Fig. I-5). Ceci va encourager l'individu à protéger le site de la blessure pendant le temps de la régénération du tissu lésé. Les différentes actions de la plupart des médiateurs de l'inflammation connus, et les propriétés des récepteurs affectés par ces molécules sont décrites dans les revues de Millan (1999) et de Julius & Basbaum (2001). Ce domaine de recherche reste très actif.

Il est remarquable de constater que certains récepteurs, comme les récepteurs ASIC ou TRP-V1, constituent de véritables points de convergence pour les actions de nombreux médiateurs de l'inflammation. Ainsi, la fixation d'ATP (Tominaga *et al.*, 2001), de bradykinine (Cesare & McNaughton, 1996), de NGF (Chuang *et al.*, 2001), et de protéinases (Dai *et al.*, 2004) sur leurs récepteurs, potentialise l'activité du récepteur TRP-V1, ou abaisse son seuil d'activation à la chaleur. Il faut également noter que les protons peuvent interagir directement avec le TRP-V1 et abaisser son seuil d'activation par la chaleur de 43 à 35°C (Tominaga *et al.*, 1998). Il en est de même pour l'éthanol, qui peut activer et sensibiliser le récepteur TRP-V1 (Trevisani *et al.*, 2002).

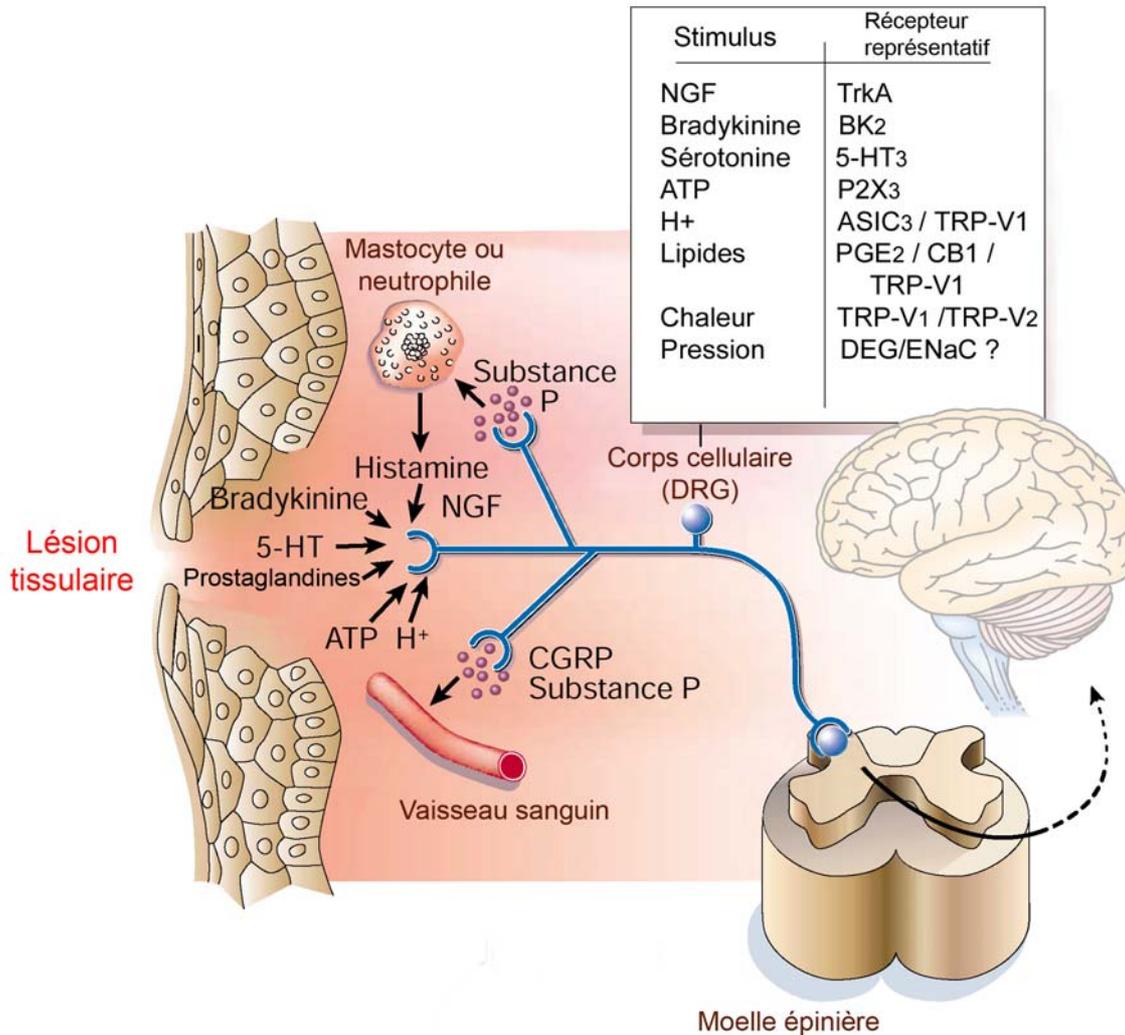


Figure I- 5 : Mise en place de l'inflammation neurogène suite à une lésion tissulaire.

Les nocicepteurs activés transmettent l'information sensorielle au système vers la corne dorsale de la moelle épinière, mais induisent également la libération de médiateurs de l'inflammation au site de la blessure. Ces médiateurs vont agir sur les vaisseaux sanguins, ainsi que sur des cellules non neuronales qui vont à leur tour libérer des médiateurs de l'inflammation auxquels les neurones sensoriels primaires sont sensible.

(Modifié d'après Julius & Basbaum, 2001).

C. Transmission du message nociceptif vers le système nerveux central

Les trains de potentiels d'action qui constituent le message nociceptif sont transmis le long de l'axone des neurones sensoriels primaires de la périphérie vers le système nerveux central, sans passage obligatoire par le corps cellulaire. Ce phénomène est lié à la nature pseudo-unipolaire de ces neurones, et de ce fait, le corps cellulaire semble *a priori* ne pas avoir d'influence directe sur les trains de potentiels d'action parcourant l'axone.

Il est intéressant de noter que la plupart des récepteurs (notamment les récepteurs GABA_A et les récepteurs P2X) qui sont exprimés aux extrémités centrales et périphériques des neurones sont également présents sur le corps cellulaire des neurones sensoriels des ganglions rachidiens et crâniens.

📖 Cette situation nous a permis d'utiliser les corps cellulaires de ces neurones comme modèle pour étudier les récepteurs GABA_A et P2X éventuellement exprimés aux extrémités centrale et périphérique des neurones sensoriels primaires.

L'excitabilité des neurones du ganglion rachidien peut toutefois être modifiée sur le trajet de leur axone par l'action de médiateurs comme l'ATP, qui sont fabriqués localement par les cellules gliales (Irnich *et al.*, 2002).

Tous les neurones du ganglion rachidien projettent vers la corne dorsale de la moelle épinière (CD). Certains neurones, comme les nocicepteurs A δ et C terminent dans la CD (quelques axones des fibres A δ projettent également dans la lamina X), mais d'autres (les neurones de type A β) projettent principalement vers les noyaux des cordons dorsaux (moelle allongée, bulbe rachidien) et émettent des collatérales vers la CD.

Les axones des fibres C se terminent principalement dans la lamina II externe de la corne dorsale de la moelle épinière, ainsi que dans les laminae II interne, I et IV, tandis que les axones des fibres A δ se terminent principalement dans les laminae I et V, ainsi que dans les laminae II, III et IV (figure I-6). Ces localisations vont déterminer le type des neurones ciblés parmi les nociceptifs spécifiques, les neurones à convergence (*wide dynamic range* : WDR), et les neurones non nociceptifs. Cependant, l'organisation des terminaisons des neurones

sensoriels primaires peut varier dans des conditions pathologiques et au cours du développement (Millan, 1999).

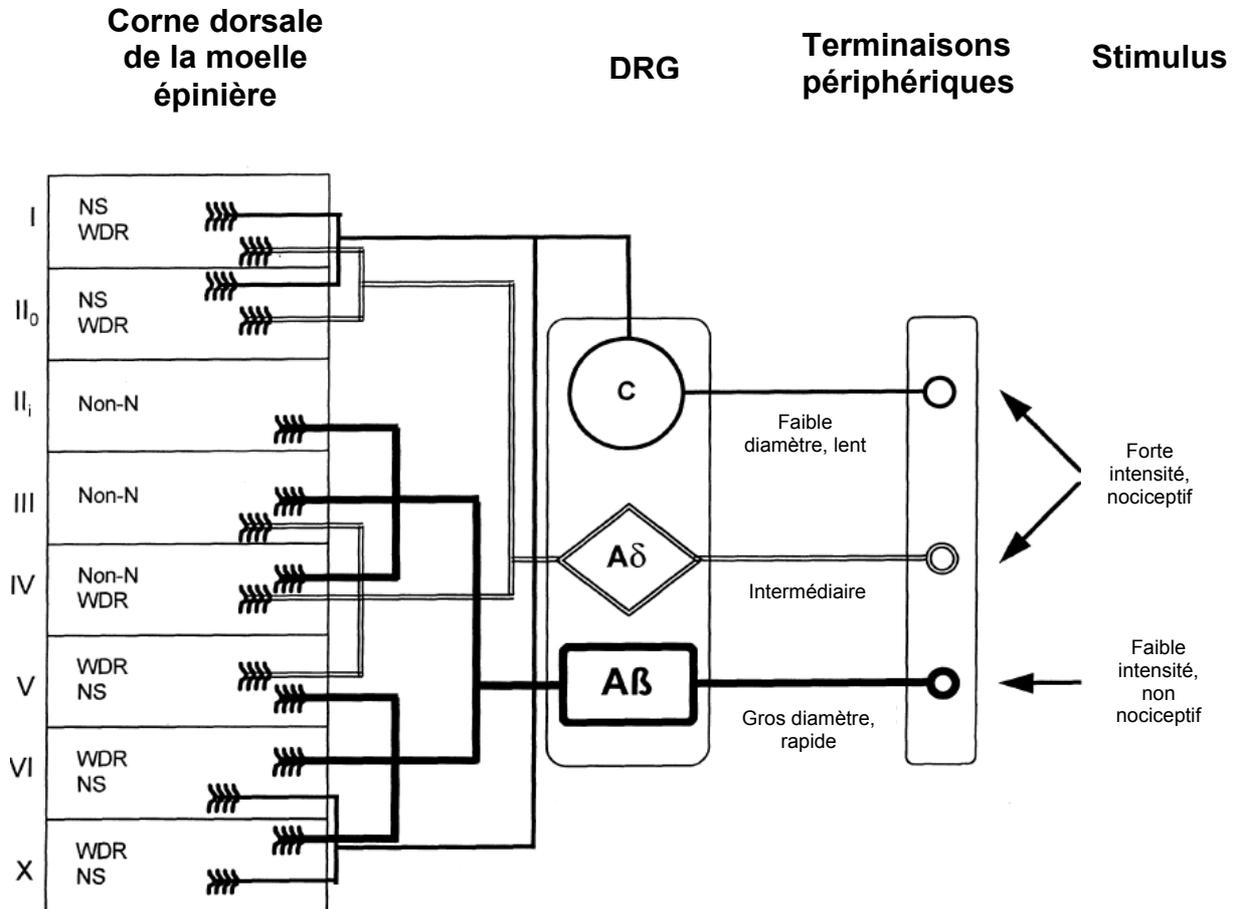


Figure I- 6 : Schéma de l'organisation qualitative des entrées des afférences primaires cutanées dans la corne dorsale de la moelle épinière.

NS : neurone nociceptif spécifique ; WDR : neurone à convergence (*Wide Dynamic Range*) ; Non-N : neurone non nociceptif ; II₀ : Lamina II_{externe} ; II_i : Lamina II_{interne} (Modifié d'après Millan, 1999).

Toutes les terminaisons centrales des neurones sensoriels primaires libèrent du glutamate, qui active post-synaptiquement des récepteurs ionotropiques (AMPA, NMDA) et métabotropiques (mGlu) sur les neurones de la corne dorsale de la moelle épinière. Cependant, d'autres neurotransmetteurs comme la substance P, le CGRP, l'ATP, ainsi que des médiateurs comme le NO, la PGE₂, et certaines neurotrophines peuvent également être libérés selon les types de neurones et les conditions physiologiques ou pathologiques (Millan, 1999). Leur synthèse et leur libération sont régulées dans des situations d'inflammation et lors de pathologies nerveuses. C'est le cas de la substance P, qui est libérée par certaines fibres A δ , uniquement dans des conditions neuropathiques ou inflammatoires (Hökfelt *et al.*, 1994).

Par ailleurs, les terminaisons centrales des fibres afférentes primaires possèdent de nombreux récepteurs ionotropiques et métabotropiques dont le fonctionnement est susceptible de moduler la transmission du message sensoriel vers les neurones du système nerveux central. Parmi ces récepteurs, on retrouve beaucoup de récepteurs exprimés également aux terminaisons périphériques des neurones sensoriels primaires : par exemple certains récepteurs ionotropiques et métabotropiques de l'ATP (respectivement P2X et P2Y, voir Chapitre III), des récepteurs de l'adénosine (Sawynok & Liu, 2003), des récepteurs GABA_A (Malcangio & Bowery, 1996), des récepteurs ASICs (Olson *et al.*, 1998), des récepteurs TRP-V1 (Guo *et al.*, 1999; Hwang & Valtschanoff, 2003), des récepteurs aux canabinoïdes (Tognetto *et al.*, 2001), et des récepteurs aux opiacées, ces derniers n'étant exprimés que lors d'une inflammation (Millan, 1986). Le message nociceptif peut également être modulé par l'activation de récepteurs post-synaptiques (présents sur les neurones de la corne dorsale de la moelle épinière). Les molécules agonistes de ces récepteurs peuvent être libérées par les neurones sensoriels primaires eux-mêmes, ou par des neurones et des cellules gliales de la moelle épinière (Julius & Basbaum, 2001).

III. L'ATP extracellulaire et la nociception.

L'adénosine 5'-triphosphate (ATP) et ses dérivés ont été isolés en 1929 (Fiske & SubbaRow, 1929; Lohmann, 1929), et leur activité pharmacologique extracellulaire a été rapidement démontrée (Drury & Szent-Gyorgi, 1929). En revanche, la caractérisation pharmacologique de leurs récepteurs a pris presque 50 ans (Burnstock, 1978).

L'implication de l'ATP dans les mécanismes de la nociception est désormais bien étayée (Burnstock, 1996), et la recherche d'antagonistes des récepteurs de l'ATP apparemment impliqués constitue un domaine de recherche très actif. L'objectif de ce travail de thèse était de participer à la compréhension des mécanismes par lesquels l'ATP exerce ses rôles dans la nociception en recherchant l'existence de molécules endogènes capables de moduler l'activité de ses récepteurs-canaux, les récepteurs P2X. Ce chapitre a pour but de présenter au lecteur les connaissances actuelles sur les propriétés et la localisation des récepteurs de l'ATP, et sur leurs rôles dans les mécanismes de la nociception.

Les récepteurs de l'ATP et de ses métabolites :

L'ATP extracellulaire est un agoniste naturel des récepteurs P2. Les récepteurs P2X sont des récepteurs-canaux perméables aux cations, et les récepteurs P2Y, sont des récepteurs couplés à des protéines G (Burnstock, 1978; Abbracchio & Burnstock, 1994; Ralevic & Burnstock, 1998). Par ailleurs, la présence d'ectonucléotidases dans le milieu extracellulaire a pour conséquence la dégradation rapide de l'ATP en ADP, qui active plus sélectivement les récepteurs P2Y, puis en AMP, et enfin en adénosine, qui active sélectivement les récepteurs P1, ces derniers étant tous des récepteurs métabotropiques (cf. figure I-7) (Burnstock, 1997; Ralevic & Burnstock, 1998).

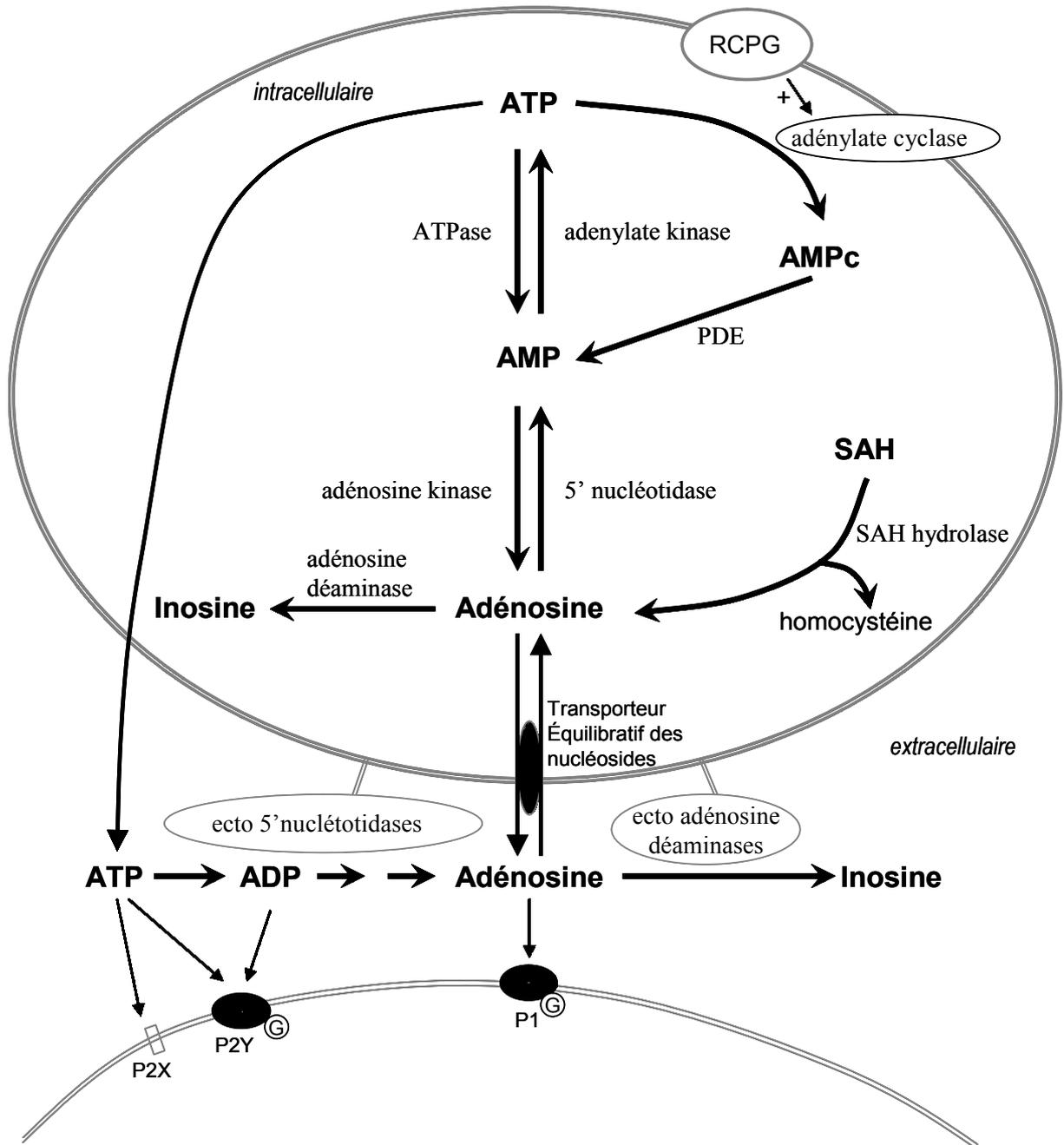


Figure I- 7 : Voies intracellulaires et extracellulaires pour la formation et le métabolisme de l'ATP, de l'AMP, et de l'adénosine (modifié d'après Sawynok & Liu, 2003).
RCPG : récepteur couplé à une protéine G ; PDE : phosphodiesterase ; SAH : A-adenosyl-homocystéine.

A. Les récepteurs P2X

Les récepteurs P2X sont des récepteurs ionotropiques perméables aux cations (Evans *et al.*, 1996). Ils sont très largement distribués dans le système nerveux central et périphérique, où ils jouent un rôle dans la transmission et dans la modulation du message nerveux. Ils sont également exprimés dans de nombreux tissus périphériques, où ils participent à de nombreuses fonctions physiologiques (motricité des muscles lisses, sécrétion, inflammation, audition...). Les rôles de ces récepteurs dans la nociception sont décrits dans le paragraphe 4).

Les récepteurs P2X semblent être constitués par l'assemblage homo ou hétéromérique de trois sous-unités P2X (Nicke *et al.*, 1998; Stoop *et al.*, 1999; Jiang *et al.*, 2003). Sept gènes différents codant pour les sous-unités P2X (P2X₁₋₇) ont été clonés chez les mammifères (Buell *et al.*, 1996). Des études de co-immunoprécipitation de différentes sous-unités P2X exprimées de façon hétérologue dans des cellules HEK-293 ont permis de déterminer les assemblages potentiels de ces sous-unités *in vivo* (Torres *et al.*, 1999). La sous-unité P2X₇, par exemple, est la seule à ne pouvoir former que des récepteurs homomériques, tandis que la sous-unité P2X₆ est la seule à ne pas pouvoir s'assembler pour former un récepteur homomérique. Le tableau I-2 résume les résultats de ces expériences de co-immunoprécipitation. Les différentes possibilités de récepteurs hétéromériques P2X peuvent encore être augmentées en considérant l'existence de variants d'épissage décrits pour la plupart des sous-unités P2X (Brandle *et al.*, 1997; Townsend-Nicholson *et al.*, 1999; Chen *et al.*, 2000). Jusqu'à présent cependant, en ce qui concerne les récepteurs hétéromériques, seule l'existence des récepteurs P2X_{2/3} (Lewis *et al.*, 1995) P2X_{1/5} (Torres *et al.*, 1998b), P2X_{4/6} (Le *et al.*, 1998), P2X_{2/6} (King *et al.*, 2000), et P2X_{1/2} (Brown *et al.*, 2002) a été démontrée au plan fonctionnel.

	P2X ₁	P2X ₂	P2X ₃	P2X ₄	P2X ₅	P2X ₆	P2X ₇
P2X ₁	+	+	+	-	+	+	-
P2X ₂		+	+	-	+	+	-
P2X ₃			+	-	+	-	-
P2X ₄				+	+	+	-
P2X ₅					+	+	-
P2X ₆						-	-
P2X ₇							+

Tableau I- 2 : co-assemblage des sous-unités P2X déterminé par co-immunoprécipitation.

(D'après Torres *et al.*, 1999).

1) Structure des sous-unités P2X

La taille des sous-unités P2X varie de 379 acides aminés pour P2X₆ à 595 acides aminés pour P2X₇. Les sous-unités P2X sont toutes constituées de deux segments transmembranaires reliés par une large boucle extracellulaire. Les extrémités N- et C-terminales de ces protéines sont intracellulaires, ce qui en fait un récepteur original. Bien que d'autres récepteurs partagent cette architecture transmembranaire (canaux sodium sensibles à l'amiloride des épithéliums, des dégénérines des canaux mécanosensibles de *Caenorhabditis elegans*, Valera *et al.*, 1994; Price *et al.*, 1996), il ne semble exister que peu ou pas d'homologie de séquence entre ces canaux et les récepteurs P2X. La figure I-8 schématise une sous-unité P2X (pour revue, consulter Buell *et al.*, 1996; MacKenzie *et al.*, 1999; Khakh, 2001; North, 2002)

L'extrémité amino-terminale comporte de 20 à 30 acides aminés selon les sous-unités. Elle possède un site consensus de phosphorylation par la protéine kinase C. Concernant les récepteurs formés uniquement de la sous-unité P2X₂ (récepteurs P2X₂ homomériques), ce site est impliqué dans le mécanisme de désensibilisation des réponses (Boué-Grabot *et al.*, 2000).

L'extrémité carboxy-terminale comporte de 28 acides aminés pour P2X₆ à 242 acides aminés pour P2X₇ (Collo *et al.*, 1996; Surprenant, 1996). Pour le récepteur P2X₂ homomérique, cette extrémité semble également intervenir dans la cinétique des réponses, (vraisemblablement en interagissant avec l'extrémité amino-terminale) : la désensibilisation est plus rapide lorsque l'extrémité carboxy-terminale de la sous-unité P2X₂ est tronquée par mutation dirigée (Boué-Grabot *et al.*, 2000). D'autre part, deux variants d'épissage possibles de la sous-unité P2X₂ ont été décrits. L'ARMm correspondant à l'un des variants (P2X_{2(b)}) comporte 207 paires de bases de moins que le variant P2X_{2(a)} sur l'extrémité carboxy-terminale, et les récepteurs formés par l'association homomérique des sous-unités P2X_{2(b)} présentent une cinétique de désensibilisation plus rapide que les récepteurs P2X_{2(a)} homomériques (Brandle *et al.*, 1997; Simon *et al.*, 1997).

L'extrémité carboxy-terminale semble également jouer un rôle dans le phénomène de dilatation de pore décrit au § 3 (Brandle *et al.*, 1997; Simon *et al.*, 1997).

Plus récemment, un motif conservé de 5 acides aminés, présent également dans d'autres familles de récepteurs, a été identifié sur l'extrémité carboxy-terminale des récepteurs P2X. Cette région semble être nécessaire à l'expression et à la stabilisation du récepteur dans la membrane cellulaire (Chaumont *et al.*, 2004).

Les deux segments transmembranaires (TM1 et TM2) comportent des acides aminés entrant dans la composition du pore du canal ionique. Cependant, certains de ces résidus ne sont pas conservés d'une espèce à l'autre. Il semble donc exister des différences structurales à ce niveau entre les récepteurs P2X des différentes espèces (Rassendren *et al.*, 1997a; Egan *et al.*, 1998). La « porte » du canal semble impliquer une glycine en position 342 (Egan *et al.*, 1998),.

La boucle extracellulaire se caractérise par la présence sur toutes les sous-unités P2X de 11 résidus chargés positivement et de 10 cystéines permettant la formation de ponts dissulfures. Elle possède en outre des sites de glycosylation sur trois résidus asparagine (182, 239 et 298), qui semblent être indispensables à la fonction du récepteur : la mutation d'au moins deux d'entre elles abouti à la formation de récepteurs non fonctionnels (Newbolt *et al.*, 1998; Torres *et al.*, 1998a). Une région extracellulaire proximale au TM1 et incluant les lysines 69 et 71 semble contribuer à la formation du site de liaison de l'ATP pour le récepteur P2X₂ homomérique (Jiang *et al.*, 2000b). Concernant le récepteur P2X₁ homomérique, les lysines 68 et 70 proches du TM1, et les arginines 292 et 309 proches du TM2 semblent participer à la formation du site de liaison à l'ATP (Ennion *et al.*, 2000).

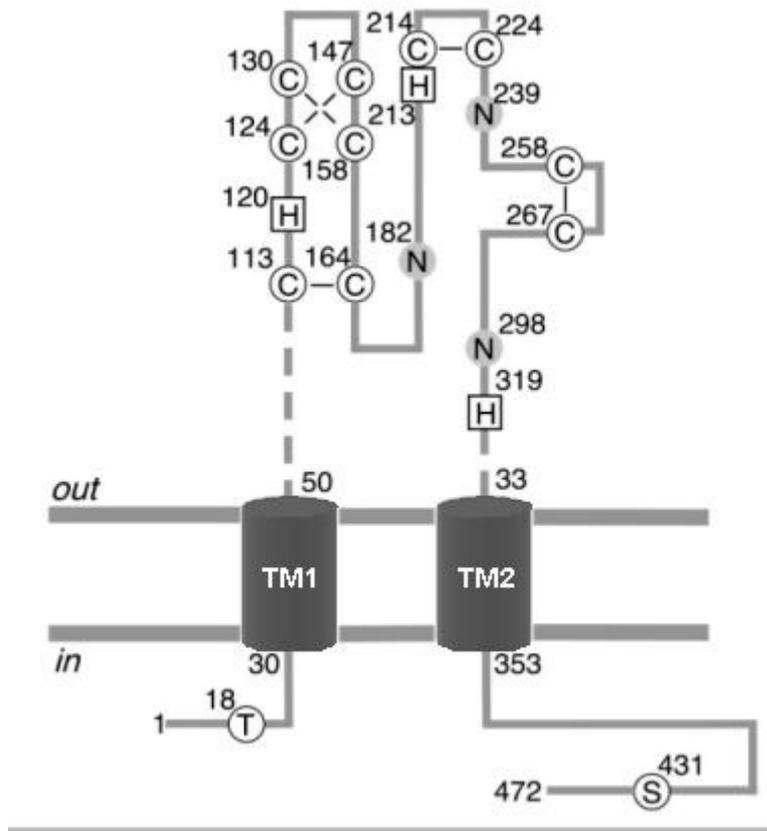


Figure I- 8 : Représentation schématique d'une sous-unité P2X et de ses sites de glycosylation, de phosphorylation, et de formation possible de ponts dissulfure.

N : sites glycosylés sur la sous-unité P2X₂ ; **T**, **S** : respectivement, résidu thréonine et sérine phosphorylés par une protéine kinase C. **C** : résidus cystéines conservés pouvant former des ponts dissulfure (représentés par des traits). **H** : résidus histidine impliqués dans la liaison des ions Zn²⁺ (positions 120 et 213) et des protons (position 319).
(D'après North, 2002).

2) localisation des récepteurs P2X

Les récepteurs P2X sont très largement distribués dans l'organisme, dans les tissus périphériques et dans le système nerveux. Les techniques de RT-PCR, d'hybridation *in situ* et d'immunohistochimie, ont permis ces dix dernières années d'établir une cartographie de la localisation des sous-unités des récepteurs P2X (Tableau I-3). La majorité de ces études a été effectuée chez le rat. Malheureusement, les anticorps anti-P2X utilisés dans les études d'immunohisto/cytochimie se sont souvent révélés non spécifiques. D'autre part, la présence d'ARN messenger ne garanti pas l'expression d'un récepteur fonctionnel à la membrane cellulaire. La plus grande prudence doit donc être observée quant à l'interprétation des résultats de ces études.

Sous-unité	Principale distribution
P2X ₁	Muscle lisse, plaquettes sanguines, cervelet, neurones de la corne dorsale de la moelle épinière
P2X ₂	Muscle lisse, système nerveux central (dont la corne dorsale de la moelle épinière), rétine, cellules chromaffines, ganglions sensoriels et autonomes
P2X ₃	Neurones sensoriels primaires, noyau du tractus solitaire, quelques neurones sympathiques
P2X ₄	système nerveux central (dont la corne dorsale de la moelle épinière), testicules, colon, ganglions sensoriels et autonomes
P2X ₅	Cellules de la peau en prolifération, intestin, vessie, thymus, moelle épinière, ganglions sensoriels
P2X ₆	système nerveux central (dont la corne dorsale de la moelle épinière), motoneurones (dans la moelle épinière), ganglions sensoriels et autonomes, muscles squelettiques, lymphocytes
P2X ₇	Cellules apoptotiques du système immunitaire, pancréas, peau, cellules ganglionnaires de la rétine

Tableau I- 3 : Principale distribution des sous-unités P2X, détectées par hybridation *in situ* et par immunocytochimie.

(Adapté d'après Burnstock *et al.*, 2001).

La sous-unité P2X₁ a été clonée pour la première fois à partir des muscles lisses du canal déférent de rat (Valera *et al.*, 1994). Elle est principalement localisée dans les muscles lisses entourant la paroi des vaisseaux, et dans le cœur, bien que son ARN messenger (ARNm) et sa protéine (immunohistochimie) aient aussi été retrouvés dans les cellules de Purkinje ainsi que dans la couche granulaire du cervelet (Kidd *et al.*, 1995; Loesch & Burnstock,

1998), et dans les ganglions sensoriels et les ganglions autonomes (Kidd *et al.*, 1995; Lewis *et al.*, 1995; Xiang *et al.*, 1998a).

La sous-unité P2X₂ est très largement exprimée dans le système nerveux central et périphérique (Norenberg & Illes, 2000). Elle a été clonée pour la première fois chez le rat à partir de cellules du phaeochromocytome (PC12) (Brake *et al.*, 1994), et la sous-unité humaine a été clonée à partir de l'hypophyse (Lynch *et al.*, 1999). La détection de son ARNm et de sa protéine (immunohistochimie) dans les neurones sensoriels primaires et dans les neurones de la corne dorsale de la moelle épinière suggère un rôle des récepteurs contenant la sous-unité P2X₂ dans la nociception (voir § 4).

La sous-unité P2X₃ est presque exclusivement exprimée dans les neurones sensoriels primaires (Vulchanova *et al.*, 1997; Chizh & Illes, 2001; Dunn *et al.*, 2001; North, 2004). Son ADNc a été fabriqué à partir du ganglion rachidien de rat nouveau-né (Chen *et al.*, 1995a; Lewis *et al.*, 1995). Son immunoréactivité est aussi détectée dans deux autres structures impliquées dans la transmission du message nociceptif : le noyau du tractus solitaire, et le noyau spinal du trijumeau (Llewellyn-Smith & Burnstock, 1998), ainsi que dans les ganglions autonomes (Xiang *et al.*, 1998a). Sa présence quasi exclusive dans une sous-population de neurones sensoriels primaires a suscité de nombreux travaux ayant pour but de déterminer le rôle de cette sous-unité dans la détection et la transmission du message nerveux nociceptif (North, 2004) (voir § 4).

La sous-unité P2X₄ est très largement exprimée dans le système nerveux central (Norenberg & Illes, 2000). Elle a été clonée pour la première fois à partir de l'hippocampe de rat (Bo *et al.*, 1995), et du cerveau humain (Garcia-Guzman *et al.*, 1997). Son ARN messager et son immunoréactivité ont été détectés dans les neurones de nombreuses régions de l'encéphale (Bo & Burnstock, 1995; Collo *et al.*, 1996; Séguéla *et al.*, 1996; Simon *et al.*, 1997; Lê *et al.*, 1998b), ainsi que dans la corne dorsale de la moelle épinière (Lê *et al.*, 1998b), dans certains ganglions sensoriels (ganglions rachidiens, noueux, trijumeau et spiral cochléaire, Séguéla *et al.*, 1996; Xiang *et al.*, 1998b), et dans les ganglions autonomes (Xiang *et al.*, 1999). L'expression de la sous-unité P2X₄ n'est toutefois pas limitée au système nerveux ; son immunoréactivité a aussi été observée dans les épithéliums des glandes endocrines, des voies respiratoires, des muscles lisses de la vessie, du tractus gastro-intestinal, de l'utérus, de l'endomètre utérin, des artères, ainsi que dans adipocytes (Bo *et al.*, 2003).

La sous-unité P2X₅ n'a en revanche pas été détectée dans le système nerveux central, à l'exception du noyau mésencéphalique du trijumeau et de la corne dorsale de la moelle épinière, où son ARNm a été retrouvé (Collo *et al.*, 1996). Elle a été clonée chez le rat à partir

du ganglion cœliaque (Collo *et al.*, 1996) et du cœur (Garcia-Guzman *et al.*, 1996), et son ARNm a été localisé dans les ganglions rachidiens et trijumeaux (Collo *et al.*, 1996). Son immunoréactivité a également été mise en évidence dans les ganglions rachidiens, noueux, trijumeau (Xiang *et al.*, 1998a), et spiral (Xiang *et al.*, 1999).

L'ARNm de la **sous-unité P2X₆** a été trouvé dans de nombreuses régions du cerveau, dans les parties ventrales et dorsales de la moelle épinière, dans les ganglions trijumeau, noueux, et rachidiens, dans le ganglion coeliaque et dans le ganglion cervical supérieur où elle a été clonée en premier (Collo *et al.*, 1996). Son immunoréactivité a également été détectée dans ces ganglions autonomes (Xiang *et al.*, 1998a). Elle est aussi fortement exprimée dans le muscle squelettique humain et de souris, ce qui lui a tout d'abord valu le nom de P2XM (Urano *et al.*, 1997; Nawa *et al.*, 1998). Chez l'humain, elle a été clonée à partir de lymphocytes où son expression est régulée par la p53, une protéine impliquée dans le cycle cellulaire (Urano *et al.*, 1997).

La sous-unité P2X₇, initialement nommée P2Z et décrite dans les mastocytes, les macrophages, les fibroblastes, les lymphocytes et les érythrocytes, a été clonée à partir de macrophages et d'encéphale de rat (Surprenant *et al.*, 1996), d'humain (Rassendren *et al.*, 1997b), et de souris (Chessell *et al.*, 1998). Elle n'est pas exprimée par les neurones, mais par les cellules de la microglie, et elle semble jouer un rôle dans le système immunitaire et dans l'inflammation (North, 2002). Son immunoréactivité a toutefois été détectée dans les cellules ganglionnaires de la rétine (Brandle *et al.*, 1998).

Les études d'hybridation *in situ*, d'immunohistochimie et immunocytochimie indiquent donc que les sous-unités des récepteurs P2X sont donc très largement exprimées dans l'organisme. Cependant, lorsque plusieurs sous-unités sont exprimées dans un même tissu, ces techniques ne permettent pas de déterminer la composition en sous-unités des types de récepteurs P2X présents et fonctionnels. Or ce point est essentiel pour le ciblage pharmaco-thérapeutique éventuel de ces récepteurs dans des situations pathologiques. L'absence d'anticorps sélectifs capables de détecter et de différencier les récepteurs P2X sur la base de leur composition en sous-unités dans les différents tissus, et l'absence d'agonistes et d'antagonistes spécifiques des différents récepteurs P2X rendent donc laborieuse la détermination des rôles précis des récepteurs P2X dans les fonctions physiologiques et pathologiques de l'organisme. De nombreux travaux ont toutefois été réalisés dans le domaine de la nociception, notamment en raison de la forte expression des récepteurs P2X₂ et P2X₃

dans les neurones sensoriels primaires, et des récepteurs P2X₂, P2X₄, et P2X₆ dans les neurones de la corne dorsale de la moelle épinière (cf. III.A.4).

3) Propriétés fonctionnelles des récepteurs P2X recombinants

Les propriétés que nous décrivons dans ce chapitre ont été démontrées grâce à des études fonctionnelles réalisées à l'aide d'enregistrements intracellulaires, extracellulaires, ou en patch-clamp, ou par des mesures du calcium libre intracellulaire par microfluorométrie. Ces expériences ont été réalisées sur des récepteurs P2X recombinants de rat (si non spécifié) et/ou d'humain.

- perméabilité au calcium :

D'après une étude réalisée sur des récepteurs-canaux recombinants de rat et d'humain (Egan & Khakh, 2004), les récepteurs P2X ont une perméabilité au calcium remarquablement supérieure à celle de la plupart des autres récepteurs-canaux, comme les récepteurs cholinergiques, sérotoninergiques, glutamatergiques (non NMDA), ou ASICs. Cette perméabilité est variable selon le sous-type de récepteurs P2X : les récepteurs homomériques P2X₃ et hétéromériques P2X_{2/3} et P2X_{1/5} ont la perméabilité la plus faible (comparable à celle des récepteurs nicotiques $\alpha 4\beta 2$), tandis que les sous-types P2X₁, P2X₄ et P2X_{4/6} ont la perméabilité la plus forte (supérieure à celle des récepteurs nicotiques $\alpha 7$, et équivalente à celle des récepteurs NMDA NR₁/NR_{2A}). Cette entrée d'ions calcium, qui représente de 3 à 15 % du flux ionique passant à travers les canaux P2X, est susceptible d'activer les voies des seconds messagers intracellulaires, et d'avoir ainsi de nombreuses conséquences physiologiques.

- dilatation de pore :

Lors d'une application prolongée (10-60 s) ou répétée d'agoniste, certains sous-types de récepteurs P2X (P2X₂, P2X₄, et P2X₇) entrent dans un état dilaté : ils deviennent alors perméables à de grosses molécules cationiques dont le poids moléculaire peut atteindre 1000 Dalton (mais ne dépassent pas 5 kD). Cette propriété a d'abord été observée avec les récepteurs P2X₇ clonés à partir des macrophages (Surprenant *et al.*, 1996; Rassendren *et al.*, 1997b), appelés P2X₇ cytolytiques en raison de la lyse cellulaire observée suite à l'entrée du

récepteur dans l'état dilaté. Cependant, ce phénomène de lyse cellulaire n'est pas observé avec les récepteurs P2X₇ exprimés par les cellules de Schwann chez la souris (Colomar & Amedee, 2001). La dilatation de pore a ensuite été observée pour des récepteurs P2X₂, P2X_{2/3} et P2X₄ recombinants et natifs (dans les neurones de DRG et du ganglion cervical supérieur), mais contrairement à la dilatation des récepteurs P2X₇ des macrophages, ce changement de perméabilité est rapidement réversible et n'est pas cytolytique (Khakh *et al.*, 1999a; Virginio *et al.*, 1999a; Virginio *et al.*, 1999b).

- propriétés cinétiques:

Concernant les propriétés cinétiques, seuls les récepteurs homomériques P2X₁ et P2X₃ présentent des courants rapidement désensibilisants ($\tau \leq 1$ s). les récepteurs P2X_{1/5} et P2X_{1/2} présentent des réponses biphasiques (Haines *et al.*, 1999; Brown *et al.*, 2002). Les autres types de récepteurs P2X homomériques ou hétéromériques décrits désensibilisent lentement ($\tau > 10$ s) et de ce fait, leur réponse présente une phase en plateau (Dunn *et al.*, 2001; North, 2002) (figure I-9). Cependant, les propriétés cinétiques des récepteurs P2X peuvent être modifiées par la phosphorylation (Boué-Grabot *et al.*, 2000), par la longueur de la partie C-terminale, ou par des changements du cytosquelette (Parker, 1998).

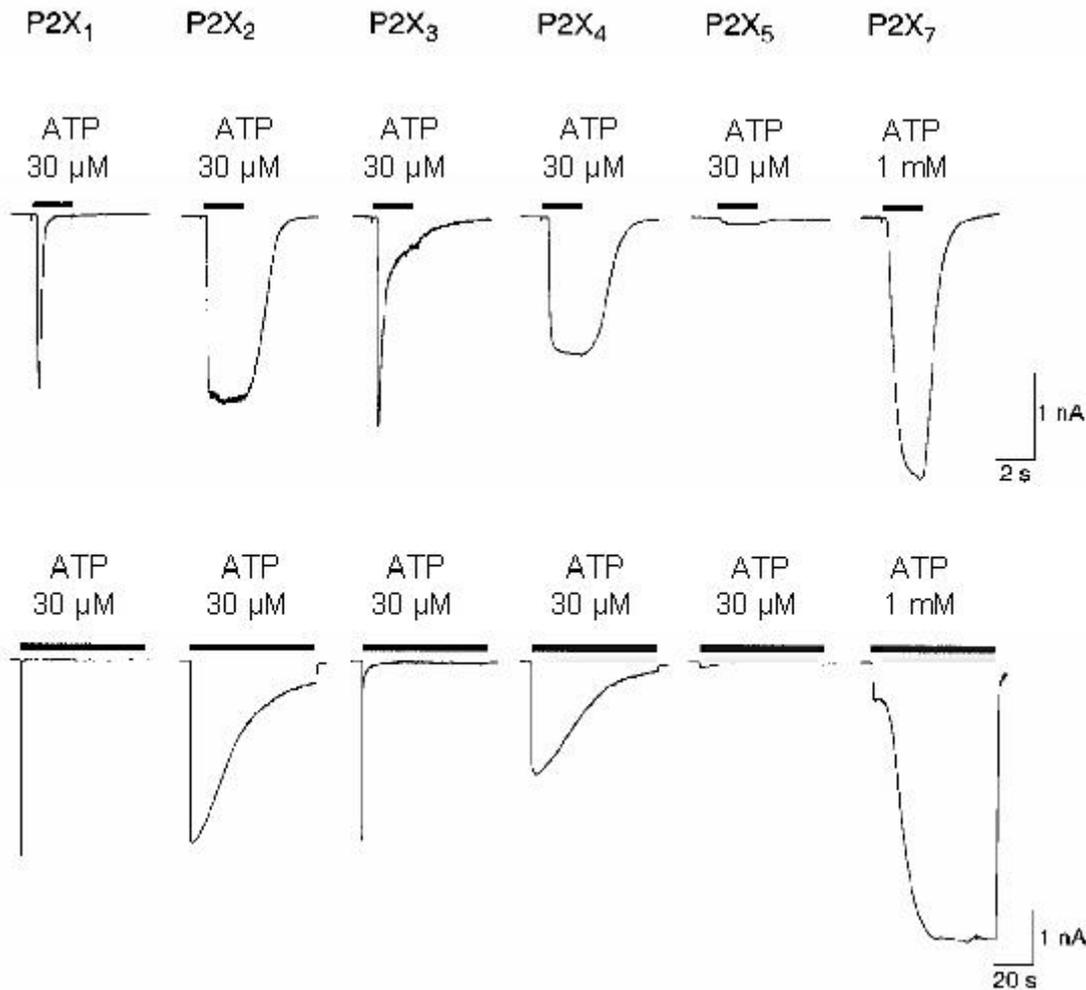


Figure I- 9 : Propriétés cinétiques des réponses membranaires à l'ATP dans des cellules HEK-293 exprimant les différents récepteurs homomériques P2X fonctionnels de rat.

Enregistrements de *patch-clamp* en configuration « cellule-entière ». En haut, applications brèves, en bas, applications longues. L'ATP (30 μ M, à l'exception du P2X₇ : 1 mM) est appliqué localement pendant 2 secondes (en haut) et 60 secondes (en bas, notez la différence d'échelle). Les cellules exprimant les récepteurs homomériques P2X₁ et P2X₃ présentent des réponses rapidement désensibilisantes (type R). Les cellules exprimant les récepteurs homomériques P2X₂, P2X₄, et P2X₅ présentent quand à eux des réponses non désensibilisantes (type ND). Lorsque l'application d'ATP est effectuée durant une minute, on observe une désensibilisation progressive de la réponse au cours de l'application, c'est pourquoi ces courants sont aussi qualifiés de « faiblement désensibilisants », ou « lentement désensibilisants ».

(D'après North, 2002).

- propriétés pharmacologiques:

Concernant les propriétés pharmacologiques, il n'existe pas d'agonistes ou d'antagonistes suffisamment spécifiques des différents types de récepteurs P2X fonctionnels. Ceci pose un réel problème lorsque l'on souhaite étudier le rôle fonctionnel des récepteurs P2X natifs ainsi que leur composition en sous-unités. Les cations, le pH, et d'autres modulateurs allostériques comme l'ivermectine sont connus pour moduler l'activité de certains récepteurs P2X en fonction de leur composition en sous-unité, et peuvent s'avérer être des outils pharmacologiques permettant parfois de discriminer entre les différents sous-types de récepteurs P2X.

Les agonistes, antagonistes et modulateurs allostériques des récepteurs P2X ainsi que les possibilités qu'ils offrent pour différencier les différents sous-types de récepteurs sont décrits dans les paragraphes suivants.

- Cas des récepteurs hétéromériques :

Les différents récepteurs P2X exprimés dans des systèmes hétérologues se distinguent par leur profil fonctionnel, défini par leurs propriétés cinétiques et pharmacologiques. Lorsque plusieurs sous-unités différentes forment un récepteur P2X hétéromérique, les propriétés de l'une ou l'autre des sous-unités vont se révéler être dominantes. Ainsi, les récepteurs homomériques P2X₂ ont des réponses faiblement désensibilisantes et sont insensibles à l' α,β -méthylène-adenosine 5'-triphosphate ($\alpha\beta$ me-ATP), tandis que les récepteurs homomériques P2X₃ ont des réponses rapidement désensibilisantes et sont activées par l' $\alpha\beta$ me-ATP. Le récepteur hétéromérique formé de l'assemblage des sous-unités P2X₂ et P2X₃, quant à lui, présente des réponses faiblement désensibilisantes (propriété héritée de la sous-unité P2X₂), et est sensible à l' $\alpha\beta$ me-ATP (propriété héritée de la sous-unité P2X₃) (Lewis *et al.*, 1995). De façon intéressante, seuls certains arrangements de sous-unités dans la structure quaternaire des récepteurs P2X hétéromériques semblent être possibles. Ainsi, les récepteurs hétérotrimériques P2X_{2/3} fonctionnels sont formés d'une sous-unité P2X₂ et de deux sous-unités P2X₃ (Jiang *et al.*, 2003).

Le tableau I-4 présente les profils cinétiques et pharmacologiques des différents récepteurs P2X exprimés fonctionnellement dans des systèmes d'expression hétérologues.

	Récepteurs homomériques						Récepteurs hétéromériques					
	P2X ₁	P2X ₂	P2X ₃	P2X ₄	P2X ₅	P2X ₇	P2X _{2/3}	P2X _{1/5}	P2X _{4/6}	P2X _{2/6}	P2X _{1/2}	
désensibilisation de la réponse :	Rapide	lente	Rapide	lente	lente	∅	lente	Biphasique	lente	lente	Biphasique	
Agonistes (CE₅₀, μM)												
ATP	1	1-30	1	10	10	100	1	1	6	30	0,6 (pic) 8 (plat.)	
ADP	30	≈300	≈50	>>100	≈300	>>300					0,4 (pic) se (plat.)	
αβmeATP	1-3	>300	1	>300	10	>>300	1-3	3	12-30	>100		
L-βγmeATP	10	>300	>300			>100						
2-meSATP	1	3	0,3	10-100	10	10	1	1	7	35		
ATP _γ S												
BzATP	3	30			>500	3						
Antagonistes (CI₅₀, μM)												
PPADS	1	1	1	>500	3	50	3-300	0,6	10			
Suramine	1	10	3	>500	4	500	30-100	1,6	10	6		
NF023	0,2	0,1	1	>100			1					
NF279	0,019	0,75	1,6	>300		>300						
TNP-ATP	0,006	1	0,001	15		>30	0,007	0,4	10			
IP5I	0,003	se	2,8	↑								
Calmidazolium						0,065						
A-317491	10	50	0,022	se(<10)	se(<10)	se(<10)	0,092					
Modulateurs allostériques (μM)												
Brillant blue G	>5 (antag.)	1,4 (antag.)	>10 (antag.)	>10 (antag.)	se	0,01	>10 (antag.)	>10 (antag.)				
Cibacron Blue	CI ₅₀ ≈0,7μM (block)	CI ₅₀ ≈0,7μM (block)	↑ > 30	0,25 (↑; block)								
Ivermectine		se	se	↑ 0,25		se				↑ (suggéré)		
éthanol		↓	se	↓ 58.10 ³								
Effets des ions (μM)												
Zn ²⁺		↑ 20		↑ <10 ↓ >30		↓ 10					↑ 6	
Ca ²⁺	Se >100.10 ³	↓ 87.10 ³	↓ 15.10 ³		↓ 7.10 ³	↓ 3.10 ³	↓ 15.10 ³	↑ plateau se sur pic				
Cu ²⁺		↑ 16		se 50		↓ 0,5						
Cd ²⁺ ; Mg ²⁺						↓ 500						
Gd ³⁺ ; La ³⁺	↓ 30	↓ 30										
H ⁺ (pK _a)	≈6,3 ↓	≈7,3 ↑	≈6,0 ↓	≈7,0 ↓		≈6,1 ↓	pH 6,3 : ↑ pH 8,3 : ↓	pH ≠ 7,3 ↓		pH < 6,3 ↓	↑pH[7,3-6,5] ↓pH < 6,5	

Tableau I- 4 : Tableau récapitulatif des propriétés cinétiques et pharmacologiques des récepteurs P2X recombinants.

(Adapté d'après North & Surprenant, 2000; Khakh et al., 2001, voir texte pour les références).

↑ : potentialisation ; ↓ : inhibition ; se : sans effet. Les cases vides indiquent des données absentes à ce jour.

Dans les tissus/cellules exprimant des récepteurs P2X, les techniques d'hybridation *in situ* permettent de détecter les ARN messagers des sous-unités P2X exprimées, et les marquages immunohistochimiques des différentes sous-unités P2X permettent *a priori* de savoir quelles sont les sous-unités qui sont exprimées à la membrane des cellules (bien que se pose le problème de la mauvaise spécificité des anticorps). Cependant, lorsque plusieurs sous-unités sont exprimées dans un même tissu, ces techniques ne permettent pas de déterminer la composition en sous-unités des types de récepteurs P2X exprimés. Or ce point est essentiel pour le ciblage pharmaco-thérapeutique éventuel de ces récepteurs. La caractérisation fonctionnelle des récepteurs P2X dans les systèmes natifs consiste donc à comparer les profils cinétiques et pharmacologiques des récepteurs étudiés avec ceux décrits dans la littérature pour les récepteurs recombinants exprimés dans des systèmes hétérologues. Les paragraphes suivants présentent les différents agonistes, antagonistes, et modulateurs allostériques des récepteurs P2X permettant parfois de discriminer entre ces différents récepteurs dans les modèles natifs.

a) Agonistes des récepteurs P2X

A l'exception de quelques analogues de la théobromine et de la théophylline (Fischer *et al.*, 1999), tous les agonistes des récepteurs P2X actuellement disponibles sont des parents de la famille des purines. Les concentrations en agoniste qui sont nécessaires pour obtenir la moitié du courant maximal (demi-concentration effective, ou CE_{50}) pour les différents sous-types récepteurs P2X sont indiquées dans le tableau I-4.

- **L'ATP :**

L'adénosine 5'-triphosphate (ATP) est l'agoniste naturel des récepteurs P2X. Elle active l'ensemble des récepteurs P2X exprimés dans des systèmes hétérologues, et la CE_{50} est en général inférieure à 30 μ M, à l'exception du récepteur homomérique P2X₇, pour lequel la CE_{50} est de l'ordre de 100 μ M (North, 2002). L'ATP est aussi un agoniste naturel des récepteurs métabotropiques P2Y (Ralevic & Burnstock, 1998) (voir Chap. III.B)).

☞ Dans notre étude, nous avons utilisé l'ATP pour activer l'ensemble des récepteurs P2X exprimés par les neurones de nos cultures de ganglions rachidiens. Nous avons également

utilisé l'ATP comme agoniste pour activer les récepteurs P2X₂ homomériques d'une lignée de cellule HEK transfectée pour exprimer ces récepteurs.

- **L'ADP :**

L'adénosine 5'-diphosphate (ADP) extracellulaire est issue de la dégradation enzymatique de l'ATP par des ectonucléotidases. C'est un agoniste des récepteurs P2Y (Ralevic & Burnstock, 1998), et elle est peu efficace sur les récepteurs P2X. Elle peut toutefois activer les récepteurs hétéromériques P2X_{1/5} avec une CE₅₀ de 10 μM, et se comporte comme un agoniste partiel des récepteurs homomériques P2X₁ et P2X₃ avec une CE₅₀ de 30 et 50 μM, respectivement (North & Surprenant, 2000).

- **L'αβméthylène-ATP :**

L'α,β-méthylène-adénosine 5'-triphosphate (αβmeATP) est un agoniste spécifique de certains récepteurs de l'ATP : elle est inefficace sur les récepteurs P2Y, et n'active que certains récepteurs P2X. D'autre part, l'αβmeATP inhibe l'action des ecto-ATPases (Chen & Lin, 1997). Cet agoniste permet d'étudier sélectivement l'activité des récepteurs homomériques P2X₁, P2X₃, et hétéromériques P2X_{2/3}, P2X_{1/5} (Ralevic & Burnstock, 1998; Haines *et al.*, 1999), et P2X_{4/6}, bien que la CE₅₀ pour ce dernier type soit plus élevée (Lê *et al.*, 1998a) (Cf. tableau I-4).

☞ Dans notre étude, nous avons utilisé l'αβmeATP pour activer une sous-population de récepteurs natifs exprimés dans les neurones du ganglion rachidien.

- **La L-β,γ-méthylène-ATP :**

La L-β,γ-méthylène-adénosine 5'-triphosphate (βγmeATP) est un agoniste sélectif des récepteurs homomériques P2X₁ (Evans *et al.*, 1995), et peut donc s'avérer utile pour différencier les réponses rapides des récepteurs homomériques P2X₁ de celles des récepteurs homomériques P2X₃. Elle est inactive sur les récepteurs P2Y (Simon *et al.*, 1995), et est résistante à l'action des ectonucléotidases (Cusack & Hourani, 1984).

- **La 2-méthylthioATP :**

La 2-méthylthioadénosine 5'-triphosphate (2-meSATP) est un agoniste des récepteurs P2X et sélective de certains P2Y (Ralevic & Burnstock, 1998). Elle peut être utilisée pour distinguer

les réponses des récepteurs homomériques P2X₁ (réponses P2X₁) des réponses P2X₃, car sa CE₅₀ est trois fois plus faible pour les récepteurs homomériques P2X₃ (300 nM pour P2X₃ vs 1 μM pour P2X₁). Concernant les récepteurs P2X présentant des réponses faiblement désensibilisantes, la CE₅₀ du 2-meSATP est du même ordre de grandeur (de l'ordre du micro molaire).

- **L'ATP_γS :**

L'adénosine 5'-O-(3-thiotriphosphate) (ATP_γS) a les mêmes actions que l'ATP sur les récepteurs homomériques P2X₁₋₅, et sur les récepteurs hétéromériques P2X_{2/3}, P2X_{1/5} et P2X_{2/6} (Collo *et al.*, 1996; Bianchi *et al.*, 1999b; Haines *et al.*, 1999; King *et al.*, 2000). En revanche, c'est un agoniste faible des récepteurs homomériques P2X₇, et partiel des récepteurs P2X_{4/6} (Chang *et al.*, 1995; Bogdanov *et al.*, 1998). L'ATP_γS est aussi agoniste de certains récepteurs P2Y. Son principal intérêt réside dans le fait qu'elle inhibe l'action des ectonucléotidases (Beukers *et al.*, 1995; Chen & Lin, 1997). Elle permet donc d'étudier les récepteurs P2X dans des tissus isolés exprimant ces enzymes à de fortes concentrations (Bailey & Hourani, 1995; Eltze & Ullrich, 1996).

- **La benzoylbenzoyl ATP :**

La 3'-benzoylbenzoyl adénosine 5'-triphosphate (BzATP) est l'agoniste le plus puissant des récepteurs homomériques P2X₇ (Ralevic & Burnstock, 1998; Bianchi *et al.*, 1999a). Cependant, elle active aussi d'autres récepteurs P2X, notamment les récepteurs P2X₁ et P2X₂ (Bianchi *et al.*, 1999b), ainsi que les récepteurs P2Y₁ et P2Y₁₁ (Communi *et al.*, 1999; Vigne *et al.*, 1999). La présence d'une réponse membranaire à l'application de BzATP dans les tissus natifs ne permet donc pas de conclure à la présence de récepteurs P2X₇ fonctionnels.

- **Les diadénosines polyphosphates :**

Les diadénosines polyphosphates (AP_nA, n=2-6) sont des ligands naturels de certains récepteurs P2X et P2Y. Leur activité pharmacologique et leur sélectivité dépend du nombre de groupements phosphates (n) de la molécule (Miras-Portugal *et al.*, 1999). Les AP₄A, AP₅A, et AP₆A, par exemple, sont des agonistes des récepteurs homomériques P2X₁, P2X₃ et P2X₄ mais n'activent pas les récepteurs P2X₂, P2X_{2/3} (Bianchi *et al.*, 1999b) et P2X_{2/6} (King *et al.*, 2000). Les diadénosines polyphosphates pourraient donc être utiles à l'identification fonctionnelle de certains récepteurs P2X dans des tissus natifs. Cependant, elles sont

rapidement inactivées par la dégradation enzymatique des ecto-diadénosine polyphosphate hydrolases endogènes : l'AP₅A, par exemple, est métabolisée en ATP + ADP, qui activent des récepteurs P2X et P2Y (Zimmermann & Braun, 1996; Miras-Portugal *et al.*, 1999).

b) Antagonistes des récepteurs P2X

- **Le PPADS :**

L'acide pyridoxalphosphate-6-azophényl-2',4'-disulphonique (PPADS) est historiquement le premier antagoniste spécifique décrit pour les récepteurs P2 (Lambrecht *et al.*, 1992). Il a été très largement utilisé pour déterminer fonctionnellement la présence de récepteurs P2 dans de nombreux tissus (Lambrecht, 1996; Ralevic & Burnstock, 1998). Cependant il a d'abord été décrit en 1992 comme un antagoniste sélectif des récepteurs P2X₁, avant d'être considéré comme un inhibiteur non sélectif (mais non universel) des récepteurs P2 (Ralevic & Burnstock, 1998). Les interprétations des études fonctionnelles initiales des récepteurs P2X natifs réalisées à l'aide du PPADS sont donc à considérer avec prudence. Le PPADS bloque les récepteurs P2Y₁ (voir Chap. III. B)), ainsi que les récepteurs P2X₁₋₃, P2X₅ et P2X_{2/3}, avec une CI₅₀ (concentration pour laquelle 50 % de l'inhibition est observée) qui se situe entre 0,1 et 5 µM (Ralevic & Burnstock, 1998). Par contre, son action est faible ou inefficace sur les récepteurs homomériques P2X₄, P2X₇, et hétéromériques P2X_{4/6} (Ralevic & Burnstock, 1998). De façon intéressante, une étude réalisée sur des récepteurs homomériques recombinants P2X₄ humains a montré que ces récepteurs étaient sensibles au blocage par le PPADS (Garcia-Guzman *et al.*, 1997). Concernant les récepteurs hétéromériques P2X_{1/5}, il inhibe la phase rapide de la réponse à l'ATP avec une CI₅₀ d'environ 1 µM, mais, à une concentration de 100 nM, il potentialise la phase de plateau de ces réponses (Surprenant *et al.*, 2000). D'autre part, il est notable qu'à de fortes concentrations (20-100 µM), le PPADS inhibe l'activité des ecto-ATPases, et peut donc augmenter les taux d'ATP extracellulaires (Chen *et al.*, 1996). Enfin, à des concentrations supérieures à 10 mM, des effets non spécifiques du PPADS, incluant l'inhibition de l'augmentation du calcium intracellulaire induite par l'IP₃ ont été observés (Vigne *et al.*, 1996).

D'autres molécules ont été fabriquées à partir du PPADS : l'acide pyridoxal-5'-phosphate-6-(2'-naphthylazo-6'-nitro-4',8'-disulfonique (PPNDS), est d'un intérêt particulier pour l'étude des récepteurs P2 dans les tissus car son action inhibitrice est 50 fois plus efficace sur les récepteurs P2X₁ que sur les récepteurs P2Y₁ (Lambrecht *et al.*, 2000).

- **La suramine :**

La suramine (acide 8-(3-benzamido-4-méthylbenzamido)-naphthalène-1,3,5-trisulfonique) est un composé polysulfonate se comportant comme antagoniste non sélectif de certains récepteurs P2X et P2Y (Ralevic & Burnstock, 1998). Tout comme le PPADS, la suramine bloque les récepteurs homomériques P2X₁₋₃, P2X₅, et hétéromériques P2X_{2/3}, P2X_{2/6} et P2X_{1/5}, et son activité est faible sur les récepteurs P2X₄, P2X₇, et P2X_{4/6} (Soto *et al.*, 1997; Lê *et al.*, 1998a; Ralevic & Burnstock, 1998; Haines *et al.*, 1999; Jones *et al.*, 2000; King *et al.*, 2000). Toutefois, la suramine interagit avec de nombreux autres récepteurs : elle inhibe les récepteurs GABA_A et les récepteurs du glutamate (Nakazawa *et al.*, 1995), les récepteurs de la sérotonine (5HT₃) (Briejer *et al.*, 1995), et les récepteurs nicotiques (Allgaier *et al.*, 1995). La suramine interagit également avec des protéines kinases, des protéases, certaines sous-unités de protéines G, ainsi que le *fibroblast growth factor* (FGF) et les ADN et ARN polymérases (pour revue, se référer à Voogd *et al.*, 1993). Enfin, la suramine est un inhibiteur des ectonucléotidases (Crack *et al.*, 1994; Chen *et al.*, 1996; Vigne *et al.*, 1996). Ces propriétés pharmacologiques limitent donc énormément l'utilisation de la suramine dans la caractérisation des récepteurs P2. C'est pourquoi de nombreux analogues de cette molécule ont été synthétisés, en vue d'augmenter la sélectivité vis-à-vis des différents sous-types de récepteurs P2 (Jacobson *et al.*, 1998).

- **Les analogues de la suramine :**

Parmi l'ensemble des analogues de la suramine, le NF023 et le NF279 ont été retenus.

Le NF023 est un antagoniste sélectif des récepteurs P2. A des concentrations de l'ordre de la dizaine de nanomolaires, il inhibe 50 % de l'activité des récepteurs P2X₁. Son efficacité sur les récepteurs homomériques P2X₃ et P2X₂ est environ 30 fois plus faible (Soto *et al.*, 1997). Concernant les récepteurs métabotropiques de l'ATP, la suramine inhibe les récepteurs P2Y₁, mais à des concentrations 10 fois plus élevées que pour les récepteurs P2X₁, et elle est inefficace sur les récepteurs P2Y₂, P2Y₄, et P2Y₆ (Lambrecht, 2000). Tout comme la suramine, le NF023 inhibe l'activité des ectonucléotidases, mais à des concentrations 100 à 1000 fois supérieures à celles induisant un blocage sélectif des récepteurs P2X₁.

Le NF279 inhibe de façon plus large les récepteurs P2X, sans agir sur les récepteurs P2Y. Sa CI₅₀ pour les récepteurs homomériques P2X₁, P2X₂, et P2X₃ est de l'ordre de la dizaine de nanomolaires (Klapperstuck *et al.*, 2000; Rettinger *et al.*, 2000), et à cette concentration, il est inactif sur les récepteurs P2X₄, P2X₇, et P2Y₁ (Lambrecht, 2000). Jusqu'à

100 μM , le NF279 n'a pas d'effet sur les récepteurs P2Y₂, P2Y₄, et P2Y₆ (Lambrecht, 2000). Il n'a pas non plus d'effet sur les ectonucléotidases (Damer *et al.*, 1998).

- **Le TNP-ATP**

Le 2',3'-O-trinitrophényl-adénosine triphosphate (TNP-ATP) est un inhibiteur non compétitif sélectif des récepteurs P2X₁, P2X₃, et P2X_{2/3} ayant des CI₅₀ de l'ordre du nanomolaire (Virginio *et al.*, 1998; Burgard *et al.*, 2000). Il inhibe également l'activité des récepteurs P2X_{1/5} avec une CI₅₀ de 200 nM. Le TNP-ATP est donc utile pour discriminer entre différents types de récepteurs P2X dans des cellules natives, bien que sa fluorescence naturelle rende impossible son utilisation en fluorimétrie. D'autre part, les actions du TNP-ATP sur d'autres récepteurs (incluant les récepteurs P2Y), et sa dégradation rapide par les ectonucléotidases limitent son utilisation dans les tissus natifs isolés (Lewis *et al.*, 1998).

☞ Dans notre étude, nous avons utilisé le TNP-ATP pour inhiber sélectivement l'activité des récepteurs P2X contenant la sous-unité P2X₃.

- **La diinosine pentaphosphate :**

A des concentrations de l'ordre de 10 nM, la diinosine pentaphosphate (IP₅I) est un inhibiteur sélectif des récepteurs homomériques P2X₁, et n'agit pas sur les récepteurs homomériques P2X₂ et P2X₃. D'autre part, elle potentialise l'activité des récepteurs P2X₄. Cette molécule peut donc s'avérer utile pour distinguer entre les récepteurs homomériques P2X₁ et P2X₃, qui induisent tous deux des réponses rapidement désensibilisantes, ainsi qu'entre les récepteurs homomériques P2X₂ et P2X₄, deux types de récepteurs que l'on ne peut pas non plus distinguer par leurs caractéristiques cinétiques. En revanche, la méconnaissance des actions de l'IP₅I sur d'autres types de récepteurs, ainsi que sa dégradation rapide par les ectonucléotidases endogènes rendent son utilisation délicate dans les préparations de tissus natifs (King *et al.*, 1999).

- **Le calmidazolium :**

Le calmidazolium est un bloquant des canaux activés par les nucléotides cycliques exprimés par les neurones du système olfactif (Kleene, 1994). Il est également connu pour bloquer les récepteurs-canaux P2X₇ recombinants à des concentrations très faibles (CI₅₀ = 15 nM),

lorsqu'ils sont activés par l'ATP ou le BzATP et uniquement lorsqu'ils sont dans un état non dilaté (Virginio *et al.*, 1997).

- **L'A317491 :**

L'A317491 est un antagoniste récemment mis au point (Jarvis *et al.*, 2002). Son action est rapide, réversible, et sélective des récepteurs homomériques P2X₃ et hétéromériques P2X_{2/3} recombinants d'humain et de rat. Son affinité pour ces deux sous-types de récepteurs est 100 fois supérieure à celle pour les autres récepteurs P2X, et il est sans effet sur la majorité des autres récepteurs membranaires connus. Du fait de sa nature non nucléotidique, il n'est pas dégradé par les ectonucléotidases, et d'autre part, il ne modifie pas leur activité (Jarvis *et al.*, 2002). Ces propriétés en font un antagoniste très utile pour la caractérisation fonctionnelle des récepteurs P2X natifs dans des modèles de culture ou de tranches, ou bien *in vivo*, et en particulier dans les neurones sensoriels primaires, dans lesquels les récepteurs P2X₃ et P2X_{2/3} sont très exprimés (voir chap. III. 3) et 4a)).

c) Modulateurs allostériques

- **Le Brilliant Blue G :**

Le Brilliant Blue G (Bleu de Coomassie) est un antagoniste non compétitif non sélectif des récepteurs P2X₁₋₄, P2X₇, P2X_{1/5}, P2X_{2/3} et P2X_{2/6} (Soltoff *et al.*, 1989). Son action sur les récepteurs P2X₅ et P2X_{4/6} n'a pas été testée. Son principal intérêt réside dans le fait que sa CI₅₀ pour les récepteurs P2X₇, sur lequel il exerce une action vraisemblablement de type allostérique, est 100 à 1000 fois inférieure à celle observée pour les autres sous-types de récepteurs P2X (Jiang *et al.*, 2000a). Il peut donc être utilisé pour mettre en évidence fonctionnellement la présence de récepteurs P2X₇ dans des préparations natives. L'un de ses inconvénients cependant tient dans la lenteur de la réversibilité de son action.

- **Le Cibacron Blue :**

Le Cibacron Blue (Reactive Blue 2) est un antagoniste de certains récepteurs P2X (CI₅₀=3-30 µM). Lorsqu'il est utilisé à de faibles concentrations (de l'ordre du micromolaire), il se comporte comme un modulateur allostérique positif des récepteurs homomériques P2X₄ de rat (Miller *et al.*, 1998), et P2X₃ humains recombinants (Alexander *et*

al., 1999). D'autre part, il facilite la sortie de l'état désensibilisé des récepteurs P2X₃ humains (Alexander *et al.*, 1999). A des concentrations plus élevées, le *Cibacron Blue* se comporte comme un antagoniste faible des récepteurs P2X₄ murins (CI₅₀>300 μM) (Miller *et al.*, 1998), mais cette propriété n'a pas été observée avec les récepteurs P2X₄ humains (Garcia-Guzman *et al.*, 1997). Tout comme la suramine, le *Cibacron Blue* interagit avec d'autres récepteurs que les récepteurs P2X à des concentrations de l'ordre de la dizaine de micromolaires : c'est un antagoniste des récepteurs GABA_A et des récepteurs du glutamate (AMPA et Kainate), ce qui limite son utilisation pour étudier fonctionnellement les récepteurs P2X dans des préparations tissulaires ou *in vivo* (Nakazawa *et al.*, 1995). D'autre part, comme le PPADS et la suramine, le *Reactive Blue 2* inhibe l'activité des ecto-ATPases (Chen *et al.*, 1996).

- **L'ivermectine :**

L'ivermectine est un agoniste des canaux chlorure activés par le glutamate exprimés chez les invertébrés (Cully *et al.*, 1994). C'est aussi un modulateur allostérique des récepteurs GABA_A (Krusek & Zemkova, 1994), et des récepteurs nicotiques α₇ (Krause *et al.*, 1998) chez les mammifères. Concernant les récepteurs P2X, l'ivermectine exerce une action allostérique positive, rapide et réversible sur les récepteurs homomériques P2X₄ et probablement sur les récepteurs hétéromériques P2X_{4/6}. Elle n'a pas d'effet sur les récepteurs homomériques P2X₂, P2X₃, P2X₇ et hétéromériques P2X_{2/3} (Khakh *et al.*, 1999b). Ces propriétés la rendent donc utilisable pour déterminer la présence de récepteurs contenant la sous-unité P2X₄ dans des tissus ou des cultures de cellules natives, bien que son action sur les récepteurs P2X₅, P2X_{1/5} et P2X_{2/6} mérite d'être examinée.

☞ Dans notre étude, nous avons utilisé l'ivermectine pour déterminer la présence éventuelle de récepteurs P2X_{4/6} parmi les récepteurs P2X activés par l'αβme-ATP dans des neurones du ganglion rachidien en culture.

- **L'éthanol :**

L'éthanol agit comme un modulateur allostérique négatif sur les récepteurs P2X₂ et P2X₄ exprimés dans des ovocytes de xénope. Il est par contre sans effet sur les récepteurs P2X₃ (Xiong *et al.*, 2000; Davies *et al.*, 2002).

- **Le toluène :**

Le toluène est un solvant inorganique connu pour ses effets toxiques sur le système nerveux central. Il a récemment été montré que le toluène est également un modulateur allostérique positif des récepteurs homomériques P2X₂ et P2X₄, et hétéromériques P2X_{2/3}. Par contre, son action sur les récepteurs homomériques P2X₃ est inhibitrice (Woodward *et al.*, 2004).

d) Sensibilité aux cations

Certains cations agissent également comme des modulateurs allostériques des récepteurs P2X. Les cations divalents et trivalents sont les plus nombreux : Ca²⁺, Zn²⁺, Cd²⁺, Mg²⁺, Gd³⁺ et La³⁺ modulent différenciellement l'activité des récepteurs P2X selon leur composition en sous-unités (Nakazawa *et al.*, 1997; Virginio *et al.*, 1997; Dunn *et al.*, 2001). Ces propriétés peuvent être utiles pour discriminer entre les différents récepteurs P2X exprimés dans des cellules natives mises en culture. Les ions Ca²⁺ extracellulaires, par exemple, inhibent l'activité des récepteurs homomériques P2X₃ mais sont sans effet sur les courants portés par les récepteurs homomériques P2X₁. Ils peuvent par conséquent permettre de discriminer entre les réponses rapides de ces deux types de récepteurs.

e) Sensibilité au pH

Les protons sont eux aussi des modulateurs allostériques de certains récepteurs P2X : l'acidification du pH extracellulaire (pH_e) à un pH 6.4 potentialise sélectivement les courants induits par l'activation des récepteurs contenant la sous-unité P2X₂, et inhibe les courants induits par l'activation des récepteurs P2X₁, P2X₃, P2X₄ (Stoop *et al.*, 1997), P2X_{1/5} (Surprenant *et al.*, 2000), et P2X₇ (Virginio *et al.*, 1997).

☞ Dans notre étude, nous avons utilisé les effets du pH_e acide pour distinguer fonctionnellement les neurones exprimant des récepteurs P2X contenant la sous-unité P2X₂ (cf. résultats chap. III. B)).

4) Rôles des récepteurs P2X dans la nociception

a) Localisation des récepteurs P2X dans les neurones sensoriels primaires

ARN messenger et protéine :

Nous décrivons ici la localisation au niveau cellulaire des différentes sous-unités P2X exprimées par les neurones du ganglion rachidien, qui ont servi de modèle pour ce travail de thèse. L'expression des sous-unités P2X dans les autres ganglions sensoriels est simplement mentionnée dans le tableau I-5

- **Corps cellulaire des neurones du ganglion rachidien :**

Dans les ganglions rachidiens (Dorsal Root Ganglia, DRG), les ARN messagers des sous-unités P2X₁ à P2X₆ ont été détectés, la sous-unité P2X₃ étant la plus fortement exprimée (Chen *et al.*, 1995a; Lewis *et al.*, 1995). Le même profil d'expression est retrouvé par des expériences d'immunocytochimie. L'immunoréactivité de la sous-unité P2X₃ est principalement détectée dans une sous-population de neurones dont les corps cellulaires sont de petit et moyen diamètres, et est absente dans la plupart des neurones de gros diamètre (Vulchanova *et al.*, 1997; Bradbury *et al.*, 1998; Vulchanova *et al.*, 1998; Xiang *et al.*, 1998a; Novakovic *et al.*, 1999). En fait, la sous-unité P2X₃ semble être localisée préférentiellement dans les nocicepteurs non peptidergiques qui lient l'isolectine B4. Son expression est fortement réduite par un traitement néonatal à la capsaïcine (Bradbury *et al.*, 1998; Vulchanova *et al.*, 1998). Il en est de même pour son ARN messenger (Chen *et al.*, 1995a).

L'immunoréactivité pour la sous-unité P2X₂ est également présente dans de nombreux neurones de petit et gros diamètres. Elle est parfois co-localisée avec l'immunoréactivité de la sous-unité P2X₃, mais pas systématiquement (Vulchanova *et al.*, 1997).

Les protéines des sous-unités P2X₁ et P2X₄₋₆ sont quant à elles détectées à des niveaux variables dans les corps cellulaires des neurones du ganglion rachidien, quel que soit leur diamètre.

- **Terminaison centrale des axones des neurones du ganglion rachidien :**

Dans la moelle épinière, l'immunoréactivité de la sous-unité P2X₃ est présente sur les terminaisons des axones des neurones du ganglion rachidien qui se terminent dans la lamina II interne de la corne dorsale (Vulchanova *et al.*, 1997; Bradbury *et al.*, 1998; Llewellyn-Smith & Burnstock, 1998)

L'immunoréactivité pour la sous-unité P2X₂ est également trouvée sur les terminaisons des neurones du ganglion rachidien dans la lamina II interne de la corne dorsale de la moelle épinière, ainsi que dans les axones se terminant dans les couches plus profondes. Il est intéressant de noter que, contrairement à la situation rencontrée dans les corps cellulaires, cette sous-unité semble rarement être co-localisée avec la sous-unité P2X₃ au niveau des terminaisons des nocicepteurs dans la partie interne de la lamina II (Vulchanova *et al.*, 1997).

- **Terminaison périphérique des axones des neurones du ganglion rachidien :**

Chez le rat et la souris, l'immunoréactivité pour la sous-unité P2X₃ est présente dans les terminaisons des fibres de la peau glabre. Ces fibres s'y étendent superficiellement et se terminent dans l'épiderme. Elle est également détectée dans les terminaisons de l'urothélium de la vessie et dans l'épithélium de la cornée (Vulchanova *et al.*, 1998; Novakovic *et al.*, 1999). Au contraire, les afférences innervant les muscles ont une immunoréactivité très faible pour la sous-unité P2X₃ (Cook *et al.*, 1997; Bradbury *et al.*, 1998). Il existe un degré élevé de co-localisation de la sous-unité P2X₃ avec le récepteur TRP-V1 (voir Chapitre II) aux terminaisons des neurones sensoriels primaires (Guo *et al.*, 1999).

Structure		Corps cellulaire	Terminaison centrale	Terminaison périphérique
Ganglion rachidien (DRG)	protéine	<ul style="list-style-type: none"> • I.R. P2X₃ : forte expression dans les neurones de faible et moyen diamètre, non peptidergiques liant l'IB4 • I.R. P2X₂ : présente dans la plupart des neurones de faible et de gros diamètre • I.R. P2X₁, P2X_{4,5,6} : dans quelques cellules, niveau relativement bas 	<ul style="list-style-type: none"> • I.R. P2X₃ : présente dans les neurones terminant dans la lamina II interne de la corne dorsale • I.R. P2X₂ : présente dans les neurones terminant dans la lamina II et dans les couches plus profondes de la corne dorsale. Peu de co-localisation avec P2X₃ 	I.R. P2X ₃ observée sur les fibres nerveuses dans l'épiderme de la peau glabre, et dans l'urothélium de la vessie
	ARNm	P2X ₁₋₆ détectés, le niveau de P2X ₃ étant le plus élevé		
Ganglion trijumeau	protéine	<ul style="list-style-type: none"> • I.R. P2X₃ : présente dans les neurones de faible et de gros diamètre • I.R. P2X_{1,2,4,5,6} : niveaux variables, plus faibles que celui de la sous-unité P2X₃ 	I.R. P2X ₂ et P2X ₃ présentes dans le noyau spinal du trijumeau	I.R. P2X ₃ visible dans les terminaisons sensorielles au niveau de la pulpe dentaire et dans les papilles caliciformes de la langue
	ARNm	P2X ₁₋₆ détectés		
Ganglion noueux	protéine	I.R. P2X ₂ et P2X ₃ co-localisées	I.R. P2X ₂ et P2X ₃ co-localisées dans le noyau du tractus solitaire	
	ARNm	P2X _{1,2,3,4} détectés Co-localisations dans quelques neurones		
Ganglion pétreux	protéine	I.R. P2X ₂ présente		
	ARNm			
Noyau mésencéphalique du trijumeau	protéine	I.R. P2X ₂ présente		
	ARNm	P2X _{2,4,5,6} détectés		

Tableau I- 5 : Distribution des ARN messagers (ARNm) et de l'immunoréactivité (I.R.) des sous-unités P2X dans les neurones sensoriels de rat.

(D'après Dunn et al., 2001).

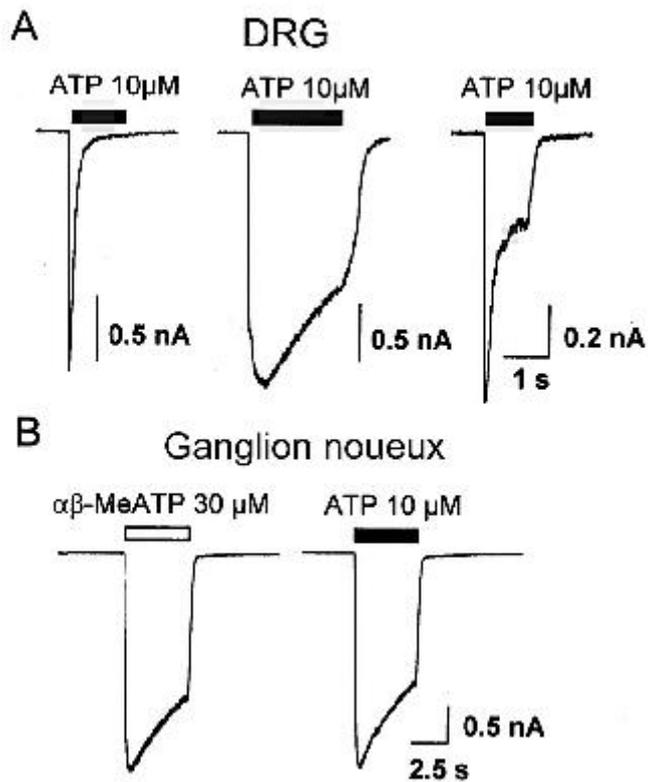


Figure I- 10 : Réponses membranaires de neurones sensoriels de rat néonataux à l'ATP et à l' α,β -méthylène-ATP ($\alpha\beta$ me-ATP).

A. Applications locales d'ATP 10 μ M sur différents neurones du ganglion rachidien (DRG) en culture, enregistrés en *patch-clamp* en configuration « cellule-entière ». Suivant le neurone enregistré, les réponses à l'ATP ont des propriétés cinétiques différentes. A gauche, une réponse de type R (rapidement désensibilisante), au milieu, une réponse de type ND (faiblement ou non désensibilisante), et à droite, une réponse de type M (mixte, comprenant les deux types de réponses précédents).

B. Dans les neurones du ganglion noueux, l' $\alpha\beta$ meATP 30 μ M et l'ATP 10 μ M induisent des réponses de type ND.

(D'après Dunn et al., 2001).

Etudes fonctionnelles :

Des enregistrements de *patch-clamp* en configuration « cellule-entière » ont permis de montrer qu'il existe trois types de réponses à l'ATP (10 μ M) dans les neurones du ganglion rachidien et les neurones du ganglion trijumeau (figure I-10). Ces réponses se distinguent par leur cinétique de désensibilisation : des réponses rapidement désensibilisantes (R) ayant la forme d'un pic, des réponses faiblement désensibilisantes (ou non désensibilisantes, ND) qui présentent un plateau pendant toute la durée de l'application, et des réponses mixtes (M), composées d'une phase transitoire et d'une phase en plateau de plus faible intensité (Cook & McCleskey, 1997; Burgard *et al.*, 1999; Grubb & Evans, 1999; Li *et al.*, 1999; Ueno *et al.*, 1999; Petruska *et al.*, 2000b; Liu *et al.*, 2001). Cependant, ces trois types de réponses sont présents dans des proportions différentes selon les études. Le type R par exemple, peut représenter de 28 % à 80 % des réponses à l'ATP (Dunn *et al.*, 2001). Les trois types de réponses sont retrouvés dans les neurones du ganglion rachidien de rat embryonnaire, nouveau-né, et adulte.

Seuls les récepteurs homomériques P2X₁ et P2X₃ peuvent être responsables des réponses de type R, et de la phase rapide des réponses de type M (Torres *et al.*, 1998b; Lê *et al.*, 1999). D'autre part, dans les neurones du ganglion rachidien, l'ARNm et l'immunoréactivité de la sous-unité P2X₃ sont détectés à des niveaux beaucoup plus élevés que pour les autres sous-unités (Chen *et al.*, 1995a; Vulchanova *et al.*, 1997). Les réponses rapides à l'ATP dans les neurones de DRG sont sensibles à l'action antagoniste de la suramine, du PPADS, et du TNP-ATP (Burgard *et al.*, 1999; Li *et al.*, 1999; Ueno *et al.*, 1999; Petruska *et al.*, 2000b; Petruska *et al.*, 2000c). Par ailleurs, aucun courant présentant une phase rapide n'est enregistré en réponse à l'ATP chez des souris invalidées pour le gène de la sous-unité P2X₃ (Cockayne *et al.*, 2000; Souslova *et al.*, 2000). Ces données permettent de conclure que la sous-unité P2X₃ est responsable des réponses transitoires et de la phase rapide des réponses mixtes dans les neurones du ganglion rachidien.

Les réponses non désensibilisantes et la phase de plateau des réponse mixtes peuvent quant à elles être portées par de nombreux types de récepteurs P2X homomériques et hétéromériques. Toutefois, l'ARNm et l'immunoréactivité des sous-unités P2X₂ et P2X₃ sont plus fortes que pour les autres sous-unités P2X dans les neurones du ganglion rachidien (Vulchanova *et al.*, 1997), ce qui suggère que les réponses non désensibilisantes à l'ATP pourraient être dues à l'activation des récepteurs homomériques P2X₂ et hétéromériques P2X_{2/3} (Lewis *et al.*, 1995). Chez les souris invalidées pour le gène de la sous-unité P2X₃, une petite proportion de neurones du ganglion rachidien présente des réponses soutenues à l'ATP

et sont insensibles à l' $\alpha\beta$ meATP, ce qui suggère qu'elles sont en majorité portées par des récepteurs homomériques P2X₂. En revanche, l'absence de différence entre la proportion des neurones présentant une réponse non désensibilisante à l'ATP chez des souris invalidées pour le gène de la sous-unité P2X₃ par rapport aux souris sauvages (Cockayne *et al.*, 2000) suggère la participation d'autres sous-types de récepteurs P2X dans la composition des réponses en plateau. Mais il est également possible qu'il y ait une surexpression d'autres sous-types de récepteurs P2X chez les souris mutantes dans le but de compenser l'absence de la sous-unité P2X₃. D'autres études suggèrent au contraire que les récepteurs P2X_{2/3} sont majoritairement responsables des réponses faiblement désensibilisantes, car presque tous les neurones de DRG répondent à l' $\alpha\beta$ meATP (10 μ M), et presque toutes ces réponses à l' $\alpha\beta$ meATP sont potentialisées par l'acidification du pH extracellulaire (Burgard *et al.*, 1999).

Les réponses de type M et ND à l'ATP sont principalement enregistrées dans des neurones de diamètre intermédiaire et qui sont insensibles à la capsaïcine (Burgard *et al.*, 1999; Grubb & Evans, 1999; Li *et al.*, 1999; Ueno *et al.*, 1999; Petruska *et al.*, 2000b; Petruska *et al.*, 2000c).

b) Localisation des récepteurs P2X dans les neurones de la corne dorsale de la moelle épinière

Dans la corne dorsale de la moelle épinière, Les ARN messagers des sous-unités P2X₄ et P2X₆ sont détectés dans les couches les plus superficielles (laminae I et II), tandis que l'ARNm de la sous-unité P2X₂ est détecté uniquement dans la lamina II (Collo *et al.*, 1996). Différentes combinaisons de récepteurs homomériques ou hétérotrimériques sont donc possibles à partir de ces trois sous-unités, à l'exception du récepteur homomérique P2X₆ et du récepteur hétéromérique P2X_{2/4} qui semblent ne pas pouvoir exister (Torres *et al.*, 1999). Les réponses à l'ATP enregistrées dans les neurones fraîchement dissociés de la corne dorsale de la moelle épinière sont de type ND, et sont insensibles à l' $\alpha\beta$ meATP (Bardoni *et al.*, 1997; Hugel & Schlichter, 2000).

c) Les récepteurs P2X à différentes étapes de la nociception

Détection du message nociceptif :

L'application par iontophorèse d'ATP sur la peau de l'avant-bras de volontaires humains induit une sensation de douleur de type brûlure après une vingtaine de secondes, et pendant plusieurs minutes (Hamilton *et al.*, 2000).

L'injection intra-articulaire ou l'injection d'ATP ou d' $\alpha\beta$ meATP intra-artérielle chez le rat anesthésié excite de façon rapide et transitoire les fibres C et A δ qui innervent l'articulation (Dowd *et al.*, 1998). Ces agonistes évoquent également des décharges dans les fibres du nerf trijumeau sensibles à la capsaïcine dans une préparation de langue de rat (Rong *et al.*, 2000). Ces données suggèrent donc que l'ATP est susceptible d'intervenir dans l'initiation du message nociceptif, via l'activation de récepteurs P2X.

Transmission du message nociceptif :

L'ATP peut aussi être libérée par les terminaisons centrales des neurones sensoriels primaires : dans une préparation de synaptosomes de la corne dorsale de la moelle épinière de rat, l'ATP peut être libérée de façon calcium-dépendante suite à l'exposition à des concentrations dépolarisantes de potassium (White *et al.*, 1985), ou à l'application de capsaïcine (Sweeney *et al.*, 1989), (cf. Chapitre II. C)). Lorsque ces expériences sont réalisées chez des rats ayant subi une rhizotomie dorsale, les quantités d'ATP libérées sont fortement réduites, mais de l'ATP reste libérable par le stimulus dépolarisant. Ceci indique que certains neurones de second ordre (neurones de la corne dorsale de la moelle épinière) peuvent également libérer de l'ATP (Sawynok *et al.*, 1993). L'ATP libérée dans la moelle épinière suite à une stimulation périphérique pourrait agir sur les récepteurs P2X présents présynaptiquement sur les terminaisons centrales des neurones sensoriels primaires, et sur les neurones de second ordre qui expriment des récepteurs P2X (cf. Chap. III 4) a) et b)).

Les cellules gliales de la moelle épinière pourraient constituer une autre source d'ATP extracellulaire, la libération d'ATP de façon basale par les astrocytes des hémisphères cérébraux de rat nouveau-nés ayant été démontrée (Queiroz *et al.*, 1997). De façon intéressante cette libération est fortement augmentée par des agonistes des récepteurs ionotropiques du glutamate.

Les récepteurs P2X₂ et P2X₃ exprimés aux terminaisons centrales des fibres sensorielles primaires fines dans la lamina II (*substantia gelatinosa*) de la moelle épinière

(Vulchanova *et al.*, 1996) ont une localisation présynaptique, ce qui suggère un rôle dans le contrôle de la libération des neurotransmetteurs. Li & Perl (1995) ont effectivement démontré que l'ATP appliquée sur des neurones de la *substantia gelatinosa* peut évoquer un courant entrant et potentialiser les courants induits par le glutamate. D'autre part, dans un modèle de co-culture, l'ATP appliquée sur les neurones du ganglion rachidien induit la libération de glutamate qui excite au niveau postsynaptique les neurones de la corne dorsale de la moelle épinière (Gu & MacDermott, 1997; Labrakakis *et al.*, 2000). Une autre étude réalisée sur des tranches de moelle épinière a montré que le PPADS, un antagoniste des récepteurs P2, peut inhiber les courants postsynaptiques excitateurs glutamatergiques des neurones de la corne dorsale évoqués par la stimulation des afférences primaires, en agissant sur des récepteurs P2X présynaptiques présents sur ces afférences (Li *et al.*, 1998). D'autre part, dans les laminae II et V de tranches de moelle épinière ayant conservé une partie des racines dorsales, l'application d' $\alpha\beta$ meATP et d'ARL67156 (un inhibiteur des ectonucléotidases) potentialise les courants postsynaptiques excitateurs évoqués par la stimulation des racines dorsales (Nakatsuka & Gu, 2001; Nakatsuka *et al.*, 2003).

La présence de récepteurs P2X dans les neurones de second ordre a également été démontrée (cf. III 4) b)). L'administration iontophorétique d'ATP *in vivo* excite les neurones de la corne dorsale de la moelle épinière du chat (Fyffe & Perl, 1984; Salter & Henry, 1985) et du noyau spinal du trijumeau chez le rat (Salt & Hill, 1983). De plus, l'application d'ATP induit un courant entrant dans des neurones de la corne dorsale de la moelle épinière de rat en culture (Jahr & Jessell, 1983; Hugel & Schlichter, 2000) ou fraîchement dissociés (Bardoni *et al.*, 1997; Rhee *et al.*, 2000). Des enregistrements en *patch-clamp* réalisées en culture ont démontré que la moitié des neurones des couches superficielles de la corne dorsale de la moelle épinière utilisent l'ATP comme neurotransmetteur rapide, en agissant sur des récepteurs sensibles à la suramine et au PPADS (Jo & Schlichter, 1999). De façon intéressante, tous ces neurones co-libèrent le neurotransmetteur inhibiteur GABA avec l'ATP, ce qui suggère que les interneurones GABAergiques sont une source importante d'ATP synaptique dans la moelle épinière. Les effets présynaptiques de l'ATP sur la libération du glutamate par les neurones sensoriels primaires et les effets excitateurs de l'ATP via les récepteurs P2X exprimés par les neurones de second ordre semblent indiquer que l'ATP jouerait un rôle facilitateur dans la transmission de l'information nociceptive. Cependant, il a été montré que l'ATP pouvait faciliter les courants postsynaptiques inhibiteurs spontanés glycinergiques (Rhee *et al.*, 2000) et GABAergiques (Hugel & Schlichter, 2000) dans des cultures de neurones de la corne dorsale. Ainsi, les composantes excitatrices et inhibitrices de

la transmission ATPergique pourraient constituer un équilibre dans la corne dorsale de la moelle épinière. Cet équilibre pourrait être perturbé dans des conditions de douleurs chroniques, connues pour engendrer par ailleurs et à plus long terme des changements morphologiques dans l'organisation de la corne dorsale de la moelle épinière.

L'ensemble de ces données suggère que l'ATP est susceptible d'intervenir dans la transmission du message douloureux, via l'activation de récepteurs P2X, et que le rôle excitateur/inhibiteur de l'ATP dans la corne dorsale de la moelle épinière pourrait dépendre des conditions physiopathologiques. Ce sujet est abordé plus en détail dans le travail de thèse de Sylvain Hugel réalisé dans le laboratoire (Hugel, 2002).

d) Rôles des récepteurs P2X dans les différents types de douleur

Lorsqu'elle est appliquée sur des plaies ou à proximité de certains nocicepteurs cutanés, l'ATP induit une sensation de douleur aiguë chez l'humain (Bleehen *et al.*, 1976; Bleehen & Keele, 1977). Lorsque l'ATP est injectée directement sous la peau du dos (Coutts *et al.*, 1981), ou de l'avant-bras, la douleur ressentie est interprétée comme une brûlure persistante, et son intensité est proportionnelle à la concentration d'ATP injectée (Hamilton *et al.*, 2000). Cette sensation semble être dépendante des neurones de DRG sensibles à la capsaïcine, et est fortement augmentée dans plusieurs modèles d'hyperalgésie (traitement aigu à la capsaïcine, irradiation aux rayons ultraviolets) (Hamilton *et al.*, 2000). Ces travaux ont suggéré l'implication de l'ATP dans la détection du message nociceptif, et de nombreuses études ont ensuite été entreprises sur des modèles *in vivo* afin de déterminer les rôles éventuels de l'ATP et des récepteurs P2X dans les différents types de douleurs (Burnstock, 1996). La première approche a naturellement consisté à utiliser des agonistes et antagonistes des récepteurs de l'ATP.

- Sous-unité P2X₃ et nociception :

Les études se sont rapidement focalisées sur les récepteurs incluant la sous-unité P2X₃, en raison de sa forte expression dans une sous-population de nocicepteurs, et de la régulation de son expression dans des modèles de douleurs inflammatoires et neuropathiques (North, 2004). Mais parallèlement à ces travaux, du fait de l'absence d'agonistes et d'antagonistes

capables de cibler individuellement les nombreux sous-types de récepteurs P2X présents sur les neurones du ganglion rachidien, deux autres approches ont été utilisées, ciblant spécifiquement les récepteurs contenant la sous-unité P2X₃ : une approche basée sur l'utilisation d'un oligonucléotide antisens spécifique de l'ARNm de cette sous-unité, et la création de souris invalidées pour le gène codant la sous-unité P2X₃.

- Utilisation d'agonistes et d'antagonistes des récepteurs P2X :

Nous avons décrit au paragraphe 3) Les propriétés des agonistes et antagonistes de l'ATP, et le lecteur pourra s'y référer si nécessaire.

Chez le rat, l' $\alpha\beta$ meATP (un agoniste non hydrolysable de certains récepteurs P2X, voir Chap. III A.3)) injectée dans la patte induit immédiatement un comportement de « léchage » de la patte (Bland-Ward & Humphrey, 1997; Tsuda *et al.*, 1999; Tsuda *et al.*, 2000). Cet effet est potentialisé par le cibacron blue, un modulateur allostérique positif des récepteurs P2X₃ et P2X_{2/3}, et inhibé par le TNP-ATP, un antagoniste des récepteurs P2X₁, P2X₃, et P2X_{2/3} (Jarvis *et al.*, 2001). L'injection sous-cutanée dans la patte postérieure d'un rat d'une solution composée de 0,5 à 15 % de formaldéhyde, une substance irritante et algogène, provoque au bout de quelques dizaines de minutes le retrait du sol de la patte injectée. Ce comportement est augmenté lors de la co-administration d' $\alpha\beta$ meATP avec le formaldéhyde, et l'effet est inhibé par la suramine et le PPADS (Sawynok & Reid, 1997).

Le TNP-ATP est aussi efficace dans l'abolition de la réponse « nocifensive » (réponse interprétée comme la tentative de fuir un stimulus nociceptif) à l'injection intra-abdominale d'acide acétique. L'inefficacité de l'IP₅I (un antagoniste sélectif des récepteurs incluant la sous-unité P2X₁) dans ce cas suggère l'implication de récepteurs incluant la sous-unité P2X₃ (Honore *et al.*, 2002b).

L'ATP et l' $\alpha\beta$ meATP, en plus d'induire un comportement « nocifensif », provoquent une hypersensibilité aux stimulus thermiques et mécaniques (Tsuda *et al.*, 2000). Chez l'humain, la douleur provoquée par l'ATP est considérablement augmentée lorsqu'une hyperalgésie a été préalablement induite et, de façon intéressante, la douleur induite par l'ATP semble dépendante des neurones sensibles à la capsaïcine (Hamilton *et al.*, 2000).

Le développement récent de l'A-317491, un antagoniste sélectif des récepteurs P2X contenant la sous-unité P2X₃, et propice à une utilisation chez l'animal, a permis de préciser l'implication des récepteurs contenant la sous-unité P2X₃ dans différents types de douleurs.

Cette molécule réduit l'hyperalgésie thermique associée à une inflammation induite par l'adjuvant complet de Freund (CFA), ainsi que l'allodynie mécanique observée lors d'une neuropathie chez le rat. De plus, l'A-317491 abolit totalement l'allodynie mécanique et l'hyperalgésie thermique chez le rat ayant subi une constriction chronique du nerf sciatique, et réduit de moitié l'allodynie tactile consécutive à la ligature du nerf spinal correspondant au territoire cutané étudié (Jarvis *et al.*, 2002).

- Utilisation d'oligonucléotides antisens dirigés contre l'ARNm de la sous-unité P2X₃ :

L'administration intrathécale durant 7 jours d'oligonucléotides anti-sens spécifiques de l'ARNm de la sous-unité P2X₃ des récepteurs de l'ATP permet de réduire de moitié l'expression de cette sous-unité dans les ganglions rachidiens (Barclay *et al.*, 2002; Honore *et al.*, 2002a). Chez les rats ayant subi ce traitement, on observe une réduction de l'allodynie mécanique induite par la ligature de l'un des nerfs spinaux (Honore *et al.*, 2002a), ainsi qu'une forte diminution de l'hyperalgésie thermique (Honore *et al.*, 2002a) et mécanique (Barclay *et al.*, 2002) lors de la phase chronique de l'inflammation induite par l'injection d' $\alpha\beta$ meATP ou de formaldéhyde dans la patte postérieure. Cependant, aucun effet n'a été observé dans un modèle d'inflammation aiguë induite par l'injection de carragénine (Barclay *et al.*, 2002; Honore *et al.*, 2002a).

- Souris invalidées pour le gène codant la sous-unité P2X₃ :

Deux groupes ont parallèlement créé et élevé des souris mutantes invalidées pour le gène de la sous-unité P2X₃ des récepteurs de l'ATP. Chez ces souris, la protéine de la sous-unité P2X₃ est indétectable dans les afférences primaires et dans les ganglions rachidiens et noueux (Cockayne *et al.*, 2000; Souslova *et al.*, 2000). Les auteurs ont observé une légère atténuation des comportements de « retrait » et de « léchage » de la patte postérieure quelques dizaines de minutes après l'injection d'une solution de formaldéhyde. En revanche, lorsque les effets comportementaux induits par l'injection d'adjuvant complet de Freund (Le Bars *et al.*, 2001) ont été étudiés, les auteurs ont observé une potentialisation de l'hyperalgésie thermique (Cockayne *et al.*, 2000). D'autre part, les souris invalidées pour le gène de la sous-unité P2X₃ ont des difficultés à vider leur vessie. Ce phénotype est dû à l'absence des récepteurs homomériques P2X₃ sur les terminaisons des fibres sensorielles bordant l'urothélium de la vessie. Ces fibres permettent de détecter la distension de la vessie lorsque

celle-ci se remplit, et provoquent en temps normal le réflexe de miction. Ce dernier point suggère un rôle plus général des récepteurs P2X₃ dans la détection de la distension des viscères dans l'organisme (Burnstock, 2001).

Ainsi, la plupart des études comportementales suggèrent un rôle de l'ATP et des récepteurs P2X incluant la sous-unité P2X₃ dans la nociception, en particulier dans les conditions d'**inflammation chronique** ou de **neuropathie**. D'autre part, la sous-unité P2X₃ est sur-exprimée chez le rat dans un modèle de douleur neuropathique (Novakovic *et al.*, 1999). Ces récepteurs ne semblent pas intervenir lors de la phase aiguë d'une inflammation.

- Sous-unité P2X₂ et nociception :

La sous-unité P2X₂ est elle aussi fortement exprimée dans les neurones sensoriels primaires, et elle peut soit former des récepteurs homomériques P2X₂, soit s'assembler avec la sous-unité P2X₃ pour former des récepteurs hétéromériques P2X_{2/3} ayant des propriétés cinétiques différentes des récepteurs homomériques P2X₂ et P2X₃ (Cf. A3)). Ces sous-types de récepteurs, pourraient avoir des rôles distincts dans la nociception consécutive à une inflammation chronique et à une neuropathie. Lors d'une injection intraplantaire d' $\alpha\beta$ meATP chez le rat, on observe une allodynie mécanique et une hyperalgésie. Compte tenu des propriétés pharmacologiques des récepteurs P2X et de leurs niveaux d'expression dans les neurones du ganglion rachidien, ces effets peuvent être dus aux récepteurs P2X₃ et/ou P2X_{2/3}. En éliminant sélectivement une sous-population de neurones du ganglion rachidien par un prétraitement néonatal à la capsaïcine, Tsuda *et al.*, (2000) ont montré que les neurones enregistrés ne présentaient presque plus de réponses rapides, caractéristiques des récepteurs homomériques P2X₃. Seules les réponses soutenues (dus vraisemblablement aux récepteurs homomériques P2X₂) persistent. Or chez les rats ayant subi ce traitement à la capsaïcine, seule l'allodynie mécanique semble être conservé lors des expériences d'injections intraplantaires d' $\alpha\beta$ meATP. Ces résultats suggèrent une implication des récepteurs hétéromériques P2X_{2/3} présents sur les fibres sensorielles primaires dans l'induction de d'allodynie mécanique.

Une autre étude réalisée par immunohistochimie suggère également l'implication de la sous-unité P2X₂ dans la nociception. En effet, après ligature lâche des nerfs L4 et L5, le niveau de la protéine P2X₂ passe de 23 % à 73 % dans les neurones du ganglion rachidien correspondant (Kim *et al.*, 2003). Aucun changement du niveau d'ARNm de cette protéine n'est cependant observé, ce qui suggère des mécanismes post-transcriptionnels.

La sous-unité P2X₂ semble donc jouer un rôle dans l'induction de l'allodynie mécanique associée aux douleurs aiguës.

- Sous-unité P2X₄ et nociception :

Deux études récentes ont montré un rôle des récepteurs P2X₄ dans le maintien de l'allodynie mécanique. Chez le rat, l'expression de la protéine P2X₄ est augmentée dès le lendemain, et fortement accrue entre le 7^{ème} et le 14^{ème} jour après ligature lâche du nerf spinal (L5). Cette augmentation est observée uniquement dans la microglie de la corne dorsale de la moelle épinière ipsilatérale, qui est hyper-activée suite à la ligature (Inoue *et al.*, 2004). De façon intéressante, l'allodynie tactile observée consécutivement à la lésion nerveuse peut être réversée par un blocage des récepteurs P2X₄ ainsi que par l'administration intraspinale d'un oligonucléotide antisens de la sous-unité P2X₄ (Tsuda *et al.*, 2003).

Ainsi, l'allodynie tactile observée plusieurs jours après une lésion nerveuse périphérique semble mettre en jeu une activation de la microglie spinale, et impliquer l'augmentation de l'expression de récepteurs P2X₄ dans cette microglie.

- Sous-unité P2X₇ et nociception :

Le blocage pharmacologique sélectif des récepteurs homomériques P2X₇ permet de réverser la réponse comportementale nociceptive observée suite à l'induction d'une inflammation par l'administration d'adjuvant complet de Freund chez le rat (Dell'Antonio *et al.*, 2002a). Les mêmes observations ont été faites chez des rats arthritiques (Dell'Antonio *et al.*, 2002b). Cet effet semble être dû à l'inhibition de la libération d'ATP qui a normalement lieu en périphérie lors de la réaction inflammatoire, et qui est stimulée par l'activation des récepteurs P2X₇. Cet effet ne semble pas impliquer les récepteurs P2X₇ exprimés par les cellules immunitaires. Les auteurs suggèrent que l'effet antinociceptif serait dû au blocage des récepteurs P2X₇ exprimé par les cellules endothéliales. Les auteurs suggèrent également que les récepteurs P2X₇ pourraient être situés sur les terminaisons nerveuses. Il faut cependant rappeler que ni l'ARNm de ce récepteur, ni sa protéine n'ont été détectés dans les neurones sensoriels primaires.

Les récepteurs P2X₇ semblent donc également impliqués dans la nociception. Leur action s'effectuerait en périphérie, principalement via des phénomènes accompagnant l'inflammation consécutive à une lésion.

L'ensemble de ces travaux a permis de mettre en évidence l'importance des récepteurs P2X dans différents types de douleur (tableau I-6). Toutefois, l'ATP active également un autre type de récepteurs P2 : les récepteurs métabotropiques P2Y.

Modèle de douleur	Type de douleur	Récepteur P2X éventuellement impliqué	Localisation
Inflammation chronique. Neuropathie	hyperalgésie thermique, mécanique. allodynie mécanique	P2X ₃	Neurones sensoriels primaires
Aiguë	allodynie mécanique (induction)	P2X _{2/3}	Terminaisons périphériques des nsp
Neuropathie	allodynie tactile (maintien)	P2X ₄	Cellules microgliales activées de la corne dorsale de la moelle épinière
Inflammation	Hyperalgésie mécanique	P2X ₇	Cellules endothéliales à proximité de la lésion

Tableau I-6 : Rôles suggérés des récepteurs P2X dans différents types de douleurs.
nsp : neurones sensoriels primaires.

B. Les récepteurs P2Y

Les récepteurs P2Y appartiennent à la superfamille des récepteurs à 7 domaines transmembranaires couplés aux protéines G. Ils sont activés par des purines (ATP et ADP) et par des pyrimidines (UTP et UDP), avec des sensibilités différentes selon le sous-type de récepteur (Abbracchio & Burnstock, 1994), avec une exception pour le récepteur P2Y₁₄, qui n'est activé que par l'UDP-glucose (Abbracchio *et al.*, 2003). Comme dans le cas des récepteurs P2X, certains sous-types de récepteurs P2Y sont bloqués par la suramine (P2Y_{2,6,11}), le PPADS (P2Y₄ et 6), et le reactive blue 2 (P2Y₆ et 11). Les récepteurs P2Y sont numérotés selon leur ordre chronologique de clonage dans les tissus de différents organismes

(de P2Y₁ à P2Y_n). Ainsi, 25 séquences individuelles encodent des récepteurs P2Y fonctionnels dans de nombreuses espèces animales.

Les paragraphes qui suivent décrivent brièvement les récepteurs P2Y, leur distribution dans l'organisme, et leurs rôles dans la nociception (von Kugelgen & Wetter, 2000; Sak & Webb, 2002)

1) Voies de transduction des récepteurs P2Y

Les récepteurs P2Y sont des récepteurs métabotropiques couplés à une protéine G, et leur activation aboutit à une augmentation ou à une diminution de la concentration en calcium libre intracellulaire, selon le sous-type concerné.

Ainsi, les récepteurs recombinants humains P2Y₁, 2, 4 et 6 sont couplés à une protéine G_{q/11} qui active la voie de la phospholipase C-β et permet la libération de calcium à partir des stocks intracellulaires et la stimulation d'une protéine kinase C (Chen *et al.*, 1995b). Le récepteur P2Y₁₁ active également la phospholipase C, mais aussi l'adénylate cyclase, par son couplage avec une protéine G_s (Communi *et al.*, 1999). L'activation de ces récepteurs augmente donc le calcium intracellulaire. Au contraire, les récepteurs P2Y₁₂ (Hollopeter *et al.*, 2001; Zhang *et al.*, 2001), P2Y₁₃ (Zhang *et al.*, 2002) et P2Y₁₄, (Wittenberger *et al.*, 2001; Abbracchio *et al.*, 2003) sont couplés à une protéine G_i et leur activation diminue le calcium libre intracellulaire.

Sous-type de récepteur P2Y	couplage	Agonistes naturels
P2Y ₁	G _q → +PLC	ADP > ATP >> UDP, UTP
P2Y ₂	G _q → +PLC	ATP = UTP >> ADP, UDP
P2Y ₄	G _q → +PLC	UTP >> ATP >> >> UDP, ADP ^(h) UTP = ATP >> UDP, ADP ^(r)
P2Y ₆	G _q → +PLC	UDP > UTP > ADP >> ATP
P2Y ₁₁	G _q → +PLC ; G _s → +AC	ADP > ATP >> UDP, UTP
P2Y ₁₂	G _i → -AC	ADP > ATP >> UDP, UTP
P2Y ₁₃	G _i → -AC	ADP > ATP >> UDP, UTP
P2Y ₁₄	G _i → -AC	UDP-glucose >> UTP, ATP, UDP, ADP

Tableau I- 7: Voies de signalisation intracellulaires et agonistes naturels des récepteurs P2Y (par ordre d'efficacité).

^(h)chez l'humain ; ^(r) chez le rongeur.

(D'après Dubyak, 2003).

2) Localisation des récepteurs P2Y

Huit sous-types de récepteurs P2Y sont présents chez les mammifères : P2Y_{1,2,4,6,11-14} (Abbracchio *et al.*, 2003; Illes & Alexandre Ribeiro, 2004). Ces récepteurs sont exprimés dans de nombreux épithéliums (parois des voies aériennes, intestin, reins, glandes exocrines, ...) où ils semblent jouer un rôle dans la régulation des flux ioniques (Dubyak, 2003). Les ARNm des récepteurs P2Y_{1,6,11-14} ont été détectés dans le système nerveux central par RT-PCR, et ceux codant les récepteurs P2Y_{1, 2, 4 et 6} ont été détectés dans les neurones sensoriels primaires de faible et gros diamètre (Moore *et al.*, 2001; Abbracchio *et al.*, 2003). De plus, des augmentations de calcium libre intracellulaire en réponse à l'UTP ont été mesurées dans les neurones sensoriels (Sanada *et al.*, 2002). L'ARNm du récepteur P2Y₂ est présent dans environ 77 % des neurones du ganglion rachidien de rat. Cette population représente 90 % des neurones de faible diamètre, et 39 % des neurones de gros diamètre (Molliver *et al.*, 2002). L'ARNm du récepteur P2Y₁ a été détecté par hybridation *in situ* dans environ 20 % des neurones du ganglion rachidien de rat, principalement dans les neurones de gros diamètre (Xiao *et al.*, 2002). Cette observation peut être mise en relation avec une étude suggérant un rôle de ces récepteurs dans la sensibilité tactile non nociceptive chez la grenouille (Nakamura & Strittmatter, 1996)

Sous-type de récepteur P2Y	localisation
P2Y ₁	Vaste, incluant Plaquettes, cœur, muscle squelettique, tissu neuronal, appareil digestif
P2Y ₂	Vaste, incluant poumon, cœur, muscle squelettique, rate, rein
P2Y ₄	Placenta, poumon, muscles lisses des parois vasculaires
P2Y ₆	Vaste, incluant poumon, cœur, aorte, rate, placenta, thymus, intestin, cerveau
P2Y ₁₁	Rate, intestin, cellules du système immunitaire
P2Y ₁₂	Plaquettes sanguines, cerveau
P2Y ₁₃	Rate, leucocytes, moelle osseuse, placenta, foie, cerveau
P2Y ₁₄	Placenta, tissu adipeux, estomac, intestin

Tableau I- 8 : Distribution tissulaire des ARNm des récepteurs P2Y chez l'humain et le rat.
(Adapté d'après von Kugelgen & Wetter, 2000; Abbracchio *et al.*, 2003; Illes & Alexandre Ribeiro, 2004).

3) Rôles des récepteurs P2Y dans la nociception

Quelques études récentes suggèrent un rôle de certains sous-types de récepteurs P2Y dans la nociception. Ainsi, les récepteurs P2Y₁ augmentent l'excitabilité des neurones du ganglion rachidien de faible diamètre en diminuant l'amplitude et la durée de la phase d'hyperpolarisation du potentiel d'action (Usachev *et al.*, 2002). L'ARNm de ces récepteurs n'est détecté que dans 20 % des neurones du ganglion rachidien en conditions non pathologiques, mais augmente jusqu'à 70 % entre la deuxième et la quatrième semaine suivant la section du nerf sciatique chez le rat (Xiao *et al.*, 2002), ce qui rappelle le phénomène observé avec les récepteurs P2X₃ (qui sont régulés positivement lors d'une neuropathie, Novakovic *et al.*, 1999). Les récepteurs P2Y₂ peuvent également augmenter l'excitabilité des neurones du ganglion rachidien chez le rat : ils semblent responsables de la dépolarisation, induite par l'application d'UTP (Molliver *et al.*, 2002), et seraient impliqués dans la baisse de la température d'activation des récepteurs à la capsaïcine (Tominaga *et al.*, 2001; Moriyama *et al.*, 2003). D'autre part, en plus de leur rôle à court terme sur l'excitabilité des neurones sensoriels, les récepteurs P2Y₂ peuvent activer sélectivement, dans des neurones du ganglion rachidien de faible diamètre et non myélinisés, le *cAMP Responsive Element Binding protein* (CREB), un facteur de transcription impliqué dans le changement de phénotype des neurones sensoriels et activé en réponse à une lésion ou à une inflammation (Molliver *et al.*, 2002).

Ainsi, il semble que les récepteurs P2Y₁ et P2Y₂ exprimés par les neurones sensoriels primaires puissent jouer un rôle pro-nociceptif et intervenir dans la plasticité de ces neurones dans des conditions de pathologie nerveuse.

En revanche, l'application intrathécale d'UTP et d'UDP chez des rats ayant subi une section du nerf sciatique se révèle être anti-nociceptive. Les récepteurs P2Y impliqués dans ce mécanisme semblent être d'un sous-type différent (vraisemblablement P2Y₆), le site d'action (présynaptique, sur les neurones sensoriels primaires ou postsynaptique, sur les neurones de second ordre de la corne dorsale) restant à déterminer (Okada *et al.*, 2002).

C. Les récepteurs de l'adénosine

Les récepteurs de l'adénosine ne sont pas activés par l'ATP, mais peuvent être activés consécutivement à la libération d'ATP dans le milieu extracellulaire, celle-ci étant rapidement dégradée en ADP, AMP, puis en adénosine par plusieurs groupes d'ecto-enzymes extracellulaires, associées aux membranes des cellules (Zimmermann, 2000). D'autre part, l'adénosine peut être sécrétée par la plupart des types cellulaires, y compris les neurones et les cellules gliales, et, dans certains tissus, elle est maintenue à des taux extracellulaires élevés par le fonctionnement de transporteurs équilibratifs (ENT : *equilibrative nucleoside transporters*), et concentratifs (CNT : *concentrative nucleoside transporters*) (Williams & Jarvis, 1991; Anderson *et al.*, 1996; Baldwin *et al.*, 1999; Baldwin *et al.*, 2004).

Quatre sous-types de récepteurs P1 (A_1 , A_{2A} , A_{2B} et A_3) ont été clonés chez les mammifères. Des souris mutantes invalidées pour les gènes des sous-types A_1 , A_{2A} , et A_3 ont pu être générées, et leur étude suggère un rôle des récepteurs de l'adénosine dans l'anxiété pour le sous-type A_1 (Johansson *et al.*, 2001), la nociception (voir ci-après) pour les sous-types A_1 , A_{2A} , et A_3 (Chen *et al.*, 1999; Johansson *et al.*, 2001; Ohta & Sitkovsky, 2001; Bailey *et al.*, 2002; Fedorova *et al.*, 2003), l'agrégation plaquettaire, la régulation de la pression artérielle pour le récepteur A_{2A} (Ledent *et al.*, 1997), et la dégranulation des mastocytes (Salvatore *et al.*, 2000) et la neuroprotection pour le récepteur A_3 (Fedorova *et al.*, 2003; Lee *et al.*, 2003). Par ailleurs, des arguments pharmacologiques impliquent l'adénosine dans de nombreuses fonctions du système nerveux, incluant la régulation du sommeil, la neuroprotection, la maturation neuronale, et la régulation des fonctions cardio-vasculaires. Les récepteurs de l'adénosine pourraient également constituer des cibles thérapeutiques dans plusieurs pathologies du système nerveux (maladie d'Alzheimer, maladie de Parkinson, chorée de Huntington, épilepsie, et schizophrénie), enfin, ces récepteurs semblent également jouer un rôle dans l'addiction. Les implications physiopathologiques des récepteurs de l'adénosine sont décrites en détail dans la revue de Ribeiro (Ribeiro, 2003).

1) Voies de transduction des récepteurs de l'adénosine

Comme les récepteurs P2Y, les récepteurs de l'adénosine (P1) sont des récepteurs métabotropiques, couplés à une protéine G. Les sous-types A_{2A} et A_{2B} interagissent avec une protéine de type G_s, et de ce fait, augmentent la concentration en AMPc intracellulaire, tandis que les sous-types A₁ et A₃ activent une protéine de type G_{i/o}, ce qui a pour conséquence une diminution des taux d'AMPc intracellulaires. D'autres voies de signalisation ont également été décrites, notamment pour les récepteurs A₁ (Fredholm *et al.*, 2001) (Tableau I-8). Dans le système nerveux, les récepteurs A₁ sont inhibiteurs de la transmission synaptique, tandis que les récepteurs A_{2A} et A_{2B} facilitent la communication neuronale. Les récepteurs de l'adénosine peuvent également interagir avec d'autres récepteurs membranaires, ionotropiques et métabotropiques, et de ce fait, sont susceptibles de réguler de façon fine les fonctions neuronales (Ribeiro, 2003).

Sous-type de récepteur de l'adénosine	Protéine G	Seconds messagers
A ₁	G _{i/o}	↓ AMPc ; ↑IP ₃ /DAG ; ↑Arachidonate ; ↑Phosphatidylethanol
A _{2A}	G _s ; G _{olf} ; G _{15/16}	↑ AMPc ↑IP ₃
A _{2B}	G _s G _{q/11}	↑ AMPc ↑IP ₃ /DAG
A ₃	G _{i/o} G _{q/11}	↓ AMPc ↑IP ₃ /DAG

Tableau I- 9 : Couplage et seconds messagers impliqués dans les voies de transduction des récepteurs de l'adénosine.

AMPc : Adénosine Monophosphate cyclique ; IP₃ : inositol tri-phosphate ; DAG : Diacyl glycérol
(Adapté d'après Fredholm *et al.*, 2001).

2) Localisation des récepteurs P1

La distribution des protéines des récepteurs A₁ et A_{2A} est bien documentée, grâce à la disponibilité de radio-ligands sélectifs. Concernant les récepteurs A_{2B} et A₃ seules des données d'hybridation *in situ* sont disponibles. La distribution de récepteurs P1 est indiquée

en détail dans le tableau I-9. On notera que les récepteurs A_1 , très largement répandus dans l'organisme, sont fortement exprimés par les interneurons des couches superficielles de la corne dorsale de la moelle épinière (Geiger *et al.*, 1984; Choca *et al.*, 1988), une région du système nerveux central impliquée dans la nociception (voir chap. II), ainsi que par les neurones des ganglions trijumeaux en culture (Carruthers *et al.*, 2001). Les récepteurs A_{2A} quant à eux, sont exprimés par plusieurs structures et types cellulaires intervenant dans la réaction immunitaire, et leur ARNm a été détecté dans les neurones du ganglion rachidien de gros diamètre (Kaelin-Lang *et al.*, 1998).

Niveau d'expression	Récepteur A ₁	Récepteur A _{2A}	Récepteur A _{2B}	Récepteur A ₃
Elevé	Cerveau (cortex, cervelet, hippocampe), corne dorsale de la moelle épinière, œil, glande surrénale, cœur (oreillettes).	Rate, thymus, leucocytes, plaquettes sanguines, neurones GABAergiques striatopallidaux, bulbe olfactif.	Caecum, colon, vessie.	<i>Testicules (rat), mastocytes (rat).</i>
Intermédiaire	Cerveau (autres régions), muscle squelettique, foie, rein, tissu adipeux, glandes salivaires, œsophage, colon, estomac, testicules	Cœur, poumon, vaisseaux sanguins	Poumon, vaisseaux sanguins, œil, éminence médiane, <i>mastocytes</i>	<i>Cervelet (humain ?), hippocampe, poumon (humain ?), rate (mouton), glande pinéale</i>
Faible	Poumon, pancréas	Cerveau (autres régions)	Tissu adipeux, glande surrénale, cerveau, rein, foie, ovaire, hypophyse	Glande thyroïde, cerveau, glande surrénale, <i>rate (humain)</i> , foie, rein, cœur, intestin, <i>testicule (humain)</i>

Tableau I- 10 : Distribution des ARNm des récepteurs de l'adénosine.

En gras : hybridation *in situ* et immunohistochimie. En italique : données ambiguës, différentes inter-espèces.

(D'après Fredholm et al., 2001).

3) Rôles des récepteurs P1 dans la nociception

a) Dans la corne dorsale de la moelle épinière

Les travaux de Post (1984) montrant les effets analgésiques de l'administration spinale de 5'-N-ethylcarboxamido adénosine (un analogue non dégradable de l'adénosine) chez la souris ont initié une série d'études sur le rôle de l'adénosine et de ses récepteurs dans la nociception. Depuis, les effets analgésiques de l'administration spinale d'analogues de l'adénosine, ou d'inhibiteurs de sa dégradation, ont été observés dans de nombreuses études comportementales sur des modèles de douleurs inflammatoires et neuropathiques (Sawynok, 1998; Kowaluk & Jarvis, 2000). Suite à une dépolarisation des neurones dans la moelle épinière, une augmentation des taux extracellulaires d'adénosine est observée, et ce phénomène peut-être amplifié par la sérotonine et la morphine. Cette augmentation pourrait être due à une libération directe d'adénosine (ce qui n'a pas été démontré), ou bien être la conséquence de la libération d'ATP par les neurones de la corne dorsale de la moelle épinière, elle-même dégradée en adénosine par les ectonucléotidases (Sawynok & Liu, 2003). A la différence des récepteurs P2X et P2Y, il existe des agonistes spécifiques de chaque sous-type de récepteurs de l'adénosine, et leur utilisation a permis de montrer que les effets analgésiques centraux de l'adénosine étaient dus à l'activation de récepteurs A₁ (Lee & Yaksh, 1996; Nakamura *et al.*, 1997; Khandwala *et al.*, 1998; Poon & Sawynok, 1998). Cette analgésie implique vraisemblablement des effets pré- et postsynaptiques (Sawynok & Liu, 2003). Jusqu'à présent, aucune étude n'a pu mettre en évidence une éventuelle implication des récepteurs A_{2B} et A₃ dans la nociception. Les récepteurs A_{2A} quant à eux, sont très peu présents dans la corne dorsale de la moelle épinière, mais leur expression est augmentée dans les neurones moteurs spinaux suite à une ischémie (Cassada *et al.*, 2002). D'après les travaux de Cassada, les récepteurs A_{2A} auraient plutôt un rôle neuroprotecteur dans ce cas (Cassada *et al.*, 2001a; 2001b). Les effets de l'adénosine dans la nociception au niveau de la moelle épinière sont résumés dans le tableau I-10.

Récepteur	site	Effet
A ₁	<i>In vivo</i>	Anti-nociceptif
	Corne dorsale (présynaptique)	Inhibition des courants calcium dans les neurones de DRG, Inhibition de la libération de CGRP, baisse de la fréquence des potentiels postsynaptiques excitateurs miniatures
	Corne dorsale (postsynaptique)	Hyperpolarisation des neurones de second ordre
	Corne latérale	Action sur le système sympathique Inhibe les entrées présynaptiques du tronc cérébral
A _{2A}	<i>In vivo</i>	Rôle incertain dans la nociception Rôle neuroprotecteur suite à un trauma, une ischémie
	Corne ventrale	Rôle inconnu, mais L'expression des récepteurs A _{2A} est augmentée suite à une blessure

Tableau I- 11 : Résumé des rôles pro- et anti-nociceptifs des récepteurs de l'adénosine dans la moelle épinière. (D'après Sawynok & Liu, 2003)

b) En périphérie

Comme nous l'avons vu au chapitre III, l'ATP peut être libérée en périphérie par de nombreux types cellulaires. Par conséquent, sa dégradation rapide par les ectonucléotidases est susceptible d'augmenter les concentrations d'adénosine extracellulaire. Mais l'adénosine semble également être directement libérée par les fibres afférentes primaires et d'autres types cellulaires (Sawynok & Liu, 2003). Grâce à des mesures réalisées par microdialyse *in vivo*, plusieurs études ont démontré que les taux d'adénosine extracellulaires pouvaient être augmentés suite à l'administration périphérique de capsaïcine (Liu, 2001), de glutamate (Liu *et al.*, 2002b), et de formaldéhyde (Liu *et al.*, 2000; Liu, 2001), ainsi que lors de la ligature des nerfs spinaux (Liu *et al.*, 2002a) (dans ces trois derniers cas, l'adénosine est libérée notamment par des neurones sensoriels primaires sensibles à la capsaïcine). Les conséquences sur la nociception sont complexes car elles impliquent les quatre sous-types de récepteurs de l'adénosine (A₁ et A_{2A} ayant la plus forte affinité). Ainsi, l'adénosine peut être antinociceptive ou pronociceptive selon les conditions et les récepteurs impliqués (Sawynok & Liu, 2003). Les effets périphériques de l'adénosine dans la nociception sont résumés dans le tableau I-11.

Récepteur	Site	Effet
A ₁	Fibres C	Anti-nociceptif Génération d'un œdème, extravasation
	Granulocytes neutrophiles, monocytes et macrophages	Augmentation de l'adhésion, migration, phagocytose
A _{2A}	Fibres C	Pro-nociceptif
	Granulocytes neutrophiles, monocytes et macrophages	Diminution de l'adhésion, génération de superoxyde, dégranulation, phagocytose, libération de cytokines
	Cellules endothéliales	Augmentation de la migration, prolifération, angiogenèse
A _{2B}	Mastocytes	Augmentation d'interleukine 8, libération d'histamine
A ₃	Monocytes et macrophages	Baisse des cytokines, augmentation des chémokines
	Mastocytes	Augmentation de la libération d'histamine

Tableau I- 12 : Résumé des effets des récepteurs de l'adénosine en périphéries concernant la nociception et l'inflammation. (D'après Sawynok & Liu, 2003).

IV. Les neurostéroïdes.

A. Définitions

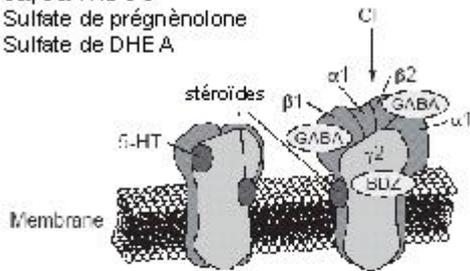
Les composés stéroïdes (dérivés du cholestérol) ont tout d'abord été identifiés comme étant des **hormones stéroïdes**, fabriquées par les glandes surrénales, les gonades et le placenta. Leurs actions sont classiquement attribuées à l'activation de récepteurs intracellulaires (nucléaires) qui agissent comme des facteurs de transcription pour réguler l'expression d'une grande diversité de gènes. Ces actions sont lentes à se développer (minutes, heures), et limitées par la transcription des gènes et la synthèse protéique (Rupprecht & Holsboer, 1999). Au cours de ces 15 dernières années, de nombreuses études ont mentionné des effets membranaires rapides (de l'ordre de la milliseconde à la seconde) de certains stéroïdes, notamment sur l'excitabilité neuronale et la modulation de systèmes de seconds messagers (McEwen, 1991; Majewska, 1992; Lambert *et al.*, 1995; Baulieu, 1997; Rupprecht & Holsboer, 1999) (Figure I-11).

Le terme « **neurostéroïde** », introduit dans les années 80 (Baulieu, 1981) s'applique quant à lui aux mêmes composés stéroïdes, mais fabriqués dans le système nerveux, *de novo* à partir du cholestérol cellulaire ou de ses dérivés. L'accumulation de ces composés dans le système nerveux est indépendante de la stéroïdogénèse effectuée par les glandes endocrines périphériques (Baulieu, 1997). Une même molécule, par exemple la progestérone, peut donc être considérée comme une hormone stéroïde, si elle est fabriquée par les glandes endocrines périphériques (en l'occurrence les gonades et le placenta), ou comme un neurostéroïde, si elle est fabriquée par les cellules du système nerveux.

De multiples études pharmacologiques et comportementales ont démontré l'implication des neurostéroïdes dans de nombreuses fonctions du système nerveux, incluant la régénération axonale (Koenig *et al.*, 1995), la neuroprotection (Guth *et al.*, 1994; Kimonides *et al.*, 1998; Frank & Sagratella, 2000; Schumacher *et al.*, 2000), le développement (Schumacher *et al.*, 1996), le stress (Purdy *et al.*, 1991; Patchev *et al.*, 1996; Zimmerberg & Brown, 1998), l'anxiété, (Majewska, 1992; Brot *et al.*, 1997; Hodge *et al.*, 2002), la dépression (Uzunova *et al.*, 1998; Strohle *et al.*, 2000; van Broekhoven & Verkes, 2003), et la mémoire (Mayo *et al.*, 1993; Vallée *et al.*, 1997). Des études sont actuellement en cours pour évaluer leur rôle dans la nociception (cf. Chap. IV D.).

Neurostéroïdes:

17 β -oestradiol
Progestérone
3 α , 5 α -THP
3 α , 5 α -THDOC
Sulfate de prégnénolone
Sulfate de DHEA



Récepteurs cibles des stéroïdes:

GABA_A
5-H₃
Nicotinique (acétylcholine)
NMDA
AMPA
Kainate
Glycine
 σ 1

Hormones stéroïdes:

17 β -oestradiol
Dihydrotestostérone
Progestérone
Aldostérone
Corticostérone
Cortisol

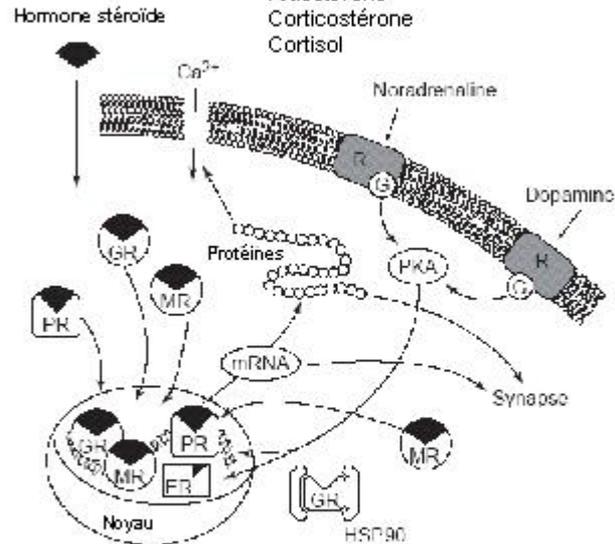


Figure I-11 : Effets non génomiques et génomiques des principaux composés stéroïdes.

Les neurostéroïdes, fabriqués par les neurones et les cellules gliales, agissent de manière paracrine ou autocrine sur les récepteurs membranaires des cellules nerveuses. Leurs effets s'effectuent dans une échelle de temps de l'ordre de la minute ou de l'heure.

Lorsque ces mêmes molécules agissent par voie hormonale (fabriquées par les glandes endocrines et apportées par la circulation), on les qualifie d'« hormones stéroïdes ». Elles agissent via des récepteurs intracellulaires qui activent dans le noyau des cellules des facteurs de transcription, exerçant une action dite « génomique ». Ces effets sont plus longs à se mettre en place et peuvent durer plus longtemps (de quelques jours à plusieurs mois).

BDZ : benzodiazépines ; **DHEA-S** : sulfate de déhydroépiandrostérone ; **P-S** : sulfate de prégnénolone ;

THDOC : tétrahydro déoxycorticostérone ; **THP** : tétrhydroprogestérone ; **R** : récepteur ; **ER** : récepteur des

oestrogènes ; **(G)** : protéine G ; **GR** : récepteur des glucocorticoïdes ; **MR** : récepteur des mineralocorticoïdes ;

PR : récepteur de la progestérone ; **HSP90** : Heat Shock Protein 90 ; **PKA** : protéine kinase A.

(Adapté d'après Rupprecht & Holsboer, 1999).

B. Biosynthèse des neurostéroïdes

Tous les neurostéroïdes dérivent du cholestérol produit directement par les cellules du système nerveux à partir de l'acétate. De nombreuses enzymes mitochondriales et microsomales interviennent dans la voie de biosynthèse des neurostéroïdes, décrite dans la figure I-12. La première étape de la neurostéroïdogénèse est assurée par le récepteur périphérique des benzodiazépines (PBR). Elle consiste à incorporer le cholestérol dans la membrane interne de la mitochondrie pour qu'il puisse être transformé en prégnénolone sous l'action de la mitochondrie : la P450 *side chain cleavage* (P450_{sc}) (Papadopoulos & Brown, 1995; Li et al., 2001). De ce fait, il est possible d'augmenter la synthèse de prégnénolone, et donc potentiellement de stimuler la neurostéroïdogénèse *in vitro* et *in vivo* à l'aide d'agonistes du PBR (Yanagibashi et al., 1989; Papadopoulos et al., 1992 ; Korneyev et al., 1993)). Certains auteurs suggèrent également que la protéine STAR (Steroidogenic Acute Regulatory Protein) est nécessaire à la translocation du cholestérol dans la mitochondrie (Sridaran et al., 1999; West et al., 2001).

Les neurostéroïdes peuvent exister sous forme libre ou conjuguée (sulfatée). Sous leur forme libre ils peuvent diffuser à travers les membranes lipidiques, et leur présence dans le milieu extracellulaire d'un tissu dépend donc uniquement de l'expression et de la régulation de leurs différentes enzymes de synthèse dans ce tissu. Sous leur forme conjuguée, ils ne peuvent pas traverser les membranes des cellules par simple diffusion. Dans ce cas, la question de leur sécrétion par les cellules n'a pas été résolue. Pourtant, plusieurs exemples de modulation allostérique de récepteurs membranaires par des neurostéroïdes sulfatés, agissant en extracellulaire ont été décrits (Mensah-Nyagan *et al.*, 1999). La présence de neurostéroïdes sulfatés dans le milieu extracellulaire pourrait être rendue possible par l'existence d'un mécanisme de sécrétion des stéroïdes sulfatés (par exemple des transporteurs), et/ou par la présence d'hydroxystéroïde sulfotransférases dans le milieu extracellulaire, mais ces faits n'ont pas été démontrés.

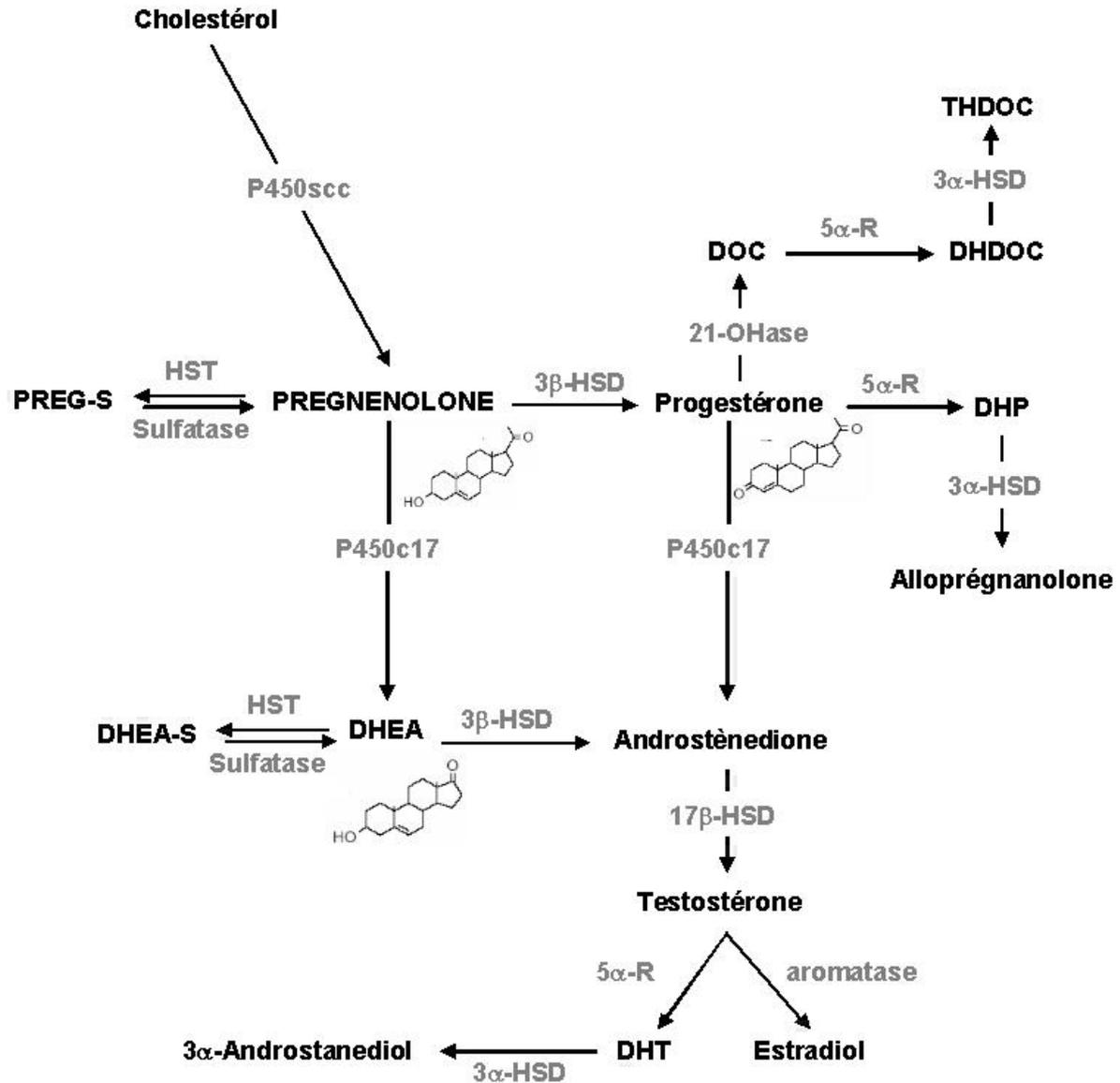


Figure I- 12 : voies de biosynthèse des neurostéroïdes.

La neurostéroïdogénèse s'effectue à partir du cholestérol fabriqué par la cellule. La première enzyme de cette voie de biosynthèse (la P450_{scc}) étant mitochondriale, le cholestérol est préalablement incorporé dans la membrane interne de la mitochondrie sous l'action d'un complexe trimérique, le récepteur périphérique des benzodiazépines. La plupart des autres enzymes de la biosynthèse des neurostéroïdes sont microsomiales.

-S indique un neurostéroïde sulfaté ; PREG : prégnénolone DOC : déoxycorticostérone ; DHP : dihydroprogestérone ; DHEA : déhydroépiandrostérone ; DHT : dihydrotestostérone.

(Les enzymes sont notées en gris) ; P450_{scc} : cytochrome P450 side chain clivage ; HST : hydroxystéroïde sulfotransférase ; HSD : hydroxystéroïde déshydrogénase ; OHase : hydroxylase ; 5α-R : 5α réductase (G. Mensah-Nyagan, communication personnelle).

C. Modes d'action des neurostéroïdes

Contrairement aux hormones stéroïdes, qui exercent leurs effets de façon endocrine, les neurostéroïdes agissent de façon paracrine et/ou autocrine sur les cellules du système nerveux.

En plus des **récepteurs intracellulaires** impliqués dans les actions génomiques des stéroïdes, les neurostéroïdes peuvent agir comme des modulateurs allostériques de **récepteurs membranaires**, incluant les récepteurs glycinergiques (Wu *et al.*, 1991), GABA_A (Majewska *et al.*, 1986; Majewska, 1992; Lambert *et al.*, 1995), muscariniques (Klangkalya & Chan, 1988), nicotiniques (Valera *et al.*, 1992), NMDA (Wu *et al.*, 1991), sérotoninergiques (5-HT₃) et σ (Monnet *et al.*, 1995; Maurice *et al.*, 1999).

A de fortes concentrations, certains neurostéroïdes comme la THDOC peuvent activer directement les récepteurs GABA_A en l'absence d'agonistes. Ceci semble être dû au fait que les neurostéroïdes agissent sur les récepteurs GABA_A sur deux sites distincts (Park-Chung *et al.*, 1999). L'action allostérique des neurostéroïdes sur les récepteurs GABA_A, semble être liée à sa composition en sous-unités. Le récepteur GABA_A est en effet formé d'un assemblage hétéro-oligomérique de 5 sous-unités (figure I-13). En 1996, Zhu *et al.* ont démontré par des expériences de co-transfections que la présence de la sous-unité δ du récepteur GABA_A empêche l'inhibition de son activité par le sulfate de prégnénolone, ainsi que sa potentialisation THDOC, mais pas son activation directe. Cependant, une étude récente a démontré que des souris invalidées pour le gène de la sous-unité δ ont des réponses comportementales atténuées aux neurostéroïdes (Mihalek *et al.*, 1999). Par la suite, Wohlfarth *et al.* (2002) ont testé les effets de la THDOC sur l'activité de récepteurs GABA_A de différentes combinaisons. Contrairement à l'étude de Zhu *et al.* (1999), Wohlfarth *et al.* ont observé une potentialisation supérieure de la THDOC sur l'activité des récepteurs GABA_A incluant la sous-unité δ . Cette potentialisation semblait également être influencée selon le type de sous-unités α co-exprimées. Les différences entre les résultats de ces deux études n'ont pas pu être élucidées, mais l'environnement neuronal, ainsi que la composition globale du récepteur en sous-unité pourraient en être responsables.

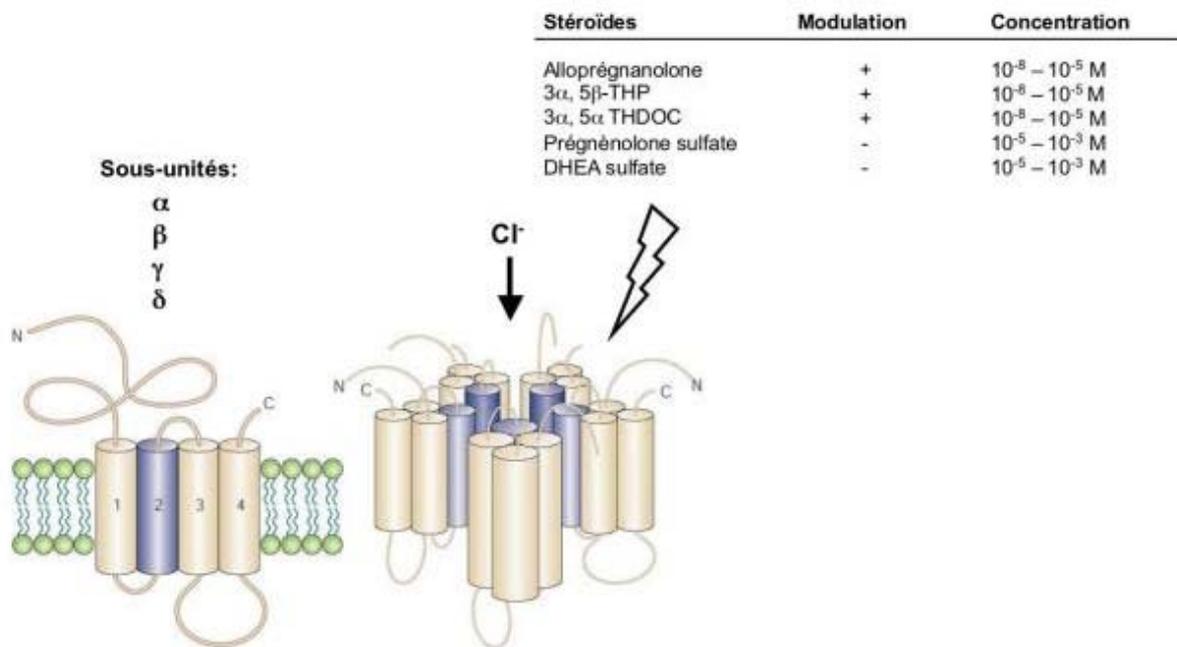


Figure I- 13 : Les récepteurs GABA_A et leur modulation allostérique par les neurostéroïdes.

Les récepteurs GABA_A sont des canaux perméables aux ions chlorure et composés de l'association oligomérique des sous-unités α , β , γ , et δ (Macdonald & Olsen, 1994; Sieghart, 1995). Dans les neurones de DRG, les principales sous-unités détectées sont les sous-unités α 1-3, β 2-3 et γ 2 (Persohn *et al.*, 1991; Zhai *et al.*, 1998). Le sous-type α 1 β 2 γ 2 est exprimé dans la plupart des régions du système nerveux central (Korpi *et al.*, 1995, ainsi que dans les neurones du ganglion rachidien (Zhai *et al.*, 1998). Plusieurs neurostéroïdes sont des modulateurs allostériques des récepteurs GABA_A (Rupprecht & Holsboer, 1999). Les neurostéroïdes 5 α ,3 α -réduits sont les plus puissants.

(Adapté d'après Moss & Smart, 2001 ; Rupprecht & Holsboer, 1999).

Les neurostéroïdes semblent également interagir avec d'autres types de molécules : le 2-méthoxyestradiol, un métabolite de l'estradiol, peut se lier à la tubuline et inhiber la polymérisation des microtubules induite par le glutamate *in vitro* (Hamel *et al.*, 1996). Au contraire, la prégnénolone favorise la polymérisation des microtubules, vraisemblablement en se liant aux *microtubule-associated proteins* de type 2 (MAP2) (Plassart-Schiess & Baulieu, 2001).

Après de nombreuses tentatives infructueuses (Schmidt *et al.*, 2000), **un récepteur membranaire de haute affinité** pour les stéroïdes (mPR : *Progesterone membrane receptor*) a pu être identifié et cloné chez la courbine (*Cynoscion nebulosus*) (Zhu *et al.*, 2003b) puis chez le poisson-zèbre, le tétodon, le xénope, la souris, le porc et l'humain (Zhu *et al.*, 2003a). Ce récepteur, activé par les progestines (17,20 β ,21-trihydroxy-4-pregnen-3-one et progestérone), semble appartenir à la superfamille des récepteurs couplés aux protéines G. Il est couplé négativement à l'adénylate cyclase (via une protéine de type G_{i/o}) et interviendrait dans la maturation des ovocytes. Son ARNm a été détecté dans les tissus reproducteurs et neuroendocrines, et sa protéine a été révélée par immunocytochimie sur les membranes des ovocytes et des spermatozoïdes. D'autre part, l'ARNm et la protéine de ce récepteur sont positivement régulés par les progestines (Zhu *et al.*, 2003b).

Enfin, en raison de leur caractère lipophile, les neurostéroïdes sont susceptibles d'exercer des **effets non spécifiques** en modifiant la fluidité des membranes cellulaires et, de ce fait, les propriétés des récepteurs membranaires (Willmer, 1961). Ces effets étant observés à des concentrations importantes de neurostéroïdes (> 10 μ M), leur pertinence dans un contexte physiologique est discutée. Toutefois, certains neurostéroïdes produits localement peuvent atteindre des concentrations importantes, de l'ordre du micromolaire (Baulieu, 1991; Schmidt *et al.*, 2000).

D. Localisation des enzymes de biosynthèse de neurostéroïdes

La plupart des enzymes présentes dans les glandes surrénales, les gonades et le placenta ont été retrouvées dans de nombreuses régions du système nerveux (Mensah-Nyagan *et al.*, 1999; Compagnone & Mellon, 2000). Leur présence peut être détectée par immunohistochimie, et la présence de leurs ARNm est détectée par hybridation *in situ*. Il est également possible de mesurer leur activité par la technique du *Pulse-Chase*.

Au cours de ce travail de thèse, nous avons en premier lieu testé sur l'activité des récepteurs P2X les effets de neurostéroïdes connus pour être de puissants modulateurs des récepteurs GABA_A : l'alloprégnanolone, et le sulfate de prégnénolone. Puis nous nous sommes intéressés à la DHEA et à la progestérone. Le tableau suivant indique la localisation dans le cerveau et la moelle épinière des enzymes nécessaires à la biosynthèse de tels neurostéroïdes.

Enzyme	Nécessaire à la synthèse de (non exhaustif)	Détection dans le cerveau	Détection dans la moelle épinière
P450_{scc}	AP, DHEA, Progestérone	ARNm ; protéine ; activité	ARNm ; protéine ; activité
3β-HSD	AP, progestérone	ARNm ; protéine ; activité	Protéine non détectée (ARNm et activité non testés)
5α-réductase	AP	ARNm ; protéine	ARNm
3α-HSD	AP	Protéine ; activité	Non testé
P450_{c17}	DHEA	ARNm ; protéine	ARNm ; protéine ; activité

Tableau I- 13 : Distribution des enzymes de biosynthèse de l'alloprégnanolone (AP), la DHEA, et la progestérone chez le rat. ARNm : détection de l'ARN message par hybridation in situ ; Protéine : détection par immunohistochimie.

(Adapté d'après Compagnone & Mellon, 2000).

L'immunoréactivité (immunohistochimie) et l'activité (*pulse-chase*) de la P450_{scc} ont également été détectées dans le ganglion rachidien chez le rat (Patte-Mensah *et al.*, 2003).

E. Les stéroïdes/neurostéroïdes et la nociception

Les stéroïdes/neurostéroïdes interviennent dans de nombreuses fonctions du système nerveux, des stades précoces du développement jusqu'à la vieillesse. Mais le premier effet rapide (non génomique) d'un stéroïde ayant été décrit fut l'effet anesthésique rapide de la progestérone observé après injection intrapéritonéale (Selye, 1941). Ces effets ont été attribués à la potentialisation des récepteurs GABA_A par la progestérone (Frye & Duncan, 1994), toutefois cette analgésie pourrait également être due aux métabolites de la progestérone, et d'autres récepteurs pourraient être impliqués : la progestérone est également un antagoniste des récepteurs σ (Su *et al.*, 1988; Monnet *et al.*, 1995).

D'autres effets de stéroïdes/neurostéroïdes sur la nociception ont été observés plus récemment : le sulfate de DHEA (DHEAS) et le sulfate de prégnénolone (PregS), injectés par voie intraplantaire chez le rat ont des effets facilitateurs (pronociceptifs) dans un test nociceptif de flexion de la patte postérieure (*ANF test*, pour *Allogenic-induced nociceptive flexor responses test*) à des concentrations très faibles (de l'ordre du femto molaire). Cet effet est reproduit par des agonistes du récepteur σ , et est bloqué par la progestérone (Ueda *et al.*, 2001). Les auteurs ont proposé un mécanisme d'action du DHEAS sur deux types de récepteurs en fonction de sa concentration. A de très faibles doses (de l'ordre du femto molaire), le DHEAS activerait un récepteur inconnu sur les mastocytes et favoriserait la libération d'histamine, un médiateur pro-nociceptif. A des doses plus élevées (de l'ordre du nano molaire), le DHEAS activerait un récepteur de type σ et induirait la libération de substance P, une autre molécule pro-nociceptive (voir chap. II). La même équipe a ensuite montré que l'injection intraplantaire de DHEAS induisait une hyperalgésie thermique, une hyperalgésie mécanique et une vasodilatation, ces effets étant bloqués par la progestérone et par la diphenhydramine (DPH), un antagoniste des récepteurs H_1 de l'histamine (Uchida *et al.*, 2003).

Certains stéroïdes/neurostéroïdes (DHEAS et PregS) sont donc susceptibles d'agir comme des molécules pro-nociceptives en périphérie.

Dans la moelle épinière, les récepteurs $GABA_A$ semblent être en partie responsables des propriétés antinociceptives de certains stéroïdes de synthèse injectés par voie intraveineuse, comme les aminostéroïdes (Goodchild *et al.*, 2000), ou le Saffan[®], issu d'un mélange de deux stéroïdes de synthèse : l'alphaxalone et l'alphadolone (Nadeson & Goodchild, 2000, 2001). Enfin, une étude préliminaire réalisée chez l'humain, indique que l'administration par voie orale d'alphadolone réduit significativement les doses de morphine demandées par des patients après une opération chirurgicale (Goodchild *et al.*, 2001). L'implication des neurostéroïdes dans les mécanismes de la nociception est également rendue probable par le fait que le récepteur périphérique des benzodiazépines (PBR), responsable de l'étape initiale de la synthèse des neurostéroïdes à partir du cholestérol (Krueger & Papadopoulos, 1990) est exprimé par les cellules de Schwann myélinisant le nerf sciatique, et que son expression est augmentée lors d'une atteinte de ce nerf (Lacor *et al.*, 1999). Plus récemment, il a été montré que l'ARNm et la protéine du PBR est sur-exprimée après une lésion du nerf sciatique ou de la moelle épinière dans les neurones du ganglion rachidien de faible et moyen diamètres et dans les cellules satellites de ces neurones. Cette expression redescend au niveau basal dans le cas où le nerf a pu se régénérer (Karchewski *et al.*, 2004).

L'ensemble de ces données indique que les neurostéroïdes semblent jouer un rôle dans certains mécanismes de la nociception.

Objectifs :

Dans le contexte de l'implication dans la nociception des récepteurs GABA_A et P2X situés aux terminaisons périphériques et centrales des neurones sensorielles primaires, et de la présence suspectée des enzymes responsables de la biosynthèse des neurostéroïdes dans les neurones sensoriels primaires et dans la moelle épinière, l'objectif de cette thèse était d'étudier les éventuels **effets modulateurs des neurostéroïdes sur l'activité des récepteurs GABA_A et P2X des neurones du ganglion rachidien.**

Parallèlement à notre travail, une équipe de notre laboratoire a démontré la présence (par immunocytochimie) et l'activité (par *pulse-chase*) de la P450*side chain cleavage* (P450scc, une enzyme initiant la biosynthèse des neurostéroïdes, voir figure I-11) dans les ganglions rachidiens, la corne dorsale de la moelle épinière, et les centres nociceptifs supraspinaux (Patte-Mensah *et al.*, 2003).

Matériels et méthodes

1. Mise en culture des neurones sensoriels des ganglions rachidiens de rat.

La culture est effectuée selon la technique décrite par (Bowie *et al.*, 1994).

a) Boîtes et milieu de culture

Afin de restreindre l'espace d'ensemencement des cellules, des anneaux de verre de 16 mm de diamètre interne sont fixés au centre des boîtes de culture (boîtes Corning 35 mm) avec de la paraffine chaude, ce qui a pour effet de créer un puits central. Chaque puits est alors traité avec 1,5 ml d'une solution de poly-L-Lysine (10 µg/ml, Sigma) préparée dans du tampon borate à 0,1 M (pH 8,4), puis les boîtes de cultures sont mises à l'incubateur pendant trois heures. Deux heures avant l'ensemencement des cellules, les boîtes sont rincées 3 fois avec de l'eau distillée stérile et une fois avec du tampon phosphate stérile dont le pH a été ajusté à 7,3. La composition de cette solution est la suivante (en mM) : NaCl 127; NaH₂PO₄ 4,3; KCL 2,7; KH₂PO₄ 1,5.

Les boîtes sont ensuite remplies avec 1,5 ml de milieu de culture et mises à l'incubateur jusqu'à l'ensemencement.

Le milieu de culture utilisé est constitué de Minimum Essential Medium alpha sans ribonucléosides et désoxyribonucléosides (MEM alpha, Gibco) filtré, auquel on ajoute des antibiotiques : pénicilline et streptomycine (50 UI/ml pour chacun, Gibco) et du sérum de cheval (10 % vol/vol, Gibco).

b) Prélèvement des ganglions

Sous anesthésie au diéthyléther, des rats âgés de 1 à 4 jours sont décapités, la peau du dos est retirée, puis la colonne vertébrale est sectionnée transversalement au niveau lombaire (L6). Une laminectomie est alors pratiquée suivant le plan horizontal rostro-caudal. La moelle épinière est enlevée afin de dégager les foramens de conjugaison dans lesquels sont logés les ganglions. Ces derniers sont prélevés à l'aide d'une pince fine et transférés dans une boîte de pétri contenant 2 ml de tampon phosphate. Après avoir enlevé les racines dorsales à l'aide

d'une pince fine et de ciseaux à iridectomie (sous une loupe binoculaire), les ganglions sont transférés à l'aide d'une pipette Pasteur stérile dans un tube Falcon stérile de 15 ml contenant 0,5 ml de tampon phosphate.

c) Dissociation enzymatique

Les ganglions sont lavés deux fois avec 5 ml de solution tampon phosphate sans calcium ni magnésium. Les ganglions sont ensuite incubés 25 minutes à 37 °C dans une solution de trypsine (0,5 g/l, Seromed/Worthington) et d'EDTA (Fluka) contenant 2 mg de collagénase de type IV (Sigma) fraîchement préparée. Lors de l'incubation, les ganglions sont remis en suspension toutes les cinq minutes. Lorsque le temps de dissociation est achevé, les ganglions sont rincés dans 5 ml de milieu de culture.

d) Dissociation mécanique

Les ganglions sont dissociés mécaniquement dans 1 ml de milieu de culture à l'aide d'une pipette Pasteur stérile, puis le surnageant est récupéré dans un tube Falcon de 15 ml. L'opération est répétée 2 fois, avec des pipettes Pasteur de diamètre décroissant, préparées par rodage de leur pointe à la flamme. Lorsque le milieu devient trouble, cela nous indique la présence de cellules dissociées en suspension. Le contenu du tube Falcon (volume final : 3 ml) est alors utilisé pour l'ensemencement dans les boîtes de culture (300 µl par puits). Jusqu'à leur utilisation pour des expériences d'électrophysiologie, les cultures sont placées dans un incubateur dont la température est maintenue à 37 °C. L'atmosphère dans laquelle se trouvent les cultures est composée de 95 % d'air et 5 % de CO₂. Elle est saturée en vapeur d'eau.

Dans ces conditions, les cellules adhèrent rapidement au fond de la boîte. Les cellules sont utilisées entre une heure et deux jours après la mise en culture. Les anneaux formant les puits centraux sont retirés à l'aide d'une pince fine juste avant les enregistrements, afin de ne pas gêner le positionnement de la pipette de *patch* lors de l'approche des cellules.

2. Mise en culture et entretien des lignées HEK-293.

Nous avons utilisé dans quelques expériences de *patch-clamp* des cellules issues d'une lignée HEK-293 et transfectées pour exprimer de façon stable la sous-unité P2X₂. Ces cellules

n'expriment normalement aucune des 7 sous-unités P2X connues. La transfection a été effectuée à l'aide d'un vecteur pCDNA3 contenant le récepteur P2X₂-Flag. L'étiquette (flag) se trouve dans la partie extracellulaire. Ce plasmide est décrit dans la publication de Stoop et al., (1999).

Cette lignée nous a été envoyée gracieusement par le docteur F. Rassendren.

a) Décongélation des cellules

Les cellules HEK-293 exprimant le récepteur P2X₂ de rat sont stockées congelées dans du DMSO dans de l'azote liquide à -160 °C. Elles sont décongelées environ une semaine avant le début des enregistrements. La décongélation doit se faire rapidement car le milieu de congélation (DMSO) est toxique pour les cellules : Le tube contenant les cellules HEK est mis au bain-marie à 37 °C au sortir du souchier d'azote liquide. Le contenu du tube est ensuite dilué rapidement (sans attendre la décongélation complète) et délicatement à l'aide d'un pipetman de 1 ml de milieu de culture chauffé à 37°C dont la composition est la suivante : DMEM-hepes (invitrogen), 10% Sérum de veau fœtal (gibco), 1% penicilline-streptomycine (gibco), 1% glutamax (gibco). On réalise ensuite une centrifugation des cellules pendant 3 minutes à 900 tours/minute. Après élimination du surnageant, le culot est remis en suspension dans environ 5 ml de milieu de culture, puis les cellules sontensemencées dans un flasque préalablement rempli avec 15 ml de milieu de culture à 37 °C. Le flasque est placé dans une étuve à 37°C dont l'atmosphère est saturée en vapeur d'eau, et composée de 95 % d'air et 5 % de CO₂.

b) repiquage des cellules

Les cellules arrivent généralement à confluence dans la semaine qui suit leur décongélation. Elles sont alors dissociées puis réensemencées dans des boîtes de culture (boîtes Corning 35 mm) et dans un grand flasque. Pour cela, le milieu de culture du flasque contenant les cellules est remplacé par 1 ml de trypsine à 0,25 % (Gibco), puis le flasque est replacé dans l'incubateur. Après une minute, le flasque est sorti de l'étuve et le fond est tapoté pour aider au décollement des cellules. La trypsine est alors neutralisée avec 10 ml de milieu complet, et les cellules sont décollées du fond du flasque et dissociées lentement par 10-15 allers-retours avec une pipette de 10 ml, en prenant soin d'éviter la création de bulles. Les cellules sont ensuite transférées dans un tube Falcon de 15 ml, pour être centrifugées 3 minutes à 1000 tours/minute. Après élimination du surnageant, le culot est repris dans 1 ml de milieu de culture. Le flasque et les boîtes à ensemenecer sont préalablement remplis avec du

milieu de culture à 37 °C. Le flasque estensemencé avec 100 µl de la suspension précédente, et les boîtes de culture sontensemencées avec 5 à 20 µl de la suspension, selon les besoins. Le cycle de dissociation – réensemencement est de 1 semaine et les cellules sont utilisées pendant leurs 4 premiers passages. Après 4 semaines, un nouvel aliquote de cellules est décongelé.

c) Sélection des HEK-293 possédant le plasmide contenant l'ADNc de la sous-unité P2X₂ pour les enregistrements électrophysiologiques

Les boîtes de cultures sontensemencées de façon à avoir quelques îlots de cellules isolées lors des enregistrements électrophysiologiques. 24 heures après l'ensemencement, le milieu de culture des boîtes est remplacé par un milieu sélectif composé du milieu de culture décrit au §2.a) auquel sont ajoutés 500 µg/ml de néomycine (G418, Promega). Etant donné que le plasmide contenant l'ADNc de la sous-unité P2X₂ contient aussi un gène de résistance à la néomycine, seules les cellules possédant le plasmide pourront survivre. Ainsi, lors des enregistrements électrophysiologiques ayant lieu les jours suivants (selon la densité des cellules dans les boîtes), la quasi-totalité des cellules exprimera la sous-unité P2X₂ des récepteurs ionotropiques de l'ATP.

d) Congélation des cellules

Le stock de cellules congelées dans l'azote liquide est maintenu stable en re-congelant régulièrement les cellules issues des aliquotes décongelés. La congélation des cellules est réalisée à l'issue d'une dissociation (cf. §2.b) de cellules arrivées à confluence dans un flasque de 10 ml. Après la centrifugation (cf. §2.b), le culot de cellules est re-suspendu dans 4 ml de milieu de congélation dont la composition est la suivante : 7,5 % de DMSO (sigma), 30 % de sérum de veau fœtal (gibco), 1 % de penicilline-streptomycine (gibco), et 61,5 % de milieu de culture (composition donnée au §2.b)). Cette suspension est ensuite partagée en 4 tubes de congélation 1 ml. Ces tubes sont placés dans un container de congélation progressive puis le container est mis au congélateur à -80 °C. Grâce au propanol contenu dans la boîte de congélation, la température des cellules baisse progressivement de 1 °C par minute. Le lendemain, les tubes de congélations sont placés dans le souchier d'azote liquide à -160 °C.

3. Enregistrements électrophysiologiques.

a) Principe

Nous avons enregistré les courants membranaires totaux des neurones en culture à l'aide de la technique du *patch-clamp* (Hamill *et al.*, 1981). Les enregistrements sont réalisés à l'aide d'une pipette en verre étirée à la chaleur de façon à obtenir à sa pointe un diamètre d'environ 1 μm . La pipette est approchée au contact de la cellule avec un micromanipulateur, puis une pression négative est appliquée à l'intérieur de la pipette à l'aide d'une seringue, ce qui permet d'obtenir une jonction de forte résistance mécanique et électrique entre la pointe de la pipette et la membrane de la cellule. L'établissement de cette jonction est suivi électriquement sous forme d'une diminution du courant qu'il faut injecter à travers la pipette pour réaliser des sauts de potentiel d'une amplitude fixe (5 mV dans nos conditions expérimentales). Lorsque la résistance électrique obtenue est de l'ordre de la dizaine de gigaohms, l'enregistrement est dit en configuration "cellule-attachée". Les courants capacitifs dus à la pipette sont alors compensés électroniquement.

Afin d'avoir accès aux courants électriques totaux de la cellule, et de pouvoir imposer une différence de potentiel de part et d'autre de la membrane cellulaire, deux configurations sont envisageables :

(1) la configuration "cellule-entière", qui nécessite la rupture du fragment de membrane isolé sous la pipette. Dans ces conditions, le contenu de l'électrode diffuse rapidement dans la cellule, et après quelques minutes, la composition du milieu intracellulaire est la même que celle du milieu intrapipette. L'inconvénient principal de cette configuration d'enregistrement est la perte plus ou moins importante de la fonctionnalité des systèmes de seconds messagers intracellulaires du fait de la dialyse du milieu intracellulaire par le contenu de la pipette. Ceci peut néanmoins être un avantage si l'on veut étudier la contribution de ces systèmes de seconds messagers à la réponse observée.

(2) La configuration dite du "patch-perforé", que nous avons retenue pour la quasi-totalité de nos expériences. Cette configuration combine les avantages des enregistrements en configuration "cellule-entière" (enregistrement des courants globaux) mais sans perte des systèmes de seconds messagers intracellulaires (Horn & Marty, 1988; Rae *et al.*, 1991). Elle permet notamment d'éviter la décroissance progressive de l'amplitude des courants membranaires en fonction du temps (phénomènes de "run-down"), que l'on pense être due à la perte de facteurs de phosphorylation intracellulaires (ATP, protéines kinases, etc...). Le principe de l'enregistrement en "patch-perforé" est d'établir la configuration "cellule-attachée"

en ayant introduit dans la solution intrapipette une substance de type antibiotique (nystatine) ou antifongique (amphotéricine B). Ces substances de la famille des polyènes macrocycliques ont pour propriété de s'insérer dans les membranes cellulaires contenant de l'ergostérol ou du cholestérol et de créer des pores sélectivement perméables aux ions monovalents (cations, et dans une moindre mesure, ions chlorures), permettant d'avoir un accès électrique au milieu intracellulaire. Ces pores sont cependant trop petits pour permettre le passage de molécules de la taille des seconds messagers, qui demeurent ainsi dans la cellule. Dans nos expériences, nous avons utilisé l'amphotéricine B comme agent perforant.

b) Etablissement de la configuration "patch-perforé"

La probabilité d'établir la configuration "cellule-attachée" dans de bonnes conditions est faible lorsque la pipette contient de l'amphotéricine B. Afin d'optimiser la formation de la jonction électrode-cellule, la pointe de la pipette est remplie sur 0,5 mm par capillarité avec une solution intracellulaire standard (sans amphotéricine B) puis le restant de la pipette par une solution intracellulaire contenant de l'amphotéricine B (150 µg/ml, Sigma). Ceci permet d'établir le contact avec la membrane cellulaire avant la diffusion de l'amphotéricine B jusqu'à la pointe de la pipette. Suite à l'équilibration des deux solutions dans la pipette, la configuration "patch-perforé" s'établit en quelques minutes. Ceci se traduit sur l'oscilloscope par l'apparition de pics de courants capacitifs au début et à la fin d'un saut de potentiel de 5 mV et d'une durée de 6 ms (appliqués à une fréquence de 50 Hz). L'amplitude de ces pics augmente progressivement avec le degré de perforation de la membrane plasmique et reflète inversement la valeur de la résistance sériée existant entre le milieu intrapipette et l'intérieur de la cellule. Lorsque ces pics ont cessé de croître, nous considérons qu'ils ont atteint leur valeur maximale dans nos conditions, la résistance sériée est alors minimale et donc l'accès électrique est maximal. Lors de nos enregistrements, la valeur de la résistance sériée (déduite par compensation électronique des pics capacitifs) était comprise entre 4 et 16 MΩ.

4. Solutions.

a) Solution extracellulaire

La solution extracellulaire utilisée pour la perfusion générale du bain a la composition suivante (en mM): NaCl: 135 ; KCl: 5; CaCl₂: 2,5 ; MgCl₂: 1 ; Glucose: 10 ; HEPES: 5. Son pH est ajusté à 7,3 à l'aide de NaOH. De la tétrodotoxine (TTX, 0,5 µM) était présente en continu dans toutes les expériences (enregistrements des cellules HEK-293 mis à part) afin de bloquer les canaux sodium dépendants du potentiel et de minimiser ainsi la probabilité de générer des potentiels d'action lors des applications pharmacologiques. Cette solution est utilisée dans les deux jours qui suivent sa préparation.

b) Solutions intracellulaires

La solution intracellulaire standard utilisée pour le remplissage de la pointe de la pipette de patch possède la composition suivante (en mM): CsCl: 9,4 ; Cs₂SO₄: 72 ; HEPES: 10 ; EGTA: 10 ; CaCl₂: 5. Cette solution contient du césium afin de bloquer les conductances au potassium.

Après ajustement du pH à 7,3 avec du CsOH et filtration, elle est stockée au congélateur à -20°C sous forme d'aliquotes de 1 ml. La composition ionique de cette solution a été choisie de façon à fixer le potentiel d'équilibre des ions chlorure (E_{Cl}) à -70 mV.

En raison de sa faible demi-vie, la solution intracellulaire contenant de l'amphotéricine B est préparée juste avant les expériences de *patch-clamp*. Trois mg d'amphotéricine B (Sigma) sont dissout dans un tube eppendorf opaque contenant 100 µl de dimethyl sulfoxyde (Sigma) par une forte agitation au vortex. Cette solution est diluée dans 1 ml de solution intracellulaire standard. Thermosensible et photolabile, la solution obtenue est conservée dans de la glace et à l'abri de la lumière. Elle n'est utilisable que dans les deux à trois heures suivant sa préparation.

Etant donné que E_{Cl} était fixé à -70 mV et que le potentiel d'équilibre des cations était de 0 mV, nous avons pu enregistrer de façon isolée les courants induits par l'activation du récepteur GABA_A en maintenant le potentiel de membrane à 0 mV et les courants induits par l'activation des récepteurs P2X de l'ATP en maintenant le potentiel de membrane à -70 mV.

5. Substances pharmacologiques.

a) Substances utilisées

Agonistes :

- Adénosine-5'-tri-Phosphate (ATP, Sigma),
- Isoguvacine (Peninsula),
- $\alpha\beta$ -Methyleneadenosine 5'-triphosphate ($\alpha\beta$ meATP Sigma),
- 8-Methyl-N-vanillyl-trans-6-nonenamide (capsaïcine, Sigma).

Antagonistes :

- Réactive blue (Sigma),
- Suramine (Sigma),
- Pyridoxalphosphate-6-azophenyl-2',4'-disulphonic acid (PPADS, Tocris, distribué par Bioblock)
- Bicuculline méthiodide (bicuculline , Sigma),
- 2',(ou 3')-O-(2,4,6-trinitrophenyl) adenosine 5'-triphosphate (TNP-ATP, Tocris).

Neurostéroïdes :

- Sulfate de prégnènone (Sigma),
- Prégnènone (Sigma),
- 3 α -hydroxy-5 α -pregnan-20-one (alloprègnanone, Sigma),
- Déhydroépiandrotérone (DHEA, Sigma),
- Sulfate de déhydroépiandrotérone (DHEA-S, Sigma).
- 5 α -pregnan-3, 20-dione (dihydroprogestérone, Steraloids)

Modulateur allostérique :

- 22,23-dihydroavermectin B1 (Ivermectin , Sigma).

Bloquant des canaux sodium voltage-dépendants : Tétrodotoxine (TTX, Latoxan).

b) Préparation des solutions stock des substances à appliquer

Elles sont préparées sous forme de solutions stock mille fois concentrées. La solution de TNP-ATP est achetée sous la forme d'une solution stock dans 0,1 M de tampon Tris et stockée au congélateur à -20 °C. L'ivermectine est préparée dans du DMSO et les neurostéroïdes sont dilués dans de l'éthanol absolu et sont conservés au réfrigérateur à 4 °C. Les autres solutions d'agonistes et d'antagonistes sont préparées dans de l'eau distillée et stockées au congélateur à -20°C. La TTX est préparée dans de l'acide acétique (pH 4,5) et stockée au congélateur à -20°C. Les substances sont ajustées à leurs concentrations finales par dilution dans le milieu extracellulaire juste avant le début de l'expérience.

6. Matériels.

a) Electrodes

Les pipettes de patch sont réalisées avec des tubes à hématocrite d'un diamètre externe de 1,4 mm (Polylabo) à l'aide d'une étireuse verticale (L/M-3-P-A, List). Les résistances obtenues pour les pipettes remplies des solutions intra-électrode étaient comprises entre 2,5 et 4,5 MΩ.

b) Dispositif expérimental

- Enregistrement des courants, acquisition et analyse :

Les électrodes sont fixées sur un porte-électrodes (CV 201A Headstage, Axon instruments, USA) et sont approchées des cellules à l'aide d'un micromanipulateur hydraulique (Narishige, Japon). Cette approche est visualisée grâce à un microscope optique équipé d'un système interférentiel de Hoffmann (Nikon, Japon). Les enregistrements sont effectués à l'aide d'un amplificateur (Axopatch 200A, Axon instruments, USA), et sont visualisés sur un oscilloscope (Tektronix 2220) ainsi que sur un enregistreur graphique (Gould). Parallèlement, les courants sont stockés sur une cassette vidéo VHS après digitalisation à 10 kHz. Les séquences d'intérêt correspondantes aux applications des différents agonistes sont numérisées *online* à 10 kHz par le logiciel Fetchex (Axon instruments), après filtrage à 4,5 kHz (filtre Frequency devices 902). Les courants sont analysés à l'aide des logiciels clampfit (Axon instruments) et Origin (Microcal Software).

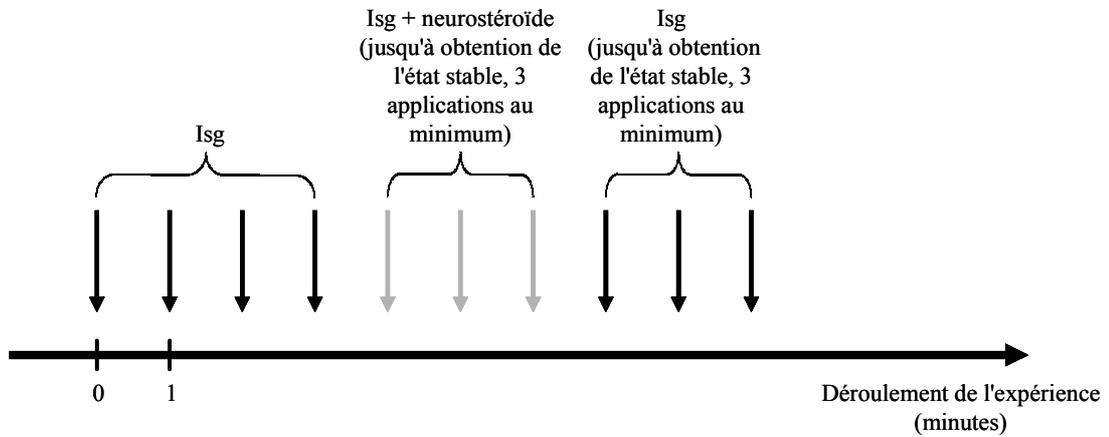
- Application des substances pharmacologiques :

Les agonistes et les drogues sont appliqués au voisinage du neurone enregistré par un système de microperfusion locale utilisant un tube en U percé au niveau de son extrémité coudée (Fenwick *et al.*, 1982). Ce système permet une application locale et rapide des substances pharmacologiques (front de montée <100 ms) à des concentrations connues. Lors de nos enregistrements, la durée des applications des substances était comprise entre 2 et 5 secondes. Durant les expériences, le bain était continuellement perfusé à un débit de 2 ml/min (volume du bain : 2 ml) par du milieu extracellulaire standard contenant de la TTX (0,5 μ M).

7. Quantification des effets des neurostéroïdes sur les réponses GABA_A et P2X.

Afin de déterminer les effets des neurostéroïdes sur les réponses GABA_A et P2X, nous avons adopté le protocole suivant (**figure M-1**) : dans un même neurone enregistré, quatre applications contrôles sont réalisées avec l'agoniste seul. Si les réponses sont reproductibles, des co-applications (au minimum trois) de l'agoniste avec le neurostéroïde à tester sont alors effectuées jusqu'à obtention de l'état stable (reproductibilité des réponses en amplitude). Enfin, des applications "retour" sont exécutées avec l'agoniste seul jusqu'à obtention de l'état stable. L'amplitude des courants est mesurée au pic des réponses.

A. Isoguvacine: Le potentiel de membrane est maintenu à 0 mV ($E_{Cl} = -70\text{mV}$, $E_{\text{cations}} = 0\text{ mV}$)



B. ATP: Le potentiel de membrane est maintenu à -70 mV ($E_{Cl} = -70\text{mV}$, $E_{\text{cations}} = 0\text{ mV}$)

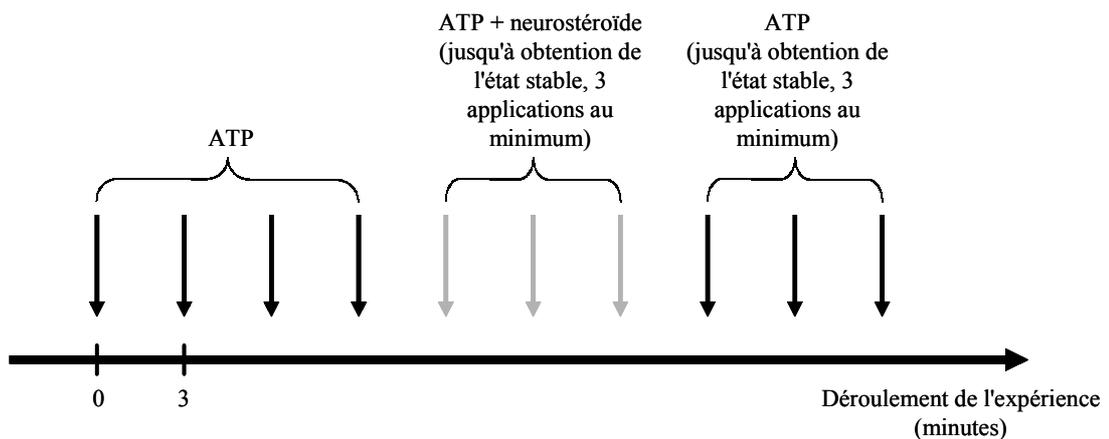


Figure M- 1 : Représentation schématique du protocole d'application de l'isoguvacine (Isg, A), de l'ATP (B), et des neurostéroïdes.

Les flèches verticales noires représentent les applications d'agoniste. Les flèches grisées représentent les co-applications de l'agoniste avec le neurostéroïde à tester. Les enregistrements peuvent durer plusieurs heures.

Nous avons déterminé les pourcentages de potentialisation, d'inhibition, et, dans quelques expériences, le pourcentage de réversion (indice de la réversibilité de l'effet) de la substance considérée pour chaque cellule enregistrée. Ces pourcentages étaient définis de la façon suivante:

$$\%_{potentialisation} = \frac{A_{effet} - A_{contrôle}}{A_{contrôle}}$$

$$\%_{inhibition} = \frac{A_{contrôle} - A_{effet}}{A_{contrôle}}$$

$$\%_{réversion} = \frac{A_{rinçage} - A_{effet}}{A_{contrôle} - A_{effet}}$$

Avec:

$A_{contrôle}$: amplitude pic de la réponse contrôle,

A_{effet} : amplitude pic de la réponse en présence de neurostéroïde,

$A_{rinçage}$: amplitude pic de la réponse après rinçage du neurostéroïde.

La moyenne des pourcentages ainsi obtenus est donnée avec son écart-type, ou le coefficient de variation correspondant (voir §8.a)).

8. tests statistiques.

a) Statistiques descriptives

Les moyennes des courants mesurés, ou les moyennes des pourcentages de potentialisation, de réversion, et d'inhibition sont données avec leurs écart-types et l'étendue (valeur minimale ; valeur maximale). Selon les cas, le coefficient de variation est donné avec la moyenne. Il est calculé comme suit :

$$CV\% = \frac{\text{écart-type}}{\text{moyenne}}$$

b) Tests paramétriques

Préalablement à l'exécution des tests paramétriques, la normalité des distributions est testée pour chaque variable (test de Shapiro-Francia), ou acceptée si $n \geq 30$.

Pour tester l'existence d'une différence significative entre deux moyennes expérimentales, nous avons utilisé le test de Student (test t).

Pour tester l'existence d'une différence significative entre les moyennes d'une même variable, classées selon plusieurs catégories, nous avons utilisé le test *Anova*.

Le risque de première espèce associé aux tests que nous avons utilisés (risque α) était de 5 %.

c) Tests non paramétriques

Afin de tester l'indépendance entre deux paramètres, nous avons utilisé le test du chi-carré (Chi^2).

Résultats

Les résultats obtenus au cours de mon travail de thèse sont présentés en quatre grandes parties :

- Dans une première partie, nous décrivons les caractéristiques électrophysiologiques des réponses membranaires suite à l'activation des récepteurs ionotropiques du GABA et de l'ATP dans les neurones sensoriels primaires de rat nouveau-nés en culture.
- La seconde partie compare les effets modulateurs de trois neurostéroïdes sur les récepteurs GABA_A et P2X présents sur les neurones sensoriels primaires du ganglion rachidien.
- La troisième partie vise à identifier la nature de la composition en sous-unités des récepteurs P2X modulés par la DHEA, grâce à des outils pharmacologiques et à l'utilisation de récepteurs recombinants.
- Enfin dans la dernière partie, nous décrivons et caractérisons les effets de la progestérone sur les réponses membranaires à l'ATP.

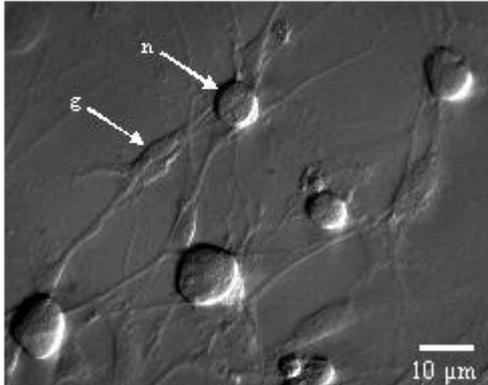
I. Caractérisation des réponses ionotropiques au GABA et à l'ATP dans les neurones sensoriels du ganglion rachidien.

A. Identification des neurones des ganglions rachidiens.

Les neurones présents dans nos cultures sont identifiés par la forme arrondie de leur corps cellulaire, leur aspect contrasté, et la présence d'un gros noyau possédant très souvent un nucléole proéminent (**figure R1A**). Par ailleurs, lors d'un enregistrement en configuration « *patch*-perforé » sans ajout de tétrodoxine (TTX) dans le milieu extracellulaire, les neurones émettent un potentiel d'action en réponse à une dépolarisation membranaire. Cette dernière est obtenue par injection d'un créneau rectangulaire de courant positif d'une durée de 900 ms. (**figure R1B**). Ces caractéristiques morphologiques et électrophysiologiques les distinguent des cellules gliales, qui apparaissent comme des cellules

fusiformes présentant de fins prolongements (**figure R1A**), et qui ne génèrent pas de potentiel d'action lorsque l'on injecte un courant dépolarisant.

A.



B.

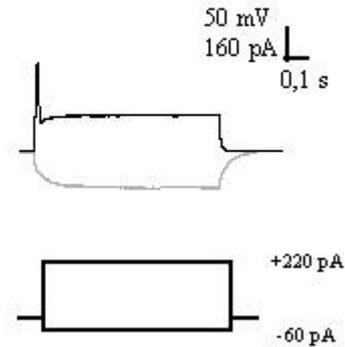


Figure R1 : Caractérisation des neurones des ganglions rachidiens.

A : Photographie d'un champ d'une culture de neurones de ganglions rachidiens (contraste interférentiel différentiel de Hoffmann, 12 heures de culture). Les neurones apparaissent comme des cellules rondes et contrastées (flèche **n**) par rapport aux cellules gliales qui ont un aspect fusiforme et aplati (flèche **g**). Notez les différences de diamètre des corps cellulaires.

B : Enregistrement électrophysiologique réalisé en conditions de courant imposé dans un neurone. Des créneaux rectangulaires de courant d'une durée de 900 ms (traces du bas) ont été injectés. Notez que l'injection de courant positif (+220 pA) induit la décharge d'un potentiel d'action, ce qui prouve que cet enregistrement a été réalisé dans un neurone.

B. Relation diamètre – capacité membranaire.

La capacité d'une membrane cellulaire permet d'estimer sa surface car toutes les membranes biologiques semblent posséder une capacité spécifique de $1 \mu\text{F}/\text{cm}^2$. Le diamètre des corps cellulaires des neurones enregistrés a été déterminé grâce à un oculaire gradué. Le diamètre moyen des neurones enregistrés était de $20,8 \pm 4,7 \mu\text{m}$ ($n=416$; gamme 12,5 à 45 μm).

Nous avons observé une forte corrélation entre le diamètre du corps cellulaire des neurones enregistrés et la capacité membranaire mesurée ($r=0,83$; $n=38$) (**figure R2**). Les neurones que nous avons enregistrés provenant de cultures de 1 à 3 jours, cette observation nous

confirme qu'ils possédaient peu de prolongements neuritiques. Ces conditions favorisent un bon contrôle du potentiel de membrane au cours des expériences de *patch-clamp* en configuration « potentiel imposé ».

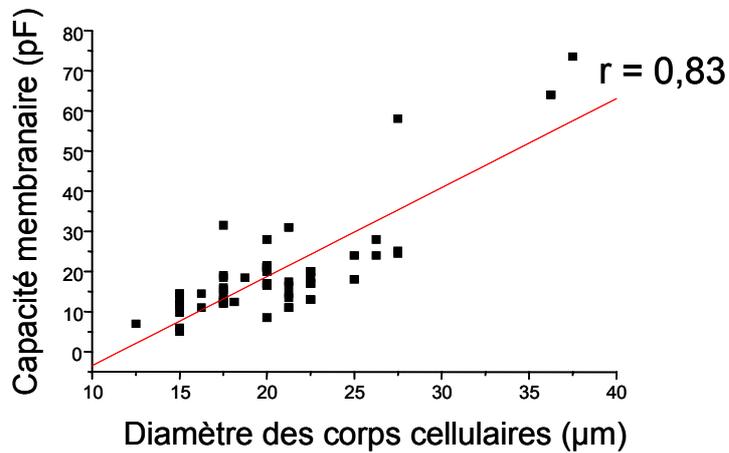


Figure R2 : Caractérisation des neurones des ganglions rachidiens.

A : Photographie d'un champ d'une culture de neurones de ganglions rachidiens (contraste interférentiel différentiel de Hoffmann, 12 heures de culture). Les neurones apparaissent comme des cellules rondes et contrastées (flèche **n**) par rapport aux cellules gliales qui ont un aspect fusiforme et aplati (flèche **g**). Notez les différences de diamètre des corps cellulaires.

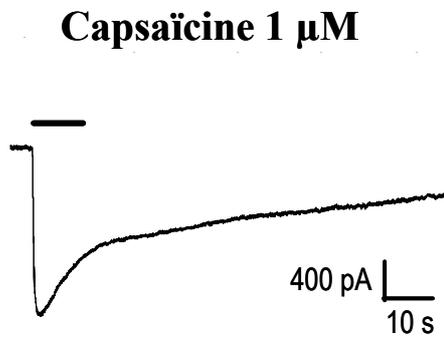
B : Enregistrement électrophysiologique réalisé en conditions de courant imposé dans un neurone. Des créneaux rectangulaires de courant d'une durée de 900 ms (traces du bas) ont été injectés. Notez que l'injection de courant positif (+220 pA) induit la décharge d'un potentiel d'action, ce qui prouve que cet enregistrement a été réalisé dans un neurone.

C. Sensibilité à la capsaïcine et diamètre neuronal.

Une étude précédente réalisée dans notre laboratoire sur des cultures de neurones fraîchement dissociés à partir de ganglions rachidiens de rats nouveau-nés, a montré l'existence de sous-populations de neurones se distinguant par leurs réponses à différents neurotransmetteurs induisant une élévation de calcium intracellulaire (Bowie *et al.*, 1994). Ces caractéristiques semblaient liées au diamètre du corps cellulaire des neurones, et à la présence ou à l'absence d'une réponse à la capsaïcine, un agoniste des récepteurs vanilloïdes de type 1 (récepteurs VR1 ou TRP-V1, voir introduction Chapitre II). Ces derniers sont des canaux cationiques présents sur des neurones sensoriels de petit diamètre chez le rat adulte (Caterina *et al.*, 1997). Dans notre étude nous avons conservé les critères établis par Bowie et coll. (1994), en subdivisant les neurones en trois catégories selon le diamètre de leur corps cellulaire : inférieur à 17 μm , compris entre 17 et 25 μm , et supérieur à 25 μm . A un potentiel de maintien de -70 mV, l'application locale de capsaïcine (1 μM) a induit un courant entrant (amplitude comprise entre 0,4 et 1,4 nA) dans 80 % des 157 neurones enregistrés (**figure R3A**). Le pourcentage des neurones répondant à la capsaïcine pour chaque catégorie est représenté sur l'histogramme de la **figure R3B**. Il apparaît que 80 % des neurones dont le diamètre est inférieur à 17 μm ($n=20$) et 83 % des neurones de diamètre compris entre 17 et 25 μm ($n=122$) présentent une réponse à la capsaïcine. Par contre, seulement 53 % des neurones de gros diamètre (>25 μm , $n=15$) répondent à la capsaïcine. Un test du Chi² nous a permis de montrer que ces trois catégories de neurones ne sont pas homogènes en ce qui concerne leur sensibilité à la capsaïcine ($P=0,028$), les neurones de gros diamètre étant les moins sensibles. D'autre part, un test *t* (test de *Student*) indique que le diamètre moyen des neurones sensibles à la capsaïcine est significativement plus faible que celui des neurones ne répondant pas à l'application de 1 μM de capsaïcine (toutes catégories confondues, $P=0,017$).

Ces résultats sont en accord avec ceux de l'étude de Bowie et coll. (1994).

A.



B.

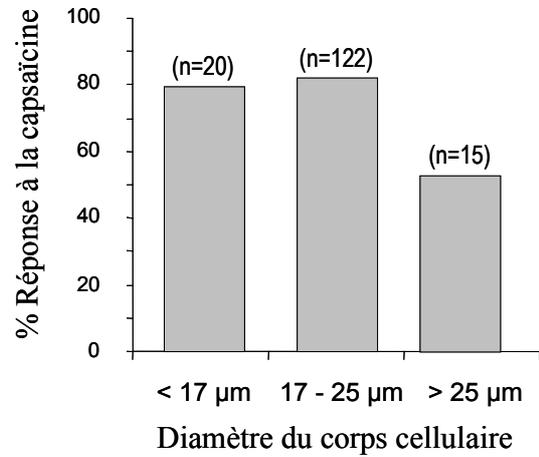


Figure R3 : Effet et distribution des réponses à la capsaïcine dans les neurones de ganglions rachidiens en culture.

A : Exemple d'un courant induit par une application de capsaïcine (1 μ M) au voisinage d'un neurone dont le potentiel de membrane a été maintenu à -70 mV.

B : Histogramme indiquant le pourcentage de neurones répondant à la capsaïcine parmi les différentes catégories de neurones considérés. Nous avons subdivisé l'ensemble des neurones en 3 catégories d'après le diamètre de leur corps cellulaire (cf Bowie *et al.*, 1994).

D. Caractéristiques de la réponse GABA_A.

1) Choix de l'agoniste et de sa concentration.

Afin d'étudier la modulation de la réponse GABA_A par les neurostéroïdes dans le sens d'une potentialisation ou d'une inhibition, nous avons utilisé l'isoguvacine, un agoniste sélectif des récepteurs GABA_A (Macdonald & Olsen, 1994), à une concentration non saturante de 20 μM. Lors des expériences de blocage des réponses GABA_A par la bicuculline, ainsi que pour l'étude de la relation courant-potentiel des réponses GABA_A, nous avons appliqué l'isoguvacine à 40 μM.

2) Effets de l'agoniste.

Dans tous les neurones testés ($n > 50$), l'application locale d'isoguvacine (20 μM) a induit un courant sortant à un potentiel de maintien de 0 mV. Dans la majorité des neurones, l'amplitude du courant était faible : $24,5 \pm 21,5$ pA (gamme : 6 à 93 pA, $n = 15$). Cependant, dans trois neurones nous avons enregistré des courants de plus forte amplitude : 264 ± 115 pA (gamme : 170 à 392 pA, $n = 3$). A la concentration utilisée (20 μM), l'isoguvacine a induit des réponses présentant peu ou pas de désensibilisation à l'occasion d'applications prolongées ou rapprochées dans le temps (**figure R4A**). Pour un intervalle de temps d'une minute entre chaque application d'isoguvacine, les réponses étaient généralement reproductibles en amplitude, et du point de vue de leur décours temporel (**figure R4A**). Nous avons retenu cet intervalle de temps pour la suite de nos expériences.

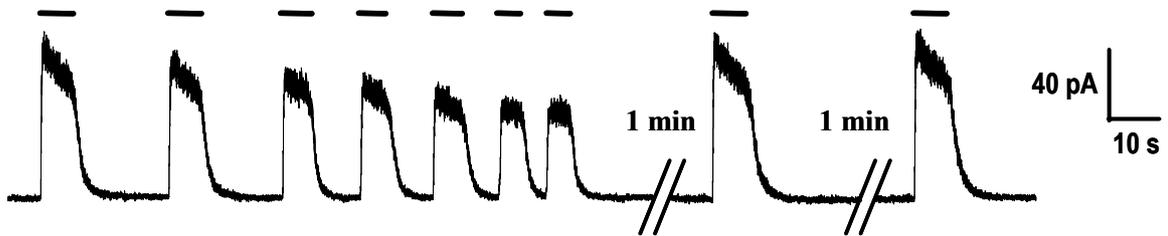
3) Effet d'un antagoniste du récepteur GABA_A.

La bicuculline (20 μM), un antagoniste sélectif des récepteurs GABA_A, co-appliquée avec l'isoguvacine (40 μM) a inhibé la réponse à l'isoguvacine de manière réversible (**figure R4B**). Le pourcentage d'inhibition était de $96,5 \pm 3,5$ % ($n = 4$).

Ce résultat confirme que le courant induit par l'isoguvacine est dû à l'activation de récepteurs GABA_A.

A.

Isg. 20 μ M



B.

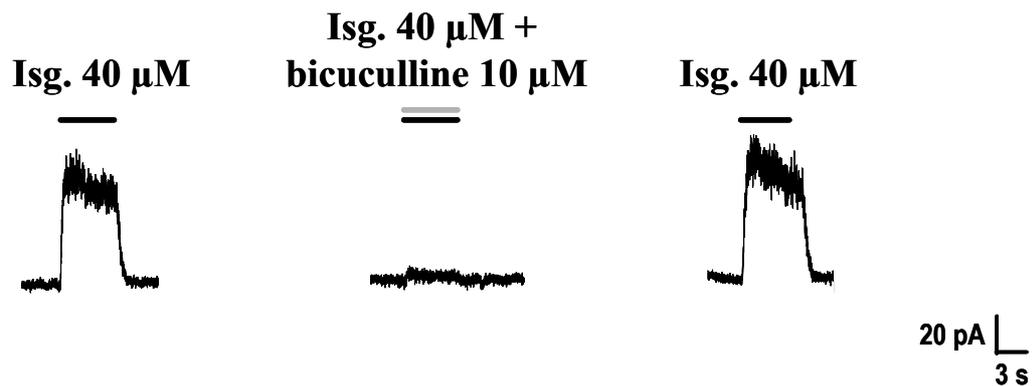


Figure R4 : Caractérisation des réponses à l'isoguvacine.

A : Des applications rapprochées d'une faible concentration d'isoguvacine (Isg, 20 μ M), un agoniste sélectif des récepteurs GABAA, induisent des courants sortants qui présentent une légère désensibilisation (diminution d'amplitude). Par contre, des applications d'isoguvacine (20 μ M) effectuées à une minute d'intervalle induisent un courant d'amplitude reproductible.

B : Le courant induit par l'application de 40 μ M d'isoguvacine est bloqué durant une co-application d'isoguvacine (40 μ M) avec de la bicuculline (10 μ M), un antagoniste des récepteurs GABAA. L'effet de la bicuculline est totalement réversible.

Les barres horizontales indiquent la durée d'application d'isoguvacine (barres noires) ou de la co-application d'isoguvacine et de bicuculline (barre grise). Le potentiel de membrane était maintenu à 0 mV.

4) Relation courant-potentiel des réponses GABA_A.

Pour établir cette relation courant-potentiel (I-V), nous avons déterminé l'amplitude au pic des courants membranaires induits par l'isoguvacine (40 μ M) à différents potentiels de maintien compris entre -110 mV et 0 mV. La relation I-V est linéaire pour des potentiels compris entre -110 mV et -50 mV et présente une rectification sortante pour des potentiels plus positifs. Dans le neurone illustré (**figure R5**), le potentiel d'inversion de la réponse à l'isoguvacine était de -68 mV, ce qui est proche du potentiel d'équilibre des ions chlorure dans nos conditions expérimentales ($E_{Cl} = -70$ mV).

Ces résultats suggèrent que l'ensemble des neurones du ganglion rachidien présente des récepteurs GABA_A fonctionnels, et confirme que ces récepteurs sont perméables aux ions chlorure (Macdonald & Olsen, 1994; Malcangio & Bowery, 1996; Mehta & Ticku, 1999).

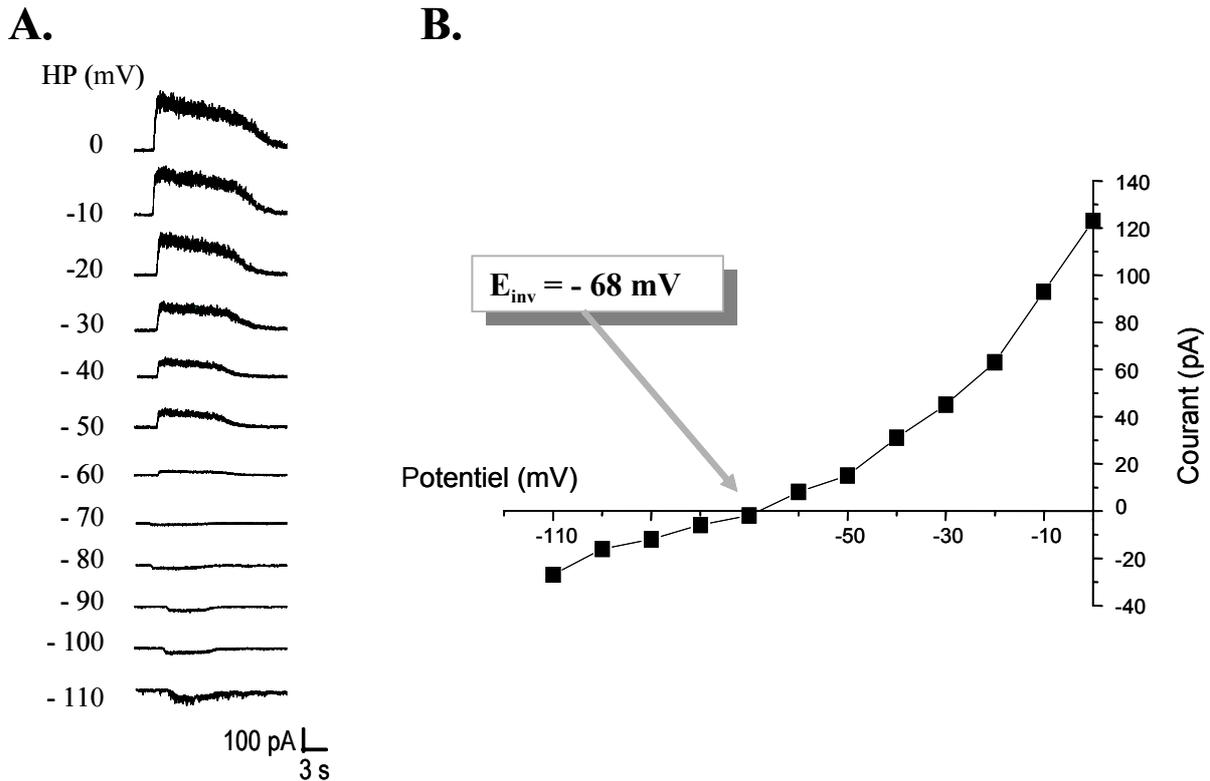


Figure R5 : Relation courant-potentiel (I-V) des réponses à l'isoguvacine (40 μM).

Les traces de courant illustrées en **A** correspondent à des potentiels de maintien (HP) compris entre -110 et 0 mV (incrément de 10 mV). **B**: La relation I-V des amplitudes des courants induits par l'isoguvacine (mesurées au pic des réponses) est quasi linéaire entre -110 et -50 mV, puis présente une rectification dans le sens sortant entre -30 et 0 mV. Dans ce neurone le potentiel d'inversion (E_{inv}) était de -68 mV, ce qui est proche du potentiel d'équilibre des ions chlorure, fixé à -70 mV dans nos expériences.

E. Description des réponses membranaires à l'ATP.

1) Choix de l'agoniste et de sa concentration.

Dans un premier temps, et afin d'étudier la modulation de la réponse P2X par les neurostéroïdes dans le sens d'une potentialisation ou d'une inhibition, nous avons utilisé l'agoniste naturel de ces récepteurs, à savoir l'Adénosine-5'-Tri-Phosphate (ATP), à une concentration non saturante de 1 μM (Robertson *et al.*, 1996). Dans ces conditions nous activons l'ensemble des sous-types des récepteurs exprimés par les neurones sensoriels (Dunn *et al.*, 2001), tout en sachant que les récepteurs homomériques P2X₂ sont les moins sensibles à l'ATP ($CE_{50} \approx 30 \mu\text{M}$), et que par conséquent ils seraient peu activés par une concentration d'ATP de 1 μM et contribueraient de façon moins importante au courant total (North, 2002). Dans certains cas, nous avons également utilisé l' $\alpha\beta$ -Méthylèneadénosine 5'-triphosphate ($\alpha\beta\text{meATP}$), un agoniste de certains récepteurs P2X (voir chapitre III.A.3).

2) Effet de l'ATP.

A un potentiel de maintien de -70 mV, l'application locale d'ATP (1 μM) a induit un courant entrant dans 97 % des neurones testés ($n = 335$). Dans 3 % des neurones testés, l'application locale d'ATP (1 μM) dans les mêmes conditions n'a induit aucun courant. Cet ensemble de neurones n'ayant pas répondu à l'ATP par un courant mesurable sera noté « **Type 0** » dans cette étude.

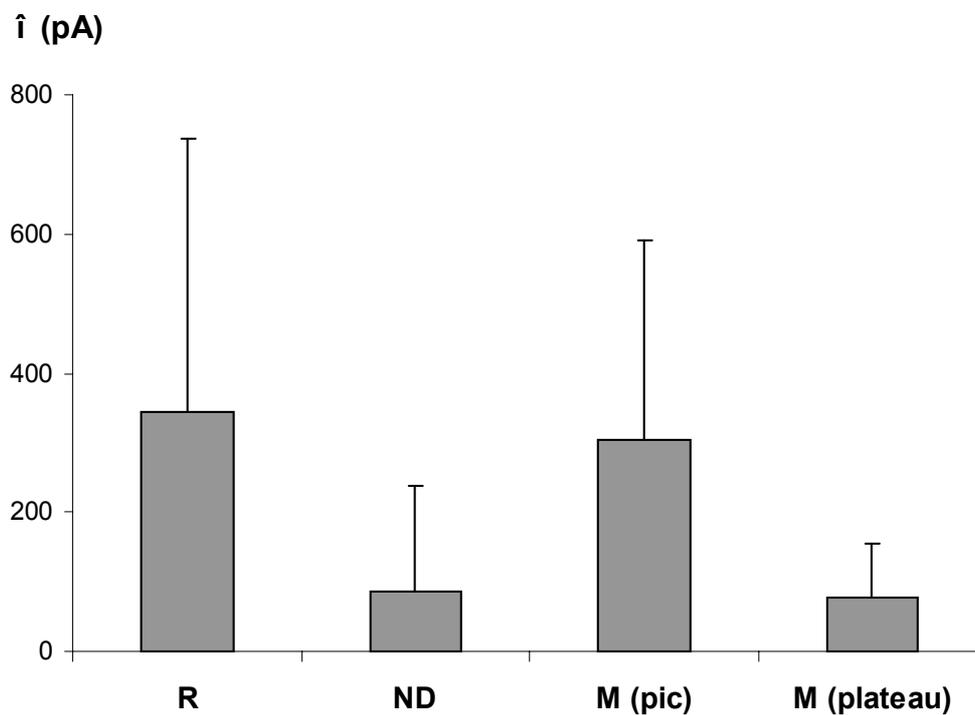
Trois types de réponses à l'ATP ont pu être distingués sur la base de leurs cinétiques (**figure R6A**). Ainsi, parmi les 325 neurones ayant répondu à l'ATP par un courant mesurable, 33 % des courants ont présenté une phase de décroissance unique et rapide (notés « **R** »), 20 % ont présenté une phase de décroissance unique et lente (maintien de la réponse en plateau pendant toute la durée de l'application, notés « **ND** » pour « non-désensibilisant »), 47 % ont présenté un aspect biphasique, comprenant une phase transitoire rapide et une phase lente en plateau (notés « **M** » pour « mixtes »).

Les réponses de type R et M se caractérisaient par une importante désensibilisation lors d'applications répétées (pour des intervalles de temps inférieurs à 20 secondes). Ces réponses étaient cependant reproductibles lors d'applications effectuées toutes les 3 minutes (**figure**

R6B). Par conséquent, nous avons choisi un intervalle de temps de 3 minutes entre chaque application d'ATP pour l'ensemble des expériences effectuées par la suite.

Il faut cependant noter que nous avons parfois observé la disparition totale de la phase rapide des courants P2X, et ce malgré un délai inter-application de 3 à 10 minutes, la phase de plateau (lorsqu'elle était présente) restant inchangée dans la plupart des cas.

Dans le graphique et le tableau ci-dessous sont reportés les courants moyens obtenus lors d'une application locale d'ATP (1 μ M), mesurés au pic et au plateau des réponses, et classés en fonction du type de la réponse.

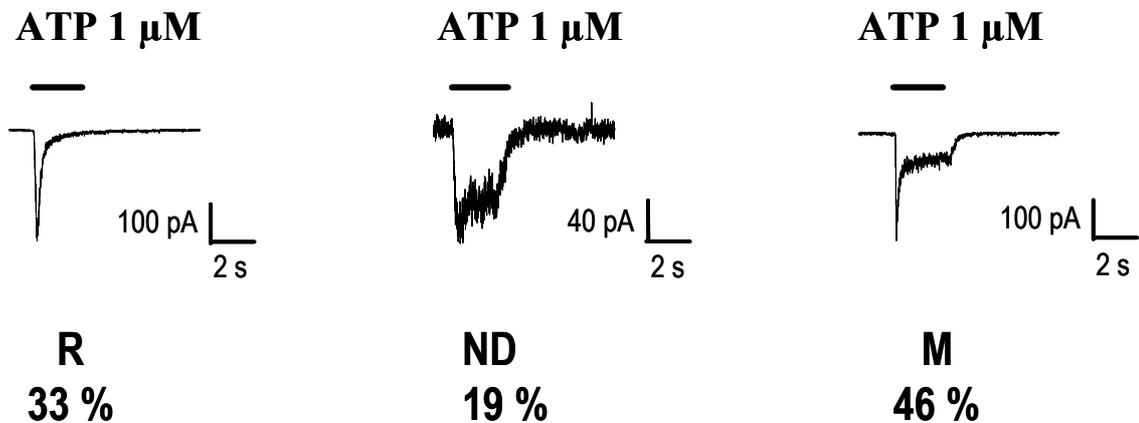


Type de la réponse	\hat{i} (pA)	e.t. (pA)	min (pA)	max (pA)	n
R	345	393	11	2875	96
ND	87	151	9	850	64
M (mesure au pic)	303	289	14	1600	127
M (mesure au plateau)	77	78	6	380	153

Tableau R- 1 : Statistiques descriptives des courants membranaires en réponse à l'ATP (1 μ M). Les mesures sont effectuées au pic pour les réponses de type R et M, et au plateau pour les réponses de type ND et M.

Nous observons une grande variabilité (e.t. : écart-type) des courants membranaires en réponse à l'ATP quel que soit le type de réponse.

A.



B.

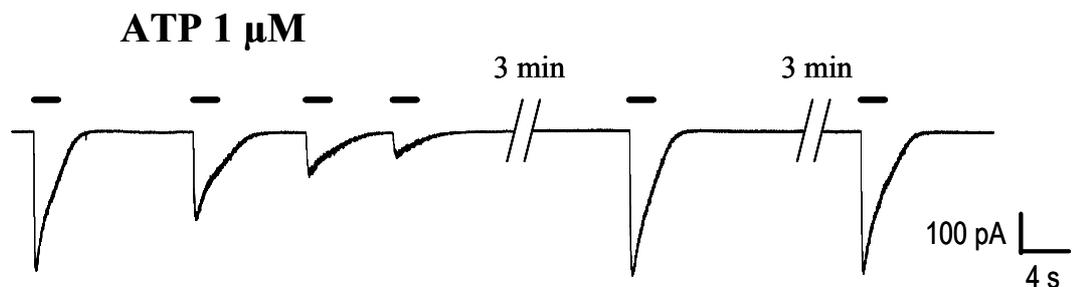


Figure R6 : Caractérisation des courants membranaires induits par l'ATP.

A : Selon les neurones testés, nous avons noté la présence de 3 types de réponses à l'application locale d'ATP (1 μ M). Dans tous les cas, la phase d'activation des courants était rapide. Cependant, les réponses se différenciaient par la cinétique de décroissance du courant durant l'application d'ATP. Ainsi, nous avons distingué des réponses à décroissance rapide (type R, panneau de gauche), lente (type ND pour non désensibilisant, panneau du milieu), ou mixte, c'est à dire présentant une phase rapide suivie d'une phase lente (type M, panneau de droite). Les pourcentages d'occurrence sont indiqués sous les types de réponses ($n = 325$ neurones ayant répondu à l'ATP 1 μ M)

B : Des applications répétées d'ATP (1 μ M) induisent une forte désensibilisation de la réponse (diminution d'amplitude du courant). Cependant, lorsque les applications d'ATP (1 μ M) étaient séparées d'un intervalle de trois minutes, le courant induit était reproductible en amplitude.

Le potentiel de membrane était maintenu à -70 mV.

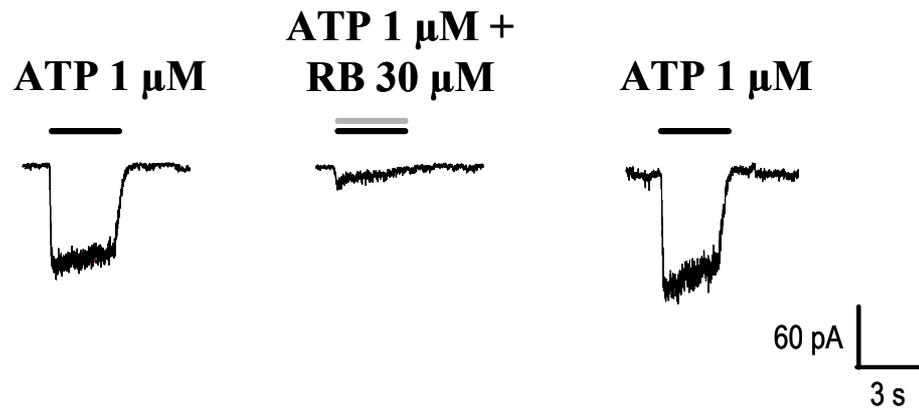
3) Effets des antagonistes des récepteurs P2X sur les réponses à l'ATP.

L'application locale de *reactive blue* (30 μM , en co-application), un antagoniste des récepteurs P2X (Ralevic & Burnstock, 1998 et voir introduction chap. III.) a bloqué de façon réversible les courants induits par l'ATP (1 μM) (**figure R7A**). Le pourcentage de blocage était de $96 \pm 2,5 \%$ ($n = 3$). Dans un autre neurone, le pourcentage d'inhibition était de 38 % seulement.

De même, l'application locale de suramine (30 μM , en co-application), un antagoniste classique des récepteurs P2X a bloqué réversiblement $92 \pm 5 \%$ ($n = 4$) de la réponse à l'ATP (1 μM) (**figure R7B**). Enfin, l'application de PPADS (50 μM , à l'équilibre) a inhibé de façon réversible les courants induits par l'ATP (1 μM). Le pourcentage de blocage était de $98 \pm 1,5 \%$ ($n = 3$, non illustré).

Ces résultats confirment que le courant induit par l'ATP est dû à l'activation de récepteurs-canaux de type P2X.

A.



B.

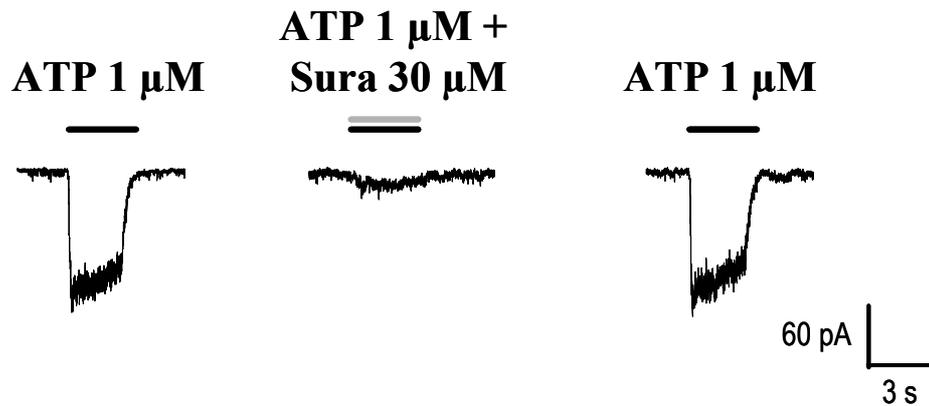


Figure R7 : Effets des antagonistes des récepteurs-canaux P2X sur les réponses induites par une application locale d'ATP (1 μM).

Le courant induit par l'application d'ATP (1 μM) est bloqué de façon réversible par une co-application avec du *reactive blue* (RB, 30 μM) (A), ou de la suramine (Sura, 30 μM) (B), deux antagonistes classiques des récepteurs-canaux de l'ATP. Les barres horizontales noires et grises indiquent respectivement les durées des applications d'ATP et des co-applications d'ATP et d'antagoniste. *Potentiel de maintien: -70 mV.*

4) Relation courant-potentiel des réponses à l'ATP.

Des applications d'ATP (1 μ M) à des potentiels de maintien allant de -70 à +40 mV ont permis d'établir la courbe courant-potentiel (I-V) des courants induits par l'ATP. Le potentiel d'inversion était proche de 0 mV (**figure R8**) ce qui est compatible avec l'activation d'une conductance cationique non sélective puisque que, dans nos conditions expérimentales, le potentiel d'équilibre des ions chlorure était fixé à -70 mV. La relation I-V présente une forte rectification entrante pour des potentiels négatifs. Pour des potentiels positifs, le courant sortant observé était de faible amplitude.

L'ensemble de ces résultats suggère que dans nos cultures de neurones du ganglion rachidien de rat nouveau-né, au moins 97 % des neurones possèdent des récepteurs P2X fonctionnels, et que leur activation induit une augmentation de la perméabilité de la membrane aux cations.

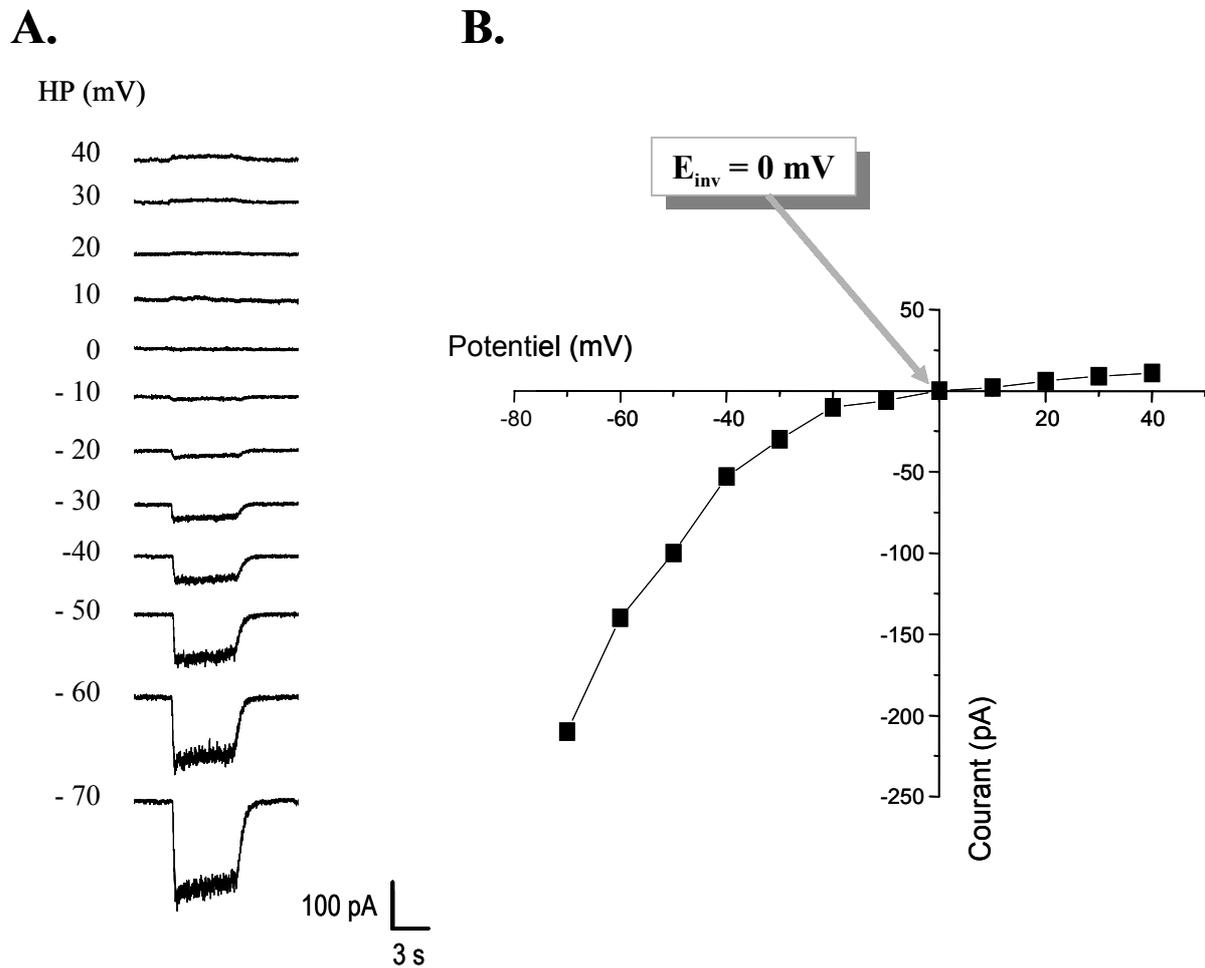


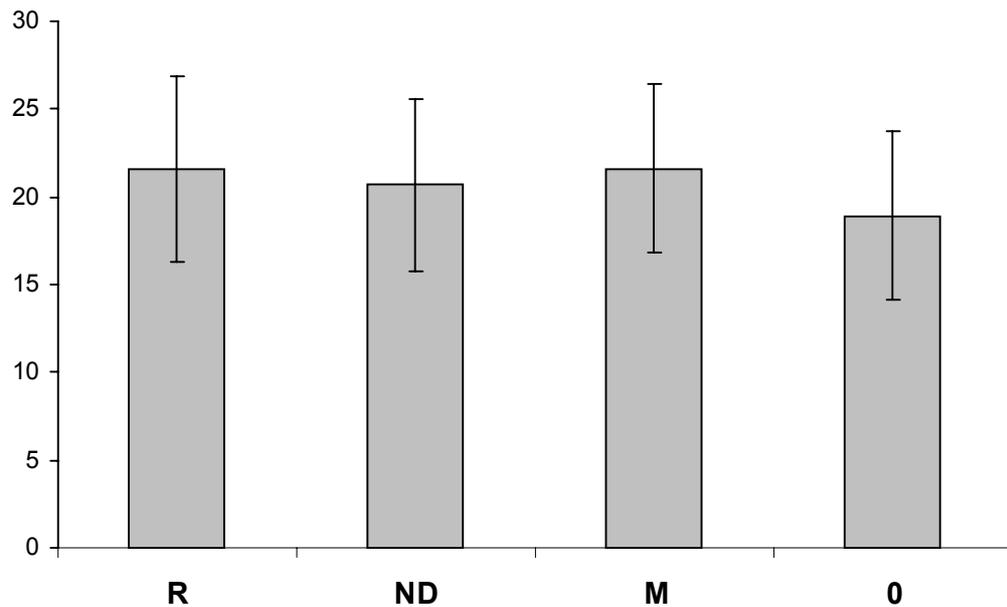
Figure R8 : Relation courant-potentiel (I-V) des amplitudes au pic des réponses à l'ATP (1 μM).

Les traces de courant illustrées en A correspondent à des potentiels de maintien (HP) compris entre -70 et +40 mV (incrément de 10 mV) (B). La relation I-V présente une forte rectification dans le sens entrant aux potentiels négatifs. Dans cette cellule, le potentiel d'inversion (E_{inv}) de la réponse à l'ATP était de 0 mV, ce qui est compatible avec l'implication d'une conductance cationique non sélective.

5) Relation « type de courant P2X » – Diamètre des neurones.

La moyenne du diamètre du corps cellulaire des neurones enregistrés a été calculée pour les différents types de réponses à une application locale d'ATP (1 μ M). Les résultats sont résumés dans le graphique et le tableau suivants :

Diamètre moyen (μ m)



Type	Diamètre moyen	Ecart-type	n
R	21,6	5,3	100
ND	20,7	4,9	58
M	21,6	4,8	137
0	18,9	4,8	10

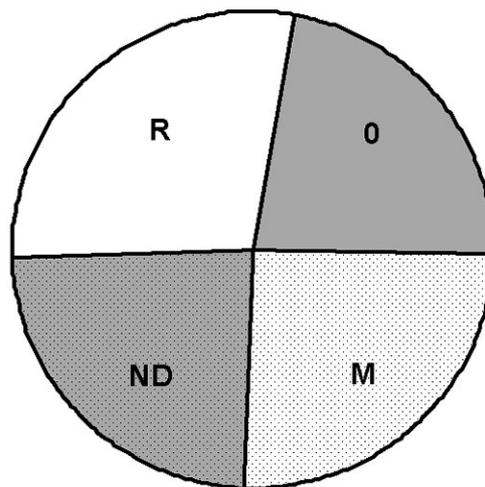
Tableau R-2 : Diamètre moyen du corps cellulaire des neurones en fonction du type de la réponse membranaire à l'ATP (1 μ M).

Malgré un diamètre en moyenne apparemment plus faible pour les neurones ne répondant pas à l'application locale d'ATP 1 μ M, le test *ANOVA* n'a pas permis de mettre en évidence une différence significative entre le diamètre des neurones présentant les différents types de réponses ($P = 0,252$).

6) Relation « type du courant P2X » - Sensibilité à la capsaïcine.

Le pourcentage de neurones sensibles à la capsaïcine a été calculé pour chaque type de réponse à l'ATP (1 μ M) observé. Les résultats sont reportés dans le graphique et le tableau ci-dessous :

% de neurones sensibles à la capsaïcine



Type	% de neurones sensibles à la capsaïcine	n testés
O	67%	6
M	75%	48
ND	71%	14
R	84%	19

Tableau R-3 : Pourcentage de neurones sensibles à la capsaïcine (1 μ M) en fonction du type de la réponse membranaire à l'ATP (1 μ M).

Malgré un pourcentage de neurones sensibles à la capsaïcine plus important dans la catégorie des neurones à réponse rapide, le test du Chi² n'a pas permis de mettre en évidence une différence significative entre les différents pourcentages ($P = 0,984$).

II. Modulation différentielle des réponses GABA_A et P2X par les neurostéroïdes.

Dans une approche initiale pour sélectionner les molécules d'intérêt, nous avons testé, sur les réponses GABA_A et P2X des mêmes neurones du ganglion rachidien, les effets modulateurs de trois neurostéroïdes : le sulfate de prégénolone, l'allopregnanolone, et la déhydroépiandrostérone (DHEA). Notre choix s'est porté dans un premier temps sur ces trois neurostéroïdes car ils sont connus pour moduler l'activité des récepteurs GABA_A dans d'autres modèles (Rupprecht & Holsboer, 1999), et susceptibles d'être synthétisés dans la corne dorsale de la moelle épinière ou le ganglion rachidien (Compagnone & Mellon, 2000). Le protocole expérimental utilisé pour chaque neurostéroïde est illustré sur la **figure R9**.

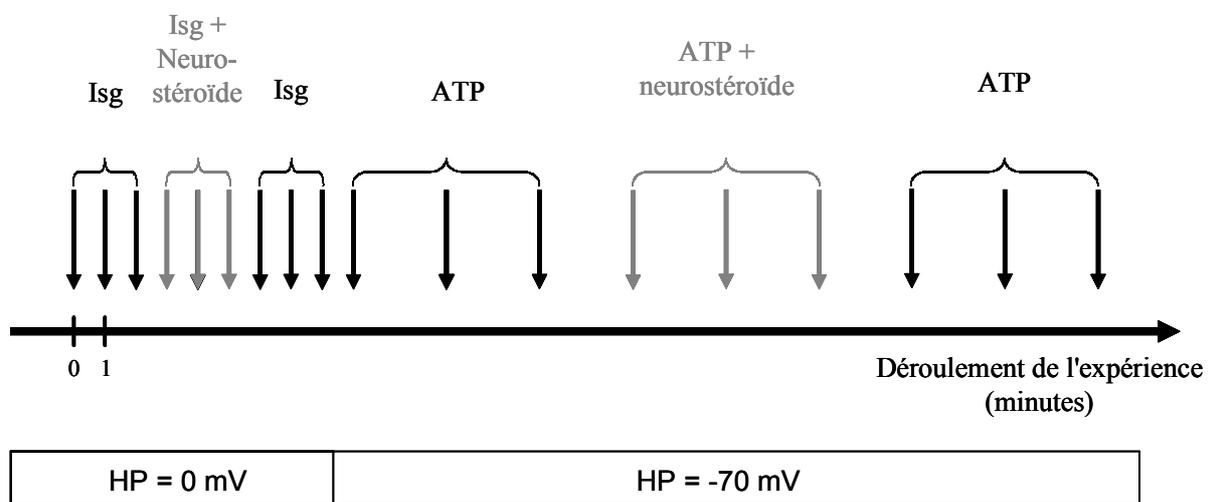


Figure R9 : Représentation schématique du protocole destiné à tester les effets des neurostéroïdes sur les réponses à l'isoguvacine (Isg), et à l'ATP dans un même neurone.

Les flèches verticales noires représentent les applications d'agoniste. Les flèches grises représentent les co-applications de l'agoniste avec le neurostéroïde à tester. Chaque accolade représente au minimum 3 applications successives espacées d'une minute pour l'isoguvacine, et de 3 minutes pour l'ATP, et donnant des réponses membranaires d'amplitude stable. Le potentiel de maintien (HP) était de 0 mV lors du test de l'effet des neurostéroïdes sur les réponses à l'isoguvacine, et de -70 mV lors de l'enregistrement des réponses à l'ATP. Les enregistrements devaient parfois durer plusieurs heures.

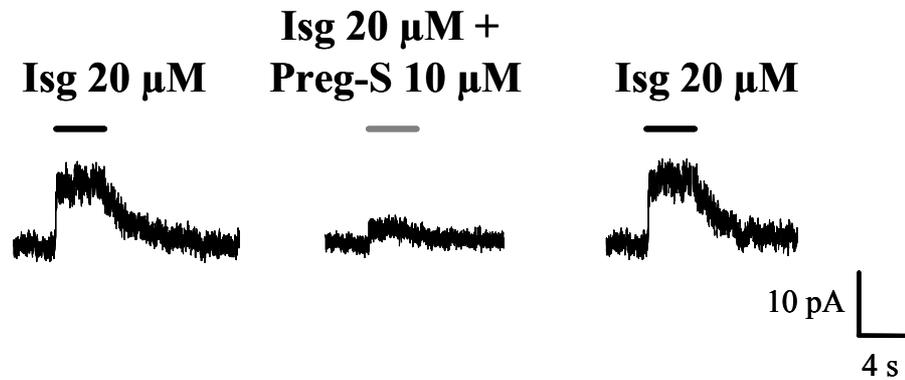
A. Effets du sulfate de prégnénone.

Les effets modulateurs de ce neurostéroïde ont été testés sur les réponses à l'isoguvacine (20 μM) puis à l'ATP (1 μM) dans 6 neurones. Les effets inhibiteurs du sulfate de prégnénone sur l'activité des récepteurs GABA_A ont été décrits dans d'autres modèles (Compagnone & Mellon, 2000).

L'application de sulfate de prégnénone seul (10 μM) n'a jamais induit de courant ni modifié le potentiel de maintien, ce qui signifie qu'il n'a pas d'effet agoniste sur quelconque un récepteur-canal exprimé dans les neurones du ganglion rachidien.

Sur la totalité des neurones testés, la co-application locale de sulfate de prégnénone (10 μM) a eu un effet inhibiteur sur le courant induit par l'isoguvacine (**figure R10A**). Le pourcentage d'inhibition était de $64 \pm 19\%$, et le pourcentage de réversion était de $63 \pm 33\%$ (gamme : 32 à 100 %). Par ailleurs, dans des conditions où le milieu extracellulaire avait été équilibré par perfusion générale du bain avec du sulfate de prégnénone (10 μM), le pourcentage d'inhibition lors de la co-application d'isoguvacine et de sulfate de prégnénone était de $67 \pm 11\%$ ($n=3$). L'amplitude de cette inhibition est comparable à celle obtenue lors des expériences de co-application en absence de sulfate de prégnénone dans le bain. En revanche, dans les mêmes neurones, le sulfate de prégnénone (10 μM) co-appliqué localement avec de l'ATP n'a eu aucun effet sur le pic ou le plateau de la réponse P2X ($n=6$, **figure R10B**). Par ailleurs, nous avons constaté l'absence d'effet du sulfate de prégnénone (10 μM) sur la réponse ATP dans 7 autres neurones dans lesquels l'effet sur la réponse à l'isoguvacine n'a pas été testé.

A.



B.

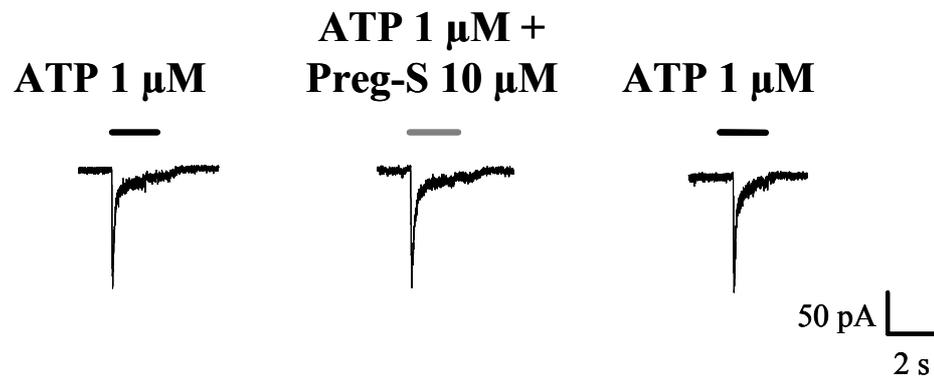


Figure R10 : Effets du sulfate de prégnénolone (Preg-S) sur les courants induits par l'isoguvacine et l'ATP.

A : Le sulfate de prégnénolone (10 μM) inhibe réversiblement l'amplitude des courants induits par l'isoguvacine (Isg, 20 μM). Dans ce neurone, Le pourcentage d'inhibition était de 92 %. *Potentiel de maintien: 0 mV.*

B : Le sulfate de prégnénolone (10 μM) n'a pas eu d'effet sur les courants induits par l'ATP (1 μM) dans le même neurone. *Potentiel de maintien: -70 mV.*

Dans cette figure et les suivantes, les barres horizontales noires représentent les durées d'application des agonistes seuls et les barres horizontales grises représentent les durées de co-application des agonistes avec les neurostéroïdes.

B. Effets de l'alloprégnanolone.

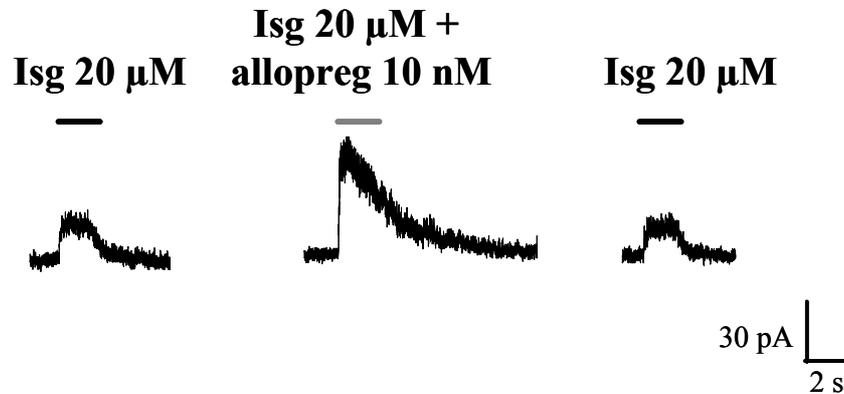
Nous avons comparé les effets modulateurs de ce neurostéroïde sur les réponses à l'isoguvacine (20 μM), puis à l'ATP (1 μM) dans 6 neurones sensoriels. L'alloprégnanolone est un modulateur allostérique positif des récepteurs GABA_A neuronaux (Compagnone & Mellon, 2000). L'application d'alloprégnanolone seule (10 μM – 1 μM) n'a jamais induit de courant membranaire, et n'a pas non plus modifié le potentiel de maintien des neurones enregistrés. Ce neurostéroïde ne semble donc pas avoir d'effet propre sur les neurones du ganglion rachidien.

Sur la totalité des neurones testés, l'application locale d'alloprégnanolone (10 nM) a eu un effet potentialisateur sur le courant induit par l'application locale d'isoguvacine (**figure R11A**). L'augmentation moyenne d'amplitude de la réponse isoguvacine était de $396\% \pm 173\%$ (gamme : 197 à 1157 %), et le pourcentage de réversion était de $93 \pm 4\%$ (gamme : 83 à 99 %). Par ailleurs, nous avons testé l'alloprégnanolone (10 nM) dans des conditions où le milieu extracellulaire (macroperfusion) contenait de l'alloprégnanolone à l'équilibre (10 nM). Le pourcentage de potentialisation était alors de $256 \pm 124\%$ ($n=3$), ce qui est comparable au pourcentage obtenu lors des expériences de co-application en absence d'alloprégnanolone dans le bain. L'alloprégnanolone (10 nM), co-appliquée avec l'ATP (1 μM), n'a eu aucun effet sur la réponse P2X des 6 neurones que nous avons testés (**figure R11B**).

De plus, l'absence d'effet de l'alloprégnanolone (10 nM et 10 μM) sur la réponse ATP a été constatée dans 4 autres neurones, dans lesquels nous n'avons pas évalué les effets sur les récepteurs GABA_A .

Ces résultats indiquent que le sulfate de prégnénolone et l'alloprégnanolone modulent de façon opposée l'activité des récepteurs GABA_A mais sont sans effet sur la réponse à l'ATP impliquant l'activation de récepteurs P2X dans les neurones du ganglion rachidien.

A.



B.

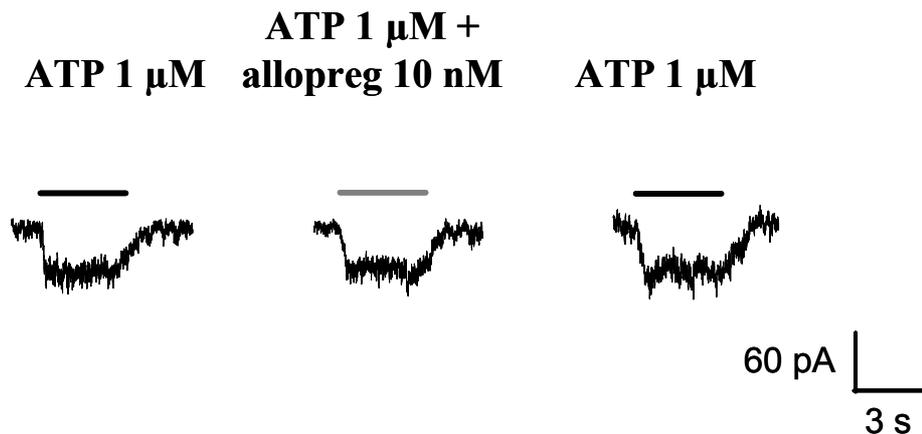


Figure R11 : Effets de l'allop rég n anolone sur les courants induits par l'isoguvacine et l'ATP.

A : L'application locale d'allop rég n anolone (allopreg) à une concentration de 10 nM a augmenté fortement et réversiblement l'amplitude des courants induits par l'isoguvacine (Isg, 20 μ M). Dans ce neurone, le pourcentage de potentialisation était de 250%. *Potentiel de maintien: 0 mV.*

B : Dans le même neurone, l'application locale d'allop rég n anolone (allopreg) à une concentration de 10 nM n'a pas eu d'effet net et mesurable sur les courants induits par l'ATP (1 μ M).

Potentiel de maintien: -70 mV.

C. Effets de la DHEA.

Les effets modulateurs de ce neurostéroïde ont été étudiés sur les réponses à l'ATP (1 μ M) puis à l'isoguvacine (20 μ M) dans 7 neurones.

Dans la totalité des neurones testés, l'application locale de 10 μ M de DHEA (déh_ydroép_iandrosterone) a eu un effet inhibiteur sur le courant induit par l'application locale de 20 μ M d'isoguvacine (**figure R12A**). Le pourcentage d'inhibition était de 34 ± 10 % ($n = 7$), et le pourcentage de réversion était de 100 %.

L'application locale d'ATP (1 μ M) a induit un courant entrant dans 5 des 7 neurones testés.

- Trois de ces réponses ont présenté une phase en plateau, qui a été potentialisée systématiquement lors de la co-application de DHEA (10 μ M) avec l'ATP. Le pourcentage de potentialisation était de 193 ± 207 % (gamme 15 à 420 %), et le pourcentage de réversion était de 92 ± 14 % (**figure R12B1**).
- Quatre de ces réponses ont présenté une phase rapide. L'une de ces réponses a été inhibée réversiblement de 34 % lors de la co-application de DHEA (10 μ M) avec l'ATP (**figure R12B2 et R13A**). Les trois autres réponses n'ont pas été modifiées en présence de DHEA.
- Par ailleurs, sur deux neurones de petit diamètre (< 17 μ m) qui ne répondaient pas à l'application locale de 1 μ M d'ATP par un courant mesurable, la co-application locale d'ATP (1 μ M) et de DHEA (10 μ M) a fait apparaître un courant entrant ayant des phases d'activation et de désactivation lentes (**figure R12B3**). Les amplitudes des courants enregistrés dans ces cellules en présence de DHEA étaient de 9 pA et 53 pA.

La DHEA appliquée seule n'a jamais induit de réponse membranaire ($n = 7$)

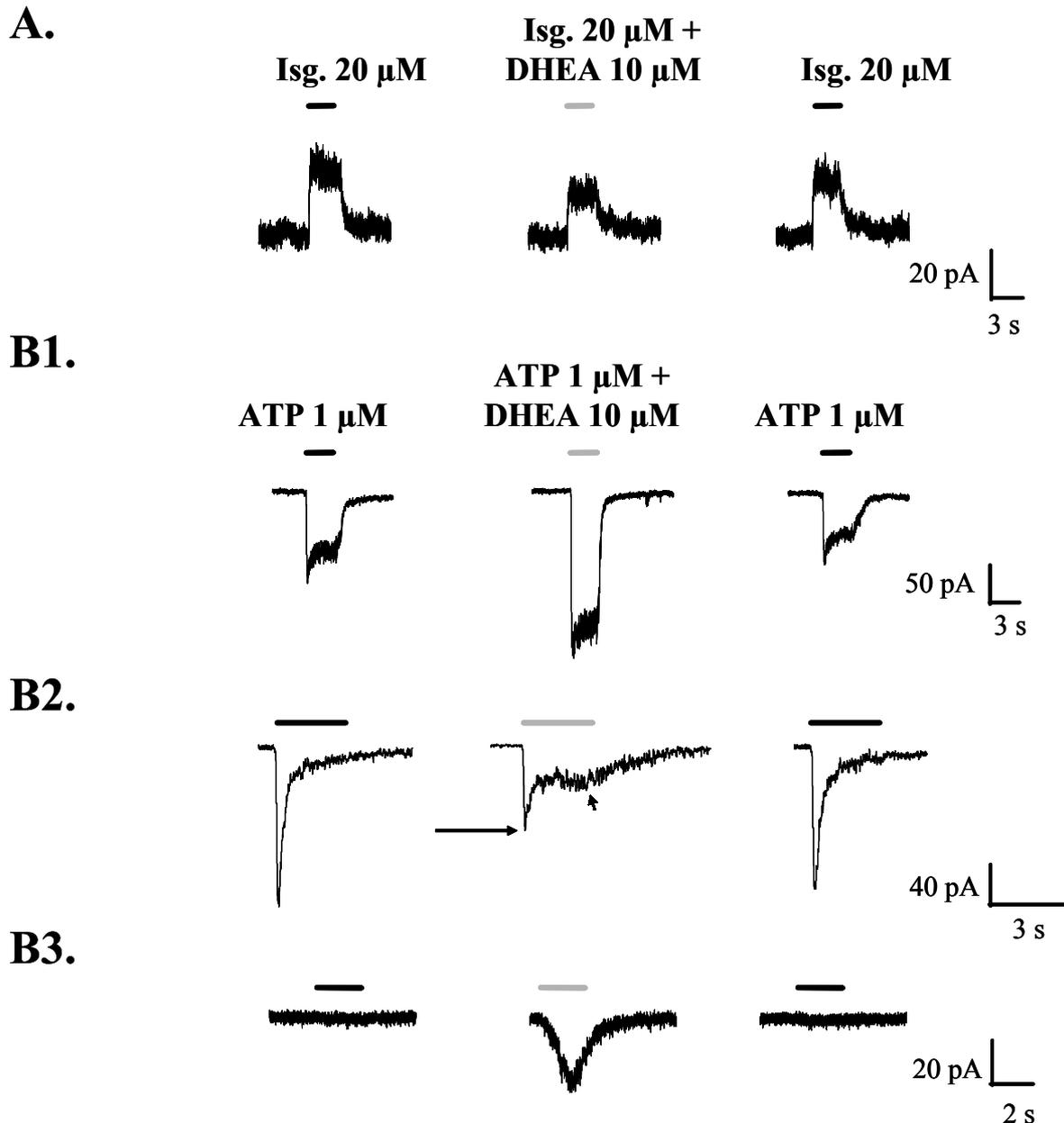


Figure R12 : Effets de la DHEA sur les courants induits par l'isoguvacine et l'ATP.

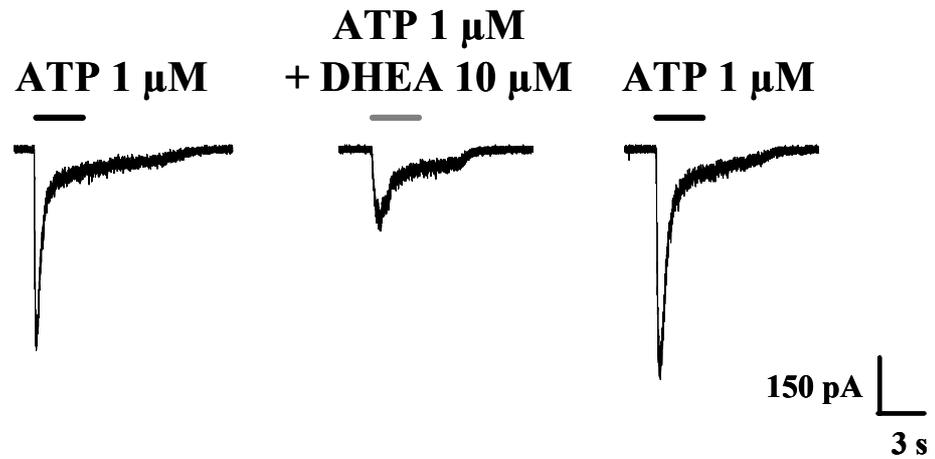
A : A une concentration de 10 μ M, la DHEA (déhydroépiandrostérone) a inhibé de façon réversible l'amplitude des courants induits par l'isoguvacine (20 μ M). Dans ce neurone, le pourcentage d'inhibition était de 30 %. Potentiel de maintien: 0 mV.

B1 : Dans le mêmes conditions d'application, la DHEA (10 μ M) a potentialisé réversiblement les courants induits par l'ATP (1 μ M). Dans ce neurone, le pourcentage de potentialisation était de 120 %.

B2 : Dans ce neurone, une phase en plateau est apparue (tête de flèche) lors de la co-application d'ATP (1 μ M) et de DHEA (10 μ M), tandis que phase rapide de la réponse à l'ATP a été inhibée par la DHEA (flèche).

B3 : Exemple d'un neurone dans lequel une application locale d'ATP (1 μ M) n'a pas induit de courant mesurable. Dans le même neurone, la co-application d'ATP (1 μ M) avec de la DHEA (10 μ M) a induit un courant entrant lent d'une amplitude de 35 pA environ. L'application locale de DHEA seule n'a pas induit de courant (non illustré). En B1 – B3, le potentiel de maintien était de -70 mV.

A.



B.

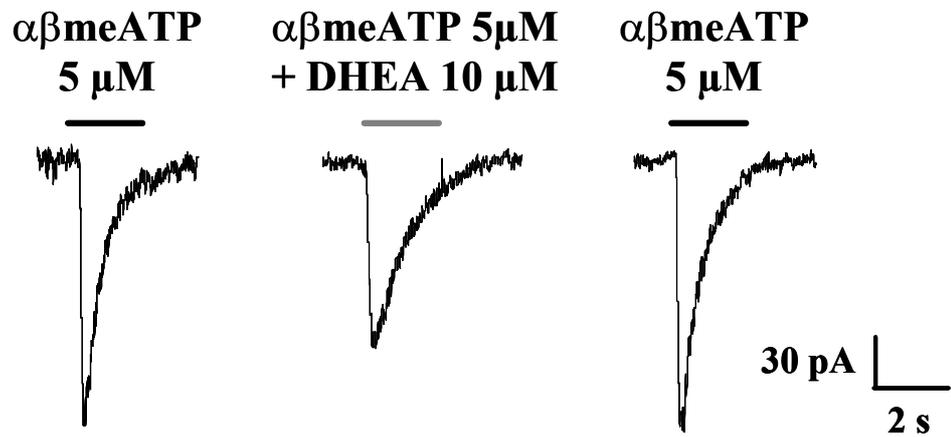


Figure R13 : Effets de la DHEA sur le pic des courants induits par l'ATP.

A : Inhibition réversible du pic d'une réponse Mixte à l'ATP (1 μ M) par la DHEA (10 μ M).

B : Inhibition réversible du pic d'une réponse Rapide à l' $\alpha\beta$ meATP (5 μ M) par la DHEA (10 μ M).

Le potentiel de maintien était de -70 mV.

L'ensemble de ces résultats indique que la DHEA inhibe faiblement les réponses $GABA_A$ et, selon le neurone enregistré, module différenciellement l'activité des récepteurs P2X : la phase rapide des réponses de types R et M semble être inhibée dans une fraction des neurones, alors que l'amplitude de la phase en plateau des réponses de type M et ND est parfois augmentée. De plus, il semble que la DHEA puisse révéler la présence d'une réponse à l'ATP dans un certain nombre de neurones, puisque des neurones ne répondant pas à l'application d'ATP seule répondent à la co-application d'ATP et de DHEA par un courant entrant.

En raison de la diversité des effets de la DHEA sur les réponses P2X, nous avons décidé d'étudier plus en détail cette modulation. Le chapitre III est entièrement consacré à ce sujet.

III. Modulation sélective et différentielle par la DHEA des récepteurs P2X en fonction de leur composition en sous-unités.

Dans le chapitre précédent, nous avons observé que, dans une fraction de neurones, la DHEA modulait les réponses membranaires à l'ATP de façon différente selon le type de la réponse (M, ND, R ou 0).

Par conséquent, nous avons ensuite tenté d'établir une corrélation entre le type de modulation observée (potentialisation ou inhibition) et la composition en sous-unité des récepteurs modulés.

Dans l'ensemble des expériences présentées dans ce chapitre, la DHEA a systématiquement été co-appliquée avec l'ATP. L'application de DHEA seule à des concentrations comprises entre 10 μ M et 100 μ M n'a jamais induit de réponse membranaire mesurable, ce qui suggère que la DHEA n'est pas un agoniste de récepteurs-canaux présents dans les neurones du ganglion rachidien.

A. Effets de la DHEA sur le pic des réponses P2X.

1) Description de l'effet.

La DHEA (10 μ M), a inhibé l'amplitude de la phase transitoire des réponses R et M induites par l'application locale d'ATP (1 μ M) dans 56 % des neurones testés ($n = 18$, types R et M confondus, voir **figures R12B2 et R13A**). Le pourcentage d'inhibition du pic était de 35 ± 8 %. La capsaïcine (1 μ M) a induit un courant dans 80 % des neurones présentant des réponses P2X inhibés par la DHEA.

2) Sélectivité de l'effet.

Les données de la littérature indiquent que seuls les récepteurs homomériques P2X₁ et P2X₃ répondent à l'ATP par un courant à décours transitoire et présentant une désensibilisation importante (Khakh *et al.*, 2001). Par ailleurs, la sous-unité P2X₃ est fortement exprimée par les neurones sensoriels primaires (Vulchanova *et al.*, 1997), alors que le niveau d'expression de la sous-unité P2X₁ est très faible dans ces neurones (Xiang *et al.*, 1998a).

L' α meATP est un agoniste qui active les récepteurs homomériques P2X₁ et P2X₃ (Khakh *et al.*, 2001). Cette activation se traduit par une réponse rapide et transitoire, et fortement désensibilisante (voir **figure R13B**). La DHEA (10 μ M) a inhibé les réponses transitoires à l' α meATP dans 60 % des neurones testés ($n=10$). Le pourcentage moyen d'inhibition était de 35 ± 13 %. Ces chiffres sont comparables à ceux obtenus lorsque l'ATP était utilisée comme agoniste.

L'ensemble de ces données indique que la DHEA inhiberait sélectivement l'activité des récepteurs homomériques P2X₃ dans les neurones sensoriels du ganglion rachidien. L'effet de la DHEA ne semble pas être restreint aux neurones sensibles à la capsaïcine.

B. Effets de la DHEA sur le plateau des réponses P2X.

1) Description de l'effet.

Dans 79 % des neurones présentant une réponse de type ND ou M ($n=53$), la DHEA (10 μ M) a augmenté l'amplitude de la phase en plateau de la réponse à l'application d'ATP (1 μ M) (**Figure R12B1**). Le pourcentage de potentialisation était de 81 ± 82 % (gamme : 8 à 420 %). 85 % des neurones de type M ou ND testés avec la DHEA étaient sensibles à la capsaïcine ($n=20$), et dans la fraction de ces neurones dont les réponses P2X ont été facilitées par la DHEA, 87 % des neurones étaient sensibles à la capsaïcine.

Par ailleurs, la DHEA a fait apparaître un plateau (que nous désignerons par la suite sous le terme de « **néoplateau** »), dans 47 % des neurones dont les réponses à l'application locale d'ATP étaient de type rapide ($n=15$, **Figure R12B2**). La moyenne du courant non désensibilisant ainsi obtenu était de 35 ± 29 pA (gamme : 5 à 94 pA). Enfin, la DHEA co-appliquée avec l'ATP (1 μ M) a fait apparaître un courant entrant avec une cinétique d'activation et de désactivation lente dans 75 % des neurones n'ayant pas répondu à une application locale d'ATP 1 μ M seule ($n=8$, **Figure R12B3**). La réponse ainsi obtenue était de 40 ± 49 pA (gamme : 9 à 133 pA). Concernant les neurones ayant des réponses P2X de type R, 86 % étaient sensibles à la capsaïcine ($n=7$), et dans la fraction des neurones R où la DHEA a fait apparaître un néoplateau, la capsaïcine a induit une réponse dans 100 % des cas (contre 50 % des cas dans la fraction des neurones pour lesquels la DHEA n'a pas fait

apparaître de néoplateau lorsqu'elle était co-appliquée avec l'ATP). Pour les neurones de type 0, la capsaïcine a induit un courant dans 3 neurones sur les 4 testés, et dans 67 % des neurones dans lesquels la DHEA a fait apparaître un néoplateau ($n = 3$).

Anisi, il semble que parmi les neurones et ayant des réponses de type R à l'ATP (1 μ M), DHEA fasse apparaître une réponse en plateau systématiquement dans les neurones sensibles à la capsaïcine, et seulement dans la moitié des neurones insensibles à la capsaïcine.

Le tableau R4 présente les données chiffrées des effets de la DHEA sur les différents types de réponses à l'ATP (1 μ M et 0,5 μ M). Les données sont représentées graphiquement p. suivante.

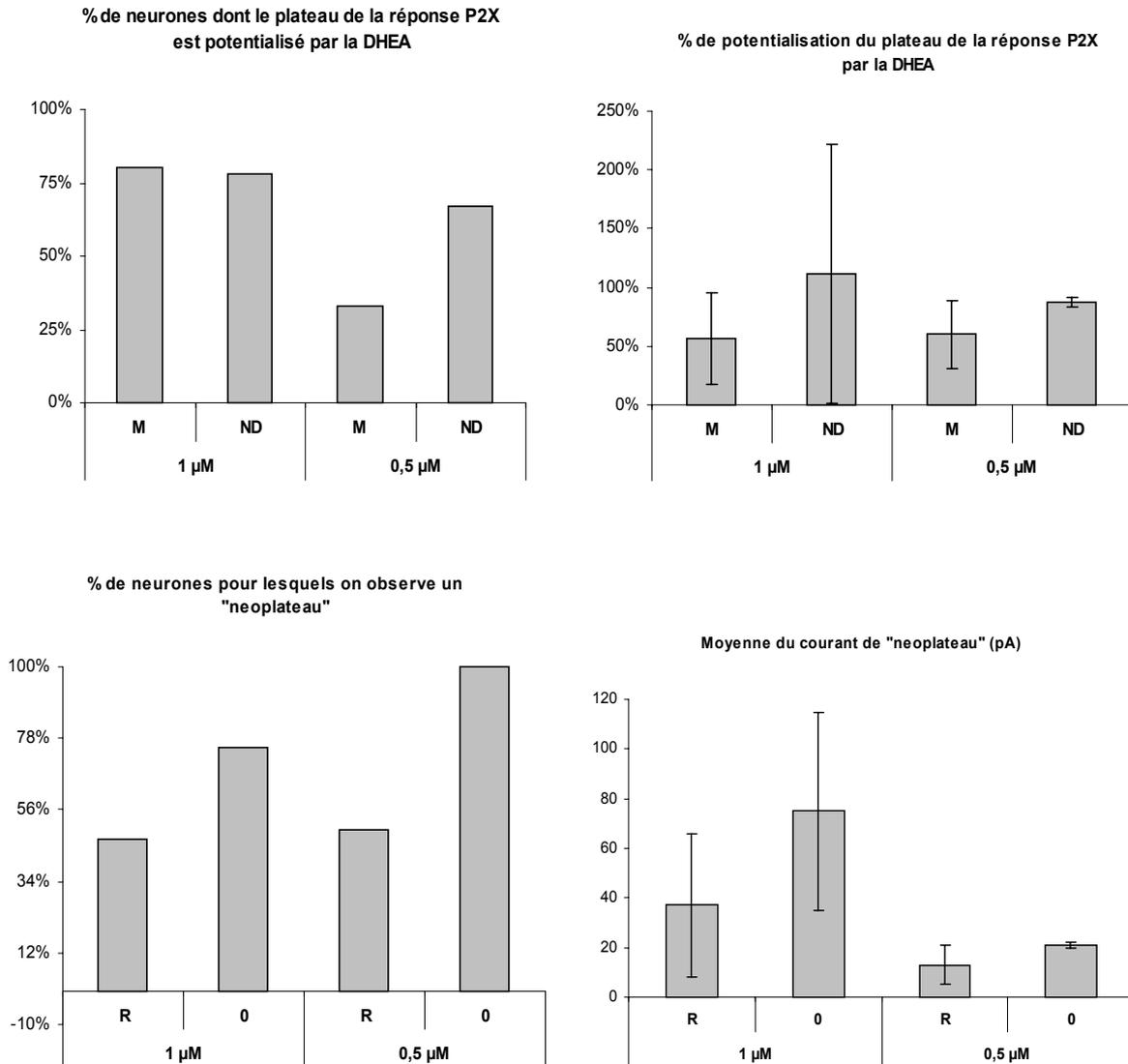
Modulation de la phase en plateau existante (Réponses M et ND) :

Concentration d'ATP	1 μ M		0,5 μ M	
	M	ND	M	ND
Type de réponse				
nombre de neurones testés avec la DHEA (10 μ M)	30	23	6	3
% de neurones avec réponse P2X potentialisée par la DHEA	80%	78%	33%	67%
% de potentialisation du plateau de la réponse P2X par la DHEA	57%	112%	60%	87%
écart-type	39%	110%	29%	4%
Minimum	8%	36%	39%	84%
Maximum	157%	420%	80%	90%

Apparition d'un néoplateau (réponses R et 0) :

Concentration d'ATP	1 μ M		0,5 μ M	
	R	0	R	0
Type de réponse				
nombre de neurones testés avec la DHEA (10 μ M)	15	8	8	2
% de neurones pour lesquels on observe un "neoplateau"	47%	75%	50%	100%
Moyenne du courant de "neoplateau" (pA)	37	75	13	21
écart-type (pA)	29	40	8	1
minimum (pA)	5	9	6	20
maximum (pA)	34	133	22	22

Tableau R- 4 : Effets de la DHEA (10 μ M) sur les réponses à l'ATP (1 μ M et 0,5 μ M).



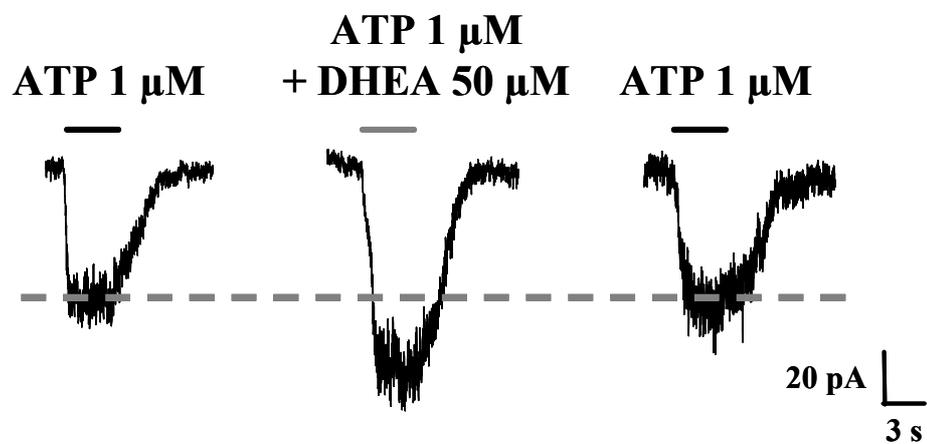
D'après ces résultats, le pourcentage de neurones présentant une réponse P2X en plateau potentialisée par la DHEA semble plus faible pour les réponses de type M lorsque la concentration d'ATP utilisée est de 0,5 μ M (cependant, la faiblesse de l'effectif ne nous permet pas de vérifier cela en utilisant un test statistique). D'autre part, et sans tenir compte de concentration d'ATP utilisée, l'effet de la DHEA sur le plateau des réponses est significativement plus important pour le type ND que pour le type M (test t : $P = 0,044$).

Concernant l'effet « néoplateau » de la DHEA, nous observons que ce phénomène est plus fréquemment observé pour les neurones ne répondant pas à l'ATP (type 0) que pour les neurones présentant une réponse de type R. D'une manière plus globale, La DHEA (10 μ M) a

facilité les réponses à l'ATP (1 μ M) dans 71 % des neurones testés ($n=76$, tous types confondus).

Par contre, la DHEA (50 μ M) n'a jamais augmenté l'amplitude du plateau des réponses P2X induites par des concentrations saturantes/maximales d'ATP (100 μ M, $n=3$ ou 1 mM, $n=3$), bien que dans les mêmes neurones, la réponse à une concentration d'ATP de 1 μ M ait été réversiblement potentialisée de 100 ± 65 % (gamme 40 à 203 %) par la DHEA (50 μ M) (figure R14).

A.



B.

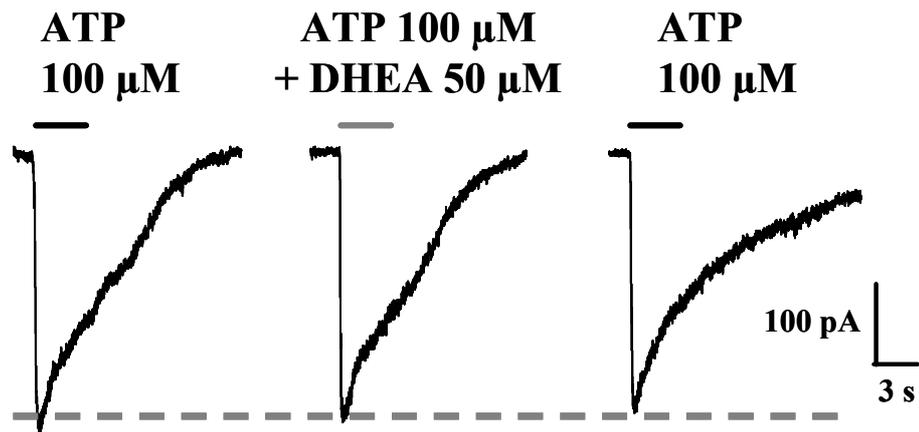


Figure R14 : Effets de la DHEA sur des réponses sous-maximale et saturante à l'ATP enregistrées dans le même neurone.

A : Effet de la DHEA (50 μ M) sur une réponse non saturante à l'ATP (1 μ M). La DHEA potentialise une réponse de type ND à l'ATP.

B : Dans le même neurone qu'en A, on note l'absence d'effet de la DHEA (50 μM) sur une réponse saturante à l'ATP (100 μM).

Le potentiel de maintien était de -70 mV.

Ces résultats indiquent que la DHEA potentialise l'activité de certains types de récepteurs P2X responsables de la phase de plateau des réponses membranaires. La présence de récepteurs P2X sensibles à la DHEA ne semble pas être dépendante de la présence de récepteurs à la capsaïcine.

2) Dose-dépendance de l'effet.

Nous avons testé les effets potentialisateurs de la DHEA à différentes concentrations (10 nM à 100 μM) sur les réponses à l'application locale d'ATP (1 μM) (**figure R15**). Le seuil de concentration à partir duquel la DHEA potentialise les réponses à l'ATP semble se situer aux alentours de 10^{-8} M. En raison de sa mauvaise solubilité dans la solution extracellulaire, la DHEA n'a pas pu être testée à des concentrations supérieures à 100 μM . Le maximum semble cependant se trouver entre 10^{-5} et 10^{-4} M. On peut noter que la courbe dose-réponse a un aspect biphasique, et que les écart-types sont importants. Cette observation suggère que la DHEA n'agit probablement pas de façon homogène sur tous les types de récepteurs P2X (voir aussi chapitre III.B.1)) pour la variabilité de l'effet de la DHEA sur les réponses P2X).

Nos résultats montrent que l'effet potentialisateur de la DHEA sur les réponses P2X est dose-dépendant. Cependant, la DHEA ne semble pas agir de façon homogène sur tous les types de récepteurs P2X exprimés par les neurones du ganglion rachidien

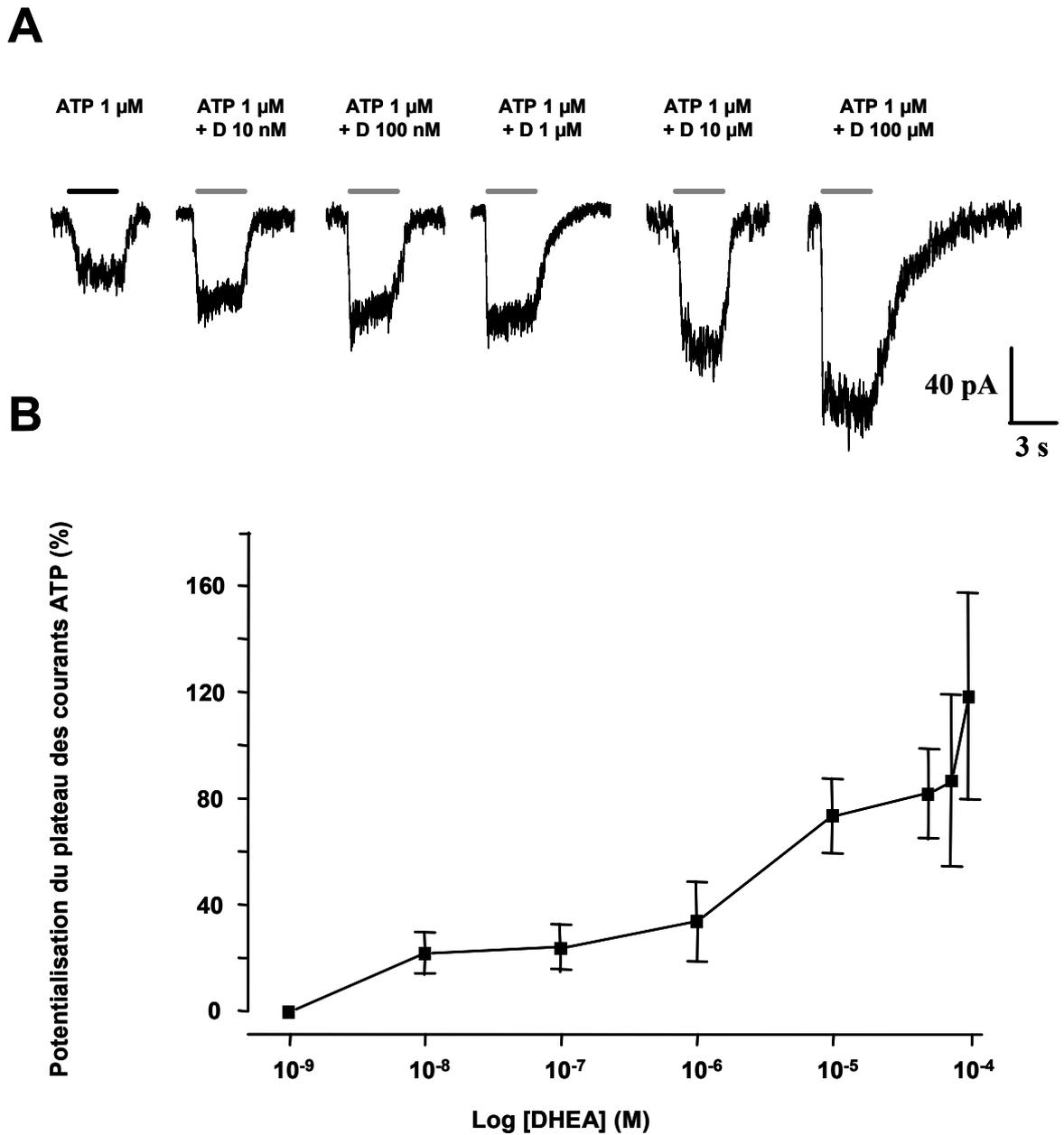


Figure R15 : Dose-dépendance de l'effet potentialisateur de la DHEA sur la phase en plateau des réponses membranaires à l'ATP (1 μ M).

A : Exemple d'un neurone pour lequel DHEA (D) a été co-appliquée à des concentrations croissantes avec l'ATP (1 μ M).

B : illustration de la dose-dépendance de l'effet de la DHEA sur la réponse à l'ATP 1 μ M ($n > 6$ pour chaque point). Notez l'aspect biphasique de la courbe.

3) Sélectivité de l'effet.

Les neurones du ganglion rachidien expriment les ARNm codant six sous-unités P2X différentes (P2X1-P2X6) (Collo *et al.*, 1996). Ces sous-unités peuvent presque toutes se co-assembler sous forme de trimères pour former un grand nombre de récepteurs homo- ou hétéromériques (Cf. tableau I-2) (Torres *et al.*, 1999; Jiang *et al.*, 2003). Malheureusement, nous ne disposons pas à l'heure actuelle d'agonistes ou d'antagonistes spécifiques de ces différents types de récepteurs P2X. Pour tenter d'identifier le ou les sous-types de récepteur(s) P2X modulé(s) par la DHEA, nous avons utilisé une combinaison d'agonistes (ATP, $\alpha\beta\text{meATP}$) et de modulateurs allostériques (pH acide, ivermectine) permettant de cibler de façon plus précise certaines sous-populations de récepteurs P2X.

a) Réponses des neurones sensoriels primaires à l' $\alpha\beta\text{meATP}$.

L' $\alpha\beta\text{meATP}$ est un agoniste des récepteurs de l'ATP qui, à des concentrations comprises entre 1 et 5 μM , n'active que les récepteurs homomériques P2X₁ et P2X₃, et les récepteurs hétéromériques P2X_{2/3}, P2X_{1/5} et P2X_{4/6} (cf. introduction Chap. III.A).

L'application locale d' $\alpha\beta\text{meATP}$ (1-5 μM) a induit des courants comparables à ceux observés avec l'ATP (Types Rapide, Non Désensibilisant, et Mixte, voir **figure R16** et comparer avec **figure R6A**). Les caractéristiques des réponses à l' $\alpha\beta\text{meATP}$ (1 μM) sont résumées dans le et le tableau ci-dessous.

Type de réponse	\hat{i} (pA)	Ecart-type (pA)	min (pA)	max (pA)	n
R	171	61	105	324	13
ND	37	14	12	60	4
M (mesuré au pic)	255	177	130	380	4
M (mesuré au plateau)	60	28	40	80	4

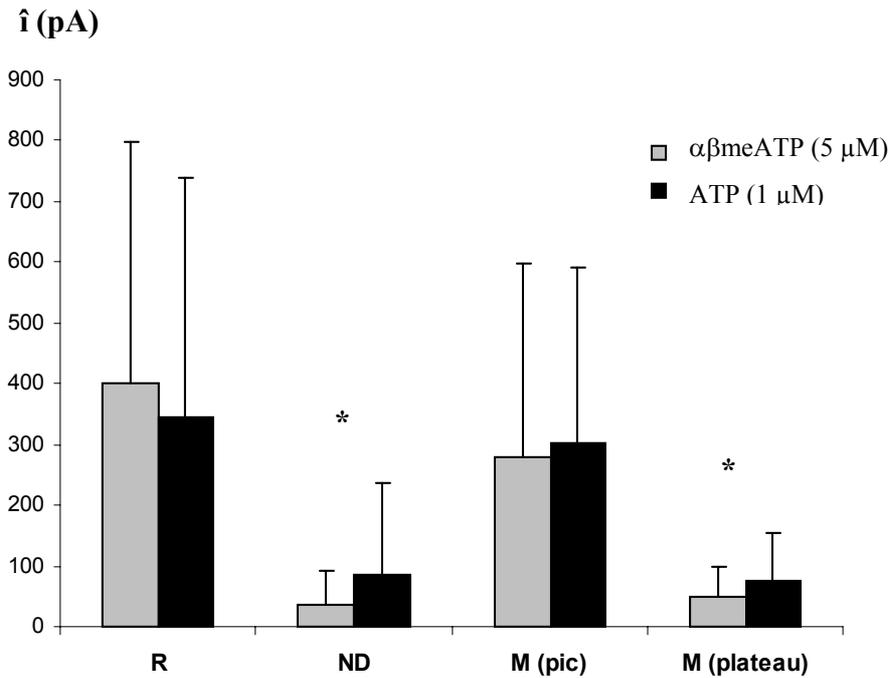
Tableau R- 5 : Caractéristiques des courants membranaires en réponse à l' $\alpha\beta\text{meATP}$ (1 μM). Les mesures sont effectuées au pic pour les réponses à de type R et M, et au plateau pour les réponses de type ND et M.

Les données présentes dans ce tableau indiquent une grande variabilité des courants membranaires en réponse à l' $\alpha\beta\text{meATP}$ quel que soit le type de la réponse.

Lors de nos expériences initiales, nous avons remarqué que la proportion de neurones ne présentant pas de courant membranaire en réponse à l'application d' $\alpha\beta\text{meATP}$ (1 μM) était relativement importante (15 %). Pour cette raison, nous avons décidé d'utiliser l' $\alpha\beta\text{meATP}$ à une concentration de 5 μM pour la suite de nos expériences. Dans ces

conditions, 97 % des neurones présentaient des réponses P2X mesurables ($n = 137$, **figure R16A**), et les proportions des différents types de réponses à l' $\alpha\beta$ meATP ($5\mu\text{M}$) étaient proches de celles obtenues avec l'ATP ($1\mu\text{M}$) (**figure R16B**).

Les amplitudes des courants obtenus en réponse à l' $\alpha\beta$ meATP ($5\mu\text{M}$) sont représentées sur le graphique ci-dessous (qui rappelle les résultats obtenus avec l'ATP $1\mu\text{M}$).



Les amplitudes des courants obtenus au plateau des courants avec l'ATP ($1\mu\text{M}$) sont significativement différentes de celles obtenues avec l' $\alpha\beta$ méthylène ATP ($5\mu\text{M}$) pour les types ND et M ($p < 0,05$). Les fortes variations des amplitudes des courants obtenus au pic ne nous ont pas permis d'effectuer des tests statistiques (puissance du test inférieure à 5%). Les données chiffrées du graphique ci-dessus pour l' $\alpha\beta$ meATP sont reportées dans le tableau R6 (page suivante).

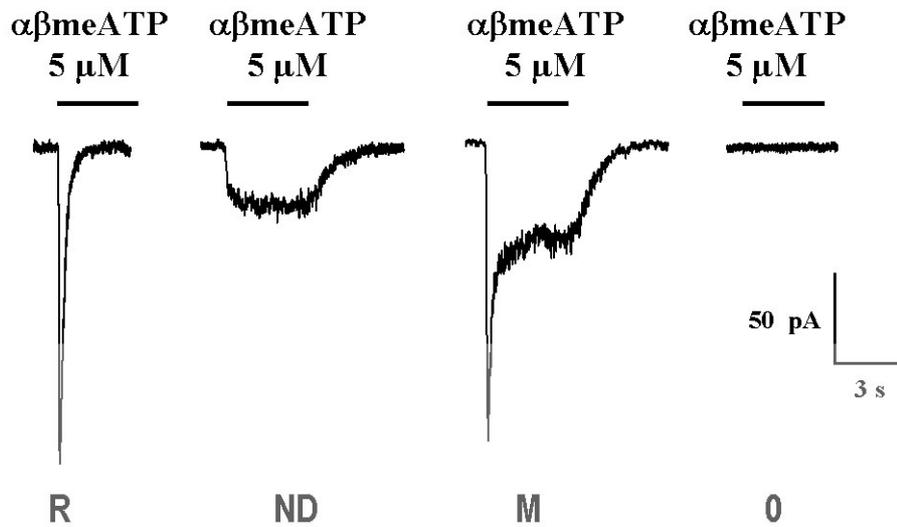
Type de la réponse	\hat{i} (pA)	Ecart-type (pA)	min (pA)	max (pA)	n
--------------------	----------------	-----------------	----------	----------	---

R	401	397	20	1404	30
ND	36	56	5	326	32
M (mesuré au pic)	279	319	15	1325	39
M (mesuré au plateau)	48	52	7	240	62

Tableau R- 6 : Caractéristiques des courants membranaires induits par l' $\alpha\beta$ meATP (5 μ M). Les mesures sont effectuées au pic pour les réponses à de type R et M, et au plateau pour les réponses de type ND et M.

On observe une grande variabilité dans l'amplitude des réponses à l' $\alpha\beta$ meATP quel que soit le type du courant.

A



B

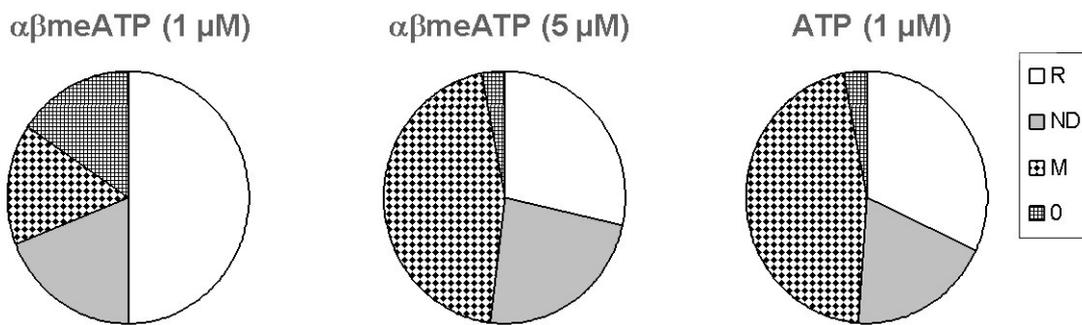


Figure R16 : L' $\alpha\beta\text{meATP}$ (5 μM) induit différents types de réponses membranaires dans les neurones du ganglion rachidien.

A : De la même façon qu'avec l'ATP (cf. Fig R6), nous avons noté l'existence de 3 types de réponses suite à l'application locale d' $\alpha\beta\text{meATP}$ (1 et 5 μM). Dans les 3 cas, la phase d'activation des courants était rapide, et les réponses se différenciaient par la cinétique de décroissance du courant durant l'application d' $\alpha\beta\text{meATP}$. Ainsi, nous avons distingué des réponses à décroissance rapide (panneau de gauche, R), lente (panneau du milieu, ND), ou mixte, c'est à dire présentant une phase rapide suivie d'une phase lente (panneau de droite, M). Dans certains cas, le neurone n'a pas répondu par un courant mesurable à l'application d' $\alpha\beta\text{meATP}$ (type 0).

B : Comparaison des proportions des différents types de réponses obtenus en selon l'agoniste et la concentration utilisés. En utilisant l' $\alpha\beta\text{meATP}$ (5 μM), les proportions sont proches de celles rencontrées avec l'ATP (1 μM).

b) Effet potentialisateur de la DHEA sur la réponse à l' $\alpha\beta$ meATP.

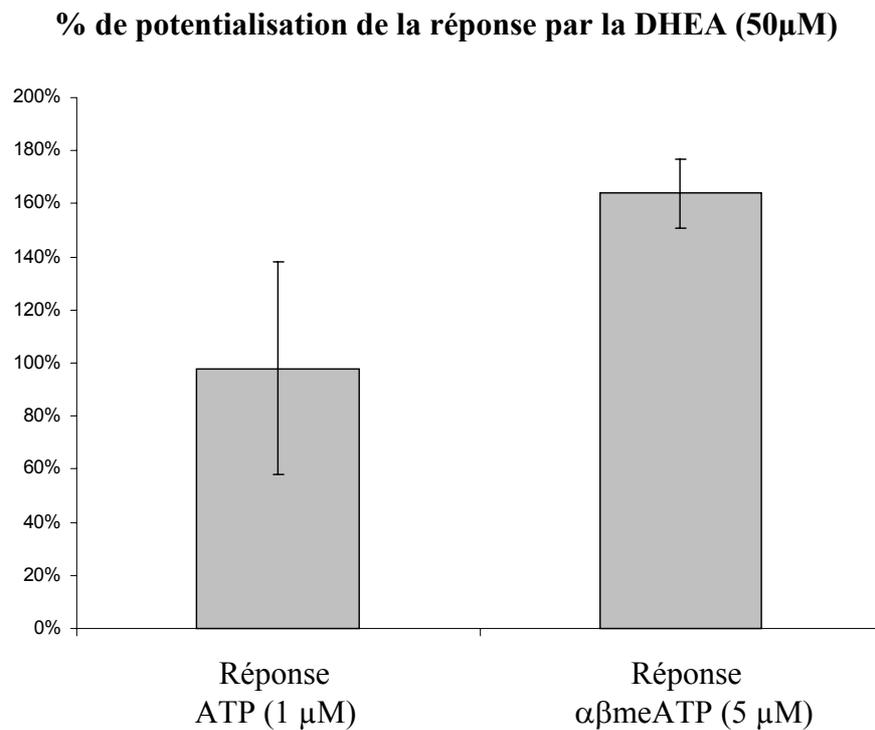
La DHEA (10 μ M) a potentialisé le plateau des réponses de type M et ND à l'application locale d' $\alpha\beta$ meATP (5 μ M) dans 56 % des neurones testés ($n = 25$).

Ce résultat indique que la DHEA potentialise des récepteurs P2X sensibles à l' $\alpha\beta$ meATP (5 μ M). Nous rappelons que lorsque nous avons utilisé l'ATP (1 μ M) comme agoniste, le pourcentage de neurones dont le plateau des réponses était modulé par la DHEA (10 μ M) était de 79 %. Ceci semble indiquer que la DHEA potentialise des récepteurs P2X sensibles à l'ATP (1 μ M), mais insensibles à l' $\alpha\beta$ meATP (5 μ M).

En utilisant l' $\alpha\beta$ meATP (5 μ M), le pourcentage d'augmentation du plateau de la réponse était de 40 ± 24 %. D'autre part, la DHEA a fait apparaître un plateau (neoplateau) dans 3 des 8 neurones ayant répondu à l'application locale d' $\alpha\beta$ meATP (5 μ M) par un courant rapidement désensibilisant (type R), transformant ainsi les réponses R en réponses M. L'amplitude moyenne du courant non désensibilisant ainsi obtenu était de 32 ± 26 pA (gamme 12 à 62 pA). Dans l'un des quatre neurones n'ayant pas répondu à l' $\alpha\beta$ meATP (5 μ M) par un courant mesurable, nous avons testé l'effet de la DHEA à une concentration de 10 μ M. Cette co-application n'a pas induit de réponse mesurable. Dans deux autres neurones n'ayant pas répondu à l' $\alpha\beta$ meATP (5 μ M), nous avons utilisé la DHEA à une concentration de 50 μ M. Dans l'un de ces 2 neurones, la DHEA a fait apparaître un courant entrant d'une intensité de 14 pA, et avec une cinétique d'activation et de désactivation lente.

La **figure R17** montre la dose-dépendance de l'effet potentialisateur de la DHEA sur le plateau des réponses à l' $\alpha\beta$ meATP de type M et ND. On peut noter que contrairement à ce qui avait été observé avec l'ATP (Fig. R15 et chapitre III.B.2)), la courbe dose-réponse de la DHEA sur la réponse $\alpha\beta$ meATP (5 μ M) ne présente pas un aspect biphasique. Le seuil de l'effet se situe entre 10^{-6} et 10^{-5} M, alors qu'avec l'ATP en tant qu'agoniste, le seuil de l'effet de la DHEA se situait entre 10^{-9} et 10^{-8} M. Ces observations semblent confirmer que la DHEA agit également sur des récepteurs P2X non activés par l' $\alpha\beta$ meATP. A une concentration de 100 μ M, l'effet facilitateur de la DHEA sur les réponses membranaires à l' $\alpha\beta$ meATP ne semble pas avoir atteint de plateau, mais la concentration donnant un effet maximal n'a pas pu être déterminée du fait de l'insolubilité de la DHEA à des concentrations supérieures à 100 μ M.

Dans cinq neurones, nous avons testé et comparé l'effet potentialisateur de la DHEA (50 μ M) sur la réponse à l'ATP (1 μ M) puis à l' α β meATP (5 μ M). Les résultats pour les réponses de type M et ND ($n = 4$) sont représentés par le graphique ci-dessous. Les données chiffrées sont reportées dans le tableau R-7.



	% potentialisation de la réponse par la DHEA (50 μ M)	
	ATP	α β meATP
Moyenne	98%	164%
Ecart-type	40%	13%
CV%	41%	8%
n	4	4

Tableau R-7 : Pourcentage de potentialisation par la DHEA du plateau des réponses à l'ATP et à l' α β meATP.

L'un des 5 neurones a présenté une réponse de type « Rapide » à l'ATP et à l' α β meATP. Dans ce neurone, la co-application d'ATP et de DHEA, et la co-application d' α β meATP et de DHEA ont fait apparaître un plateau (néoplateau) de même intensité (22 pA).

Ces données nous indiquent que la DHEA potentialise de façon dose-dépendante l'activité de récepteurs P2X hétéromériques ayant comme agoniste l' $\alpha\beta\text{meATP}$. D'après les données de la littérature, la composition en sous-unités de ces récepteurs pourrait être parmi les suivantes : P2X_{2/3} et/ou P2X_{4/6} et/ou P2X_{1/5}.

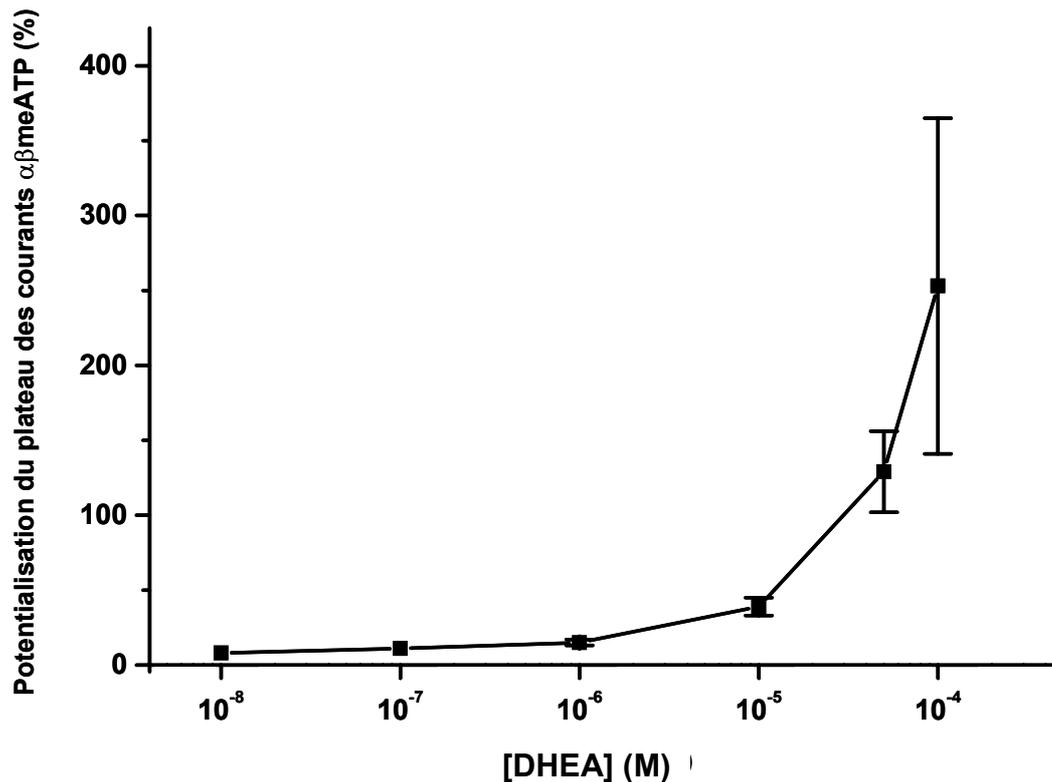


Figure R17 : Dose-dépendance de l'effet facilitateur de la DHEA sur la réponse à l' $\alpha\beta\text{meATP}$ (5 μM).

Notez que la courbe n'a pas l'aspect biphasique observé avec l'ATP (voir **figure R15**). A une concentration de 100 μM , l'effet facilitateur de la DHEA sur les réponses membranaires à l' $\alpha\beta\text{meATP}$ ne semble pas avoir atteint de plateau.

$n > 3$ pour chaque point.

c) Détermination des sous-types de récepteurs P2X potentialisés par la DHEA.

- Corrélation entre les effets de différents modulateurs des réponses P2X :

Afin de déterminer plus précisément la nature des sous-unités entrant dans la composition des récepteurs P2X potentialisés par la DHEA, nous avons mis à profit les effets de l'ivermectine, un modulateur allostérique positif des réponses P2X des récepteurs contenant la sous-unité P2X₄ (Khakh *et al.*, 1999b), et les effets de l'acidification du milieu extracellulaire (pH_e=6,3) sur les réponses P2X. Nous savons en effet que l'acidification du milieu extracellulaire potentialise sélectivement l'activité des récepteurs P2X contenant la sous-unité P2X₂, et inhibe sélectivement l'activité des récepteurs homomériques P2X_{1/5} (Stoop *et al.*, 1997, et cf. introduction chap.III.A.3; Haines *et al.*, 1999; Surprenant *et al.*, 2000). Le déroulement des expériences pour chacun des neurones testés est schématisé sur la **figure R18**, et les résultats sont résumés dans la **figure R19**.

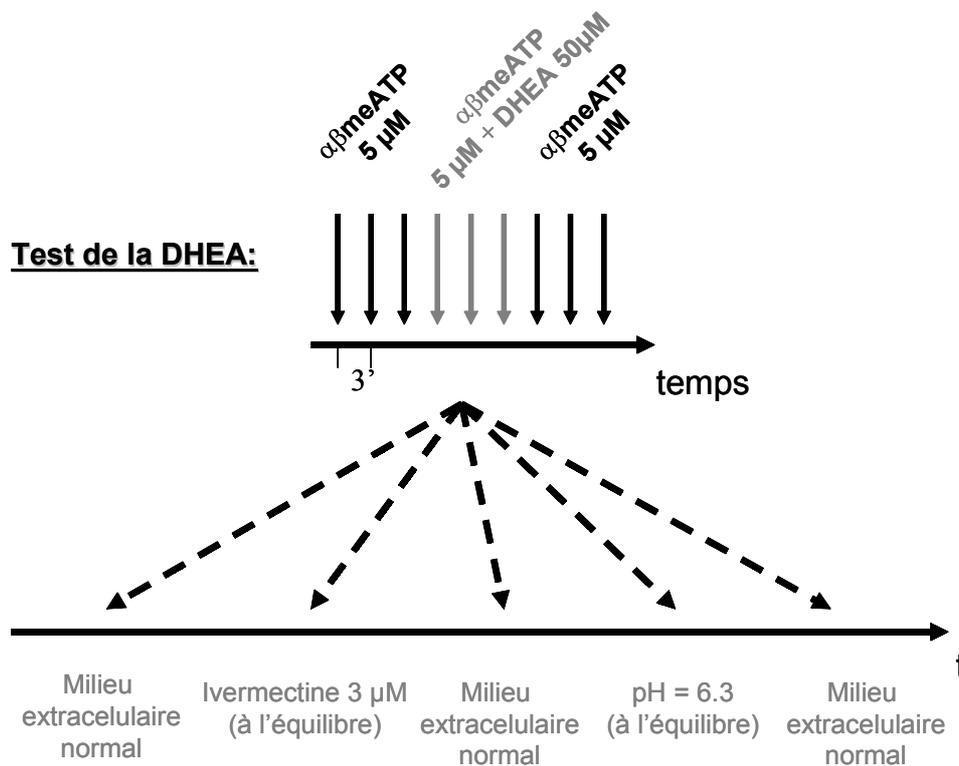
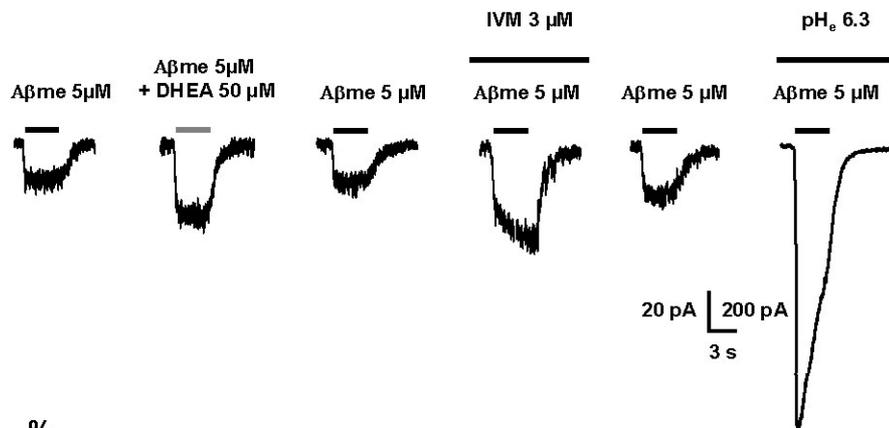


Figure R18 : Protocole utilisé pour déterminer le ou les type(s) de récepteur(s) P2X modulé(s) par la DHEA.

Chaque flèche verticale représente une application locale. Les flèches en pointillés indiquent les conditions dans lesquelles les tests de la DHEA sur la réponse à l'αβmeATP ont été successivement effectués. Ce protocole a été effectué sur 14 neurones.

A



B

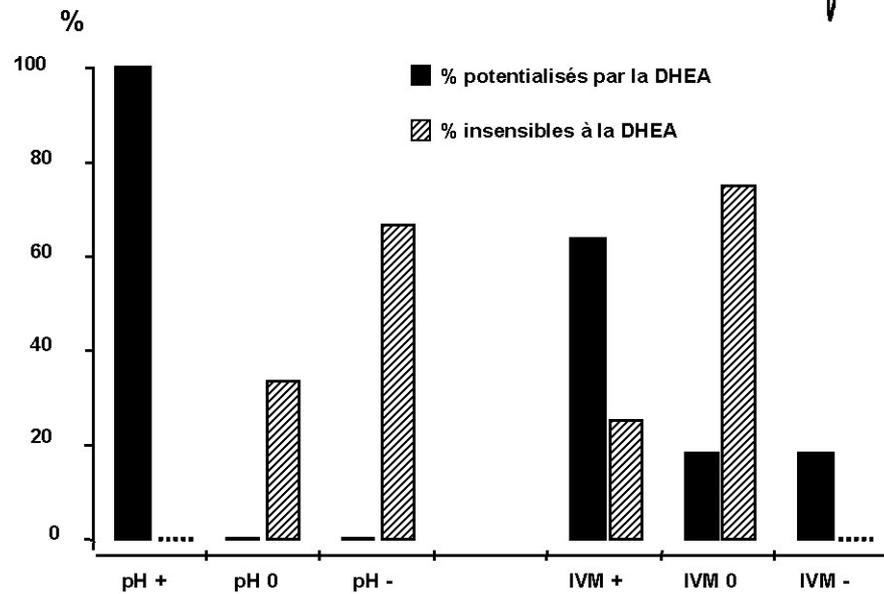


Figure R19 : Identification de la sous-unité responsable de l'effet facilitateur de la DHEA sur les réponses P2X.

A : Exemple d'un neurone pour lequel la réponse à l' $\alpha\beta$ meATP ($\alpha\beta$ me 5 μ M) a été successivement potentialisée par la DHEA (50 μ M), l'ivermectine (IVM, 3 μ M, à l'équilibre), et le pH extracellulaire acide (pH_e 6,3, à l'équilibre). Notez le changement d'échelle pour l'effet du pH_e

B : Pourcentage de neurones possédant des réponses P2X sensibles (barres noires) ou insensibles (barres hachurées) à la DHEA regroupés par catégorie de sensibilité au pH_e acide: potentialisation (pH+), insensibilité (pH 0), ou inhibition (pH -), et à l'ivermectine: potentialisation (IVM +), insensibilité (IVM 0), ou inhibition (IVM -). Tous les neurones ayant des réponses P2X potentialisées par le pH_e acide sont aussi potentialisés par la DHEA, et les neurones ayant des réponses P2X insensibles ou inhibées par le pH_e 6,3 ne sont jamais modulés par la DHEA. Par contre, il ne semble pas exister de corrélation stricte entre l'effet de la DHEA et les effets de l'ivermectine sur les réponses à l' $\alpha\beta$ meATP.

Les effets de ces deux modulateurs allostériques sur la réponse à l' $\alpha\beta$ meATP (5 μ M) dans les 14 neurones que nous avons enregistrés étaient les suivants :

- L'ivermectine (3 μ M, appliquée à l'équilibre) a augmenté l'amplitude de la phase de plateau de la réponse à l' $\alpha\beta$ meATP de 82 ± 45 % dans 57 % des neurones enregistrés. Elle a inhibé la réponse de 96 ± 5 % dans 14 % des cas, et n'a pas eu d'effet dans 29 % des neurones testés ($n=14$).
- Lors de l'acidification du milieu extracellulaire (pH 6,3), nous avons observé différents effets sur la réponse à l' $\alpha\beta$ meATP : une inhibition de 90 ± 14 % dans 2 neurones ($n = 14$), et une potentialisation de 2881 ± 1682 % dans 11 des 14 neurones testés (Pour un de ces neurones, la réponse à l' $\alpha\beta$ meATP était de type « rapide » ; lors de l'acidification du milieu extracellulaire, la réponse a été transformée en réponse de type « non désensibilisant », avec un plateau de 1183 pA). Une absence d'effet du pH_e acide sur la réponse à l' $\alpha\beta$ meATP a été constatée dans seulement 1 neurone ($n = 14$ testés).

Le plateau des réponses à l' $\alpha\beta$ meATP a été facilité par la DHEA (50 μ M) dans 79 % des neurones enregistrés ($n = 14$).

- Toutes les réponses à l' $\alpha\beta$ meATP **sensibles à la DHEA** ont également été systématiquement augmentées par le pH_e acide (100 %, $n = 11$). En revanche, les réponses à l' $\alpha\beta$ meATP sensibles à la DHEA n'ont pas toutes été potentialisées par l'ivermectine (70 % potentialisées, 10 % non modulées, et 20 % inhibées, $n = 11$).
- Les réponses à l' $\alpha\beta$ meATP **non modulées par la DHEA** ont été soit inhibées (67 %, $n = 3$) soit non affectées (33 %, $n=3$) par le pH_e 6,3, et soit potentialisées (25 %, $n = 3$), soit non affectées par l'ivermectine (75 %, $n = 3$). L'ensemble de ces observations est résumé et illustré dans la **figure R19**.

Ainsi, il semble exister une corrélation stricte entre la potentialisation de la réponse à l' $\alpha\beta$ meATP par la DHEA, et la potentialisation de la réponse à l' $\alpha\beta$ meATP par le pH extracellulaire acide. Par contre, il n'existe pas de corrélation évidente entre la modulation de la réponse $\alpha\beta$ meATP par la DHEA et la modulation par l'ivermectine. La DHEA ne semble donc moduler que les réponses des récepteurs contenant la sous-unité $P2X_2$.

Etant donné que nous avons utilisé l' $\alpha\beta$ meATP comme agoniste, et que l' $\alpha\beta$ meATP n'active pas les récepteurs homomériques $P2X_2$, nous pouvons supposer que les réponses modulées étaient dues à l'activation de récepteurs hétéromériques $P2X_{2/3}$.

- Utilisation d'un antagoniste sélectif de certains récepteurs P2X :

Afin de déterminer si la DHEA pouvait également potentialiser les réponses des récepteurs homomériques P2X₂, nous avons utilisé le 2',(ou 3')-O-(2,4,6-Trinitrophenyl) adénosine 5'-triphosphate (TNP-ATP). À une concentration de 1 micromolaire, cet antagoniste non compétitif des récepteurs P2X bloque complètement les récepteurs homomériques et hétéromériques contenant les sous-unités P2X₁ et P2X₃, mais pas les récepteurs homomériques P2X₂ (Khakh *et al.*, 2001, et voir introduction chap. III.A.3). Le protocole utilisé est illustré sur la **figure R20**.

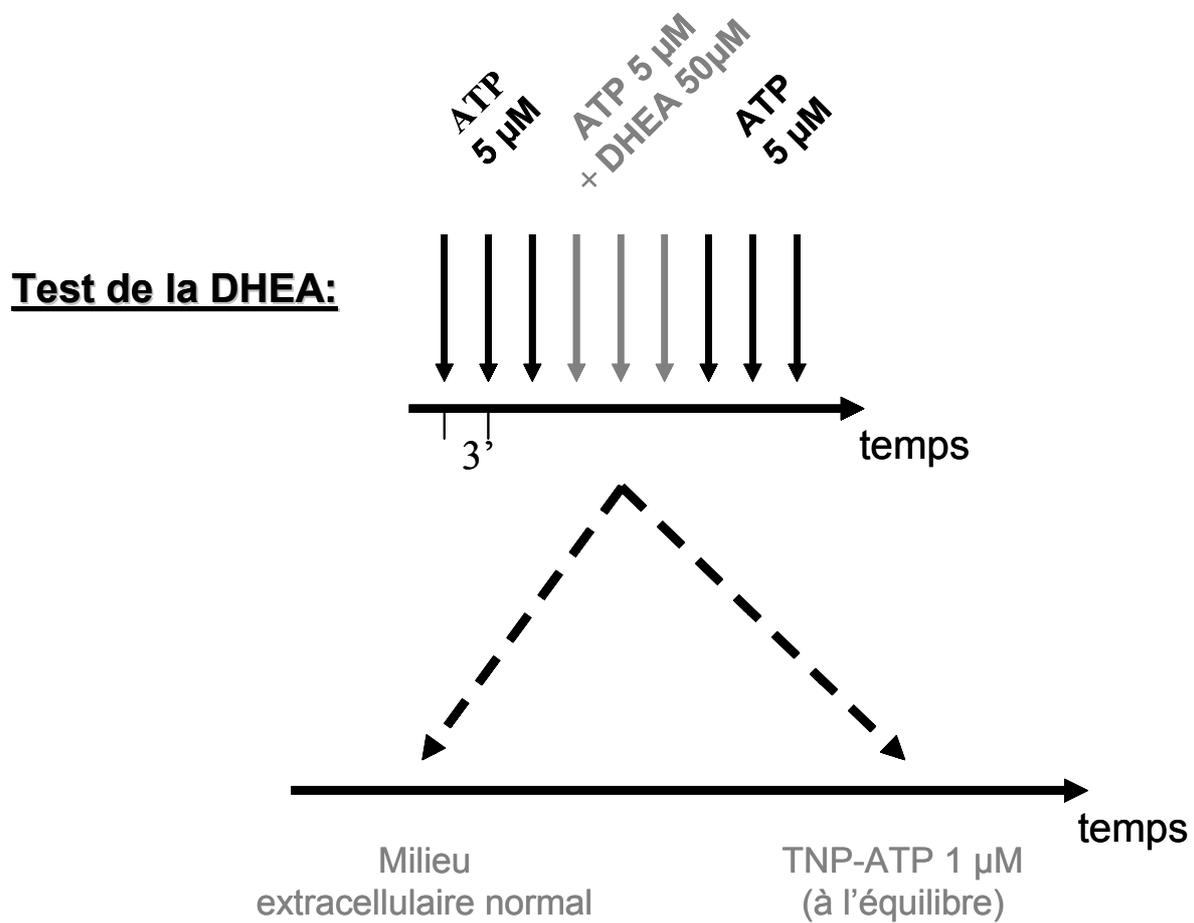


Figure R20 : Représentation schématique du protocole destiné à tester les effets de la DHEA (50 µM) sur la réponse membranaire à l'ATP (5 µM) en absence puis en présence de TNP-ATP (1 µM, à l'équilibre).

Chaque flèche verticale représente une application locale.

Les flèches en pointillés indiquent les conditions dans lesquelles le test de la DHEA sur la réponse à l'ATP a été successivement effectué.

A une concentration de 100 nM, le TNP-ATP appliqué à l'équilibre, a inhibé totalement la phase rapide des courants induits par 1 μM d'ATP ($n=3$) ou par 5 μM d' $\alpha\beta\text{meATP}$ ($n=3$). En revanche, la phase en plateau a été inhibée partiellement, de $69 \pm 20\%$ (gamme 49 à 89 %, $n=3$) pour les courants induits par l'ATP (1 μM) et de $47 \pm 19\%$ (gamme 27 à 69 %, $n=4$) pour les courants induits par l' $\alpha\beta\text{meATP}$ (5 μM) (**Figure R21**). Afin d'être certains d'inhiber totalement les réponses portées par les récepteurs $\text{P2X}_{2/3}$, nous avons utilisé le TNP-ATP à une concentration de 1 μM pour la suite des expériences.

A une concentration de 1 μM , le TNP-ATP appliqué à l'équilibre a inhibé totalement la phase rapide des courants induits par 5 μM d'ATP ($n=5$) et 5 μM d' $\alpha\beta\text{meATP}$ ($n=6$). De plus, Le TNP-ATP (1 μM) a bloqué totalement la phase en plateau des réponses à l'ATP (5 μM) dans 3 des neurones 10 testés, et celle des réponses à l' $\alpha\beta\text{meATP}$ (5 μM) dans la moitié des neurones testés ($n=8$). Globalement, l'inhibition de la phase de plateau par le TNP-ATP était de $86 \pm 21\%$ (gamme 47 à 100 %) pour les courants induits par l'ATP, et de $91 \pm 10\%$ (gamme 74 à 100 %) pour les courants induits par l' $\alpha\beta\text{meATP}$.

En présence de TNP-ATP (1 μM , à l'équilibre), les réponses résiduelles à l'ATP 5 μM ont été potentialisées de $183 \pm 86\%$ par la DHEA (50 μM) dans 3 des 8 neurones testés. Dans les mêmes conditions, les réponses à l'ATP (20 μM) ont été potentialisées de $165 \pm 201\%$ par la DHEA (50 μM) dans 2 des 4 neurones testés (**figure R21**). Dans tous les neurones dans lesquels la DHEA a augmenté l'amplitude de la réponse à l'ATP, nous avons également observé une potentialisation de la réponse par le pH acide (6,3). Lorsque les réponses à l'ATP n'étaient pas modulées par la DHEA, elles étaient également insensibles au pH acide ($n=4$).

Ces résultats indiquent que la DHEA semble également potentialiser l'activité des récepteurs homomériques P2X_2 .

TNP-ATP 100nM

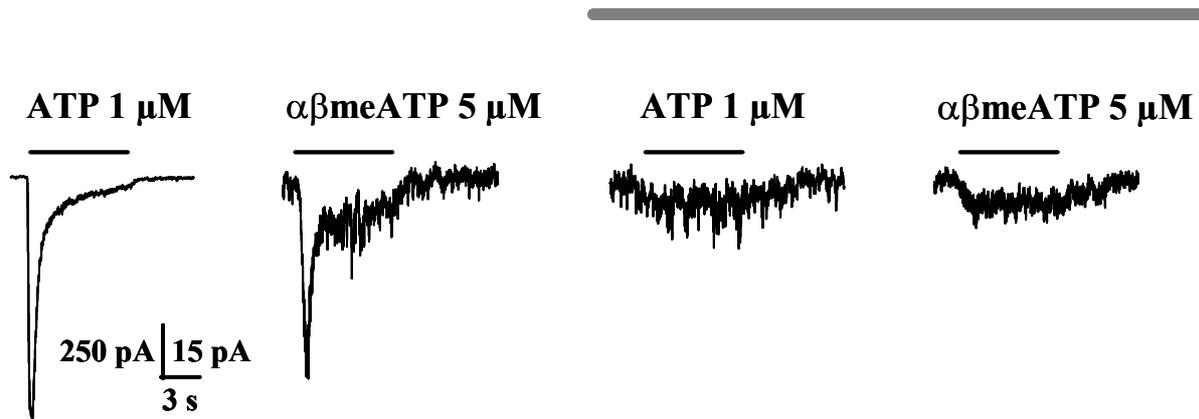


Figure R21 : Effet du TNP-ATP sur les réponses à l'ATP et à l' $\alpha\beta$ meATP.

Le TNP-ATP (100 nM, à l'équilibre) a inhibé totalement la phase rapide des réponses à l'ATP (1 μ M) et à l' $\alpha\beta$ meATP (5 μ M). La phase en plateau quand à elle s'est trouvée fortement mais pas totalement inhibée en présence de TNP-ATP.

Notez la différence dans l'échelle des amplitudes entre la réponse illustrée à gauche de la figure et les autres réponses.

La **figure R22B** illustre la dose-dépendance de l'effet de la DHEA sur les réponses à l'ATP (20 μ M) en présence de TNP-ATP (1 μ M à l'équilibre). Dans ces conditions, la population de récepteurs capables de répondre à l'ATP est restreinte, et les écarts-types observés sur la courbe de la **figure R22** sont plus faibles que ceux de la **figure R15** (cf. chap. III.B.2)). D'autre part, l'aspect de la courbe de la **figure R22** n'est pas biphasique, ce qui semble indiquer qu'en présence de TNP-ATP (1 μ M), la DHEA agit sur une sous-population relativement homogène de récepteurs.

Ainsi, la DHEA semble potentialiser l'activité des récepteurs homomériques P2X₂.

Cet effet facilitateur de la DHEA s'exerce sur l'activité des récepteurs P2X₂ de façon dose-dépendante.

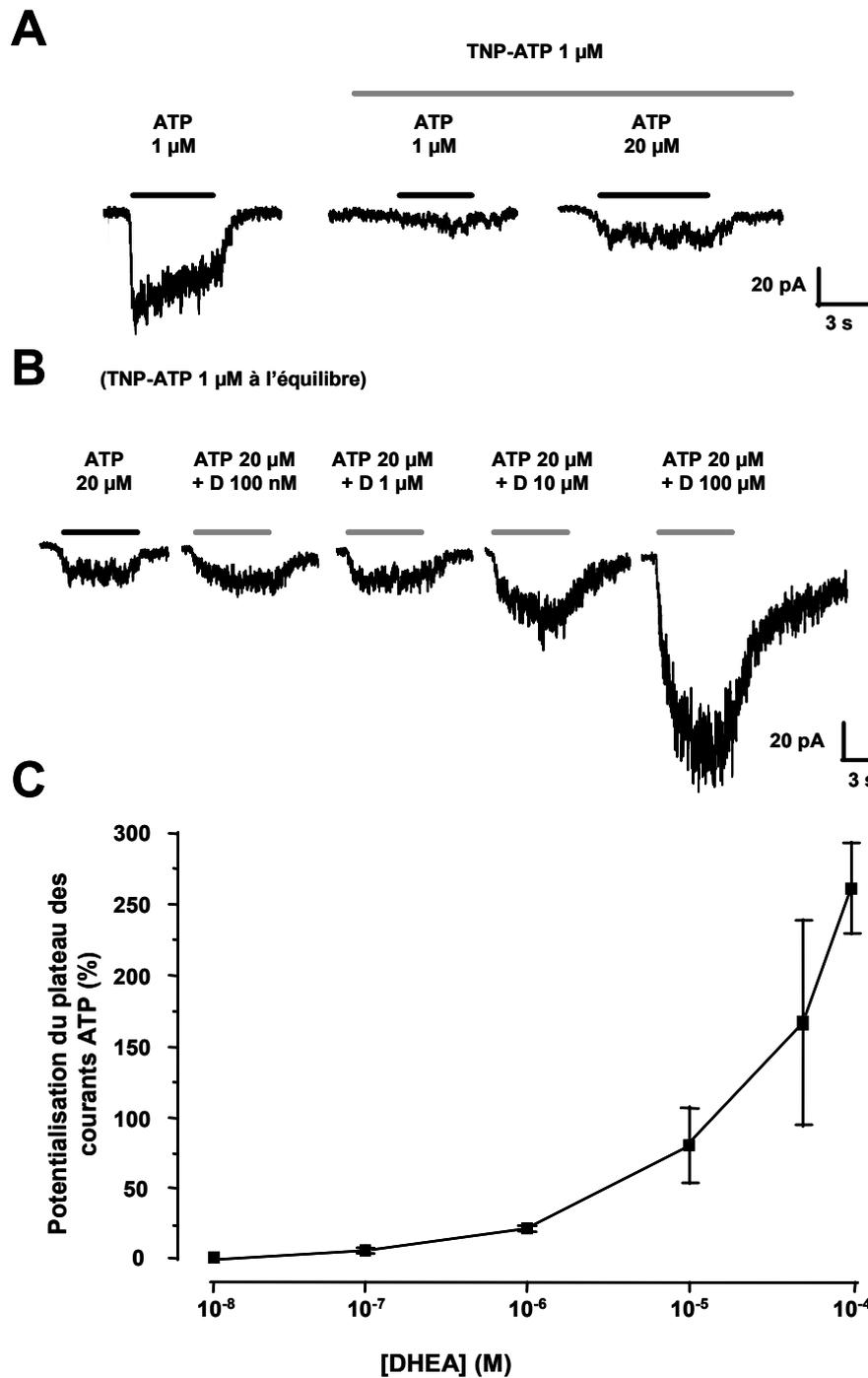


Figure R22 : Effet facilitateur de la DHEA sur les réponses membranaires à l'ATP résistantes au TNP-ATP.

A : La réponse à l'ATP (1 μM) est presque abolie en présence de TNP-ATP (1 μM). Cependant, à une concentration de 20 μM , l'ATP induit un courant mesurable en présence de TNP-ATP (1 μM).

B : Dans le même neurone qu'en A, la DHEA (D) a été co-appliquée à des concentrations croissantes avec l'ATP (20 μM) en présence continue de TNP-ATP (1 μM).

C : L'effet facilitateur de la DHEA sur la réponse à l'ATP (20 μM) en présence de TNP-ATP (1 μM) est dose-dépendant ($n=3$ pour chaque point).

- Test de la DHEA sur des neurones du ganglion noueux.

Des données d'hybridation *in situ* et d'immunohistochimie ont montré que les neurones du ganglion noueux expriment uniquement les ARNm et les protéines des sous-unités P2X₂ et P2X₃ (Vulchanova *et al.*, 1997). Par ailleurs, des données électrophysiologiques indiquent que ces neurones expriment des récepteurs homomériques P2X₂ et hétéromériques P2X_{2/3} fonctionnels (Dunn *et al.*, 2001)

Nous avons réalisé des cultures de neurones du ganglion noueux de rats âgés de 3 à 6 jours afin de déterminer les effets de la DHEA sur les réponses P2X de ces neurones. Pour activer l'ensemble des récepteurs P2X présents sur les neurones du ganglion noueux, nous avons utilisé comme agoniste l'ATP à une concentration de 1 μ M. Pour activer uniquement les récepteurs hétéromériques P2X_{2/3}, nous avons appliqué l' $\alpha\beta$ meATP à une concentration de 5 μ M, et pour activer de façon isolée les récepteurs homomériques P2X₂, nous avons appliqué l'ATP (1 μ M) en présence de TNP-ATP (1 μ M).

La DHEA (50 μ M) a potentialisé la réponse à l'ATP (1 μ M) dans la totalité des neurones testés ($n=3$). L'amplitude moyenne de la réponse à l'ATP était de 167 ± 117 pA, et le pourcentage de potentialisation par la DHEA était de 24 ± 11 %. Ce qui est beaucoup plus faible que dans le cas des neurones du ganglion rachidien (environ 80 %, voir discussion). D'autre part, la DHEA (50 μ M) a potentialisé réponse à l' $\alpha\beta$ meATP (5 μ M) dans 100 % des neurones testés ($n=3$). L'amplitude moyenne de la réponse à l' $\alpha\beta$ meATP était de 355 ± 367 pA, et le pourcentage de potentialisation par la DHEA était de 19 ± 15 %. Dans deux de ces neurones, nous avons testé la DHEA (50 μ M) sur les réponses à l'ATP (20 μ M) en présence de TNP-ATP (1 μ M). L'amplitude des réponses était de 56 pA et 124 pA, et les pourcentages de potentialisation de ces réponses par la DHEA étaient de 296 % et 36 %.

Ces résultats démontrent que la DHEA potentialise l'activité des récepteurs P2X exprimés par les neurones du ganglion noueux. D'après les données de la littérature, il s'agirait de récepteurs homomériques P2X₂ et hétéromériques P2X_{2/3}. La persistance de l'effet de la DHEA lors de l'utilisation de l' $\alpha\beta$ meATP (qui active sélectivement les récepteurs hétéromériques P2X_{2/3}), et de l'ATP en conditions de TNP ATP (ce qui active uniquement les récepteurs homomériques P2X₂), nous permet de suggérer que la DHEA module ces deux types de récepteurs. La DHEA semble plus efficace lorsque l'on active sélectivement les récepteurs homomériques P2X₂ (conditions TNP-ATP).

On ne peut toutefois pas exclure que la DHEA lève le blocage exercé par le TNP-ATP sur les récepteurs hétéromériques P2X_{2/3}. Nous avons donc utilisé une lignée cellulaire HEK-293 exprimant exclusivement les récepteurs homomériques P2X₂ pour vérifier que l'effet facilitateur de la DHEA s'exerçait bien sur ce type de récepteurs.

- Test de la DHEA sur les réponses à l'ATP dans une lignée de cellules HEK-293 transfectée avec la sous-unité P2X₂ de rat.

Afin de vérifier l'hypothèse selon laquelle la DHEA pouvait potentialiser l'activité des récepteurs P2X₂ homomériques (cf. paragraphe précédent), nous avons testé les effets de la DHEA sur les réponses membranaires à l'ATP (5 μM) dans des cellules issues d'une lignée HEK-293 transfectée avec l'ADNc de la sous-unité P2X₂ et exprimant de façon stable des récepteurs homomériques P2X₂.

Dans la totalité des cellules testées, la réponse à l'ATP a été potentialisée par la DHEA (10 μM). Le pourcentage de potentialisation était de 106 ± 87 % (gamme 19 à 285 %, *n* = 7). La modulation des réponses P2X₂ par la DHEA (50 μM) est illustrée dans la **figure R23**.

Ces résultats confirment que la DHEA module positivement l'activité des récepteurs homomériques P2X₂.

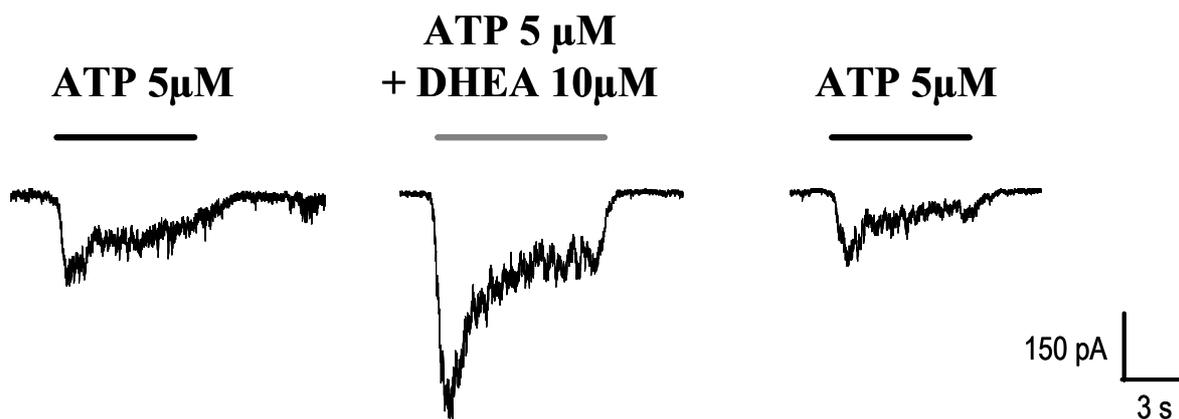


Figure R23 : Effet de la DHEA sur la réponse à l'ATP dans des cellules HEK-293 exprimant de façon stable la sous-unité P2X₂.

Dans 100 % des cas (*n* = 7), nous avons observé une facilitation réversible de la réponse des récepteurs homomériques P2X₂ exprimés de façon stable par une lignée de cellules HEK-293. Le pourcentage de potentialisation était de 106 ± 87 % (gamme 19 à 285 %, *n* = 7).

4) Mécanisme d'action de l'effet facilitateur de la DHEA sur les réponses P2X.

Les résultats présentés précédemment (voir chapitre III.B.1) et 2)) indiquent :

- qu'une co-application d'ATP et de DHEA peut faire apparaître une réponse dans un neurone qui ne répondait pas à l'application d'ATP (1 μ M) seule (**figure R12B₃**),
- que l'effet de la DHEA sur le plateau des réponses P2X est concentration-dépendant (**figures R15, R17, et R22**),
- que la DHEA est sans effet sur les réponses induites par des concentrations saturantes d'ATP (**figure R14**).

L'ensemble de ces données suggère une modulation allostérique positive de la DHEA sur les récepteurs P2X (voir discussion). Nous avons toutefois voulu déterminer si les effets de la DHEA étaient conservés lors de la dialyse des systèmes de seconds messagers, et lors du blocage de certaines protéines G ou des récepteurs Sigma.

a) Effet de la DHEA en conditions d'enregistrement « cellule-entière ».

Dans ces conditions d'enregistrement, l'intérieur de la cellule est rapidement dialysé par le contenu de la pipette, et les seconds messagers intracellulaires sont fortement dilués, étant donné le rapport très élevé entre le volume du milieu intra-pipette et le volume du cytoplasme. Cette configuration nous permet de vérifier si l'effet de la DHEA est dépendant des seconds messagers intracellulaires.

La DHEA a été testée sur les réponses à l'ATP (1 μ M) en conditions « cellule-entière » dans cinq neurones. Dans 60 % des cas, la DHEA a potentialisé le plateau de la réponse P2X. Le pourcentage de potentialisation était de 65 ± 47 % ($n = 3$, gamme 32 à 267 %).

Ces résultats sont comparables à ceux obtenus en configuration « *pacth*-perforé » (voir chapitre III.B.1)).

Ces données indiquent que l'effet facilitateur de la DHEA sur le plateau des réponses P2X persiste en conditions « cellule-entière ». Ceci nous permet de suggérer que

les effets de la DHEA sont relativement indépendants des systèmes de seconds messagers intracellulaires.

b) Effet de la DHEA après incubation des cultures avec la toxine pertussique.

Dans le but de vérifier si l'effet facilitateur de la DHEA sur l'activation des récepteurs P2X était dépendant de certaines protéines G, nous avons incubé les neurones pendant une nuit en présence de toxine pertussique (PTX, 150 ng/ml), qui inactive fonctionnellement les protéines G_{i/o} par ADP-ribosylation de leurs sous-unités α .

Nous avons ensuite testé la DHEA (50 μ M) sur les réponses à l'ATP (1 μ M) dans 6 neurones issus de 3 cultures différentes traitées par la PTX. Dans 67 % des neurones, le plateau des réponses P2X a été potentialisé par la DHEA. Le pourcentage de potentialisation était de 83 ± 44 %, ce qui semble comparable au pourcentage de modulation observé en absence de préincubation avec la PTX (104 ± 63 %).

Ces résultats montrent que les effets potentialisateurs de la DHEA sur les récepteurs P2X sont indépendants de l'activation de protéines de type G_{i/o}.

c) Effet de la DHEA en présence de progestérone 5 μ M.

Les données de la littérature indiquent que la DHEA potentialise l'activité des récepteurs NMDA par un mécanisme dépendant des récepteurs σ (Baulieu, 1997). Ces récepteurs σ peuvent être bloqués par la progestérone (Maurice *et al.*, 1999). Nous avons donc testé la DHEA (50 μ M) seule, puis en présence de progestérone (5 μ M) sur les réponses à l'ATP (1 μ M) des neurones de ganglions rachidiens.

La DHEA a potentialisé les réponses P2X de 63 ± 34 % (gamme 34 – 112 %, $n = 5$) dans 100 % des neurones testés, et cette potentialisation a systématiquement persisté en présence de progestérone ($n = 5$). D'autre part, pour deux neurones, la potentialisation de la réponse P2X par la DHEA en présence de progestérone était en moyenne 20 % supérieure à la potentialisation obtenue par la DHEA sans progestérone. Dans les mêmes neurones, nous

avons testé la progestérone (5 μM) seule sur les réponses à l'ATP (1 μM), et nous avons observé une potentialisation de la réponse P2X de $99 \pm 16\%$ (gamme 80 – 111 %, $n = 3$) dans 60% des cas ($n = 5$). La progestérone appliquée seule (sans ATP) n'a jamais induit de courant dans nos conditions. La **figure R24** illustre l'ensemble des résultats ci-dessus.

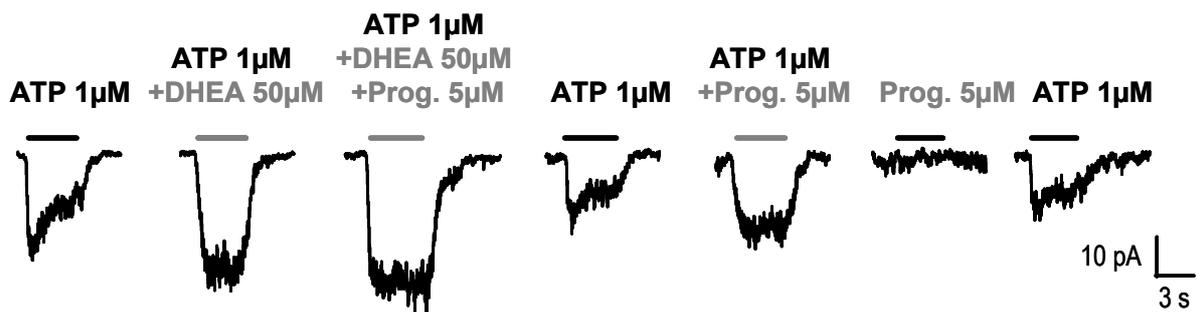


Figure R24 : Modulation de la réponse P2X par la progestérone.

Dans ce neurone, la DHEA (50 μM) a modulé les réponses à l'ATP (1 μM). L'ajout de progestérone (5 μM) n'a pas bloqué l'effet facilitateur de la DHEA. Au contraire, dans le même neurone, la progestérone (5 μM) a potentialisé la réponse membranaire à l'ATP (1 μM) de 112 %, sans induire de réponse mesurable lorsqu'elle a été appliquée seule (en l'absence d'ATP).

L'ensemble de nos résultats suggère que la DHEA potentialise de façon sélective l'activité des récepteurs homo- et hétéromériques P2X incluant la sous-unité P2X₂. Cette modulation est indépendante des systèmes de seconds messagers et de l'activation des protéines Gi/o et des récepteurs σ .

D'autre part, la progestérone n'antagonise pas les effets de la DHEA, mais semble avoir des effets similaires à ceux de la DHEA sur les récepteurs P2X. Nous avons décidé d'étudier ce point plus en détail et les résultats obtenus sont présentés au chapitre IV.

C. Interaction entre l'effet de la DHEA et l'effet du pH extracellulaire acide sur le plateau des réponses P2X.

Etant donné que les réponses impliquant des récepteurs P2X qui incluent la sous-unité P2X₂ sont potentialisées à la fois par la DHEA et le pH extracellulaire (pH_e) acide, nous avons voulu déterminer si ces effets sont simplement additifs ou supra-additifs.

Comme indiqué dans le protocole de la **figure R18**, nous avons testé dans les mêmes neurones les effets de la DHEA sur les réponses membranaires à l' $\alpha\beta$ meATP (5 μ M) en conditions de pH_e physiologique (7,3), puis en conditions de pH_e acide (6,3).

Ainsi, nous avons pu déterminer pour chaque neurone testé ($n=8$) l'effet de l'acidification du pH_e sur la réponse $\alpha\beta$ meATP, ainsi que les effets de la DHEA dans les deux conditions de pH_e.

Le caractère additif ou supra-additif a été vérifié en comparant le pourcentage de potentialisation de la réponse $\alpha\beta$ meATP par la DHEA en conditions de pH_e 6,3 (**P**), à la somme algébrique des effets individuels du pH_e 6,3 et de l'effet de la DHEA en pH_e 7,3 sur la réponse $\alpha\beta$ meATP (**S**).

Dans la moitié des neurones enregistrés ($n=8$), nous avons observé une additivité simple entre l'effet de la DHEA et l'effet du pH_e 6,3 sur les réponses membranaires à l' $\alpha\beta$ meATP (écart entre (S) et (P) : 48 ± 87 %, $n=4$). En revanche, pour 50 % des neurones testés l'effet de la DHEA en conditions de pH 6,3 (3) était beaucoup plus important (écart moyen entre (S) et (P) : 11722 ± 10588 %, $n=4$). (**Figure R25**)

Nous avons réalisé les mêmes expériences en utilisant l'ATP (1 μ M) comme agoniste. Dans les deux tiers des neurones testés ($n=9$) nous avons observé une additivité simple entre l'effet de la DHEA et l'effet du pH_e 6,3 sur les réponses membranaires à l'ATP (écart entre (S) et (P) : 9 ± 11 %, $n=6$). Cependant, dans un tiers des neurones, l'effet de la DHEA en conditions de pH_e 6,3 (P) était plus important, (écart moyen entre (S) et (P) : 1349 ± 881 %, $n=3$), sans être aussi grand que celui observé avec l' $\alpha\beta$ meATP comme agoniste.

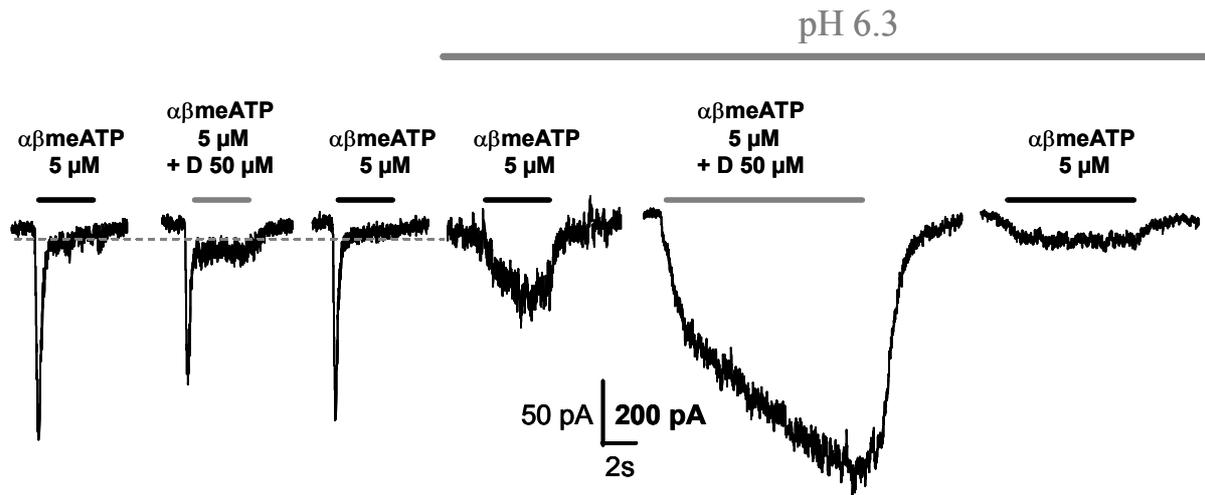


Figure R25 : Interaction entre l'effet facilitateur de la DHEA et l'effet facilitateur du pHe 6,3 sur la réponse à l' $\alpha\beta\text{meATP}$ 5 μM .

Exemple d'un neurone dans lequel la DHEA (50 μM) a fait apparaître un plateau et a inhibé le pic des réponses membranaires à l' $\alpha\beta\text{meATP}$ (5 μM) de type rapide. Dans ce neurone, l'application d' $\alpha\beta\text{meATP}$ (5 μM) en conditions de pHe acide a induit une réponse avec une cinétique d'activation et de désactivation lente, qui a été très fortement et réversiblement potentialisée par la DHEA (notez le changement d'échelle).

Dans ces expériences, la perfusion de la solution extracellulaire à pHe acide débutait quelques minutes avant l'application des agonistes des récepteurs P2X, et par conséquent, les *Acid Sensitive Ion Channels* (ASIC), qui sont des canaux présents dans les neurones sensoriels primaires et qui sont directement activés par le pHe acide se trouvaient dans un état désensibilisé. Nous avons toutefois voulu vérifier si la DHEA pouvait moduler directement l'activité des canaux ASIC. Pour cela, nous avons appliqué localement une solution extracellulaire à pH 6,3 dans des conditions où le milieu extracellulaire (composé de la même solution) était à pH 7,3, puis nous avons co-appliqué la solution à pH 6,3 avec la DHEA (10 μM).

Dans les 5 neurones que nous avons testés, 3 ont répondu à l'application d'une solution extracellulaire à pH 6,3 par un courant entrant. L'amplitude de ce courant était de 604 ± 547 pA ($n = 3$). La DHEA, co-appliquée avec la solution à pH 6,3 n'a pas modulé

l'amplitude des réponses au pH acide dans ces trois neurones, et n'a pas non plus induit de réponse membranaire pour les 2 neurones n'ayant pas répondu à l'application de pH acide par un courant mesurable.

Ces résultats suggèrent que pour une fraction des neurones il y a additivité entre l'effet de la DHEA et l'effet du pH_e acide sur les réponses P2X, tandis pour une autre partie des neurones, l'effet de la DHEA et l'effet du pH_e acide sont supra-additifs. La supra-additivité est plus fréquente et plus importante avec l' $\alpha\beta meATP$ qu'avec l'ATP.

L'importance de la supra-additivité s'est révélée très variable selon les neurones (écart entre (S) et (P) de 1012 % à 25129 %. Ces écarts pourraient être dus à des différences d'état de phosphorylation des récepteurs, ou bien à la présence d'un récepteur inconnu couplé aux récepteurs P2X. Il conviendrait d'augmenter les effectifs de nos expériences pour aborder cette question plus en détail.

IV. Modulation sélective par la progestérone des récepteurs homomériques P2X₂.

Dans la partie précédente, nous avons observé que le blocage des récepteurs sigma par la progestérone n'antagonisait pas la modulation des réponses P2X par la DHEA. Au contraire, nous avons remarqué que la progestérone pouvait reproduire les effets potentialisateurs de la DHEA sur les réponses P2X. Nous avons par conséquent décidé d'étudier ce point plus en détail.

A. Modulation des réponses P2X par la progestérone dans les neurones sensoriels primaires.

1) Description de l'effet.

Nous avons testé la progestérone sur les réponses membranaires à l'ATP (1 μ M) dans 33 neurones du ganglion rachidien.

De façon intéressante, et contrairement à la DHEA (cf. chapitre III.A), la progestérone (5-50 μ M), n'a jamais modulé la phase rapide des réponses à l'ATP (type R et M, $n=27$), et n'a jamais fait apparaître de phase en plateau pour les neurones présentant des réponses P2X de type R ($n=12$). Cependant, la progestérone a potentialisé le plateau des réponses à une application locale d'ATP (1 μ M) dans 57 % des neurones testés (type M et ND, $n=21$). A une concentration de 10 μ M, la progestérone a augmenté l'amplitude du plateau des réponses P2X de 73 ± 45 % ($n=7$, gamme 14 à 125 %). Ces résultats sont illustrés dans la **figure R26A**.

Ainsi, la progestérone a augmenté l'amplitude des courants P2X (tous types confondus), dans 36 % des neurones testés ($n=33$). Il faut noter que ce pourcentage est plus faible que celui observé pour la DHEA (71 %, $n=77$, voir chapitre III.B.1)).

2) Sélectivité de l'effet.

Etant donné que la progestérone ne potentialise les réponses membranaires à l'ATP que dans une fraction des neurones testés (36 %, $n=33$), et sachant que les neurones du

ganglion rachidien expriment différents sous-types de récepteurs P2X, nous avons tenté de déterminer quels étaient les récepteurs P2X modulés par la progestérone. Pour ce faire, nous avons utilisé une approche similaire à celle employée dans le cas de la DHEA (cf. chapitre III.B), c'est-à-dire en se basant sur :

- la sensibilité de la réponse à l'ATP au pH_e acide, qui nous permet de déterminer si le neurone enregistré possède des récepteurs P2X contenant la sous-unité P2X₂ (voir chapitre III). Il en est de même pour les réponses potentialisées par la DHEA, qui nécessitent la présence de sous-unités P2X₂,
- l'utilisation de l' $\alpha\beta$ meATP comme agoniste, ce qui nous permet de restreindre le nombre de sous-types de récepteurs P2X activés. Ainsi, les courants non désensibilisants (en plateau) consécutifs à l'application d' $\alpha\beta$ meATP ne peuvent théoriquement être dus qu'à l'activation de récepteurs hétéromériques P2X_{2/3}, P2X_{1/5}, ou P2X_{4/6}.

a) Utilisation de la DHEA et du pH_e acide.

- Sensibilité à la DHEA :

Dans chacun des 11 neurones testés, nous avons comparé les effets de la progestérone et de la DHEA sur les réponses membranaires à l'ATP (1 μ M). Dans 64 % des neurones testés, les réponses P2X ont été potentialisées par la DHEA (10 μ M). Le pourcentage de potentialisation était de 63 ± 34 %. Dans les mêmes neurones, la progestérone (5 μ M) a facilité les réponses de 99 ± 16 % dans seulement 45 % des cas.

L'ensemble des réponses P2X facilitées par la progestérone l'était également par la DHEA. Par contre, la situation inverse n'a pas été systématiquement observée. En effet, dans 18 % des cas, les réponses membranaires à l'ATP potentialisées par la DHEA ne l'ont pas été par la progestérone.

- Sensibilité au pH_e acide :

Dans 9 neurones pour lesquels la progestérone a été testée sur la réponse P2X, nous avons vérifié les effets du pH_e acide (6,3) sur les réponses à l'ATP (1 μ M).

La progestérone a potentialisé les réponses P2X dans 2 neurones, tandis que le pH_e acide a potentialisé les réponses P2X dans 6 neurones, incluant les 2 neurones sensibles à la

progestérone. Ainsi, la progestérone n'a pas modulé les réponses membranaires à l'ATP dans 66 % des neurones ayant des réponses P2X sensibles au pH_e acide.

Ces résultats nous indiquent que la progestérone augmente sélectivement l'activité d'une sous-population des récepteurs P2X incluant la sous-unité P2X₂.

Remarque : La prégnénolone, qui est le précurseur obligatoire de tous les neurostéroïdes endogènes, a été testée en co-application avec l'ATP (1 μM) sur 3 neurones. Aucun effet modulateur de la prégnénolone n'a été observé sur les réponses P2X, bien que pour deux de ces neurones, la DHEA et la progestérone ont potentialisé la phase en plateau des réponses à l'ATP. En revanche, de façon intéressante, la dihydroprogestérone, un métabolite 5α-réduit de la progestérone, a potentialisé sur les réponses à l'ATP (1 μM) non désensibilisantes dans 2 neurones sur 2 testés. Dans ces 2 neurones, la progestérone a également potentialisé le plateau des réponses à l'ATP.

b) Utilisation de l'αβmeATP.

Dans les neurones du ganglion rachidien, la majorité des récepteurs P2X contenant la sous-unité P2X₂ est représentée par des récepteurs hétéromériques P2X_{2/3} et, dans une moindre mesure, par des récepteurs homomériques P2X₂ (Dunn *et al.*, 2001). Pour déterminer quel(s) sous-type(s) de récepteur(s) est/sont la/les cible(s) de la progestérone, nous avons étudié dans chacun des neurones testés l'effet de la progestérone :

- sur les réponses membranaires à l'ATP (1 μM), qui active à la fois les récepteurs P2X_{2/3} et P2X₂,

- sur les réponses membranaires à l'αβmeATP (5 μM), qui active les récepteurs P2X_{2/3} sans activer les récepteurs P2X₂. Lorsque cela était possible, nous avons également testé les effets de la DHEA et du pH_e 6,3 sur la réponse à l'αβmeATP dans les mêmes neurones.

La progestérone (10 μM) n'a jamais modulé les réponses membranaires à l'αβmeATP (5 μM) dans les 27 neurones que nous avons testés.

- Dans 6 de ces neurones, nous avons également déterminé les effets de la DHEA (50 μM) sur les réponses membranaires à l'αβmeATP et nous avons observé une facilitation de la réponse dans 67 % des cas (**Figure R26B**).

- Dans 11 neurones, nous avons vérifié les effets du pH_e acide et nous avons observé une facilitation des réponses membranaires à l'αβmeATP dans 55 % des cas.

- Enfin, dans 12 neurones pour lesquels nous n'avons pas observé d'effet de la progestérone (50 μM) sur les réponses membranaires à l' $\alpha\beta\text{meATP}$ (5 μM), nous avons testé les effets de la progestérone sur les réponses membranaires à l'ATP (1 μM), et nous avons observé une facilitation de ces réponses dans 25 % des cas. Le pourcentage moyen de l'effet de la progestérone (50 μM) sur les réponses à l'ATP était dans ce cas de $26 \pm 12 \%$.

Ces résultats nous permettent de suggérer que la progestérone potentialise sélectivement l'activité des récepteurs homomériques P2X_2 dans les neurones du ganglion rachidien.

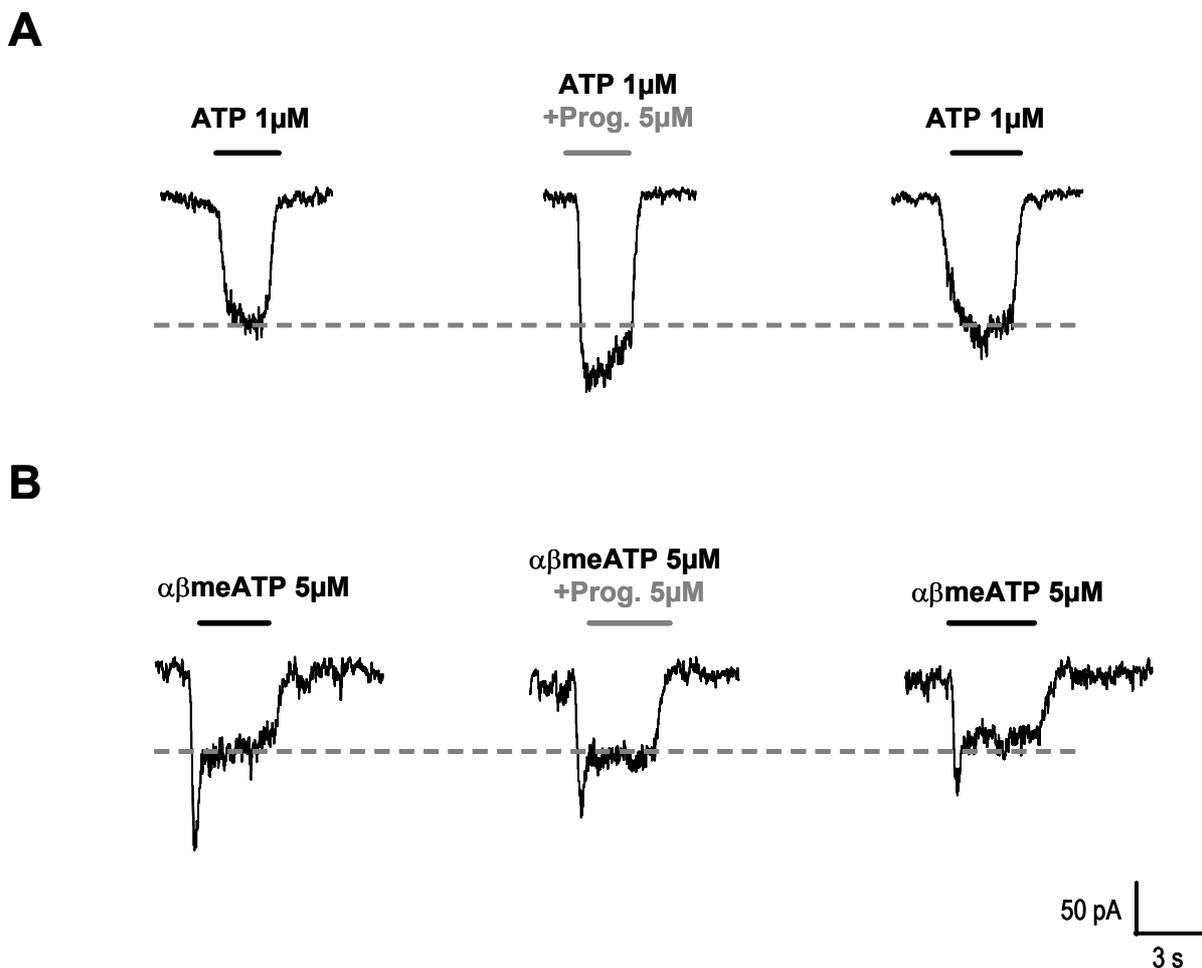


Figure R26 : La progestérone potentialise l'activité de certains récepteurs P2X .

A : La progestérone (5 μM) a potentialisé de façon réversible les réponses membranaires à l'application d'ATP (1 μM) dans 57 % des neurones testés.

B : La progestérone n'a jamais modulé la réponse à l' $\alpha\beta\text{meATP}$ (5 μM).

3) Persistance de l'effet facilitateur de la progestérone sur les réponses P2X en conditions « cellule-entière » et lors du blocage des protéines $G_{i/o}$.

Nous avons testé l'effet facilitateur de la progestérone (5 μ M) sur les réponses à l'ATP (1 μ M) en configuration « cellule-entière » afin d'altérer les systèmes de seconds messagers.

Nous avons également testé la progestérone sur les réponses à l'ATP (1 μ M) dans des neurones préalablement incubés pendant une nuit en présence de toxine pertussique (PTX, 150 ng/ml), afin d'inactiver les protéines $G_{i/o}$.

Nous avons observé un effet facilitateur de la progestérone sur les réponses à P2X dans deux neurones enregistrés en configuration « cellule-entière ». D'autre part, dans les cultures de neurones du ganglion rachidien préalablement incubées avec la PTX, nous avons observé un effet facilitateur de la progestérone sur les réponses P2X dans deux tiers des neurones testés ($n = 3$).

Ces données semblent indiquer que l'effet facilitateur de la progestérone sur le plateau des réponses P2X persiste en conditions « cellule-entière », et lors de l'inhibition des protéines $G_{i/o}$ par la toxine pertussique.

Ceci nous permet de suggérer que les effets de la progestérone sont relativement indépendants des systèmes de seconds messagers, et ne nécessitent pas l'activation des protéines de type $G_{i/o}$.

B. Potentialisation par la progestérone de l'activité des récepteurs homomériques P2X₂ recombinants exprimés dans une lignée de cellules HEK-293.

Nous avons précédemment formulé l'hypothèse que dans les neurones sensoriels primaires, la DHEA potentialiserait sélectivement les réponses membranaires portées par les récepteurs ionotropiques de l'ATP de type hétéromérique P2X_{2/3} et homomérique P2X₂, tandis que la progestérone faciliterait sélectivement les réponses portées par les récepteurs homomériques P2X₂. Afin d'étudier plus en détail les effets de la progestérone, et d'être en mesure de les comparer aux effets de la DHEA, nous avons réalisé des enregistrements en configuration « cellule entière » de cellules HEK-293 (*Human Embryonic Kidney 293*) exprimant de façon stable la sous-unité P2X₂ de rat. Ces cellules exprimaient donc à leur membrane uniquement des récepteurs homomériques P2X₂.

1) Comparaison des effets de la progestérone et de la DHEA dans les mêmes cellules.

Nous avons testé et comparé directement les effets de la DHEA (10 µM) et de la progestérone (10 µM) sur les réponses membranaires à l'ATP (5 µM) pour 5 cellules HEK-293 transfectées.

Le pourcentage de potentialisation des réponses P2X₂ avec DHEA (10 µM) était de 118 ± 95 %, et le pourcentage de potentialisation des réponses P2X₂ avec la progestérone (10 µM) était de 325 ± 302 %, soit un effet environ 2,7 fois plus important de la progestérone par rapport à celui de la DHEA. La **figure R27** illustre ce résultat.

Ce résultat nous indique que la progestérone semble potentialiser l'activité des récepteurs homomériques de façon plus efficace que la DHEA.

Remarque : Un test *t* pour données appariées (*test de Student*) n'a pas permis de mettre en évidence une différence significative entre le pourcentage de potentialisation des réponses P2X par la DHEA et par la progestérone ($P=0,162$). Il faut toutefois noter qu'en raison du faible effectif ($n=5$) et de l'importance des écart-types, nous n'avons que 19 % de chances de mettre en évidence une différence significative. L'utilisation d'un test statistique n'est

donc pas justifiée dans ce cas, et seule l'augmentation de l'effectif pourra nous permettre de confirmer ou d'infirmer notre hypothèse.

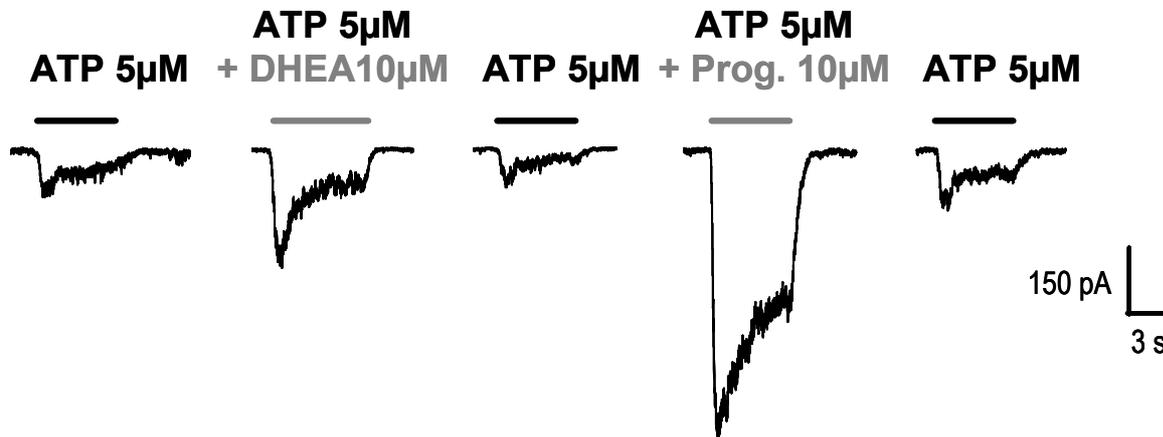


Figure R27 : Potentialisation de la réponse des récepteurs homomériques P2X₂ par la DHEA et la progestérone dans des cellules HEK-293 transfectées.

La progestérone (10 μM) et la DHEA (10 μM) potentialisent l'activité des récepteurs homomériques P2X₂ dans des cellules HEK-293 transfectées de façon stable avec l'ADNc de la sous-unité P2X₂. On observe qu'à concentration égale, l'effet de la progestérone est beaucoup plus important que celui de la DHEA.

2) Dose-dépendance de l'effet facilitateur de la progestérone sur les réponses P2X₂.

Nous avons testé l'effet de la progestérone à des concentrations croissantes sur les réponses membranaires à l'ATP (5 μM) dans des cellules HEK-293 transfectées de façon stable avec l'ADNc de la sous-unité P2X₂. La **figure R28** illustre le caractère concentration-dépendant de cet effet. Le seuil de l'effet de la progestérone semble se situer entre 10⁻⁹ et 10⁻⁸ M. En raison de l'insolubilité de la progestérone à des concentrations supérieures à 100 μM dans la solution extracellulaire, il nous a été impossible de déterminer la dose maximale à laquelle la progestérone facilite les réponses P2X₂.

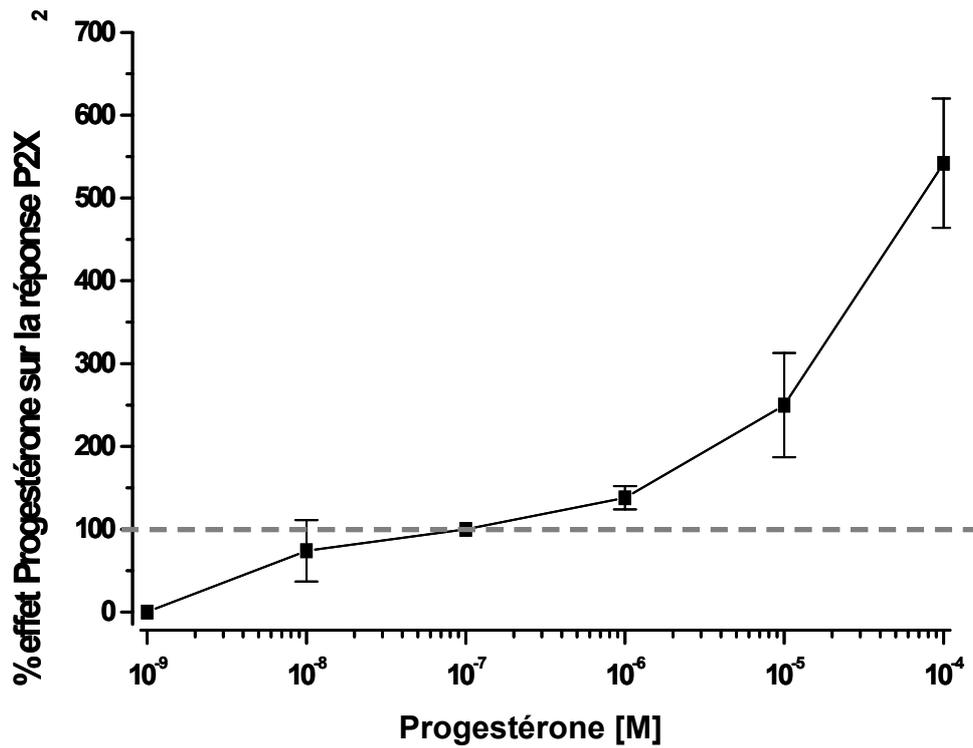


Figure R28 : L'effet facilitateur de la progestérone sur la réponse des récepteurs homomériques P2X₂ est dose-dépendante.

La progestérone a été testée à des concentrations croissantes (de 1 nM à 100 μM) sur les réponses à l'ATP (5 μM). Il semble qu'à une concentration de 100 μM, l'effet potentialisateur de la progestérone n'ait pas atteint de plateau.

$n \geq 3$ pour chaque point, valeurs normalisées par rapport à l'effet induit par 10⁻⁷ M de progestérone et fixé à 100 %.

Discussion

Ce travail de thèse a permis tout d'abord de montrer que la totalité des neurones du ganglion rachidien qui sont présents dans nos cultures possède des récepteurs GABA_A fonctionnels, que l'on peut activer par une application locale d'isoguvacine (30 µM), un agoniste sélectif de ces récepteurs. Nos résultats montrent également que la grande majorité (97 %) des neurones sensoriels répond à l'application locale d'ATP (1 µM) par un courant rapide de nature cationique, ce qui traduit la présence de récepteurs-canaux de type P2X. Des données immunohistochimiques et physiologiques indiquent que les récepteurs GABA_A et P2X exprimés aux terminaisons périphériques et centrales de ces neurones sont souvent également présents sur le corps cellulaire des neurones du ganglion rachidien (Malcangio & Bowery, 1996; Vulchanova *et al.*, 1997; Carlton *et al.*, 1999). En périphérie, ces récepteurs pourraient moduler la transduction ou la genèse des messages sensoriels, alors que les récepteurs présents sur les terminaisons centrales des neurones sensoriels sont susceptibles de contrôler la transmission de l'information vers le système nerveux central. En raison de leur perméabilité aux ions chlorure, les récepteurs GABA_A joueraient un rôle inhibiteur, tandis que les récepteurs P2X, perméables aux cations, auraient pour effet, dans certaines conditions, de potentialiser la transmission du message sensoriel (voir introduction, Chap. III.A.4). Par conséquent, les récepteurs P2X et GABA_A pourraient représenter des cibles privilégiées pour des substances modulatrices endogènes, afin d'influencer la détection ou la transmission de l'information sensorielle.

Nos résultats suggèrent que certains neurostéroïdes pourraient être impliqués dans la modulation des récepteurs GABA_A et P2X et jouer à ce titre un rôle dans l'initiation et la transmission des messages sensoriels, notamment nociceptifs. Dans ce contexte, nous montrons pour la première fois l'existence d'une modulation rapide de récepteurs canaux de l'ATP par la DHEA et la progestérone. Dans le cadre de la discussion qui va suivre, nous aborderons d'abord la question de la composition en sous-unités des récepteurs P2X que nous avons étudiés, puis nous discuterons du mécanisme d'action de la DHEA sur ces récepteurs ainsi que du rôle éventuel des neurostéroïdes dans la nociception. Pour terminer, nous envisagerons l'intérêt d'une modulation sélective de ces récepteurs par la DHEA et la

progestérone dans un contexte physiologique et pharmacologique, notamment dans le cadre de la nociception.

1. Types de neurones sensoriels enregistrés.

Étant donné que nous avons enregistré principalement des neurones dont les corps cellulaires étaient de diamètre faible et moyen ($20,8 \pm 4,7 \mu\text{m}$), il est probable que la majorité des neurones pour lesquels nous avons testé les effets des neurostéroïdes sur l'activité des récepteurs GABA_A et P2X soient des nocicepteurs de type $A\delta$ (faiblement myélinisés) ou C (Cf. introduction Chap. II.A). D'autre part, 80 % des neurones que nous avons enregistrés possédaient des récepteurs TRP-V1 fonctionnels car ils répondaient à une application locale de capsaïcine ($1 \mu\text{M}$) par un courant entrant. Cette caractéristique semble indiquer qu'il s'agit de nocicepteurs sensibles à la chaleur Cf. introduction Chap. II.A).

2. Caractéristiques des réponses P2X.

- réponses rapides :

Dans près de 80 % des neurones enregistrés, les réponses membranaires que nous avons induites par l'application locale d'ATP ($1 \mu\text{M}$) ou l' $\alpha\beta\text{meATP}$ ($5\mu\text{M}$) ont présenté une phase rapide et transitoire, que nous savons être due principalement aux **récepteurs homomériques P2X₃** (Dunn *et al.*, 2001). Ces récepteurs sont présents en grande quantité dans les neurones sensoriels primaires où ils jouent très probablement un rôle dans les douleurs accompagnant l'inflammation chronique et les neuropathies (North, 2004, et introduction Chap. III.A.4).

- réponses non désensibilisantes :

Les réponses induites par l'ATP ($1 \mu\text{M}$) ou l' $\alpha\beta\text{meATP}$ ($5\mu\text{M}$) ont présenté une phase en plateau dans environ 65 % des neurones testés. Le caractère non désensibilisant de ces courants indique qu'ils pourraient être dus à l'activation de récepteurs homomériques P2X₂, P2X₄, P2X₅, et/ou de récepteurs hétéromériques P2X_{2/3}, P2X_{1/5}, P2X_{2/6}, P2X_{4/6}. Alternativement, il pourrait également s'agir d'un sous-type de récepteur constitué d'une

association de sous-unités P2X connues mais dont l'association n'a pas été décrite jusqu'à présent (Cf. introduction Chap. III.A.2)). Des expériences d'hybridation *in situ* ont montré que les ARN messagers des sous-unités P2X₁ à P2X₆ sont exprimés dans les neurones du ganglion rachidien, et des données d'immunohistochimie indiquent que parmi les différentes sous-unités P2X, les sous-unités P2X₂ et P2X₃ sont les plus fortement exprimées dans les neurones du ganglion rachidien. Ces résultats indiquent que la majorité des réponses non désensibilisantes à l'ATP de ces neurones seraient dues aux récepteurs hétéromériques P2X_{2/3} (Cf. introduction Chap. III.A.3)). Nos données semblent confirmer ces observations, puisque dans près de 80 % des neurones, l'acidification du milieu extracellulaire a fortement potentialisé les réponses non désensibilisantes à l' α βmeATP (qui active les récepteurs P2X₁, P2X₃, P2X_{2/3}, P2X_{1/5} et P2X_{4/6}), or ce phénomène n'est observé qu'avec les récepteurs P2X contenant la sous-unité P2X₂ (Stoop *et al.*, 1997, et introduction Chap. III.A.2)d) ; Virginio *et al.*, 1997; Surprenant *et al.*, 2000). Cependant, il semble que d'autres sous-unités P2X pourraient intervenir de façon non négligeable dans les réponses P2X non désensibilisantes. En effet, l'ivermectine, un modulateur allostérique des récepteurs P2X incluant la sous-unité P2X₄ (Khakh *et al.*, 1999b, et introduction Chap. III.A.2)c)), a potentialisé les réponses à l' α βmeATP (5 μM) dans près de 60 % des neurones testés, ce qui signifie qu'une fraction du courant membranaire induit par l' α βmeATP est peut-être due à des récepteurs de type P2X_{4/6}.

D'autre part, lorsque nous avons appliqué l'ATP (1 μM) en présence de TNP-ATP (1 μM, à l'équilibre), nous avons observé des réponses non désensibilisantes à l'ATP dans 70 % des neurones. Or les récepteurs P2X_{2/3} sont inhibés par de faibles concentrations de TNP-ATP (CI₅₀= 2 nM) (Khakh *et al.*, 2001). Dans ces conditions, les seuls récepteurs activables connus sont les récepteurs hétéromériques P2X_{4/6} (Séguéla, communication personnelle) et les récepteurs homomériques P2X₂ (l'action du TNP-ATP sur les récepteurs P2X_{2/6} n'a pas été décrite dans la littérature à ce jour). Or la progestérone, qui semble potentialiser sélectivement les récepteurs homomériques P2X₂ (cf. résultats chap. IV), n'a potentialisé les réponses P2X que dans 50 % des cas. L'ensemble de ces données suggère que les récepteurs homomériques P2X₂ participent aux réponses P2X dans une fraction des neurones du ganglion rachidien, mais que d'autres sous-types de récepteurs contribuent également aux courants induits par l'ATP.

3. Hypothèse spéculative sur la composition en sous-unités des récepteurs P2X natifs exprimés par les neurones de DRG.

De façon intéressante, nous avons observé que la DHEA pouvait révéler une composante non désensibilisante (ND) dans des neurones, qui en l'absence de DHEA, répondaient à l'ATP par un courant de type rapide et transitoire traduisant l'activation de récepteurs homomériques P2X₃, (voir résultats chap. III.B)). Nos résultats indiquent que cette composante ND est due à l'activation de récepteurs P2X incluant la sous-unité P2X₂ (Il s'agirait principalement de récepteurs P2X_{2/3} et P2X₂, Dunn *et al.*, 2001). La progestérone en revanche, n'a jamais révélé de composante ND dans des neurones ayant des réponses à l'ATP de type rapide. En considérant l'ensemble de nos observations (incluant les données pharmacologiques et les modulations des réponses par les protons, l'ivermectine, la DHEA et la progestérone), nous pouvons formuler une hypothèse spéculative sur la composition des récepteurs P2X responsables des réponses R, M et ND dans les neurones de DRG.

- réponses de type R :

Etant donné que la progestérone potentialise l'activité des récepteurs P2X₂ homomériques mais n'a pas d'effet sur les récepteurs P2X_{2/3} hétéromériques, nos observations suggèrent que dans les neurones exprimant la sous-unité P2X₃ à forte densité (présence de réponses de type R), les sous-unités P2X₂ synthétisées entreraient dans la formation de récepteurs hétéromériques P2X_{2/3} (révélés en présence de DHEA) plutôt que dans la formation de récepteurs homomériques P2X₂. On pourrait spéculer que dans ces conditions, les sous-unités P2X₂ sont « titrées » par les sous-unités P2X₃ et que l'excédent de sous-unités P2X₃ va former des récepteurs homomériques conduisant à l'apparition de réponses de type R.

- réponses de type M :

Une autre fraction des neurones exprimant la sous-unité P2X₃ en grande quantité pourrait exprimer la sous-unité P2X₂ en quantité suffisante pour observer une composante en plateau dans la réponse, mais insuffisante pour titrer totalement la sous-unité P2X₃. On observe alors des réponses mixtes à l'ATP. Une partie du plateau des réponses pourrait également être due à d'autres types de récepteurs, notamment aux récepteurs P2X_{4/6} (voir résultats chap. III.B. et ci-après).

- réponses de type ND :

Une fraction (70 % d'après nos expériences réalisées en pH acide, voir résultats chap.III.B.) des neurones de type ND exprimant principalement la sous-unité P2X₂ pourrait exprimer également la sous-unité P2X₃. Mais cette sous-unité serait moins exprimée que dans les neurones présentant une réponse R ou M à l'ATP, et par conséquent elle pourrait être entièrement « titrée » par la sous-unité P2X₂. Dans ces conditions, on n'observerait pas de pic (réponses de type R) dans les réponses à l'ATP. La phase en plateau de ces réponses pourrait être due à des récepteurs P2X_{2/3}, P2X₂ et P2X_{4/6}.

Une autre fraction des neurones de type ND (neurones dont le corps cellulaire est de plus gros diamètre, Vulchanova *et al.*, 1997) n'exprime pas la sous-unité P2X₃. Les réponses P2X de ces neurones pourraient être principalement dues à des récepteurs P2X_{4/6} (puisque presque tous les neurones que nous avons testés répondent à l' $\alpha\beta$ meATP) et, étant donné que 50 % des réponses à l'ATP sont potentialisées par la progestérone dans ces neurones, certaines seraient également en partie dues aux récepteurs P2X₂ homomériques.

D'autre part, en présence de TNP-ATP (1 μ M à l'équilibre), et en restreignant les sous-types de récepteurs P2X activables par l'utilisation de l' $\alpha\beta$ meATP (qui, à 5 μ M, active les récepteurs P2X_{4/6} mais pas les récepteurs P2X₂) nous avons observé une réponse dans 50 % des neurones enregistrés. Ces résultats, suggèrent un rôle non négligeable des récepteurs P2X_{4/6} dans les réponses P2X des neurones de DRG de rat, mais sont apparemment en contradiction avec les données de Souslova et coll. obtenues chez des souris invalidées pour le gène de la sous-unité P2X₃ (2000). Dans cette étude, les auteurs n'observent quasiment pas de réponse de type ND en réponse à l' $\alpha\beta$ meATP (10 μ M) chez les souris mutantes (alors que ce type de réponse est observé dans plus 80 % des neurones testés chez les souris sauvages), ce qui exclue *a priori* la participation du récepteur P2X_{4/6} dans les réponses P2X non désensibilisantes des neurones de DRG de souris. Cette différence avec nos résultats provient peut-être d'une différence de sensibilité des récepteurs P2X_{4/6} à l' $\alpha\beta$ meATP chez la souris, ou à l'absence de ce sous-type de récepteur dans les neurones de DRG de souris. De plus, il ne faut pas exclure un éventuel changement du profil d'expression des différentes sous-unités P2X suite à l'invalidation du gène de la sous-unité P2X₃. Il est également possible que nous ayons activé un sous-type de récepteur P2X non décrit pour l'instant dans les systèmes d'expression hétérologues. Quoiqu'il en soit, ce récepteur est activé par l' $\alpha\beta$ meATP et est insensible au TNP-ATP.

Enfin, nous avons observé une inhibition des réponses à l' $\alpha\beta$ meATP (5 μ M) dans 12 % des cas lors d'enregistrements en conditions de pH acide. A notre connaissance, les seules réponses P2X ayant ce profil (sensibilité à l' $\alpha\beta$ meATP, réponse non désensibilisante, et bloquée par le pH extracellulaire acide) correspondent à l'activation des récepteurs P2X_{1/5}. Il est donc possible qu'une faible fraction des neurones de DRG que nous avons enregistrés possédait des récepteurs P2X_{1/5}. Cependant, les effets du pH_e acide sur les récepteurs P2X_{4/6} n'ont pas été décrits, et il pourrait tout aussi bien s'agir de ce sous-type de récepteurs, ou bien d'un sous-type non encore décrit. Par ailleurs, l'expression de la protéine correspondant à P2X₁ dans les neurones de DRG et du système nerveux en général n'a pas été démontrée pour le moment.

Ainsi, la majorité des réponses P2X non désensibilisantes (en plateau) des neurones du ganglion rachidien de nos cultures sont apparemment dues à l'activation de récepteurs P2X_{2/3}. Cependant, il semble que les récepteurs P2X_{4/6} et P2X₂ contribuent également à ces réponses membranaires. D'autre part, il se pourrait que des récepteurs P2X_{1/5} soient présents et fonctionnels dans nos cultures, mais ceci reste à être démontré. Concernant les autres sous-types de récepteurs P2X : P2X₄ et P2X₅ homomériques, P2X_{2/6}, ou bien des sous-types non décrits constitués de sous-unités P2X₁ à 6, nos données actuelles ne permettent pas de conclure en faveur ou en défaveur de leur expression fonctionnelle dans les neurones de DRG.

4. Mécanisme d'action des neurostéroïdes sur les récepteurs P2X.

Nous avons montré que la DHEA semblait d'une part inhiber sélectivement l'activité des récepteurs homomériques P2X₃, et d'autre part potentialiser sélectivement l'activité des récepteurs P2X contenant la sous-unité P2X₂. La progestérone quant à elle semble moduler uniquement les récepteurs homomériques P2X₂ en potentialisant leur activité.

4.1. Effet inhibiteur de la DHEA sur le pic des réponses P2X :

Nos résultats ont montré que la DHEA inhibait le pic des réponses P2X dans environ deux tiers des cas. Comme nous l'avons vu dans le paragraphe précédent, il est fort probable que ces réponses sont dues à l'activation d'une population relativement homogène de

récepteurs homomériques P2X₃ (Dunn *et al.*, 2001 et voir introduction chap. III.A). Il faut cependant remarquer que la DHEA n'a pas systématiquement modulé le pic des réponses à l'ATP ou à l' $\alpha\beta$ meATP. Nous n'avons pour l'instant pas d'explication pour cette absence d'effet sur une sous-population de récepteurs, mais nous pourrions spéculer que la sensibilité d'un récepteur donné puisse varier selon son état de phosphorylation/déphosphorylation. D'une façon générale, tous les récepteurs P2X possèdent des sites de phosphorylation (Khakh, 2001; North, 2002), et il serait intéressant de vérifier expérimentalement si la manipulation de l'état de phosphorylation de ces récepteurs module leur sensibilité à la DHEA.

L'absence d'effet de la DHEA sur une sous-population de neurones présentant une réponse avec un pic rapide, ainsi que l'absence d'effet modulateur de la progestérone, de l'allopregnanolone et du sulfate de prégénolone sur l'ensemble des courants de type R (P2X₃) testés, indique cependant que l'inhibition des courants P2X₃ par la DHEA est spécifique et n'est pas liée à une interaction lipophile des neurostéroïdes avec la double couche lipidique des membranes plasmiques (Schmidt *et al.*, 2000). Le caractère rapide et réversible de l'inhibition par la DHEA de certaines réponses P2X₃ semble indiquer que l'action de ce neurostéroïde s'effectuerait via un site allostérique. Cependant, en raison de la forte désensibilisation de la réponse des récepteurs P2X₃ et de la difficulté d'obtenir des réponses stables et reproductibles, quelle que soit la concentration d'agoniste utilisée ou le délai entre les applications successives d'agoniste, nous n'avons pas pu directement tester cette hypothèse, ni même le caractère dose-dépendant de l'effet inhibiteur de la DHEA.

4.2. Effet potentialisateur de la DHEA et de la progestérone sur le plateau des réponses P2X :

- Dose dépendance des effets de la DHEA et de la progestérone.

Nos résultats indiquent que la DHEA et la progestérone potentialisent l'activité des récepteurs P2X dans une fraction des neurones testés. Cet effet est dose-dépendant. Avec comme agoniste l'ATP (1 μ M) Le seuil de concentration à partir duquel l'effet est observé semble se situer aux alentours de 10⁻⁸ M pour la DHEA, et entre 10⁻⁹ et 10⁻⁸ M pour la progestérone. En raison de la mauvaise solubilité des neurostéroïdes dans le milieu extracellulaire que nous avons utilisé, il ne nous a pas été possible de déterminer la concentration à partir de laquelle la DHEA et la progestérone n'augmentent plus les réponses

P2X (concentration maximale). Par conséquent, nous n'avons pas pu calculer l' EC_{50} de l'action de ces neurostéroïdes. Mais si l'on considère que la concentration saturante de DHEA est comprise entre 10^{-4} et 10^{-3} M, l' EC_{50} pourrait se situer entre 10^{-6} et 10^{-5} M dans les neurones sensoriels primaires. Il conviendrait pour être plus précis d'effectuer des courbes effet-dose de la DHEA dans des cellules transfectées avec les sous-unités P2X d'intérêt :

- avec la sous-unité P2X₂ uniquement, en utilisant l'ATP comme agoniste.

Cette courbe pourrait être comparée à celle obtenue dans les neurones du ganglion rachidien en conditions de TNP-ATP 1 μ M à l'équilibre, à conditions d'en augmenter l'effectif.

- avec les sous-unités P2X₂ et P2X₃, en utilisant comme agoniste l' $\alpha\beta$ meATP.

Concernant les neurones du ganglion rachidien, les effets de la DHEA étaient très variables pour toutes les concentrations testées, compte tenu de la variabilité d'expression des sous-unités P2X selon les cellules enregistrées. Par conséquent, nous n'avons pas pu comparer strictement les courbes effet-dose que nous avons obtenu avec l' $\alpha\beta$ meATP comme agoniste, ou en conditions de TNP-ATP 1 μ M, avec la courbe effet-dose obtenue en conditions standard (voir résultats figures R15, R17 et R22). Ainsi, nous n'avons pas poussé plus avant nos expérimentations à ce sujet.

Concernant la progestérone, le seuil de son effet sur les réponses à l'ATP dans des cellules HEK-293 transfectées pour exprimer uniquement les récepteurs P2X₂ semble se situer entre 10^{-9} et 10^{-8} M, et la dose maximale à laquelle la progestérone facilite les réponses P2X₂ semble être supérieure ou égale à 10^{-4} M. Si tel est le cas, l' EC_{50} pourrait se situer vers 10^{-5} M.

- Sélectivité des effets de la DHEA et de la progestérone.

Les propriétés pharmacologiques des récepteurs P2X (potentialisation sélective des récepteurs incluant la sous-unité P2X₂ par le pH extracellulaire acide, modulation par l'ivermectine des récepteurs P2X₄ et P2X_{4/6} (voir introduction chap. III. A.3)), ainsi que l'utilisation d'un agoniste sélectif des récepteurs P2X_{1, 3, 2/3, 1/5 et 4/6}, l' $\alpha\beta$ meATP, et d'un antagoniste sélectif des récepteurs P2X_{1, 3, 2/3 et 1/5}, le TNP-ATP, nous ont permis d'établir que la DHEA potentialisait sélectivement l'activité des récepteurs P2X incluant la sous-unité P2X₂, et que la progestérone potentialisait uniquement l'activité des récepteurs homomériques P2X₂. Nos conclusions sont basées sur les observations suivantes :

- les effets potentialisateurs de la DHEA et de la progestérone sont strictement corrélés à l'effet potentialisateur du pH extracellulaire acide,
- l'effet de la DHEA est observé sur les réponses à l'ATP et à l' $\alpha\beta$ meATP, tandis la progestérone potentialise uniquement les réponses à l'ATP (donc la progestérone ne module pas les récepteurs hétéromériques P2X_{2/3}).
- Les effets de la DHEA et de la progestérone sur les récepteurs P2X₂ homomériques ont été confirmés par des expériences réalisées sur une lignée de cellules HEK-293 exprimant de façon stable la sous-unité P2X₂.

D'autre part, l'effet facilitateur de la DHEA sur le plateau des réponses P2X a été systématiquement observé dans des neurones du ganglion noueux en culture. Rappelons que ces neurones n'expriment pas d'autres sous-unités P2X que la sous-unité P2X₂ et la sous-unité P2X₃. Dans ces cellules, la DHEA a augmenté les réponses à l' $\alpha\beta$ meATP (qui active les récepteurs hétéromériques P2X_{2/3}, et pas les récepteurs homomériques P2X₂). La DHEA a également augmenté les réponses à l'ATP en conditions de TNP-ATP 1 μ M, qui au contraire permet d'enregistrer uniquement les réponses des récepteurs homomériques P2X₂ dans les neurones du ganglion noueux.

Cependant, en conditions standard avec l'ATP ainsi qu'avec l' $\alpha\beta$ meATP comme agonistes, le pourcentage de potentialisation observé était beaucoup plus faible que dans les neurones du ganglion rachidien. La faiblesse de l'effet (<30 %) n'est pas observé en conditions de TNP-ATP (1 μ M), ou nous enregistrons uniquement les réponses des récepteurs homomériques P2X₂. Cette dissimilitude ne semble pas due à une différence du nombre de sous-unités P2X₂ composant les récepteurs P2X dans les neurones du ganglion noueux par rapport à ceux du ganglion rachidien, puisque le récepteur hétéromérique P2X_{2/3} est apparemment obligatoirement constitué d'une sous-unité P2X₂ et de 2 sous-unités P2X₃ (Jiang *et al.*, 2003). Il est possible que l'état de phosphorylation des sous-unités P2X₃ influence le degré d'efficacité de la DHEA pour moduler les récepteurs P2X_{2/3}. Nous avons soulevé cette hypothèse concernant l'effet inhibiteur de la DHEA sur le pic des réponses P2X. Nous n'avons cependant pas la possibilité technique de la tester à l'heure actuelle.

Quoi qu'il en soit, il conviendrait d'augmenter les effectifs de nos enregistrements de neurones du ganglion noueux pour pouvoir comparer statistiquement les pourcentages de potentialisation de la réponse à l' $\alpha\beta$ meATP avec ceux obtenus dans les neurones du ganglion rachidien. La culture des neurones du ganglion noueux est cependant moins aisée que celle

des neurones du ganglion rachidien. Pour cette raison, nous avons choisi de ne pas faire d'avantage d'expériences sur ce modèle pour le moment.

- La modulation des récepteurs P2X par la DHEA et la progestérone est-elle de type allostérique ?

Dans les neurones du ganglion rachidien, la potentialisation du plateau des réponses P2X par la DHEA et la progestérone n'est pas observée avec d'autres neurostéroïdes, comme l'allopregnanolone ou la prégénolone (sulfatée ou non sulfatée). Cet effet se met en place en moins d'une centaine de millisecondes (vitesse de notre système d'application), et est réversible, ce qui semble indiquer que son mécanisme d'action serait de type allostérique. Cette hypothèse est confirmée par le fait que la DHEA n'a pas eu d'effet sur une réponse à une concentration maximale d'ATP (100 μ M - 1 mM) dans des neurones où son effet potentialisateur avait été observé sur des réponses sous-maximales à l'ATP (1 μ M). D'autre part, parmi les 8 neurones n'ayant pas répondu à l'application locale d'ATP (1 μ M), 6 ont présenté un courant entrant lors de la co-application d'ATP et de DHEA (10 - 50 μ M). Par ailleurs, dans le cas d'un de ces neurones, nous avons appliqué l'ATP à une concentration plus élevée (5 μ M) mais en absence de DHEA. Dans ce cas, le neurone a répondu par un courant entrant démontrant qu'il exprimait bien des récepteurs fonctionnels de l'ATP, mais que ceux-ci n'étaient probablement pas activés de façon détectable dans nos conditions expérimentales par une concentration d'ATP de 1 μ M. Cette observation suggère que la DHEA a probablement augmenté l'affinité de ces récepteurs pour l'ATP.

- La modulation des récepteurs P2X par la DHEA et la progestérone implique-t-elle des seconds messagers et/ou de récepteurs des neurostéroïdes distincts des récepteurs P2X ?

Certains effets dépendant des seconds messagers (notamment passant par l'activation de protéines G) sont très rapides (échelle de la seconde). Cependant, les effets potentialisateurs de la DHEA et de la progestérone sont aussi observés lors d'enregistrements en configuration « cellule-entière », configuration dans laquelle il est fort probable que les systèmes de seconds messagers intracellulaires soient peu actifs du fait de la dialyse du milieu intracellulaire par le milieu intra-pipette. Il convient cependant de préciser que certains mécanismes de seconds messagers intracellulaires appartenant à des microdomaines sous-membranaires ne sont sans doute pas altérés en configuration cellule-entière.

Les effets modulateurs de la DHEA et de la progestérone persistent également lors de l'inhibition des protéines G de type Gi/o par un prétraitement des neurones avec la toxine pertussique. Par conséquent, les effets de la DHEA et de la progestérone sont indépendants de l'activation de protéines G de type Gi/o.

Il a été montré que les récepteurs σ sont des cibles potentielles de certains neurostéroïdes : la DHEAS par exemple, est agoniste de ces récepteurs et via cette action, elle potentialise indirectement l'activité des récepteurs NMDA (Monnet *et al.*, 1995). Nous avons vérifié que ce n'était pas le cas pour les récepteurs P2X : l'effet de la DHEA sur ces récepteurs persiste en présence de progestérone (5 μ M, à l'équilibre), qui bloque l'activité des récepteurs σ 1 (Monnet *et al.*, 1995; Maurice *et al.*, 1999).

Nous concluons que la DHEA et la progestérone agissent très probablement en augmentant l'affinité de certains récepteurs P2X (incluant la sous-unité P2X₂ pour la DHEA, et uniquement homomériques P2X₂ pour la progestérone) par un mécanisme de type allostérique.

5. Sources possibles de DHEA et de progestérone.

Avant de discuter des rôles éventuels de la DHEA et de la progestérone dans la nociception, il est important de rappeler qu'il existe deux types de sources pour la synthèse de tels stéroïdes dans l'organisme (cf. introduction Chap. IV.A.) :

- une source endocrine : à partir du cholestérol, la progestérone est synthétisée par les ovaires chez la femelle et sa synthèse varie durant le cycle œstrien chez la ratte (ou menstruel chez la femme). La DHEA est elle aussi dérivée du cholestérol et est synthétisée par les glandes surrénales chez le mâle et la femelle. La DHEA et la progestérone sont alors considérées comme des stéroïdes neuroactifs et leurs effets sont systémiques.
- une source gliale ou neuronale : la DHEA et la progestérone sont synthétisées localement à partir du cholestérol par les neurones ou les cellules gliales disposant de l'équipement enzymatique adéquat, et indépendamment de la synthèse des stéroïdes circulants. On les considère alors comme des neurostéroïdes et leurs actions sont paracrines et/ou autocrines.

Concernant la DHEA, un point essentiel est à souligner : chez les rongeurs (rat, souris) la DHEA est quasiment indétectable dans la circulation sanguine (Baulieu & Robel, 1996;

Guillemette *et al.*, 1996; Baulieu, 1997). Ainsi, seules les sources neuronales/gliales peuvent être envisagées pour les rôles éventuels de ce neurostéroïde sur les récepteurs P2X *in vivo*. Par contre chez les primates et chez l'humain, la DHEA est présente en grande quantité dans la circulation sanguine (Baulieu & Robel, 1996; Baulieu, 1997). Les concentrations plasmatiques les plus élevées mesurées chez l'humain atteignent 10 μM (Parker & Odell, 1980; Guillemette *et al.*, 1996; Hornsby, 1997). Il est donc probable que la DHEA provenant de sources endocrines et nerveuses puisse agir sur les récepteurs P2X humains *in vivo* (voir ci-après).

5.1. Sources endocrines :

Chez l'humain, la DHEA est essentiellement fabriquée par les glandes surrénales et sa concentration plasmatique diminue avec l'âge à partir de 30 ans (avec cependant une forte variabilité inter-individuelle). La régulation de la concentration circulante de DHEA est assez méconnue. Elle est principalement sous la dépendance de l'hormone adrénocorticotrope (ACTH) et est très sensible aux variations des taux plasmatiques de cette hormone. Mais il est probable que des facteurs autres que surrénaux (tels que l'insulinémie) y participent. D'autre part, la concentration plasmatique de DHEA ne semble pas varier avec différents états pathologiques, excepté dans le syndrome de déficience surrénalienne (Schlienger *et al.*, 2002).

La progestérone quant à elle, en tant qu'hormone ovarienne, pourrait avoir un rôle différent selon le sexe, voire jouer un rôle uniquement chez la femelle. La progestérone est synthétisée par le corps jaune suite à l'ovulation, lors de la phase lutéale. N'étant pas dégradée en 17-hydroxyprogestérone du fait de l'absence de la 17-20 desmolase dans le corps jaune, elle peut, dans ces conditions, atteindre des concentrations circulantes importantes (Thibault & Levasseur, 2001), et se retrouver éventuellement en quantité suffisante à proximité des terminaisons sensorielles périphériques pour moduler l'activité des récepteurs P2X. Il faudrait néanmoins que les terminaisons sensorielles périphériques expriment des récepteurs P2X₂ homomériques puisque, à première vue, seul ce sous-type de récepteur P2X est modulé par la progestérone. La présence de récepteurs P2X₂ homomériques sur les terminaisons sensorielles périphériques n'a cependant pas pu être démontrée à ce jour, à défaut d'outils pharmacologiques spécifiques ou d'anticorps reconnaissant sélectivement ces récepteurs.

5.2. Sources nerveuses :

La progestérone et la DHEA peuvent aussi être synthétisées *de novo* par les cellules du système nerveux central et périphérique, et indépendamment de leur concentration plasmatique. Elles sont alors considérées comme des neurostéroïdes (Baulieu, 1997). Les cellules de Schwann entourant le nerf sciatique expriment le récepteur périphérique des benzodiazépines (PBR), qui permet d'initier la synthèse des neurostéroïdes à partir du cholestérol (Lacor *et al.*, 1999). Les corps cellulaires des neurones des ganglions rachidiens expriment la p450scc, enzyme permettant la synthèse de prégnénolone qui est le précurseur universel des neurostéroïdes (Patte-Mensah *et al.*, 2003). Cette enzyme est également présente et fonctionnelle dans les couches superficielles (laminae I et II) de la corne dorsale de la moelle épinière (Patte-Mensah *et al.*, 2003) où se terminent la plupart des axones des fibres A δ et C (cf. Introduction Chap.II.C). Des données préliminaires de l'équipe du Professeur Guy Mensah-Nyagan dans notre unité de recherche indiquent également que la DHEA peut être synthétisée dans la corne dorsale de la moelle épinière (communication personnelle du Pr. Mensah-Nyagan et de C. Kibaly). D'autre part, la production tonique de neurostéroïdes 5 α -réduits (dont font partie l'alloprégnanolone et la tétrahydrocorticostérone) a été mise en évidence chez le rat immature, et peut être stimulée chez l'adulte par activation du PBR (Keller *et al.*, 2004). La DHEA et la progestérone ne sont pas des neurostéroïdes 5 α -réduits, mais la progestérone en est un précurseur essentiel.

Ainsi, il semble que des neurostéroïdes puissent être produits dans les régions où se font la détection et la modulation du message nociceptif, et où l'on trouve également des récepteurs P2X. Nous allons maintenant aborder les rôles éventuels de la DHEA et de la progestérone dans la nociception par l'intermédiaire de leurs effets sur les récepteurs P2X.

6. Rôle éventuel de la DHEA et de la progestérone dans les mécanismes de la nociception.

Si la DHEA module également les récepteurs P2X humains, nous pouvons imaginer un tonus inhibiteur faible de la DHEA sur l'activité des récepteurs P2X₃ exprimés par les

terminaisons périphériques des neurones sensoriels primaires, et donc sur l'initiation de certains messages sensoriels, *a priori* nociceptifs.

En fin de grossesse, la concentration plasmatique de progestérone peut atteindre 0,5 nmoles/l chez la femme (Thibault & Levasseur, 2001). On peut alors s'attendre à un rôle particulier de la progestérone dans la nociception à ce moment (là encore, il faudrait vérifier que le récepteur P2X₂ humain soit sensible à la progestérone).

Comme nous l'avons vu en introduction, les récepteurs P2X sont présents au niveau des terminaisons libres des fibres afférentes nociceptives, lieu où le message nociceptif est détecté (Julius & Basbaum, 2001). Concernant les récepteurs GABA_A, qui sont inhibés par la DHEA (voir Résultats chap. II.C) et potentialisés par la progestérone (Wu *et al.*, 1990), la présence de sous-unités $\beta 2/\beta 3$ et α de ce récepteur a été observée par immunomarquage dans environ 10-15 % des fibres fines non myélinisées innervant la peau glabre chez le chat (Carlton *et al.*, 1999).

Les récepteurs GABA_A et P2X sont également présents au niveau des terminaisons centrales des neurones du ganglion rachidien, dans la corne dorsale de la moelle épinière (Malcangio & Bowery, 1996). Cette première synapse sensori-spinale constitue un lieu privilégié pour la modulation du message sensoriel (Chizh & Illes, 2001). Il est donc possible que la DHEA et/ou la progestérone puissent jouer un rôle dans certains mécanismes de la nociception, en modulant des récepteurs GABA_A et/ou P2X à ces endroits stratégiques. C'est ce dont nous allons discuter dans les paragraphes qui suivent.

6.1. Détection du message sensoriel :

En périphérie, l'ATP peut être libérée par de nombreux types cellulaires (cellules de Schwann, kératinocytes, neurones sensoriels primaires, cellules tumorales, et toute cellule lysée) lors d'une lésion tissulaire, d'une inflammation, d'une tumeur, ou d'une distension viscérale ou vasculaire (Chizh & Illes, 2001). L'ATP excite ensuite les récepteurs P2X des afférences nociceptives, qui peuvent elles-mêmes libérer d'avantage d'ATP, induisant éventuellement un mécanisme d'auto-activation ou de prolongation de l'effet du stimulus initial (Kennedy *et al.*, 2003).

Les récepteurs P2X présents sur les terminaisons périphériques des neurones sensoriels primaires sont principalement des récepteurs homomériques P2X₃ et des récepteurs hétéromériques de type P2X_{2/3} (Chizh *et al.*, 1995), mais ces deux sous-types de récepteurs sont apparemment présents sur des catégories de fibres distinctes.

Les récepteurs homomériques P2X₃ sont présents principalement sur les fibres thermociceptives de faible diamètre sensibles à la capsaïcine et seraient responsables de l'hyperalgésie thermique observée lors d'une inflammation chronique ou lors d'une neuropathie (North, 2004, et voir introduction chap. III A.4).

Les récepteurs P2X_{2/3} hétéromériques, présents sur les terminaisons de fibres insensibles à la capsaïcine seraient quant à eux responsables de l'induction de l'allodynie mécanique (Tsuda *et al.*, 2000). La DHEA produite localement pourrait donc exercer une modulation différentielle sur ces deux types de sensations douloureuses. Elle pourrait d'une part potentialiser l'allodynie mécanique associée à la libération d'ATP consécutive à une lésion, et d'autre part inhiber l'hyperalgésie thermique associée à une inflammation chronique. Dans le cas de l'allodynie mécanique, les effets pro-nociceptifs de la DHEA pourraient être grandement augmentés par l'acidification du milieu extracellulaire consécutive à la libération de bradykinine et d'histamine (Wildman *et al.*, 1997). Cette hypothèse est corroborée par nos observations qui montrent que les effets potentialisateurs de la DHEA et du pH acide sur les réponses des récepteurs P2X incluant la sous-unité P2X₂ sont supra-additifs dans une sous-population de neurones (voir Résultats Chap. III.B.4)). Bien que la présence de récepteurs P2X₂ homomériques sur les terminaisons périphériques des neurones sensoriels primaires n'ait pas été démontrée, des données d'immunohistochimie indiquent que la sous-unité P2X₂ est présente dans les neurones de DRG de gros diamètre, neurones dans lesquels la sous-unité P2X₃ est apparemment absente (Vulchanova *et al.*, 1997; Bradbury *et al.*, 1998; Xiang *et al.*, 1998a; Novakovic *et al.*, 1999; Labrakakis *et al.*, 2000; Petruska *et al.*, 2000a). D'autre part, nos résultats suggèrent que les récepteurs P2X₂ homomériques participent à la réponse P2X dans les neurones du ganglion rachidien. Il est donc possible que ces récepteurs soient transportés le long de l'axone vers les terminaisons périphériques des fibres afférentes primaires de gros diamètre. Dans ce cas, la DHEA et la progestérone (qui agit plus efficacement, voir Résultats Chap. IV.B.1)) auraient pour effet d'augmenter l'intensité du message sensoriel. Classiquement, on considère que les corps cellulaires de gros diamètre correspondent à des fibres de type A β (origine cutanée) ou A α (origine musculaire) et que ces fibres véhiculent essentiellement des informations non nociceptives (tactiles et proprioceptives). Ceci est en partie faux car une sous-population de fibres A β /A α véhiculant

des informations nociceptives est clairement documentée (Lawson, 2002). Ces considérations suggèrent que les récepteurs P2X₂ et leur modulation pourraient jouer un rôle à la fois dans la sensibilité nociceptive et tactile/proprioceptive. La progestérone pourrait exercer un rôle plus spécifique en modulant sélectivement l'activité des fibres sensorielles exprimant les récepteurs P2X₂ homomériques. En tant que stéroïde endocrinien, elle exercerait son rôle excitateur sur les terminaisons périphériques uniquement chez la femelle, lors de la phase lutéale ou en pendant la parturition en fin de gestation, lorsque sa concentration plasmatique est maximale (Thibault & Levasseur, 2001). Il serait à ce titre intéressant d'étudier les variations de seuil à des stimulus tactiles et nociceptifs dans ces différentes situations physiologiques.

6.2 Corps cellulaire des DRG :

Le corps cellulaire des neurones du ganglion rachidien exprime les ARNm des sous-unités P2X₁₋₆ et la présence d'immunoréactivité (IR) pour ces 6 sous-unités a été détectée (Dunn *et al.*, 2001). Il faut néanmoins rappeler que les résultats d'expériences d'immunohistochimie sont à considérer avec précaution du fait du manque de spécificité des anticorps actuellement disponibles. D'après ces études, les sous-unités P2X₃ et P2X₂ semblent être les plus fortement exprimées.

Nos résultats confirment que les réponses P2X des récepteurs présents sur les corps cellulaires des neurones du ganglion rachidien sont dues aux récepteurs P2X₃ homomériques pour une sous-population de neurones (réponses de type R), et aux récepteurs P2X_{2/3} et P2X₂ pour une autre sous-population de neurones (réponses de type ND). Etant donné que la P450^{scc} est exprimée et est active au niveau des ganglions rachidiens (Patte-Mensah *et al.*, 2003), les neurostéroïdes pourraient jouer un rôle à ce niveau en modulant les réponses P2X, à condition que de l'ATP extracellulaire active ces récepteurs, ce qui ne semble pas être le cas en situation normale. Cependant, plusieurs études réalisées chez l'animal et chez l'humain ont montré que certaines douleurs neuropathiques étaient maintenues par l'activité des neurones du système sympathique. Dans ces circonstances pathologiques, les efférences sympathiques innervent les neurones sensoriels primaires en formant des arborisations en panier autour de leurs corps cellulaires (Ramer, 1999). Or certaines de ces fibres sympathiques co-libèrent de l'ATP avec la noradrénaline (Burnstock, 1995). Il est donc possible que l'ATP participe à ce couplage pathologique entre les fibres sympathiques et les neurones sensoriels primaires

(Hamilton & McMahon, 2000). Dans cette situation, il serait intéressant de déterminer quelles sous-populations de neurones sensoriels sont innervées par les fibres sympathiques. Si les neurones innervés expriment des récepteurs P2X₃ homomériques, la DHEA pourrait peut-être jouer un rôle inhibiteur sur la transmission des douleurs maintenues par le système sympathique. Si par contre les fibres sensorielles innervées expriment des récepteurs P2X_{2/3} ou P2X₂, la DHEA et la progestérone auraient un rôle facilitateur sur ce type de douleur.

6.3. Transmission du message sensoriel :

Etant donné que les concentrations de DHEA et de progestérone dans le système nerveux central sont relativement indépendantes de leurs concentrations circulantes, il est peu probable que, dans des conditions physiologiques, les stéroïdes endocrines contribuent de façon prédominante à la stimulation des récepteurs P2X situés sur les terminaisons centrales des neurones du ganglion rachidien et sur les neurones de second ordre de la corne dorsale superficielle.

Nous avons vu au paragraphe 6.2 que des neurostéroïdes peuvent être produits à l'endroit même où s'effectue la transmission du message nociceptif, dans les couches I et II de la corne dorsale de la moelle épinière.

Cette transmission s'effectue par une libération de glutamate, dans les couches superficielles pour les messages nociceptifs, et dans des couches plus profondes (lamina V) pour ce qui concerne les messages nociceptifs en provenance des fibres A δ et les messages non nociceptifs. Le glutamate va ensuite activer post-synaptiquement des récepteurs NMDA et AMPA situés sur les neurones de second ordre du système nerveux central. Sur les terminaisons présynaptiques des neurones sensoriels primaires, on trouve des récepteurs GABA_A (Malcangio & Bowery, 1996) et des récepteurs P2X (Chizh & Illes, 2001). Les récepteurs GABA_A lorsqu'ils sont activés vont inhiber la libération de glutamate, tandis que les récepteurs P2X vont potentialiser la libération de glutamate (Engelman & MacDermott, 2004), et donc *a priori* augmenter l'intensité du message. Ainsi, la transmission de l'information au niveau de cette synapse sensori-spinale est sous le contrôle d'une balance entre d'une part la composante inhibitrice GABAergique, et d'autre part la composante facilitatrice ATPergique. Nous pensons que c'est à ce niveau que certains neurostéroïdes pourraient être synthétisés et modifier l'équilibre de cette balance. Nos résultats ont en effet montré que les récepteurs GABA_A et P2X présents sur les neurones sensoriels primaires

pouvaient être modulés de façon différentielle par la DHEA, et que la modulation des récepteurs P2X dépendait de leur composition en sous-unités. De plus, l'ATP peut être co-libérée avec le GABA par une sous-population de neurones de la corne dorsale de la moelle épinière (Jo & Schlichter, 1999). D'autre part, l'ATP peut être libérée par les astrocytes *in vitro* (Wang *et al.*, 2000), et les astrocytes pourraient ainsi influencer la transmission et l'intégration des messages nociceptifs dans la corne dorsale. Par ailleurs, les astrocytes de la corne dorsale de la moelle épinière libèrent l'ATP de façon importante dans certaines conditions pathologiques, par exemple lors d'une ischémie (Evanko *et al.*, 2004).

Concernant les récepteurs GABA_A, le signe de cette modulation dépendra principalement du type de neurostéroïde produit. Dans le contexte de la synapse sensori-spinale évoquée plus haut, nos résultats nous permettent de penser que lorsque de l'alloprégnanolone serait produite, la transmission du message nociceptif serait inhibée plus fortement car l'activité des récepteurs GABA_A présynaptiques serait potentialisée. Par contre, lorsque du sulfate de prégnénolone, de la progestérone ou de la DHEA seraient produits, la transmission du message nociceptif serait inhibée moins fortement car l'activité des récepteurs GABA_A présynaptiques serait elle-même inhibée.

Concernant les récepteurs P2X, l'existence d'une modulation par les neurostéroïdes dépendrait bien sûr du type de neurostéroïde synthétisé, mais aussi du ou des type(s) de récepteur(s) P2X exprimé(s) aux terminaisons centrales des neurones du ganglion rachidien. En effet, nos résultats indiquent d'une part, en ce qui concerne la DHEA, que les récepteurs homomériques P2X₃ peuvent être inhibés par ce neurostéroïde, tandis que les récepteurs hétéromériques contenant la sous-unité P2X₂ et les récepteurs hétéromériques P2X_{2/3} peuvent être potentialisés par la DHEA. D'autre part, la progestérone potentialiserait uniquement l'activité des récepteurs homomériques P2X₂. Or des données immunocytochimiques indiquent que les récepteurs homomériques P2X₂ sont présents dans une partie des prolongements centraux des neurones non peptidergiques du ganglion rachidien qui se terminent dans la lamina II de la corne dorsale de la moelle épinière, tandis que les récepteurs homomériques P2X₃ sont présents dans une fraction des prolongements centraux des petits neurones du ganglion rachidien, au niveau d'une bande étroite de la lamina II interne (Vulchanova *et al.*, 1997). D'autre part, le degré de co-localisation entre les sous-unités P2X₂ et les sous-unités P2X₃ semble relativement faible dans les terminaisons centrales des afférences primaires aboutissant dans la lamina II, ce qui suggère que certaines terminaisons pourraient exprimer d'une façon dominante des récepteurs P2X₃ homomériques, d'autres des récepteurs P2X₂ homomériques, et finalement une dernière population exprimerait

principalement des récepteurs hétéromériques P2X_{2/3} (Vulchanova *et al.*, 1997). Ces résultats sont en partie confirmés par les expériences électrophysiologiques de Nakatsuka et coll. (2003) qui suggèrent que les neurones des couches superficielles de la corne dorsale de la moelle épinière reçoivent des entrées glutamatergiques de terminaisons exprimant des récepteurs P2X₃ ou P2X_{2/3} et des récepteurs TRP-V1. Les neurones de la lamina V recevraient quant à eux des entrées glutamatergiques de neurones de plus gros diamètre exprimant des récepteurs P2X_{2/3}, ainsi que des entrées glutamatergiques provenant de neurones de la couche II et exprimant des récepteurs P2X présynaptiques de type P2X_{4/6} ou bien d'un sous-type non décrit (Nakatsuka *et al.*, 2003). D'après nos résultats, les récepteurs P2X_{4/6} ne semblent modulés ni par la DHEA, ni par la progestérone. De plus, la P450scc semble absente dans la lamina V (Patte-Mensah *et al.*, 2003). Cette enzyme est en revanche exprimée dans la couche II, et la DHEA et la progestérone pourraient donc y être produites. Ces neurostéroïdes pourraient moduler l'activité des récepteurs P2X situés sur les afférences primaires, et donc la transmission glutamatergique sensori-spinale qui sous-tend le message nociceptif. Mais ils pourraient également agir sur les récepteurs GABA_A et P2X situés sur les interneurons de la couche II, notamment ceux parmi lesquels une co-transmission GABA/ATP a été décrite (Jo & Schlichter, 1999; Hugel & Schlichter, 2000).

Le caractère sélectif de la modulation des récepteurs P2X par la DHEA et la progestérone en fonction de leur composition en sous-unités permet de penser que ces neurostéroïdes pourraient être produits dans des états pathologiques précis, et ainsi moduler certains types de douleurs.

Conclusions & Perspectives :

Tout d'abord, ce travail de thèse a contribué à la caractérisation des récepteurs P2X natifs des neurones du ganglion rachidien. Nous avons également mis en évidence une modulation différentielle des récepteurs GABA_A et P2X par les neurostéroïdes. Dans ce cadre, nous montrons pour la première fois une modulation directe des récepteurs P2X par des neurostéroïdes.

Enfin, nos résultats indiquent que la modulation par les neurostéroïdes des récepteurs P2X dépend de leur composition en sous-unités : la DHEA semble pouvoir inhiber les récepteurs P2X₃ homomériques, et elle potentialise les récepteurs P2X incluant les sous-unité P2X₂. La progestérone, quant à elle, potentialise sélectivement les récepteurs P2X₂ homomériques.

Ce travail de thèse ouvre un certain nombre de perspectives, qui nous allons évoquer brièvement dans les paragraphes qui suivent.

- **Concernant la nociception :**

Nos résultats permettent de formuler l'hypothèse que des neurostéroïdes, produits localement dans la couche II de la corne dorsale de la moelle épinière, pourraient agir sur les composantes inhibitrice (GABAergique) et facilitatrice (ATPergique) de la balance contrôlant présynaptiquement la transmission glutamatergique entre les neurones sensoriels primaires et les neurones de la corne dorsale. Pour vérifier cela, il serait intéressant de réaliser des expériences sur des tranches de moelle épinière ayant conservé une partie des racines dorsales. Ceci permettrait de stimuler la racine dorsale et d'enregistrer les courants synaptiques des neurones de la couche II afin d'évaluer les effets de l'ATP et du GABA en présence ou en absence de neurostéroïdes, ou après stimulation de la neurostéroïdogénèse endogène (par stimulation du PBR par exemple) sur la transmission synaptique glutamatergique entre les afférences primaires et les interneurons de la corne dorsale.

Comme nous l'avons vu au §6.2, la P450_{scc} est exprimée dans les couches superficielles de la corne dorsale de la moelle épinière (qui transmettent l'information nociceptive), mais pas dans les couches plus profondes (Patte-Mensah *et al.*, 2003).

Concernant les récepteurs P2X, les neurones des couches I expriment uniquement les sous-unités P2X₄ et P2X₆ et les neurones des couches II expriment en plus la sous-unité P2X₂ (les ARNm des sous-unités P2X ne semblent pas être exprimés dans la couche III). La présence de la sous-unité P2X₂ indique que la DHEA, la progestérone, et peut-être la dihydroprogestérone pourraient potentialiser l'activité des récepteurs P2X des neurones de la couche II de la corne dorsale moelle épinière. Au cours de ce travail de thèse, nous avons obtenu quelques résultats préliminaires concernant la modulation par la DHEA des récepteurs P2X dans des cultures de neurones fraîchement dissociés de la corne dorsale superficielle de la moelle épinière. Nous avons effectivement observé une potentialisation des réponses à l'ATP dans ces neurones. De plus, la DHEA a fait apparaître un courant P2X dans des neurones ne répondant pas à l'application locale d'ATP (10 µM). Ces résultats préliminaires indiquent que ce neurostéroïde est susceptible d'intervenir dans le traitement de l'information nociceptive dans le réseau neuronal de la corne dorsale de la moelle épinière. Les travaux de Hugel suggèrent que les récepteurs P2X exprimés pré- et post-synaptiquement sur les neurones du réseau spinal de la corne dorsale superficielle pourraient exprimer la sous-unité P2X₂ (Hugel & Schlichter, 2000; Hugel, 2002). Nos résultats préliminaires obtenus avec la DHEA confirment cette hypothèse. La DHEA pourrait donc agir à ce niveau, et il serait intéressant de tester les effets de la progestérone et de la dihydroprogestérone sur les récepteurs P2X dans ces neurones afin de détecter la présence de récepteurs P2X₂ homomériques dans cette préparation, y compris au niveau synaptique. Les effets de ces neurostéroïdes sur le traitement de l'information nociceptive dans la couche II pourraient être complexes, du fait des effets différentiels de la DHEA et de la progestérone sur la composante excitatrice de la co-transmission mixte GABA/ATP entre les neurones des couches superficielles de la corne dorsale de la moelle épinière (Jo & Schlichter, 1999; Hugel & Schlichter, 2000). Des expériences menées en culture sur des paires isolées de neurones de la corne dorsale (Jo & Schlichter, 1999; Hugel & Schlichter, 2000) devraient permettre de clarifier ces points.

Il serait également intéressant de tester les effets des neurostéroïdes sur l'animal entier, dans des situations de douleurs connues pour être influencées par l'activation des récepteurs P2X (douleurs neuropathiques et douleurs inflammatoires au stade chronique). On pourrait tout d'abord étudier chez l'animal sain les seuils de sensibilité thermiques et mécaniques nociceptifs et non nociceptifs après injection d'ATP ou d' $\alpha\beta$ meATP dans la patte arrière avec ou sans co-injection de DHEA ou de progestérone, ou bien lors d'injections

intrathécales d'ATP ou d' $\alpha\beta$ meATP avec ou sans neurostéroïdes. Ces mêmes expériences pourraient être poursuivies sur des modèles animaux de neuropathie ou d'inflammation.

- **Concernant les autres rôles physiologiques des récepteurs P2X :**

Au cours de notre travail de thèse, nous nous sommes intéressés à l'implication des récepteurs P2X et des neurostéroïdes dans la nociception. Nous avons observé que, dans les neurones sensoriels primaires, la DHEA potentialisait sélectivement l'activité des récepteurs P2X incluant la sous-unité P2X₂, et que la progestérone potentialisait uniquement l'activité des récepteurs homomériques P2X₂. Or la sous-unité P2X₂ est très largement exprimée dans le système nerveux central (Norenberg & Illes, 2000), dans des structures où les enzymes de biosynthèse de la DHEA et de la progestérone (respectivement la P450c17 et la 3 β -HSD) sont parfois également exprimées (Compagnone & Mellon, 2000).

C'est le cas par exemple du bulbe olfactif, où les récepteurs P2X sont impliqués dans la réponse aux odeurs chez la souris (Hegg *et al.*, 2003), et où l'ARNm de la 3 β -HSD a été détecté. On peut alors imaginer que les neurostéroïdes, en agissant sur les récepteurs P2X, pourraient être impliqués dans des mécanismes comportementaux impliquant la reconnaissance des odeurs.

La sous-unité P2X₂ est également exprimée dans les régions CA1 et CA3 de l'hippocampe, où la 3 β -HSD est exprimée et active (Compagnone & Mellon, 2000). Or certains neurostéroïdes semblent être impliqués dans les mécanismes de la mémoire (Vallée *et al.*, 1997). Il est possible que certaines actions pro ou antimnésiantes décrites pour les neurostéroïdes impliquent la modulation des récepteurs P2X₂.

Il serait donc intéressant de vérifier les actions de la DHEA et de la progestérone dans les tissus exprimant leurs enzymes de synthèse, et exprimant également la sous-unité P2X₂. Ces études permettraient peut-être de mieux comprendre les actions des neurostéroïdes et le rôle de la sous-unité P2X₂ dans l'organisme.

- **Concernant l'utilité pharmacologique de nos résultats :**

Enfin, en raison de leur sélectivité pour certains sous-types de récepteurs P2X, la DHEA et la progestérone pourraient se révéler être des outils pharmacologiques utiles. La DHEA et la progestérone pourraient permettre l'identification sélective des récepteurs P2X₂ homo et hétéromériques dans différentes structures du système nerveux. D'autre part, la

progestérone, du fait de sa sélectivité étroite pour les récepteurs P2X₂ homomériques, pourrait se révéler un outil pharmacologique précieux pour mieux comprendre le rôle de ces récepteurs dans la détection et la transmission du message sensoriel, et éventuellement concernant d'autres fonctions physiologiques dans lesquelles ces récepteurs sont impliqués.

Références bibliographiques :

- Abbracchio, M. P., Boeynaems, J. M., Barnard, E. A., Boyer, J. L., Kennedy, C., Miras-Portugal, M. T., King, B. F., Gachet, C., Jacobson, K. A., Weisman, G. A. & Burnstock, G. (2003). Characterization of the UDP-glucose receptor (re-named here the P2Y₁₄ receptor) adds diversity to the P2Y receptor family. *Trends Pharmacol Sci* **24**, 52-55.
- Abbracchio, M. P. & Burnstock, G. (1994). Purinoceptors: are there families of P2X and P2Y purinoceptors? *Pharmacol Ther*, **64**, 445-475.
- Alexander, K., Niforatos, W., Bianchi, B., Burgard, E. C., Lynch, K. J., Kowaluk, E. A., Jarvis, M. F. & van Biesen, T. (1999). Allosteric modulation and accelerated resensitization of human P2X₃ receptors by cibacron blue. *J Pharmacol Exp Ther* **291**, 1135-1142.
- Allgaier, C., Wellmann, H., Schobert, A., Kurz, G. & von Kugelgen, I. (1995). Cultured chick sympathetic neurons: ATP-induced noradrenaline release and its blockade by nicotinic receptor antagonists. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* **352**, 25-30.
- Anderson, C. M., Xiong, W., Young, J. D., Cass, C. E. & Parkinson, F. E. (1996). Demonstration of the existence of mRNAs encoding N1/cif and N2/cit sodium/nucleoside cotransporters in rat brain. *Brain Res Mol Brain Res* **42**, 358-361.
- Andrew, D. & Craig, A. D. (2001). Spinothalamic lamina I neurons selectively sensitive to histamine: a central neural pathway for itch. *Nat Neurosci* **4**, 72-77.
- Bailey, A., Ledent, C., Kelly, M., Hourani, S. M. & Kitchen, I. (2002). Changes in spinal delta and kappa opioid systems in mice deficient in the A2A receptor gene. *J Neurosci* **22**, 9210-9220.
- Bailey, S. J. & Hourani, S. M. (1995). Effects of suramin on contractions of the guinea-pig vas deferens induced by analogues of adenosine 5'-triphosphate. *Br J Pharmacol* **114**, 1125-1132.
- Baldwin, S. A., Beal, P. R., Yao, S. Y., King, A. E., Cass, C. E. & Young, J. D. (2004). The equilibrative nucleoside transporter family, SLC29. *Pflügers Arch* **447**, 735-743.
- Baldwin, S. A., Mackey, J. R., Cass, C. E. & Young, J. D. (1999). Nucleoside transporters: molecular biology and implications for therapeutic development. *Mol Med Today* **5**, 216-224.
- Barclay, J., Patel, S., Dorn, G., Wotherspoon, G., Moffatt, S., Eunson, L., Abdel'al, S., Natt, F., Hall, J., Winter, J., Bevan, S., Wishart, W., Fox, A. & Ganju, P. (2002). Functional downregulation of P2X₃ receptor subunit in rat sensory neurons reveals a significant role in chronic neuropathic and inflammatory pain. *J Neurosci* **22**, 8139-8147.

- Bardoni, R., Goldstein, P. A., Lee, C. J., Gu, J. G. & MacDermott, A. B. (1997). ATP P2X receptors mediate fast synaptic transmission in the dorsal horn of the rat spinal cord. *J Neurosci* **17**, 5297-5304.
- Basbaum, A. I. & Jessell, T. M. (2000). In *Principles of Neurosciences*. ed. Jessell, T. M., pp. 472-491. McGraw-Hill, New York.
- Basbaum, A. I. & Woolf, C. J. (1999). Pain. *Curr Biol*, vol. **9**, R429-431.
- Baulieu, E. E. (1981). In *Steroid Hormone Regulation of the Brain*. ed. K. Fuxe, J. A. G., and L. Wetterberg. Pergamon, Oxford, UK.
- Baulieu, E. E. (1991). Neurosteroids: a new function in the brain. *Biol Cell* **71**, 3-10.
- Baulieu, E. E. (1997). Neurosteroids: of the nervous system, by the nervous system, for the nervous system. *Recent Prog Horm Res* **52**, 1-32.
- Baulieu, E. E. & Robel, P. (1996). Dehydroepiandrosterone and dehydroepiandrosterone sulfate as neuroactive neurosteroids. *J Endocrinol* **150** Suppl, S221-239.
- Bessou, P., Burgess, P. R., Perl, E. R. & Taylor, C. B. (1971). Dynamic properties of mechanoreceptors with unmyelinated (C) fibers. *J Neurophysiol*, **34**, pp. 116-131.
- Beukers, M. W., Kerkhof, C. J., van Rhee, M. A., Ardanuy, U., Gurgel, C., Widjaja, H., Nickel, P., AP, I. J. & Soudijn, W. (1995). Suramin analogs, divalent cations and ATP gamma S as inhibitors of ecto-ATPase. In *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*, **351**, 523-528.
- Bianchi, B. R., Lynch, K. J., Touma, E., Niforatos, W., Burgard, E. C., Alexander, K. M., Park, H. S., Yu, H., Metzger, R., Kowaluk, E., Jarvis, M. F. & van Biesen, T. (1999a). Pharmacological characterization of recombinant human and rat P2X receptor subtypes. *Eur J Pharmacol*, **376**, 127-138.
- Bianchi, B. R., Lynch, K. J., Touma, E., Niforatos, W., Burgard, E. C., Alexander, K. M., Park, H. S., Yu, H., Metzger, R., Kowaluk, E., Jarvis, M. F. & van Biesen, T. (1999b). Pharmacological characterization of recombinant human and rat P2X receptor subtypes. *Eur J Pharmacol* **376**, 127-138.
- Bland-Ward, P. A. & Humphrey, P. P. (1997). Acute nociception mediated by hindpaw P2X receptor activation in the rat. *Br J Pharmacol* **122**, 365-371.
- Bleehen, T., Hobbiger, F. & Keele, C. A. (1976). Identification of algogenic substances in human erythrocytes. *J Physiol* **262**, 131-149.
- Bleehen, T. & Keele, C. A. (1977). Observations on the algogenic actions of adenosine compounds on the human blister base preparation. *Pain* **3**, 367-377.
- Bo, X. & Burnstock, G. (1995). Characterization and autoradiographic localization of [3H] alpha, beta-methylene adenosine 5'-triphosphate binding sites in human urinary bladder. *Br J Urol* **76**, 297-302.

- Bo, X., Kim, M., Nori, S. L., Schoepfer, R., Burnstock, G. & North, R. A. (2003). Tissue distribution of P2X4 receptors studied with an ectodomain antibody. *Cell Tissue Res* **313**, 159-165.
- Bo, X., Zhang, Y., Nassar, M., Burnstock, G. & Schoepfer, R. (1995). A P2X purinoceptor cDNA conferring a novel pharmacological profile. *FEBS Lett* **375**, 129-133.
- Bogdanov, Y. D., Wildman, S. S., Clements, M. P., King, B. F. & Burnstock, G. (1998). Molecular cloning and characterization of rat P2Y4 nucleotide receptor. *Br J Pharmacol* **124**, 428-430.
- Boué-Grabot, E., Archambault, V. & Seguela, P. (2000). A protein kinase C site highly conserved in P2X subunits controls the desensitization kinetics of P2X(2) ATP-gated channels. *J Biol Chem* **275**, 10190-10195.
- Bowie, D., Feltz, P. & Schlichter, R. (1994). Subpopulations of neonatal rat sensory neurons express functional neurotransmitter receptors which elevate intracellular calcium. *Neuroscience* **58**, 141-149.
- Bradbury, E. J., Burnstock, G. & McMahon, S. B. (1998). The expression of P2X3 purinoreceptors in sensory neurons: effects of axotomy and glial-derived neurotrophic factor. *Mol Cell Neurosci* **12**, 256-268.
- Brake, A. J., Wagenbach, M. J. & Julius, D. (1994). New structural motif for ligand-gated ion channels defined by an ionotropic ATP receptor. *Nature* **371**, 519-523.
- Brandle, U., Kohler, K. & Wheeler-Schilling, T. H. (1998). Expression of the P2X7-receptor subunit in neurons of the rat retina. *Brain Res Mol Brain Res* **62**, 106-109.
- Brandle, U., Spielmanns, P., Osteroth, R., Sim, J., Surprenant, A., Buell, G., Ruppersberg, J. P., Plinkert, P. K., Zenner, H. P. & Glowatzki, E. (1997). Desensitization of the P2X(2) receptor controlled by alternative splicing. *FEBS Lett* **404**, 294-298.
- Briejer, M. R., Akkermans, L. M., Meulemans, A. L., Lefebvre, R. A. & Schuurkes, J. A. (1995). 5-HT-induced neurogenic relaxations of the guinea-pig proximal colon: investigation into the role of ATP and VIP in addition to nitric oxide. *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol* **351**, 126-135.
- Brot, M. D., Akwa, Y., Purdy, R. H., Koob, G. F. & Britton, K. T. (1997). The anxiolytic-like effects of the neurosteroid allopregnanolone: interactions with GABA(A) receptors. *Eur J Pharmacol* **325**, 1-7.
- Brown, S. G., Townsend-Nicholson, A., Jacobson, K. A., Burnstock, G. & King, B. F. (2002a). Heteromultimeric P2X(1/2) receptors show a novel sensitivity to extracellular pH. *J Pharmacol Exp Ther* **300**, 673-680.
- Buell, G., Collo, G. & Rassendren, F. (1996). P2X receptors: an emerging channel family. *Eur J Neurosci* **8**, 2221-2228.

- Burgard, E. C., Niforatos, W., van Biesen, T., Lynch, K. J., Kage, K. L., Touma, E., Kowaluk, E. A. & Jarvis, M. F. (2000). Competitive antagonism of recombinant P2X(2/3) receptors by 2', 3'-O-(2,4,6-trinitrophenyl) adenosine 5'-triphosphate (TNP-ATP). *Mol Pharmacol* **58**, 1502-1510.
- Burgard, E. C., Niforatos, W., van Biesen, T., Lynch, K. J., Touma, E., Metzger, R. E., Kowaluk, E. A. & Jarvis, M. F. (1999). P2X receptor-mediated ionic currents in dorsal root ganglion neurons. *J Neurophysiol* **82**, 1590-1598.
- Burgess, P. R. & Perl, E. R. (1967a). Myelinated afferent fibres responding specifically to noxious stimulation of the skin. *J Physiol*, **190**, 541-562.
- Burnstock, G. (1978). A basis for distinguishing two types of purinergic al P -purinoceptor in the rat portal vein with characteristics of the A - 1 2 receptor. In *Cell Membrane Receptors for Drugs rather than the A -subtype*. *Eur. J. Pharmacol.* **100**, 363–368. *1 and Hormones: A Multidisciplinary Approach*. ed. Straub, R. W., pp. 107–118. Raven Press,, New Kennedy, C., Burnstock, G., 1985. Evidence for two types of P - 2 York.
- Burnstock, G. (1995). Noradrenaline and ATP: cotransmitters and neuromodulators. *J Physiol Pharmacol* **46**, 365-384.
- Burnstock, G. (1996). A unifying purinergic hypothesis for the initiation of pain. *Lancet* **347**, 1604-1605.
- Burnstock, G. (1997). The past, present and future of purine nucleotides as signalling molecules. *Neuropharmacology* **36**, 1127-1139.
- Burnstock, G. (2001). Purine-mediated signalling in pain and visceral perception. *Trends Pharmacol Sci* **22**, 182-188.
- Carlton, S. M., Zhou, S. & Coggeshall, R. E. (1999). Peripheral GABA(A) receptors: evidence for peripheral primary afferent depolarization. *Neuroscience* **93**, 713-722.
- Carruthers, A. M., Sellers, L. A., Jenkins, D. W., Jarvie, E. M., Feniuk, W. & Humphrey, P. P. (2001). Adenosine A(1) receptor-mediated inhibition of protein kinase A-induced calcitonin gene-related peptide release from rat trigeminal neurons. *Mol Pharmacol* **59**, 1533-1541.
- Cassada, D. C., Gangemi, J. J., Rieger, J. M., Linden, J., Kaza, A. K., Long, S. M., Kron, I. L., Tribble, C. G. & Kern, J. A. (2001a). Systemic adenosine A2A agonist ameliorates ischemic reperfusion injury in the rabbit spinal cord. *Ann Thorac Surg* **72**, 1245-1250.
- Cassada, D. C., Tribble, C. G., Laubach, V. E., Nguyen, B. N., Rieger, J. M., Linden, J., Kaza, A. K., Long, S. M., Kron, I. L. & Kern, J. A. (2001b). An adenosine A2A agonist, ATL-146e, reduces paralysis and apoptosis during rabbit spinal cord reperfusion. *J Vasc Surg* **34**, 482-488.
- Cassada, D. C., Tribble, C. G., Long, S. M., Kaza, A. K., Linden, J., Rieger, J. M., Rosin, D., Kron, I. L. & Kern, J. A. (2002). Adenosine A2A agonist reduces paralysis after spinal

- cord ischemia: correlation with A2A receptor expression on motor neurons. *Ann Thorac Surg* **74**, 846-849; discussion 849-850.
- Caterina, M. J., Leffler, A., Malmberg, A. B., Martin, W. J., Trafton, J., Petersen-Zeitz, K. R., Koltzenburg, M., Basbaum, A. I. & Julius, D. (2000). Impaired nociception and pain sensation in mice lacking the capsaicin receptor. *Science*, **288**, 306-313.
- Caterina, M. J., Rosen, T. A., Tominaga, M., Brake, A. J. & Julius, D. (1999). A capsaicin-receptor homologue with a high threshold for noxious heat. *Nature*, **398**, 436-441.
- Caterina, M. J., Schumacher, M. A., Tominaga, M., Rosen, T. A., Levine, J. D. & Julius, D. (1997). The capsaicin receptor: a heat-activated ion channel in the pain pathway. *Nature* **389**, 816-824.
- Cervero, F. (1995). Visceral pain: mechanisms of peripheral and central sensitization. *Ann Med* **27**, 235-239.
- Cervero, F., Meyer, R. A. & Campbell, J. N. (1994). A psychophysical study of secondary hyperalgesia: evidence for increased pain to input from nociceptors. *Pain* **58**, 21-28.
- Cesare, P. & McNaughton, P. (1996). A novel heat-activated current in nociceptive neurons and its sensitization by bradykinin. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 15435-15439.
- Chang, K., Hanaoka, K., Kumada, M. & Takuwa, Y. (1995). Molecular cloning and functional analysis of a novel P2 nucleotide receptor. *J Biol Chem* **270**, 26152-26158.
- Chaumont, S., Jiang, L. H., Penna, A., North, R. A. & Rassendren, F. (2004). Identification of a trafficking motif involved in the stabilization and polarization of P2X receptors. *J Biol Chem* **279**, 29628-29638.
- Chen, B. C., Lee, C. M. & Lin, W. W. (1996). Inhibition of ecto-ATPase by PPADS, suramin and reactive blue in endothelial cells, C6 glioma cells and RAW 264.7 macrophages. *Br J Pharmacol* **119**, 1628-1634.
- Chen, B. C. & Lin, W. W. (1997). Inhibition of ecto-ATPase by the P2 purinoceptor agonists, ATPgammaS, alpha,beta-methylene-ATP, and AMP-PNP, in endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* **233**, 442-446.
- Chen, C., Parker, M. S., Barnes, A. P., Deininger, P. & Bobbin, R. P. (2000). Functional expression of three P2X(2) receptor splice variants from guinea pig cochlea. In *J Neurophysiol*, **83**, 1502-1509.
- Chen, C. C., Akopian, A. N., Sivilotti, L., Colquhoun, D., Burnstock, G. & Wood, J. N. (1995a). A P2X purinoceptor expressed by a subset of sensory neurons. *Nature* **377**, 428-431.
- Chen, J. F., Huang, Z., Ma, J., Zhu, J., Moratalla, R., Standaert, D., Moskowitz, M. A., Fink, J. S. & Schwarzschild, M. A. (1999). A(2A) adenosine receptor deficiency attenuates brain injury induced by transient focal ischemia in mice. *J Neurosci* **19**, 9192-9200.

- Chen, Z. P., Levy, A. & Lightman, S. L. (1995b). Nucleotides as extracellular signalling molecules. *J Neuroendocrinol* **7**, 83-96.
- Chessell, I. P., Simon, J., Hibell, A. D., Michel, A. D., Barnard, E. A. & Humphrey, P. P. (1998). Cloning and functional characterisation of the mouse P2X7 receptor. *FEBS Lett* **439**, 26-30.
- Chizh, B. A., Cumberbatch, M. J., Birch, P. J. & Headley, P. M. (1995). Endogenous modulation of excitatory amino acid responsiveness by tachykinin NK1 and NK2 receptors in the rat spinal cord. *Br J Pharmacol* **115**, 1013-1019.
- Chizh, B. A. & Illes, P. (2001). P2X receptors and nociception. *Pharmacol Rev* **53**, 553-568.
- Choca, J. I., Green, R. D. & Proudfit, H. K. (1988). Adenosine A1 and A2 receptors of the substantia gelatinosa are located predominantly on intrinsic neurons: an autoradiography study. *J Pharmacol Exp Ther* **247**, 757-764.
- Chu, C. J., Huang, S. M., De Petrocellis, L., Bisogno, T., Ewing, S. A., Miller, J. D., Zipkin, R. E., Daddario, N., Appendino, G., Di Marzo, V. & Walker, J. M. (2003). N-oleoyldopamine, a novel endogenous capsaicin-like lipid that produces hyperalgesia. *J Biol Chem* **278**, 13633-13639.
- Chuang, H. H., Prescott, E. D., Kong, H., Shields, S., Jordt, S. E., Basbaum, A. I., Chao, M. V. & Julius, D. (2001). Bradykinin and nerve growth factor release the capsaicin receptor from PtdIns(4,5)P2-mediated inhibition. *Nature* **411**, 957-962.
- Clark, D., Hugues, J. & Gasser, H. S. (1935). Afferent function in the group of nerve fibres of slowest conduction velocity. *American Journal of Physiology* **114**, 69-76.
- Cockayne, D. A., Hamilton, S. G., Zhu, Q. M., Dunn, P. M., Zhong, Y., Novakovic, S., Malmberg, A. B., Cain, G., Berson, A., Kassotakis, L., Hedley, L., Lachnit, W. G., Burnstock, G., McMahon, S. B. & Ford, A. P. (2000). Urinary bladder hyporeflexia and reduced pain-related behaviour in P2X3-deficient mice. *Nature* **407**, 1011-1015.
- Collo, G., North, R. A., Kawashima, E., Merlo-Pich, E., Neidhart, S., Surprenant, A. & Buell, G. (1996). Cloning of P2X5 and P2X6 receptors and the distribution and properties of an extended family of ATP-gated ion channels. *J Neurosci* **16**, 2495-2507.
- Colomar, A. & Amedee, T. (2001). ATP stimulation of P2X(7) receptors activates three different ionic conductances on cultured mouse Schwann cells. *Eur J Neurosci* **14**, 927-936.
- Communi, D., Robaye, B. & Boeynaems, J. M. (1999). Pharmacological characterization of the human P2Y11 receptor. *Br J Pharmacol* **128**, 1199-1206.
- Compagnone, N. A. & Mellon, S. H. (2000). Neurosteroids: biosynthesis and function of these novel neuromodulators. *Front Neuroendocrinol* **21**, 1-56.

- Cook, S. P. & McCleskey, E. W. (1997). Desensitization, recovery and Ca²⁺-dependent modulation of ATP-gated P2X receptors in nociceptors. *Neuropharmacology* **36**, 1303-1308.
- Cook, S. P. & McCleskey, E. W. (2002). Cell damage excites nociceptors through release of cytosolic ATP. *Pain* **95**, 41-47.
- Cook, S. P., Vulchanova, L., Hargreaves, K. M., Elde, R. & McCleskey, E. W. (1997). Distinct ATP receptors on pain-sensing and stretch-sensing neurons. *Nature* **387**, 505-508.
- Coutts, A. A., Jorizzo, J. L., Eady, R. A., Greaves, M. W. & Burnstock, G. (1981). Adenosine triphosphate-evoked vascular changes in human skin: mechanism of action. *Eur J Pharmacol* **76**, 391-401.
- Crack, B. E., Beukers, M. W., McKechnie, K. C., Ijzerman, A. P. & Leff, P. (1994). Pharmacological analysis of ecto-ATPase inhibition: evidence for combined enzyme inhibition and receptor antagonism in P2X-purinoceptor ligands. *Br J Pharmacol* **113**, 1432-1438.
- Cully, D. F., Vassilatis, D. K., Liu, K. K., Paress, P. S., Van der Ploeg, L. H., Schaeffer, J. M. & Arena, J. P. (1994). Cloning of an avermectin-sensitive glutamate-gated chloride channel from *Caenorhabditis elegans*. *Nature* **371**, 707-711.
- Cusack, N. J. & Hourani, S. M. (1984). Some pharmacological and biochemical interactions of the enantiomers of adenylyl 5'-(beta, gamma-methylene)-diphosphonate with the guinea-pig urinary bladder. *Br J Pharmacol* **82**, 155-159.
- Dai, Y., Moriyama, T., Higashi, T., Togashi, K., Kobayashi, K., Yamanaka, H., Tominaga, M. & Noguchi, K. (2004). Proteinase-activated receptor 2-mediated potentiation of transient receptor potential vanilloid subfamily 1 activity reveals a mechanism for proteinase-induced inflammatory pain. *J Neurosci* **24**, 4293-4299.
- Damer, S., Niebel, B., Czeche, S., Nickel, P., Ardanuy, U., Schmalzing, G., Rettinger, J., Mutschler, E. & Lambrecht, G. (1998). NF279: a novel potent and selective antagonist of P2X receptor-mediated responses. *Eur J Pharmacol* **350**, R5-6.
- Davies, D. L., Machu, T. K., Guo, Y. & Alkana, R. L. (2002). Ethanol sensitivity in ATP-gated P2X receptors is subunit dependent. *Alcohol Clin Exp Res* **26**, 773-778.
- Davis, J. B., Gray, J., Gunthorpe, M. J., Hatcher, J. P., Davey, P. T., Overend, P., Harries, M. H., Latcham, J., Clapham, C., Atkinson, K., Hughes, S. A., Rance, K., Grau, E., Harper, A. J., Pugh, P. L., Rogers, D. C., Bingham, S., Randall, A. & Sheardown, S. A. (2000). Vanilloid receptor-1 is essential for inflammatory thermal hyperalgesia. *Nature*, **405**, 183-187.
- De Groat, W. C. (1986). Spinal cord projections and neuropeptides in visceral afferent neurons. *Prog Brain Res*, **67**, 165-187.

- Dell'Antonio, G., Quattrini, A., Cin, E. D., Fulgenzi, A. & Ferrero, M. E. (2002a). Relief of inflammatory pain in rats by local use of the selective P2X7 ATP receptor inhibitor, oxidized ATP. *Arthritis Rheum* **46**, 3378-3385.
- Dell'Antonio, G., Quattrini, A., Dal Cin, E., Fulgenzi, A. & Ferrero, M. E. (2002b). Antinociceptive effect of a new P(2Z)/P2X7 antagonist, oxidized ATP, in arthritic rats. *Neurosci Lett* **327**, 87-90.
- Delany, N. S., Hurle, M., Facer, P., Alnadaf, T., Plumpton, C., Kinghorn, I., See, C. G., Costigan, M., Anand, P., Woolf, C. J., Crowther, D., Sanseau, P. & Tate, S. N. (2001). Identification and characterization of a novel human vanilloid receptor-like protein, VRL-2. *Physiol Genomics* **4**, 165-174.
- Dirajlal, S., Pauers, L. E. & Stucky, C. L. (2003). Differential response properties of IB(4)-positive and -negative unmyelinated sensory neurons to protons and capsaicin. *J Neurophysiol* **89**, 513-524.
- Djoughri, L., Bleazard, L. & Lawson, S. N. (1998). Association of somatic action potential shape with sensory receptive properties in guinea-pig dorsal root ganglion neurones. *J Physiol*, **513** (3), 857-872.
- Dowd, E., McQueen, D. S., Chessell, I. P. & Humphrey, P. P. (1998). P2X receptor-mediated excitation of nociceptive afferents in the normal and arthritic rat knee joint. *Br J Pharmacol* **125**, 341-346.
- Driscoll, M. & Chalfie, M. (1991). The mec-4 gene is a member of a family of *Caenorhabditis elegans* genes that can mutate to induce neuronal degeneration. *Nature*, **349**, 588-593.
- Drury, A. N. & Szent-Gyorgi, A. (1929). The physiological activity of adenine compounds with special reference to their action upon the mammalian heart. *J. Physiol.*, **68**, 213-237.
- Dubyak, G. R. (2003). Knock-out mice reveal tissue-specific roles of P2Y receptor subtypes in different epithelia. *Mol Pharmacol* **63**, 773-776.
- Dunn, P. M., Zhong, Y. & Burnstock, G. (2001). P2X receptors in peripheral neurons. *Prog Neurobiol* **65**, 107-134.
- Egan, T. M., Haines, W. R. & Voigt, M. M. (1998). A domain contributing to the ion channel of ATP-gated P2X2 receptors identified by the substituted cysteine accessibility method. *J Neurosci* **18**, 2350-2359.
- Egan, T. M. & Khakh, B. S. (2004). Contribution of calcium ions to P2X channel responses. *J Neurosci* **24**, 3413-3420.
- Eltze, M. & Ullrich, B. (1996). Characterization of vascular P2 purinoceptors in the rat isolated perfused kidney. *Eur J Pharmacol* **306**, 139-152.
- Engelman, H. S. & MacDermott, A. B. (2004). Presynaptic ionotropic receptors and control of transmitter release. *Nat Rev Neurosci* **5**, 135-145.

- Ennion, S., Hagan, S. & Evans, R. J. (2000). The role of positively charged amino acids in ATP recognition by human P2X(1) receptors. *J Biol Chem* **275**, 29361-29367.
- Evanko, D. S., Zhang, Q., Zorec, R. & Haydon, P. G. (2004). Defining pathways of loss and secretion of chemical messengers from astrocytes. *Glia* **47**, 233-240.
- Evans, R. J., Lewis, C., Buell, G., Valera, S., North, R. A. & Surprenant, A. (1995). Pharmacological characterization of heterologously expressed ATP-gated cation channels (P2x purinoceptors). *Mol Pharmacol* **48**, 178-183.
- Evans, R. J., Lewis, C., Virginio, C., Lundstrom, K., Buell, G., Surprenant, A. & North, R. A. (1996). Ionic permeability of, and divalent cation effects on, two ATP-gated cation channels (P2X receptors) expressed in mammalian cells. *J Physiol* **497** (2), 413-422.
- Fedorova, I. M., Jacobson, M. A., Basile, A. & Jacobson, K. A. (2003). Behavioral characterization of mice lacking the A3 adenosine receptor: sensitivity to hypoxic neurodegeneration. *Cell Mol Neurobiol* **23**, 431-447.
- Fenwick, E. M., Marty, A. & Neher, E. (1982). A patch-clamp study of bovine chromaffin cells and of their sensitivity to acetylcholine. *J Physiol* **331**, 577-597.
- Fischer, B., Yefidoff, R., Major, D. T., Rutman-Halili, I., Shneyvays, V., Zinman, T., Jacobson, K. A. & Shainberg, A. (1999). Characterization of "mini-nucleotides" as P2X receptor agonists in rat cardiomyocyte cultures. An integrated synthetic, biochemical, and theoretical study. *J Med Chem*, **42**, 2685-2696.
- Fiske, C. H. & SubbaRow, Y. (1929). Phosphorus compounds of muscle and the guinea-pig vas deferens. *Eur. J. Pharmacol.* **92**, 161-163.
- Frank, C. & Sagratella, S. (2000). Neuroprotective effects of allopregnenolone on hippocampal irreversible neurotoxicity in vitro. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* **24**, 1117-1126.
- Fredholm, B. B., AP, I. J., Jacobson, K. A., Klotz, K. N. & Linden, J. (2001). International Union of Pharmacology. XXV. Nomenclature and classification of adenosine receptors. *Pharmacol Rev* **53**, 527-552.
- Frye, C. A. & Duncan, J. E. (1994). Progesterone metabolites, effective at the GABAA receptor complex, attenuate pain sensitivity in rats. *Brain Res* **643**, 194-203.
- Fyffe, R. E. & Perl, E. R. (1984). Is ATP a central synaptic mediator for certain primary afferent fibers from mammalian skin? *Proc Natl Acad Sci U S A* **81**, 6890-6893.
- Garcia-Anoveros, J., Samad, T. A., Zuvella-Jelaska, L., Woolf, C. J. & Corey, D. P. (2001). Transport and localization of the DEG/ENaC ion channel BNaC1alpha to peripheral mechanosensory terminals of dorsal root ganglia neurons. *J Neurosci*, **21**, 2678-2686.

- Garcia-Guzman, M., Soto, F., Gomez-Hernandez, J. M., Lund, P. E. & Stuhmer, W. (1997). Characterization of recombinant human P2X4 receptor reveals pharmacological differences to the rat homologue. *Mol Pharmacol* **51**, 109-118.
- Garcia-Guzman, M., Soto, F., Laube, B. & Stuhmer, W. (1996). Molecular cloning and functional expression of a novel rat heart P2X purinoceptor. *FEBS Lett* **388**, 123-127.
- Gebhart, G. F. (1996). Visceral polymodal receptors. *Prog Brain Res*, **113**, 101-112.
- Geiger, J. D., LaBella, F. S. & Nagy, J. I. (1984). Characterization and localization of adenosine receptors in rat spinal cord. *J Neurosci* **4**, 2303-2310.
- Goodchild, C. S., Guo, Z. & Nadeson, R. (2000). Antinociceptive properties of neurosteroids I. Spinally-mediated antinociceptive effects of water-soluble aminosteroids. *Pain* **88**, 23-29.
- Goodchild, C. S., Robinson, A. & Nadeson, R. (2001). Antinociceptive properties of neurosteroids IV: pilot study demonstrating the analgesic effects of alphadolone administered orally to humans. *Br J Anaesth* **86**, 528-534.
- Grubb, B. D. & Evans, R. J. (1999). Characterization of cultured dorsal root ganglion neuron P2X receptors. *Eur J Neurosci* **11**, 149-154.
- Gu, J. G. & MacDermott, A. B. (1997). Activation of ATP P2X receptors elicits glutamate release from sensory neuron synapses. *Nature* **389**, 749-753.
- Guillemette, C., Hum, D. W. & Belanger, A. (1996). Levels of plasma C19 steroids and 5 alpha-reduced C19 steroid glucuronides in primates, rodents, and domestic animals. *Am J Physiol* **271**, E348-353.
- Guler, A. D., Lee, H., Iida, T., Shimizu, I., Tominaga, M. & Caterina, M. (2002). Heat-evoked activation of the ion channel, TRPV4. *J Neurosci* **22**, 6408-6414.
- Guo, A., Vulchanova, L., Wang, J., Li, X. & Elde, R. (1999). Immunocytochemical localization of the vanilloid receptor 1 (VR1): relationship to neuropeptides, the P2X3 purinoceptor and IB4 binding sites. *Eur J Neurosci* **11**, 946-958.
- Guth, L., Zhang, Z. & Roberts, E. (1994). Key role for pregnenolone in combination therapy that promotes recovery after spinal cord injury. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**, 12308-12312.
- Haines, W. R., Torres, G. E., Voigt, M. M. & Egan, T. M. (1999). Properties of the novel ATP-gated ionotropic receptor composed of the P2X(1) and P2X(5) isoforms. *Mol Pharmacol* **56**, 720-727.
- Hamel, E., Lin, C. M., Flynn, E. & D'Amato, R. J. (1996). Interactions of 2-methoxyestradiol, an endogenous mammalian metabolite, with unpolymerized tubulin and with tubulin polymers. *Biochemistry* **35**, 1304-1310.

- Hamill, O. P., Marty, A., Neher, E., Sakmann, B. & Sigworth, F. J. (1981). Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches. *Pflugers Arch* **391**, 85-100.
- Hamilton, S. G. & McMahon, S. B. (2000). ATP as a peripheral mediator of pain. *J Auton Nerv Syst* **81**, 187-194.
- Hamilton, S. G., Warburton, J., Bhattacharjee, A., Ward, J. & McMahon, S. B. (2000). ATP in human skin elicits a dose-related pain response which is potentiated under conditions of hyperalgesia. *Brain* **123** (6), 1238-1246.
- Handwerker, H. O. & Kobal, G. (1993). Psychophysiology of experimentally induced pain. *Physiol Rev*, **73**, 639-671.
- Hegg, C. C., Greenwood, D., Huang, W., Han, P. & Lucero, M. T. (2003). Activation of purinergic receptor subtypes modulates odor sensitivity. *J Neurosci* **23**, 8291-8301.
- Hodge, C. W., Raber, J., McMahon, T., Walter, H., Sanchez-Perez, A. M., Olive, M. F., Mehmert, K., Morrow, A. L. & Messing, R. O. (2002). Decreased anxiety-like behavior, reduced stress hormones, and neurosteroid supersensitivity in mice lacking protein kinase Cepsilon. *J Clin Invest* **110**, 1003-1010.
- Hökfelt, T., Zhang, X. & Wiesenfeld-Hallin, Z. (1994). Messenger plasticity in primary sensory neurons following axotomy and its functional implications. *Trends Neurosci*, **17**, 22-30.
- Hollopeter, G., Jantzen, H. M., Vincent, D., Li, G., England, L., Ramakrishnan, V., Yang, R. B., Nurden, P., Nurden, A., Julius, D. & Conley, P. B. (2001). Identification of the platelet ADP receptor targeted by antithrombotic drugs. *Nature* **409**, 202-207.
- Honore, P., Kage, K., Mikusa, J., Watt, A. T., Johnston, J. F., Wyatt, J. R., Faltynek, C. R., Jarvis, M. F. & Lynch, K. (2002a). Analgesic profile of intrathecal P2X₃ antisense oligonucleotide treatment in chronic inflammatory and neuropathic pain states in rats. *Pain* **99**, 11-19.
- Honore, P., Mikusa, J., Bianchi, B., McDonald, H., Cartmell, J., Faltynek, C. & Jarvis, M. F. (2002b). TNP-ATP, a potent P2X₃ receptor antagonist, blocks acetic acid-induced abdominal constriction in mice: comparison with reference analgesics. *Pain* **96**, 99-105.
- Horn, R. & Marty, A. (1988). Muscarinic activation of ionic currents measured by a new whole-cell recording method. *J Gen Physiol* **92**, 145-159.
- Hornsby, P. J. (1997). DHEA: a biologist's perspective. *J Am Geriatr Soc* **45**, 1395-1401.
- Hugel, S. (2002). Etude des propriétés fonctionnelles des récepteurs P2X et de la modulation de la co-transmission mixte GABA/ATP dans les neurones des couches superficielles de la corne dorsale de la moelle épinière de rat, Thèse de l'Université Louis Pasteur, Strasbourg.

- Hugel, S. & Schlichter, R. (2000). Presynaptic P2X receptors facilitate inhibitory GABAergic transmission between cultured rat spinal cord dorsal horn neurons. *J Neurosci* **20**, 2121-2130.
- Hwang, S. J. & Valtschanoff, J. G. (2003). Vanilloid receptor VR1-positive afferents are distributed differently at different levels of the rat lumbar spinal cord. *Neurosci Lett* **349**, 41-44.
- Illes, P. & Alexandre Ribeiro, J. (2004). Molecular physiology of P2 receptors in the central nervous system. *Eur J Pharmacol* **483**, 5-17.
- Irnich, D., Tracey, D. J., Polten, J., Burgstahler, R. & Grafe, P. (2002). ATP stimulates peripheral axons in human, rat and mouse--differential involvement of A(2B) adenosine and P2X purinergic receptors. *Neuroscience* **110**, 123-129.
- Inoue, K., Tsuda, M. & Koizumi, S. (2004). ATP- and adenosine-mediated signaling in the central nervous system: chronic pain and microglia: involvement of the ATP receptor P2X4. *J Pharmacol Sci* **94**, 112-114.
- Jacobson, K., Kim, Y., Camaioni, E. & Rhee, A. v. (1998). Structure activity relationships of P2 receptor agonists and antagonists. In *The P2 nucleotide receptors*. ed. Turner JT, W. G., Fedan JS, pp. 81-107. Humana, Totowa.
- Jahr, C. E. & Jessell, T. M. (1983). ATP excites a subpopulation of rat dorsal horn neurones. *Nature* **304**, 730-733.
- Jarvis, M. F., Burgard, E. C., McGaraughty, S., Honore, P., Lynch, K., Brennan, T. J., Subieta, A., Van Biesen, T., Cartmell, J., Bianchi, B., Niforatos, W., Kage, K., Yu, H., Mikusa, J., Wismer, C. T., Zhu, C. Z., Chu, K., Lee, C. H., Stewart, A. O., Polakowski, J., Cox, B. F., Kowaluk, E., Williams, M., Sullivan, J. & Faltynek, C. (2002). A-317491, a novel potent and selective non-nucleotide antagonist of P2X3 and P2X2/3 receptors, reduces chronic inflammatory and neuropathic pain in the rat. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 17179-17184.
- Jarvis, M. F., Wismer, C. T., Schweitzer, E., Yu, H., van Biesen, T., Lynch, K. J., Burgard, E. C. & Kowaluk, E. A. (2001). Modulation of BzATP and formalin induced nociception: attenuation by the P2X receptor antagonist, TNP-ATP and enhancement by the P2X(3) allosteric modulator, cibacron blue. *Br J Pharmacol* **132**, 259-269.
- Jiang, L. H., Kim, M., Spelta, V., Bo, X., Surprenant, A. & North, R. A. (2003). Subunit arrangement in P2X receptors. *J Neurosci* **23**, 8903-8910.
- Jiang, L. H., Mackenzie, A. B., North, R. A. & Surprenant, A. (2000a). Brilliant blue G selectively blocks ATP-gated rat P2X(7) receptors. *Mol Pharmacol* **58**, 82-88.
- Jiang, L. H., Rassendren, F., Surprenant, A. & North, R. A. (2000b). Identification of amino acid residues contributing to the ATP-binding site of a purinergic P2X receptor. *J Biol Chem* **275**, 34190-34196.

- Jo, Y. H. & Schlichter, R. (1999). Synaptic corelease of ATP and GABA in cultured spinal neurons. *Nat Neurosci* **2**, 241-245.
- Johansson, B., Halldner, L., Dunwiddie, T. V., Masino, S. A., Poelchen, W., Gimenez-Llort, L., Escorihuela, R. M., Fernandez-Teruel, A., Wiesenfeld-Hallin, Z., Xu, X. J., Hardemark, A., Betsholtz, C., Herlenius, E. & Fredholm, B. B. (2001). Hyperalgesia, anxiety, and decreased hypoxic neuroprotection in mice lacking the adenosine A1 receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 9407-9412.
- Jones, C. A., Chessell, I. P., Simon, J., Barnard, E. A., Miller, K. J., Michel, A. D. & Humphrey, P. P. (2000). Functional characterization of the P2X(4) receptor orthologues. *Br J Pharmacol* **129**, 388-394.
- Julius, D. & Basbaum, A. I. (2001). Molecular mechanisms of nociception. *Nature* **413**, 203-210.
- Kaelin-Lang, A., Lauterburg, T. & Burgunder, J. M. (1998). Expression of adenosine A2a receptor gene in rat dorsal root and autonomic ganglia. *Neurosci Lett* **246**, 21-24.
- Karchewski, L. A., Bloechlinger, S. & Woolf, C. J. (2004). Axonal injury-dependent induction of the peripheral benzodiazepine receptor in small-diameter adult rat primary sensory neurons. *Eur J Neurosci* **20**, 671-683.
- Keller, A. F., 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. *J Neurosci* **24**, 907-915.
- Kennedy, C., Assis, T. S., Currie, A. J. & Rowan, E. G. (2003). Crossing the pain barrier: P2 receptors as targets for novel analgesics. *J Physiol* **553**, 683-694.
- Khakh, B. S. (2001). Molecular physiology of P2X receptors and ATP signalling at synapses. *Nat Rev Neurosci* **2**, 165-174.
- Khakh, B. S., Bao, X. R., Labarca, C. & Lester, H. A. (1999a). Neuronal P2X transmitter-gated cation channels change their ion selectivity in seconds. *Nat Neurosci* **2**, 322-330.
- Khakh, B. S., Burnstock, G., Kennedy, C., King, B. F., North, R. A., Seguela, P., Voigt, M. & Humphrey, P. P. (2001). International union of pharmacology. XXIV. Current status of the nomenclature and properties of P2X receptors and their subunits. *Pharmacol Rev* **53**, 107-118.
- Khakh, B. S., Proctor, W. R., Dunwiddie, T. V., Labarca, C. & Lester, H. A. (1999b). Allosteric control of gating and kinetics at P2X(4) receptor channels. *J Neurosci* **19**, 7289-7299.
- Khandwala, H., Zhang, Z. & Loomis, C. W. (1998). Inhibition of strychnine-allodynia is mediated by spinal adenosine A1- but not A2-receptors in the rat. *Brain Res* **808**, 106-109.

- Kidd, E. J., Grahames, C. B., Simon, J., Michel, A. D., Barnard, E. A. & Humphrey, P. P. (1995). Localization of P2X purinoceptor transcripts in the rat nervous system. *Mol Pharmacol* **48**, 569-573.
- Kim, C., Chung, J. M. & Chung, K. (2003). Changes in the gene expression of six subtypes of P2X receptors in rat dorsal root ganglion after spinal nerve ligation. *Neurosci Lett* **337**, 81-84.
- Kimonides, V. G., Khatibi, N. H., Svendsen, C. N., Sofroniew, M. V. & Herbert, J. (1998). Dehydroepiandrosterone (DHEA) and DHEA-sulfate (DHEAS) protect hippocampal neurons against excitatory amino acid-induced neurotoxicity. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 1852-1857.
- King, B. F., Liu, M., Pintor, J., Gualix, J., Miras-Portugal, M. T. & Burnstock, G. (1999). Diinosine pentaphosphate (IP5I) is a potent antagonist at recombinant rat P2X1 receptors. *Br J Pharmacol*, **128**, 981-988.
- King, B. F., Townsend-Nicholson, A., Wildman, S. S., Thomas, T., Spyer, K. M. & Burnstock, G. (2000). Coexpression of rat P2X2 and P2X6 subunits in Xenopus oocytes. *J Neurosci* **20**, 4871-4877.
- Kirschstein, T., Greffrath, W., Busselberg, D. & Treede, R. D. (1999). Inhibition of rapid heat responses in nociceptive primary sensory neurons of rats by vanilloid receptor antagonists. *J Neurophysiol*, **82**, 2853-2860.
- Klangkalya, B. & Chan, A. (1988). Structure-activity relationships of steroid hormones on muscarinic receptor binding. *J Steroid Biochem* **29**, 111-118.
- Klapperstuck, M., Buttner, C., Nickel, P., Schmalzing, G., Lambrecht, G. & Markwardt, F. (2000). Antagonism by the suramin analogue NF279 on human P2X(1) and P2X(7) receptors. *Eur J Pharmacol* **387**, 245-252.
- Kleene, S. J. (1994). Inhibition of olfactory cyclic nucleotide-activated current by calmodulin antagonists. *Br J Pharmacol* **111**, 469-472.
- Koenig, H. L., Schumacher, M., Ferzaz, B., Thi, A. N., Ressouches, A., Guennoun, R., Jung-Testas, I., Robel, P., Akwa, Y. & Baulieu, E. E. (1995). Progesterone synthesis and myelin formation by Schwann cells. *Science* **268**, 1500-1503.
- Korneyev A, Pan BS, Polo A, Romeo E, Guidotti A, Costa E (1993) Stimulation of brain pregnenolone synthesis by mitochondrial diazepam binding inhibitor receptor ligands in vivo. *J Neurochem* **61**:1515-1524.
- Korpi, E. R., Wong, G. & Luddens, H. (1995). Subtype specificity of gamma-aminobutyric acid type A receptor antagonism by clozapine. *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol* **352**, 365-373.
- Kowaluk, E. A. & Jarvis, M. F. (2000). Therapeutic potential of adenosine kinase inhibitors. *Expert Opin Investig Drugs* **9**, 551-564.

- Krause, R. M., Buisson, B., Bertrand, S., Corringer, P. J., Galzi, J. L., Changeux, J. P. & Bertrand, D. (1998). Ivermectin: a positive allosteric effector of the alpha7 neuronal nicotinic acetylcholine receptor. *Mol Pharmacol* **53**, 283-294.
- Krishtal, O. A. & Pidoplichko, V. I. (1980). A receptor for protons in the nerve cell membrane. *Neuroscience* **5**, 2325-2327.
- Krueger, K. E. & Papadopoulos, V. (1990). Peripheral-type benzodiazepine receptors mediate translocation of cholesterol from outer to inner mitochondrial membranes in adrenocortical cells. *J Biol Chem* **265**, 15015-15022.
- Krusek, J. & Zemkova, H. (1994). Effect of ivermectin on gamma-aminobutyric acid-induced chloride currents in mouse hippocampal embryonic neurones. *Eur J Pharmacol* **259**, 121-128.
- Labrakakis, C., Gerstner, E. & MacDermott, A. B. (2000). Adenosine triphosphate-evoked currents in cultured dorsal root ganglion neurons obtained from rat embryos: desensitization kinetics and modulation of glutamate release. *Neuroscience* **101**, 1117-1126.
- Lacor, P., Gandolfo, P., Tonon, M. C., Brault, E., Dalibert, I., Schumacher, M., Benavides, J. & Ferzaz, B. (1999). Regulation of the expression of peripheral benzodiazepine receptors and their endogenous ligands during rat sciatic nerve degeneration and regeneration: a role for PBR in neurosteroidogenesis. *Brain Res* **815**, 70-80.
- Lambert, J. J., Belelli, D., Hill-Venning, C. & Peters, J. A. (1995). Neurosteroids and GABAA receptor function. *Trends Pharmacol Sci* **16**, 295-303.
- Lambrecht, G. (1996). Design and pharmacology of selective P2-purinoceptor antagonists. *J Auton Pharmacol* **16**, 341-344.
- Lambrecht, G. (2000). Agonists and antagonists acting at P2X receptors: selectivity profiles and functional implications. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* **362**, 340-350.
- Lambrecht, G., Friebe, T., Grimm, U., Windscheif, U., Bungardt, E., Hildebrandt, C., Baumert, H. G., Spatz-Kumbel, G. & Mutschler, E. (1992). PPADS, a novel functionally selective antagonist of P2 purinoceptor-mediated responses. *Eur J Pharmacol* **217**, 217-219.
- Lambrecht, G., Rettinger, J., Baumert, H. G., Czeche, S., Damer, S., Ganso, M., Hildebrandt, C., Niebel, B., Spatz-Kumbel, G., Schmalzing, G. & Mutschler, E. (2000). The novel pyridoxal-5'-phosphate derivative PPNDS potently antagonizes activation of P2X(1) receptors. *Eur J Pharmacol* **387**, R19-21.
- Lawson, S. N. (1979). The postnatal development of large light and small dark neurons in mouse dorsal root ganglia: a statistical analysis of cell numbers and size. *J Neurocytol*, **8**, 275-294.
- Lawson, S. N. (2002). Phenotype and function of somatic primary afferent nociceptive neurones with C-, Delta- or Aalpha/beta-fibres. *Exp Physiol* **87**, 239-244.

- Lawson, S. N., Crepps, B. & Perl, E. R. (2002). Calcitonin gene-related peptide immunoreactivity and afferent receptive properties of dorsal root ganglion neurones in guinea-pigs. *J Physiol*, **540**, 989-1002.
- Lawson, S. N., Crepps, B. A. & Perl, E. R. (1997). Relationship of substance P to afferent characteristics of dorsal root ganglion neurones in guinea-pig. *J Physiol*, **505** (1), 177-191.
- Lawson, S. N., Harper, A. A., Harper, E. I., Garson, J. A. & Anderton, B. H., ed. (1984). *A monoclonal antibody against neurofilament protein specifically labels a subpopulation of rat sensory neurones*, vol. 228.
- Lawson, S. N. & Waddell, P. J. (1991). Soma neurofilament immunoreactivity is related to cell size and fibre conduction velocity in rat primary sensory neurons. *J Physiol*, vol. **435**, 41-63.
- Le Bars, D., Gozariu, M. & Cadden, S. W. (2001). Animal models of nociception. *Pharmacol Rev* **53**, 597-652.
- Lê, K. T., Babinski, K. & Seguela, P. (1998a). Central P2X4 and P2X6 channel subunits coassemble into a novel heteromeric ATP receptor. *J Neurosci* **18**, 7152-7159.
- Lê, K. T., Villeneuve, P., Ramjaun, A. R., McPherson, P. S., Beaudet, A. & Seguela, P. (1998b). Sensory presynaptic and widespread somatodendritic immunolocalization of central ionotropic P2X ATP receptors. *Neuroscience* **83**, 177-190.
- Lê, K. T., Boue-Grabot, E., Archambault, V. & Seguela, P. (1999). Functional and biochemical evidence for heteromeric ATP-gated channels composed of P2X1 and P2X5 subunits. *J Biol Chem* **274**, 15415-15419.
- Ledent, C., Vaugeois, J. M., Schiffmann, S. N., Pedrazzini, T., El Yacoubi, M., Vanderhaeghen, J. J., Costentin, J., Heath, J. K., Vassart, G. & Parmentier, M. (1997). Aggressiveness, hypoalgesia and high blood pressure in mice lacking the adenosine A2a receptor. *Nature* **388**, 674-678.
- Lee, H. T., Ota-Setlik, A., Xu, H., D'Agati, V. D., Jacobson, M. A. & Emala, C. W. (2003). A3 adenosine receptor knockout mice are protected against ischemia- and myoglobinuria-induced renal failure. *Am J Physiol Renal Physiol* **284**, F267-273.
- Lee, Y. W. & Yaksh, T. L. (1996). Pharmacology of the spinal adenosine receptor which mediates the antiallodynic action of intrathecal adenosine agonists. *J Pharmacol Exp Ther* **277**, 1642-1648.
- Lembeck, F. & Gamse, R. (1982). Substance P in peripheral sensory processes. In *Ciba Found Symp*, pp. 35-54.
- Lewis, C., Neidhart, S., Holy, C., North, R. A., Buell, G. & Surprenant, A. (1995). Coexpression of P2X2 and P2X3 receptor subunits can account for ATP-gated currents in sensory neurons. *Nature* **377**, 432-435.

- Lewis, C. J., Surprenant, A. & Evans, R. J. (1998). 2',3'-O-(2,4,6- trinitrophenyl) adenosine 5'-triphosphate (TNP-ATP)--a nanomolar affinity antagonist at rat mesenteric artery P2X receptor ion channels. *Br J Pharmacol* **124**, 1463-1466.
- Li, C., Peoples, R. W., Lanthorn, T. H., Li, Z. W. & Weight, F. F. (1999). Distinct ATP-activated currents in different types of neurons dissociated from rat dorsal root ganglion. *Neurosci Lett* **263**, 57-60.
- Li, J. & Perl, E. R. (1995). ATP modulation of synaptic transmission in the spinal substantia gelatinosa. *J Neurosci* **15**, 3357-3365.
- Li, P., Calejesan, A. A. & Zhuo, M. (1998). ATP P2x receptors and sensory synaptic transmission between primary afferent fibers and spinal dorsal horn neurons in rats. *J Neurophysiol* **80**, 3356-3360.
- Li H, Yao Z, Degenhardt B, Teper G, Papadopoulos V (2001) Cholesterol binding at the cholesterol recognition/ interaction amino acid consensus (CRAC) of the peripheral-type benzodiazepine receptor and inhibition of steroidogenesis by an HIV TAT-CRAC peptide. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**:1267-1272.
- Liedtke, W., Choe, Y., Marti-Renom, M. A., Bell, A. M., Denis, C. S., Sali, A., Hudspeth, A. J., Friedman, J. M. & Heller, S. (2000). Vanilloid receptor-related osmotically activated channel (VR-OAC), a candidate vertebrate osmoreceptor. *Cell* **103**, 525-535.
- Lingueglia, E., Champigny, G., Lazdunski, M. & Barbry, P. (1995). Cloning of the amiloride-sensitive FMRFamide peptide-gated sodium channel. *Nature*, **378**, 730-733.
- Lingueglia, E., de Weille, J. R., Bassilana, F., Heurteaux, C., Sakai, H., Waldmann, R. & Lazdunski, M. (1997). A modulatory subunit of acid sensing ion channels in brain and dorsal root ganglion cells. *J Biol Chem*, **272**, 29778-29783.
- Liu, M., King, B. F., Dunn, P. M., Rong, W., Townsend-Nicholson, A. & Burnstock, G. (2001). Coexpression of P2X(3) and P2X(2) receptor subunits in varying amounts generates heterogeneous populations of P2X receptors that evoke a spectrum of agonist responses comparable to that seen in sensory neurons. *J Pharmacol Exp Ther* **296**, 1043-1050.
- Liu, X. J., White, T. D. & Sawynok, J. (2000). Potentiation of formalin-evoked adenosine release by an adenosine kinase inhibitor and an adenosine deaminase inhibitor in the rat hind paw: a microdialysis study. *Eur J Pharmacol* **408**, 143-152.
- Liu, X. J., White, T. D. & Sawynok, J. (2002a). Enhanced release of adenosine in rat hind paw following spinal nerve ligation: involvement of capsaicin-sensitive sensory afferents. *Neuroscience* **114**, 379-387.
- Liu, X. J., White, T. D. & Sawynok, J. (2002b). Intraplantar injection of glutamate evokes peripheral adenosine release in the rat hind paw: involvement of peripheral ionotropic

- glutamate receptors and capsaicin-sensitive sensory afferents. *J Neurochem* **80**, 562-570.
- Liu, X. J., White, T.D., Sawynok, J. (2001). Involvement of primary sensory afferents, postganglionic sympathetic nerves and mast cells in the formalin-evoked peripheral release of adenosine. *Eur. J. Pharmacol.* **42**, 147-155.
- Llewellyn-Smith, I. J. & Burnstock, G. (1998). Ultrastructural localization of P2X3 receptors in rat sensory neurons. *Neuroreport* **9**, 2545-2550.
- Loesch, A. & Burnstock, G. (1998). Electron-immunocytochemical localization of P2X1 receptors in the rat cerebellum. In *Cell Tissue Res*, **294**, 253-260.
- Lohmann, K. (1929). Uber die pyrophosphatfraktion im muskel. *Naturwissenschaften*, **17**.
- Lynch, K. J., Touma, E., Niforatos, W., Kage, K. L., Burgard, E. C., van Biesen, T., Kowaluk, E. A. & Jarvis, M. F. (1999). Molecular and functional characterization of human P2X(2) receptors. *Mol Pharmacol* **56**, 1171-1181.
- Lynn, B. (1991). 'Silent' nociceptors in the skin. *Trends Neurosci*, **14**, 95.
- Macdonald, R. L. & Olsen, R. W. (1994). GABAA receptor channels. *Annu Rev Neurosci* **17**, 569-602.
- MacKenzie, A. B., Surprenant, A. & North, R. A. (1999). Functional and molecular diversity of purinergic ion channel receptors. *Ann N Y Acad Sci* **868**, 716-729.
- Majewska, M. D. (1992). Neurosteroids: endogenous bimodal modulators of the GABAA receptor. Mechanism of action and physiological significance. *Prog Neurobiol* **38**, 379-395.
- Majewska, M. D., Harrison, N. L., Schwartz, R. D., Barker, J. L. & Paul, S. M. (1986). Steroid hormone metabolites are barbiturate-like modulators of the GABA receptor. *Science* **232**, 1004-1007.
- Malcangio, M. & Bowery, N. G. (1996). GABA and its receptors in the spinal cord. *Trends Pharmacol Sci* **17**, 457-462.
- Mano, I. & Driscoll, M. (1999). DEG/ENaC channels: a touchy superfamily that watches its salt. In *Bioessays*, **21**, 568-578.
- Maurice, T., Phan, V. L., Urani, A., Kamei, H., Noda, Y. & Nabeshima, T. (1999). Neuroactive neurosteroids as endogenous effectors for the sigma1 (sigma1) receptor: pharmacological evidence and therapeutic opportunities. *Jpn J Pharmacol* **81**, 125-155.
- Mayo, W., Dellu, F., Robel, P., Cherkaoui, J., Le Moal, M., Baulieu, E. E. & Simon, H. (1993). Infusion of neurosteroids into the nucleus basalis magnocellularis affects cognitive processes in the rat. *Brain Res* **607**, 324-328.

- McEwen, B. S. (1991). Non-genomic and genomic effects of steroids on neural activity. *Trends Pharmacol Sci* **12**, 141-147.
- McKemy, D. D., Neuhauser, W. M. & Julius, D. (2002). Identification of a cold receptor reveals a general role for TRP channels in thermosensation. *Nature* **416**, 52-58.
- McMahon, S. B., Armanini, M. P., Ling, L. H. & Phillips, H. S. (1994). Expression and coexpression of Trk receptors in subpopulations of adult primary sensory neurons projecting to identified peripheral targets. *Neuron*, **12**, 1161-1171.
- Mehta, A. K. & Ticku, M. K. (1999). An update on GABAA receptors. *Brain Res Brain Res Rev* **29**, 196-217.
- Mensah-Nyagan, A. G., Do-Rego, J. L., Beaujean, D., Luu-The, V., Pelletier, G. & Vaudry, H. (1999). Neurosteroids: expression of steroidogenic enzymes and regulation of steroid biosynthesis in the central nervous system. *Pharmacol Rev* **51**, 63-81.
- Mihalek, R. M., Banerjee, P. K., Korpi, E. R., Quinlan, J. J., Firestone, L. L., Mi, Z. P., Lagenaur, C., Tretter, V., Sieghart, W., Anagnostaras, S. G., Sage, J. R., Fanselow, M. S., Guidotti, A., Spigelman, I., Li, Z., DeLorey, T. M., Olsen, R. W. & Homanics, G. E. (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, M. J. (1986). Multiple opioid systems and pain. *Pain*, **27**, 303-347.
- Millan, M. J. (1999). The induction of pain: an integrative review. *Prog Neurobiol* **57**, 1-164.
- Miller, K. J., Michel, A. D., Chessell, I. P. & Humphrey, P. P. (1998). Cibacron blue allosterically modulates the rat P2X4 receptor. *Neuropharmacology* **37**, 1579-1586.
- Miras-Portugal, M. T., Gualix, J., Mateo, J., Diaz-Hernandez, M., Gomez-Villafuertes, R., Castro, E. & Pintor, J. (1999). Diadenosine polyphosphates, extracellular function and catabolism. *Prog Brain Res* **120**, 397-409.
- Molliver, D. C., Cook, S. P., Carlsten, J. A., Wright, D. E. & McCleskey, E. W. (2002). ATP and UTP excite sensory neurons and induce CREB phosphorylation through the metabotropic receptor, P2Y2. *Eur J Neurosci* **16**, 1850-1860.
- Molliver, D. C., Wright, D. E., Leitner, M. L., Parsadonian, A. S., Doster, K., Wen, D., Yan, Q. & Snider, W. D. (1997). IB4-binding DRG neurons switch from NGF to GDNF dependence in early postnatal life. *Neuron* **19**, 849-861.
- Monnet, F. P., Mahe, V., Robel, P. & Baulieu, E. E. (1995). Neurosteroids, via sigma receptors, modulate the [3H]norepinephrine release evoked by N-methyl-D-aspartate in the rat hippocampus. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**, 3774-3778.
- Moore, D. J., Chambers, J. K., Wahlin, J. P., Tan, K. B., Moore, G. B., Jenkins, O., Emson, P. C. & Murdock, P. R. (2001). Expression pattern of human P2Y receptor subtypes: a

- quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction study. *Biochim Biophys Acta* **1521**, 107-119.
- Moriyama, T., Iida, T., Kobayashi, K., Higashi, T., Fukuoka, T., Tsumura, H., Leon, C., Suzuki, N., Inoue, K., Gachet, C., Noguchi, K. & Tominaga, M. (2003). Possible involvement of P2Y2 metabotropic receptors in ATP-induced transient receptor potential vanilloid receptor 1-mediated thermal hypersensitivity. *J Neurosci* **23**, 6058-6062.
- Nadeson, R. & Goodchild, C. S. (2000). Antinociceptive properties of neurosteroids II. Experiments with Saffan and its components alphaxalone and alphadolone to reveal separation of anaesthetic and antinociceptive effects and the involvement of spinal cord GABA(A) receptors. *Pain* **88**, 31-39.
- Nadeson, R. & Goodchild, C. S. (2001). Antinociceptive properties of neurosteroids III: experiments with alphadolone given intravenously, intraperitoneally, and intragastrically. *Br J Anaesth* **86**, 704-708.
- Nagy, I. & Rang, H. (1999). Noxious heat activates all capsaicin-sensitive and also a sub-population of capsaicin-insensitive dorsal root ganglion neurons. *Neuroscience* **88**, 995-997.
- Nakamura, F. & Strittmatter, S. M. (1996). P2Y1 purinergic receptors in sensory neurons: contribution to touch-induced impulse generation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 10465-10470.
- Nakamura, I., Ohta, Y. & Kemmotsu, O. (1997). Characterization of adenosine receptors mediating spinal sensory transmission related to nociceptive information in the rat. *Anesthesiology* **87**, 577-584.
- Nakatsuka, T. & Gu, J. G. (2001). ATP P2X receptor-mediated enhancement of glutamate release and evoked EPSCs in dorsal horn neurons of the rat spinal cord. *J Neurosci* **21**, 6522-6531.
- Nakatsuka, T., Tsuzuki, K., Ling, J. X., Sonobe, H. & Gu, J. G. (2003). Distinct roles of P2X receptors in modulating glutamate release at different primary sensory synapses in rat spinal cord. *J Neurophysiol* **89**, 3243-3252.
- Nakazawa, K., Inoue, K., Ito, K. & Koizumi, S. (1995). Inhibition by suramin and reactive blue 2 of GABA and glutamate receptor channels in rat hippocampal neurons. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* **351**, 202-208.
- Nakazawa, K., Liu, M., Inoue, K. & Ohno, Y. (1997). Potent inhibition by trivalent cations of ATP-gated channels. *Eur J Pharmacol* **325**, 237-243.
- Nawa, G., Urano, T., Tokino, T., Ochi, T. & Miyoshi, Y. (1998). Cloning and characterization of the murine P2XM receptor gene. *J Hum Genet* **43**, 262-267.

- Nealen, M. L., Gold, M. S., Thut, P. D. & Caterina, M. J. (2003). TRPM8 mRNA is expressed in a subset of cold-responsive trigeminal neurons from rat. *J Neurophysiol* **90**, 515-520.
- Newbolt, A., Stoop, R., Virginio, C., Surprenant, A., North, R. A., Buell, G. & Rassendren, F. (1998). Membrane topology of an ATP-gated ion channel (P2X receptor). *J Biol Chem* **273**, 15177-15182.
- Nicke, A., Baumert, H. G., Rettinger, J., Eichele, A., Lambrecht, G., Mutschler, E. & Schmalzing, G. (1998). P2X1 and P2X3 receptors form stable trimers: a novel structural motif of ligand-gated ion channels. *Embo J*, **17**, 3016-3028.
- Norenberg, W. & Illes, P. (2000). Neuronal P2X receptors: localisation and functional properties. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* **362**, 324-339.
- North, R. A. (2002). Molecular physiology of P2X receptors. *Physiol Rev* **82**, 1013-1067.
- North, R. A. (2004). P2X3 receptors and peripheral pain mechanisms. *J Physiol* **554**, 301-308.
- North, R. A. & Surprenant, A. (2000). Pharmacology of cloned P2X receptors. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **40**, 563-580.
- Novakovic, S. D., Kassotakis, L. C., Oglesby, I. B., Smith, J. A., Eglen, R. M., Ford, A. P. & Hunter, J. C. (1999). Immunocytochemical localization of P2X3 purinoceptors in sensory neurons in naive rats and following neuropathic injury. *Pain* **80**, 273-282.
- Ohta, A. & Sitkovsky, M. (2001). Role of G-protein-coupled adenosine receptors in downregulation of inflammation and protection from tissue damage. *Nature* **414**, 916-920.
- Okada, M., Nakagawa, T., Minami, M. & Satoh, M. (2002). Analgesic effects of intrathecal administration of P2Y nucleotide receptor agonists UTP and UDP in normal and neuropathic pain model rats. *J Pharmacol Exp Ther* **303**, 66-73.
- Olausson, H., Lamarre, Y., Backlund, H., Morin, C., Wallin, B. G., Starck, G., Ekholm, S., Strigo, I., Worsley, K., Vallbo, A. B. & Bushnell, M. C. (2002). Unmyelinated tactile afferents signal touch and project to insular cortex. *Nat Neurosci* **5**, 900-904.
- Olson, T. H., Riedl, M. S., Vulchanova, L., Ortiz-Gonzalez, X. R. & Elde, R. (1998). An acid sensing ion channel (ASIC) localizes to small primary afferent neurons in rats. *Neuroreport* **9**, 1109-1113.
- Papadopoulos V, Brown AS (1995) Role of the peripheral-type benzodiazepine receptor and the polypeptide diazepam binding inhibitor in steroidogenesis. *J Steroid Biochem Mol Biol* **53**:103-110.
- Papadopoulos V, Guarneri P, Kreuger KE, Guidotti A, Costa E (1992) Pregnenolone biosynthesis in C6-2B glioma cell mitochondria: regulation by a mitochondrial diazepam binding inhibitor receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**:5113-5117.

- Park-Chung, M., Malayev, A., Purdy, R. H., Gibbs, T. T. & Farb, D. H. (1999). Sulfated and unsulfated steroids modulate gamma-aminobutyric acidA receptor function through distinct sites. *Brain Res* **830**, 72-87.
- Parker, K. E. (1998). Modulation of ATP-gated non-selective cation channel (P2X1 receptor) activation and desensitization by the actin cytoskeleton. *J Physiol*, **510** (1), 19-25.
- Parker, L. N. & Odell, W. D. (1980). Control of adrenal androgen secretion. *Endocr Rev* **1**, 392-410.
- Patapoutian, A., Peier, A. M., Story, G. M. & Viswanath, V. (2003). ThermoTRP channels and beyond: mechanisms of temperature sensation. *Nat Rev Neurosci* **4**, 529-539.
- Patchev, V. K., Hassan, A. H., Holsboer, D. F. & Almeida, O. F. (1996). The neurosteroid tetrahydroprogesterone attenuates the endocrine response to stress and exerts glucocorticoid-like effects on vasopressin gene transcription in the rat hypothalamus. *Neuropsychopharmacology* **15**, 533-540.
- Patte-Mensah, C., Kappes, V., Freund-Mercier, M. J., Tsutsui, K. & Mensah-Nyagan, A. G. (2003). Cellular distribution and bioactivity of the key steroidogenic enzyme, cytochrome P450side chain cleavage, in sensory neural pathways. *J Neurochem* **86**, 1233-1246.
- Peier, A. M., Moqrich, A., Hergarden, A. C., Reeve, A. J., Andersson, D. A., Story, G. M., Earley, T. J., Dragoni, I., McIntyre, P., Bevan, S. & Patapoutian, A. (2002a). A TRP channel that senses cold stimuli and menthol. *Cell* **108**, 705-715.
- Peier, A. M., Reeve, A. J., Andersson, D. A., Moqrich, A., Earley, T. J., Hergarden, A. C., Story, G. M., Colley, S., Hogenesch, J. B., McIntyre, P., Bevan, S. & Patapoutian, A. (2002b). A heat-sensitive TRP channel expressed in keratinocytes. *Science* **296**, 2046-2049.
- Persohn, E., Malherbe, P. & Richards, J. G. (1991). In situ hybridization histochemistry reveals a diversity of GABAA receptor subunit mRNAs in neurons of the rat spinal cord and dorsal root ganglia. *Neuroscience* **42**, 497-507.
- Petruska, J. C., Cooper, B. Y., Gu, J. G., Rau, K. K. & Johnson, R. D. (2000a). Distribution of P2X1, P2X2, and P2X3 receptor subunits in rat primary afferents: relation to population markers and specific cell types. *J Chem Neuroanat* **20**, 141-162.
- Petruska, J. C., Cooper, B. Y., Johnson, R. D. & Gu, J. G. (2000b). Distribution patterns of different P2x receptor phenotypes in acutely dissociated dorsal root ganglion neurons of adult rats. *Exp Brain Res* **134**, 126-132.
- Petruska, J. C., Napaporn, J., Johnson, R. D., Gu, J. G. & Cooper, B. Y. (2000c). Subclassified acutely dissociated cells of rat DRG: histochemistry and patterns of capsaicin-, proton-, and ATP-activated currents. *J Neurophysiol* **84**, 2365-2379.
- Plassart-Schiess, E. & Baulieu, E. E. (2001). Neurosteroids: recent findings. *Brain Res Brain Res Rev* **37**, 133-140.

- Poon, A. & Sawynok, J. (1998). Antinociception by adenosine analogs and inhibitors of adenosine metabolism in an inflammatory thermal hyperalgesia model in the rat. *Pain* **74**, 235-245.
- Post, C. (1984). Antinociceptive effects in mice after intrathecal injection of 5'-N-ethylcarboxamide adenosine. *Neurosci Lett* **51**, 325-330.
- Price, M. P., Lewin, G. R., McIlwrath, S. L., Cheng, C., Xie, J., Heppenstall, P. A., Stucky, C. L., Mannsfeldt, A. G., Brennan, T. J., Drummond, H. A., Qiao, J., Benson, C. J., Tarr, D. E., Hrstka, R. F., Yang, B., Williamson, R. A. & Welsh, M. J. (2000). The mammalian sodium channel BNC1 is required for normal touch sensation. *Nature*, **407**, 1007-1011.
- Price, M. P., McIlwrath, S. L., Xie, J., Cheng, C., Qiao, J., Tarr, D. E., Sluka, K. A., Brennan, T. J., Lewin, G. R. & Welsh, M. J. (2001). The DRASIC cation channel contributes to the detection of cutaneous touch and acid stimuli in mice. *Neuron*, **32**, 1071-1083.
- Price, M. P., Snyder, P. M. & Welsh, M. J. (1996). Cloning and expression of a novel human brain Na⁺ channel. *J Biol Chem* **271**, 7879-7882.
- Purdy, R. H., Morrow, A. L., Moore, P. H., Jr. & Paul, S. M. (1991). Stress-induced elevations of gamma-aminobutyric acid type A receptor-active steroids in the rat brain. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**, 4553-4557.
- Queiroz, G., Gebicke-Haerter, P. J., Schobert, A., Starke, K. & von Kugelgen, I. (1997). Release of ATP from cultured rat astrocytes elicited by glutamate receptor activation. *Neuroscience* **78**, 1203-1208.
- Rae, J., Cooper, K., Gates, P. & Watsky, M. (1991). Low access resistance perforated patch recordings using amphotericin B. *J Neurosci Methods* **37**, 15-26.
- Raja, S. N., Meyer, R. A., Ringkamp, M. & Campbell, J. N. (1999). In *Textbook of Pain*. ed. Melzack, R., pp. 11-57. Churchill Livingstone, Edinburgh, 1999.
- Ralevic, V. & Burnstock, G. (1998). Receptors for purines and pyrimidines. *Pharmacol Rev*, **50**, 413-492.
- Ramer, M. S., Thompson, S.W., McMahon, S.B. (1999). Causes and consequences of sympathetic basket formation in dorsal root ganglia. *Pain Suppl.* **6**, 111-120.
- Rassendren, F., Buell, G., Newbolt, A., North, R. A. & Surprenant, A. (1997a). Identification of amino acid residues contributing to the pore of a P2X receptor. *Embo J* **16**, 3446-3454.
- Rassendren, F., Buell, G. N., Virginio, C., Collo, G., North, R. A. & Surprenant, A. (1997b). The permeabilizing ATP receptor, P2X7. Cloning and expression of a human cDNA. *J Biol Chem* **272**, 5482-5486.

- Reid, G., Babes, A. & Pluteanu, F. (2002). A cold- and menthol-activated current in rat dorsal root ganglion neurones: properties and role in cold transduction. *J Physiol* **545**, 595-614.
- Rettinger, J., Schmalzing, G., Damer, S., Muller, G., Nickel, P. & Lambrecht, G. (2000). The suramin analogue NF279 is a novel and potent antagonist selective for the P2X(1) receptor. *Neuropharmacology* **39**, 2044-2053.
- Rhee, J. S., Wang, Z. M., Nabekura, J., Inoue, K. & Akaike, N. (2000). ATP facilitates spontaneous glycinergic IPSC frequency at dissociated rat dorsal horn interneuron synapses. *J Physiol* **524 Pt 2**, 471-483.
- Ribeiro, J. A. (2003). Adenosine receptors in the nervous system: pathophysiological implications. *Progress in Neurobiology* **68**, 377-392.
- Robertson, S. J., Rae, M. G., Rowan, E. G. & Kennedy, C. (1996). Characterization of a P2X-purinoceptor in cultured neurones of the rat dorsal root ganglia. *Br J Pharmacol* **118**, 951-956.
- Rong, W., Burnstock, G. & Spyer, K. M. (2000). P2X purinoceptor-mediated excitation of trigeminal lingual nerve terminals in an in vitro intra-arterially perfused rat tongue preparation. *J Physiol* **524** (3), 891-902.
- Rupprecht, R. & Holsboer, F. (1999). Neuroactive steroids: mechanisms of action and neuropsychopharmacological perspectives. *Trends Neurosci* **22**, 410-416.
- Sak, K. & Webb, T. E. (2002). A retrospective of recombinant P2Y receptor subtypes and their pharmacology. *Arch Biochem Biophys* **397**, 131-136.
- Salt, T. E. & Hill, R. G. (1983). Excitation of single sensory neurones in the rat caudal trigeminal nucleus by iontophoretically applied adenosine 5'-triphosphate. *Neurosci Lett* **35**, 53-57.
- Salter, M. W. & Henry, J. L. (1985). Effects of adenosine 5'-monophosphate and adenosine 5'-triphosphate on functionally identified units in the cat spinal dorsal horn. Evidence for a differential effect of adenosine 5'-triphosphate on nociceptive vs non-nociceptive units. *Neuroscience* **15**, 815-825.
- Salvatore, C. A., Tilley, S. L., Latour, A. M., Fletcher, D. S., Koller, B. H. & Jacobson, M. A. (2000). Disruption of the A(3) adenosine receptor gene in mice and its effect on stimulated inflammatory cells. *J Biol Chem* **275**, 4429-4434.
- Sanada, M., Yasuda, H., Omatsu-Kanbe, M., Sango, K., Isono, T., Matsuura, H. & Kikkawa, R. (2002). Increase in intracellular Ca(2+) and calcitonin gene-related peptide release through metabotropic P2Y receptors in rat dorsal root ganglion neurons. *Neuroscience* **111**, 413-422.
- Sawynok, J. (1998). Adenosine receptor activation and nociception. *Eur. J. Pharmacol.* **317**, 1-11.

- Sawynok, J., Downie, J. W., Reid, A. R., Cahill, C. M. & White, T. D. (1993). ATP release from dorsal spinal cord synaptosomes: characterization and neuronal origin. *Brain Res* **610**, 32-38.
- Sawynok, J. & Liu, X. J. (2003). Adenosine in the spinal cord and periphery: release and regulation of pain. *Progress in Neurobiology* **69**, 313-340.
- Sawynok, J. & Reid, A. (1997). Peripheral adenosine 5'-triphosphate enhances nociception in the formalin test via activation of a purinergic p2X receptor. *Eur J Pharmacol* **330**, 115-121.
- Schlienger, J. L., Perrin, A. E. & Goichot, B. (2002). [DHEA: an unknown star]. *Rev Med Interne* **23**, 436-446.
- Schmelz, M. (2001). A neural pathway for itch. *Nat Neurosci* **4**, 9-10.
- Schmelz, M., Schmidt, R., Bickel, A., Handwerker, H. O. & Torebjork, H. E. (1997). Specific C-receptors for itch in human skin. *J Neurosci*, **17**, 8003-8008.
- Schmidt, B. M., Gerdes, D., Feuring, M., Falkenstein, E., Christ, M. & Wehling, M. (2000). Rapid, nongenomic steroid actions: A new age? *Front Neuroendocrinol* **21**, 57-94.
- Schmidt, R., Schmelz, M., Forster, C., Ringkamp, M., Torebjork, E. & Handwerker, H. (1995). Novel classes of responsive and unresponsive C nociceptors in human skin. *J Neurosci*, **15**, 333-341.
- Schumacher, M., Akwa, Y., Guennoun, R., Robert, F., Labombarda, F., Desarnaud, F., Robel, P., De Nicola, A. F. & Baulieu, E. E. (2000). Steroid synthesis and metabolism in the nervous system: trophic and protective effects. *J Neurocytol* **29**, 307-326.
- Schumacher, M., Robel, P. & Baulieu, E. E. (1996). Development and regeneration of the nervous system: a role for neurosteroids. *Dev Neurosci* **18**, 6-21.
- Séguéla, P., Haghghi, A., Soghomonian, J. J. & Cooper, E. (1996). A novel neuronal P2x ATP receptor ion channel with widespread distribution in the brain. *J Neurosci* **16**, 448-455.
- Selye, H. (1941). The anesthetic effects of steroid hormones. *Proc Soc Exp Biol Med* **46**, 106-112.
- Sherrington, C. S. (1906). *The Integrative Action of the Nervous System*. Scribner, New York.
- Sieghart, W. (1995). Structure and pharmacology of gamma-aminobutyric acidA receptor subtypes. *Pharmacol Rev* **47**, 181-234.
- Simon, J., Kidd, E. J., Smith, F. M., Chessell, I. P., Murrell-Lagnado, R., Humphrey, P. P. & Barnard, E. A. (1997). Localization and functional expression of splice variants of the P2X2 receptor. *Mol Pharmacol* **52**, 237-248.

- Simon, J., Webb, T. E., King, B. F., Burnstock, G. & Barnard, E. A. (1995). Characterisation of a recombinant P2Y purinoceptor. *Eur J Pharmacol* **291**, 281-289.
- Simone, D. A. & Kajander, K. C. (1997). Responses of cutaneous A-fiber nociceptors to noxious cold. *J Neurophysiol*, **77**, 2049-2060.
- Smith, G. D., Gunthorpe, M. J., Kelsell, R. E., Hayes, P. D., Reilly, P., Facer, P., Wright, J. E., Jerman, J. C., Walhin, J. P., Ooi, L., Egerton, J., Charles, K. J., Smart, D., Randall, A. D., Anand, P. & Davis, J. B. (2002). TRPV3 is a temperature-sensitive vanilloid receptor-like protein. *Nature* **418**, 186-190.
- Snider, W. D. & McMahon, S. B. (1998). Tackling pain at the source: new ideas about nociceptors. *Neuron* **20**, 629-632.
- Soltoff, S. P., McMillian, M. K. & Talamo, B. R. (1989). Coomassie Brilliant Blue G is a more potent antagonist of P2 purinergic responses than Reactive Blue 2 (Cibacron Blue 3GA) in rat parotid acinar cells. *Biochem Biophys Res Commun* **165**, 1279-1285.
- Soto, F., Garcia-Guzman, M. & Stuhmer, W. (1997). Cloned ligand-gated channels activated by extracellular ATP (P2X receptors). *J Membr Biol* **160**, 91-100.
- Souslova, V., Cesare, P., Ding, Y., Akopian, A. N., Stanfa, L., Suzuki, R., Carpenter, K., Dickenson, A., Boyce, S., Hill, R., Nebunius-Oosthuizen, D., Smith, A. J., Kidd, E. J. & Wood, J. N. (2000). Warm-coding deficits and aberrant inflammatory pain in mice lacking P2X3 receptors. *Nature* **407**, 1015-1017.
- Sridaran R, Philip GH, Li H, Culty M, Liu Z, Stocco DM, Papadopoulos V (1999) GnRH agonist treatment decreases progesterone synthesis, luteal peripheral benzodiazepine receptor mRNA, ligand binding and steroidogenic acute regulatory protein expression during pregnancy. *J Mol Endocrinol* **22**:45-54.
- Stoop, R., Surprenant, A. & North, R. A. (1997). Different sensitivities to pH of ATP-induced currents at four cloned P2X receptors. *J Neurophysiol* **78**, 1837-1840.
- Stoop, R., Thomas, S., Rassendren, F., Kawashima, E., Buell, G., Surprenant, A. & North, R. A. (1999a). Contribution of individual subunits to the multimeric P2X(2) receptor: estimates based on methanethiosulfonate block at T336C. *Mol Pharmacol* **56**, 973-981.
- Story, G. M., Peier, A. M., Reeve, A. J., Eid, S. R., Mosbacher, J., Hricik, T. R., Earley, T. J., Hergarden, A. C., Andersson, D. A., Hwang, S. W., McIntyre, P., Jegla, T., Bevan, S. & Patapoutian, A. (2003). ANKTM1, a TRP-like channel expressed in nociceptive neurons, is activated by cold temperatures. *Cell* **112**, 819-829.
- Strohle, A., Pasini, A., Romeo, E., Hermann, B., Spalletta, G., di Michele, F., Holsboer, F. & Rupprecht, R. (2000). Fluoxetine decreases concentrations of 3 alpha, 5 alpha-tetrahydrodeoxycorticosterone (THDOC) in major depression. *J Psychiatr Res* **34**, 183-186.

- Strotmann, R., Harteneck, C., Nunnenmacher, K., Schultz, G. & Plant, T. D. (2000). OTRPC4, a nonselective cation channel that confers sensitivity to extracellular osmolarity. *Nat Cell Biol* **2**, 695-702.
- Su, T. P., London, E. D. & Jaffe, J. H. (1988). Steroid binding at sigma receptors suggests a link between endocrine, nervous, and immune systems. *Science* **240**, 219-221.
- Surprenant, A. (1996). Functional properties of native and cloned P2X receptors. *Ciba Found Symp* **198**, 208-219; discussion 219-222.
- Surprenant, A., Rassendren, F., Kawashima, E., North, R. A. & Buell, G. (1996). The cytolytic P2Z receptor for extracellular ATP identified as a P2X receptor (P2X7). *Science* **272**, 735-738.
- Surprenant, A., Schneider, D. A., Wilson, H. L., Galligan, J. J. & North, R. A. (2000). Functional properties of heteromeric P2X(1/5) receptors expressed in HEK cells and excitatory junction potentials in guinea-pig submucosal arterioles. *J Auton Nerv Syst* **81**, 249-263.
- Sweeney, M. I., White, T. D. & Sawynok, J. (1989). Morphine, capsaicin and K⁺ release purines from capsaicin-sensitive primary afferent nerve terminals in the spinal cord. *J Pharmacol Exp Ther* **248**, 447-454.
- Thibault, C. & Levasseur, C. (2001). *La reproduction chez les mammifères et l'homme*. Ellipse/Inra Eds, France
- Tognetto, M., Amadesi, S., Harrison, S., Creminon, C., Trevisani, M., Carreras, M., Matera, M., Geppetti, P. & Bianchi, A. (2001). Anandamide excites central terminals of dorsal root ganglion neurons via vanilloid receptor-1 activation. *J Neurosci* **21**, 1104-1109.
- Tominaga, M., Caterina, M. J., Malmberg, A. B., Rosen, T. A., Gilbert, H., Skinner, K., Raumann, B. E., Basbaum, A. I. & Julius, D. (1998). The cloned capsaicin receptor integrates multiple pain-producing stimuli. *Neuron*, **21**, 531-543.
- Tominaga, M., Wada, M. & Masu, M. (2001). Potentiation of capsaicin receptor activity by metabotropic ATP receptors as a possible mechanism for ATP-evoked pain and hyperalgesia. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 6951-6956.
- Torebjork, H. E. & Hallin, R. G. (1973). Perceptual changes accompanying controlled preferential blocking of A and C fibre responses in intact human skin nerves. *Exp Brain Res* **16**, 321-332.
- Torres, G. E., Egan, T. M. & Voigt, M. M. (1998a). N-Linked glycosylation is essential for the functional expression of the recombinant P2X2 receptor. *Biochemistry* **37**, 14845-14851.
- Torres, G. E., Egan, T. M. & Voigt, M. M. (1999). Hetero-oligomeric assembly of P2X receptor subunits. Specificities exist with regard to possible partners. *J Biol Chem* **274**, 6653-6659.

- Torres, G. E., Haines, W. R., Egan, T. M. & Voigt, M. M. (1998b). Co-expression of P2X1 and P2X5 receptor subunits reveals a novel ATP-gated ion channel. *Mol Pharmacol* **54**, 989-993.
- Townsend-Nicholson, A., King, B. F., Wildman, S. S. & Burnstock, G. (1999). Molecular cloning, functional characterization and possible cooperativity between the murine P2X4 and P2X4a receptors. In *Brain Res Mol Brain Res*, vol. 64, pp. 246-254.
- Traub, R. J. (1997). Spinal modulation of the induction of central sensitization. *Brain Res*, **778**, 34-42.
- Treede, R. D., Meyer, R. A. & Campbell, J. N. (1990). Comparison of heat and mechanical receptive fields of cutaneous C-fiber nociceptors in monkey. *J Neurophysiol*, **64**, 1502-1513.
- Treede, R. D. a. M., W. (1995). Modern concepts of pain and hyperalgesia: beyond the polymodal C-nociceptor. *News Physiol. Sci.*, **10**, 216-228.
- Trevisani, M., Smart, D., Gunthorpe, M. J., Tognetto, M., Barbieri, M., Campi, B., Amadesi, S., Gray, J., Jerman, J. C., Brough, S. J., Owen, D., Smith, G. D., Randall, A. D., Harrison, S., Bianchi, A., Davis, J. B. & Geppetti, P. (2002). Ethanol elicits and potentiates nociceptor responses via the vanilloid receptor-1. *Nat Neurosci* **5**, 546-551.
- Tsuda, M., Koizumi, S., Kita, A., Shigemoto, Y., Ueno, S. & Inoue, K. (2000). Mechanical Allodynia Caused by Intraplantar Injection of P2X Receptor Agonist in Rats: Involvement of Heteromeric P2X2/3 Receptor Signaling in Capsaicin-Insensitive Primary Afferent Neurons. *J Neurosci (Online)* **20**, RC90.
- Tsuda, M., Ueno, S. & Inoue, K. (1999). Evidence for the involvement of spinal endogenous ATP and P2X receptors in nociceptive responses caused by formalin and capsaicin in mice. *Br J Pharmacol* **128**, 1497-1504.
- Tsuda, M., Shigemoto-Mogami, Y., Koizumi, S., Mizokoshi, A., Kohsaka, S., Salter, M. W. & Inoue, K. (2003). P2X4 receptors induced in spinal microglia gate tactile allodynia after nerve injury. *Nature* **424**, 778-783.
- Uchida, H., Mizuno, K., Yoshida, A. & Ueda, H. (2003). Neurosteroid-induced hyperalgesia through a histamine release is inhibited by progesterone and p,p'-DDE, an endocrine disrupting chemical. *Neurochem Int* **42**, 401-407.
- Ueda, H., Inoue, M., Yoshida, A., Mizuno, K., Yamamoto, H., Maruo, J., Matsuno, K. & Mita, S. (2001). Metabotropic neurosteroid/sigma-receptor involved in stimulation of nociceptor endings of mice. *J Pharmacol Exp Ther* **298**, 703-710.
- Ueno, S., Tsuda, M., Iwanaga, T. & Inoue, K. (1999). Cell type-specific ATP-activated responses in rat dorsal root ganglion neurons. *Br J Pharmacol* **126**, 429-436.

- Urano, T., Nishimori, H., Han, H., Furuhata, T., Kimura, Y., Nakamura, Y. & Tokino, T. (1997). Cloning of P2XM, a novel human P2X receptor gene regulated by p53. *Cancer Res* **57**, 3281-3287.
- Usachev, Y. M., DeMarco, S. J., Campbell, C., Strehler, E. E. & Thayer, S. A. (2002). Bradykinin and ATP accelerate Ca(2+) efflux from rat sensory neurons via protein kinase C and the plasma membrane Ca(2+) pump isoform 4. *Neuron* **33**, 113-122.
- Uzunova, V., Sheline, Y., Davis, J. M., Rasmusson, A., Uzunov, D. P., Costa, E. & Guidotti, A. (1998). Increase in the cerebrospinal fluid content of neurosteroids in patients with unipolar major depression who are receiving fluoxetine or fluvoxamine. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 3239-3244.
- Valera, S., Ballivet, M. & Bertrand, D. (1992). Progesterone modulates a neuronal nicotinic acetylcholine receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**, 9949-9953.
- Valera, S., Hussy, N., Evans, R. J., Adami, N., North, R. A., Surprenant, A. & Buell, G. (1994). A new class of ligand-gated ion channel defined by P2x receptor for extracellular ATP. *Nature* **371**, 516-519.
- Vallée, M., Mayo, W., Darnaudery, M., Corpechot, C., Young, J., Koehl, M., Le Moal, M., Baulieu, E. E., Robel, P. & Simon, H. (1997). Neurosteroids: deficient cognitive performance in aged rats depends on low pregnenolone sulfate levels in the hippocampus. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**, 14865-14870.
- van Broekhoven, F. & Verkes, R. J. (2003). Neurosteroids in depression: a review. *Psychopharmacology (Berl)* **165**, 97-110.
- Vigne, P., Hechler, B., Gachet, C., Breittmayer, J. P. & Frelin, C. (1999). Benzoyl ATP is an antagonist of rat and human P2Y1 receptors and of platelet aggregation. *Biochem Biophys Res Commun* **256**, 94-97.
- Vigne, P., Pacaud, P., Urbach, V., Feolde, E., Breittmayer, J. P. & Frelin, C. (1996). The effect of PPADS as an antagonist of inositol (1,4,5)trisphosphate induced intracellular calcium mobilization. *Br J Pharmacol* **119**, 360-364.
- Virginio, C., Church, D., North, R. A. & Surprenant, A. (1997). Effects of divalent cations, protons and calmidazolium at the rat P2X7 receptor. *Neuropharmacology* **36**, 1285-1294.
- Virginio, C., MacKenzie, A., North, R. A. & Surprenant, A. (1999a). Kinetics of cell lysis, dye uptake and permeability changes in cells expressing the rat P2X7 receptor. *J Physiol* **519** (2), 335-346.
- Virginio, C., MacKenzie, A., Rassendren, F. A., North, R. A. & Surprenant, A. (1999b). Pore dilation of neuronal P2X receptor channels. *Nat Neurosci* **2**, 315-321.
- Virginio, C., Robertson, G., Surprenant, A. & North, R. A. (1998). Trinitrophenyl-substituted nucleotides are potent antagonists selective for P2X1, P2X3, and heteromeric P2X2/3 receptors. *Mol Pharmacol* **53**, 969-973.

- von Kugelgen, I. & Wetter, A. (2000). Molecular pharmacology of P2Y-receptors. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* **362**, 310-323.
- Voogd, T. E., Vansterkenburg, E. L., Wilting, J. & Janssen, L. H. (1993). Recent research on the biological activity of suramin. *Pharmacol Rev* **45**, 177-203.
- Vulchanova, L., Arvidsson, U., Riedl, M., Wang, J., Buell, G., Surprenant, A., North, R. A. & Elde, R. (1996). Differential distribution of two ATP-gated channels (P2X receptors) determined by immunocytochemistry. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 8063-8067.
- Vulchanova, L., Riedl, M. S., Shuster, S. J., Buell, G., Surprenant, A., North, R. A. & Elde, R. (1997). Immunohistochemical study of the P2X2 and P2X3 receptor subunits in rat and monkey sensory neurons and their central terminals. *Neuropharmacology* **36**, 1229-1242.
- Vulchanova, L., Riedl, M. S., Shuster, S. J., Stone, L. S., Hargreaves, K. M., Buell, G., Surprenant, A., North, R. A. & Elde, R. (1998). P2X3 is expressed by DRG neurons that terminate in inner lamina II. *Eur J Neurosci* **10**, 3470-3478.
- Waldmann, R. & Lazdunski, M. (1998). H(+)-gated cation channels: neuronal acid sensors in the NaC/DEG family of ion channels. *Curr Opin Neurobiol*, **8**, 418-424.
- Wang, Z., Haydon, P. G. & Yeung, E. S. (2000). Direct observation of calcium-independent intercellular ATP signaling in astrocytes. *Anal Chem* **72**, 2001-2007.
- Welch, J. M., Simon, S. A. & Reinhart, P. H. (2000). The activation mechanism of rat vanilloid receptor 1 by capsaicin involves the pore domain and differs from the activation by either acid or heat. In *Proc Natl Acad Sci U S A*, **97**, 13889-13894.
- West LA, Horvat RD, Roess DA, Barisas BG, Juengel JL, Niswender GD (2001) Steroidogenic acute regulatory protein and peripheral-type benzodiazepine receptor associate at the mitochondrial membrane. *Endocrinology* **142**:502-505.
- White, T. D., Downie, J. W. & Leslie, R. A. (1985). Characteristics of K⁺- and veratridine-induced release of ATP from synaptosomes prepared from dorsal and ventral spinal cord. *Brain Res* **334**, 372-374.
- Wiertelak, E. P., Smith, K. P., Furness, L., Mooney-Heiberger, K., Mayr, T., Maier, S. F. & Watkins, L. R. (1994). Acute and conditioned hyperalgesic responses to illness. *Pain*, **56**, 227-234.
- Wildman, S. S., King, B. F. & Burnstock, G. (1997). Potentiation of ATP-responses at a recombinant P2x2 receptor by neurotransmitters and related substances. *Br J Pharmacol* **120**, 221-224.
- Williams, T. C. & Jarvis, S. M. (1991). Multiple sodium-dependent nucleoside transport systems in bovine renal brush-border membrane vesicles. *Biochem J* **274** (1), 27-33.

- Willmer, E. N. (1961). Steroids and cell surfaces. *Biol Rev Camb Philos Soc* **36**, 368-398.
- Wissenbach, U., Bodding, M., Freichel, M. & Flockerzi, V. (2000). Trp12, a novel Trp related protein from kidney. *FEBS Lett* **485**, 127-134.
- Wittenberger, T., Schaller, H. C. & Hellebrand, S. (2001). An expressed sequence tag (EST) data mining strategy succeeding in the discovery of new G-protein coupled receptors. *J Mol Biol* **307**, 799-813.
- Wohlfarth, K. M., Bianchi, M. T. & Macdonald, R. L. (2002). Enhanced neurosteroid potentiation of ternary GABA(A) receptors containing the delta subunit. *J Neurosci* **22**, 1541-1549.
- Woodward, J., Nowak, M. W. & Davies, D. (2004). Effects of the abused solvent toluene on recombinant P2X receptors expressed in HEK293 cells. *Brain Res Mol Brain Res* **125**, 86-95.
- Woolf, C. J. & Salter, M. W. (2000). Neuronal plasticity: increasing the gain in pain. *Science*, **288**, 1765-1769.
- Wu, F. S., Gibbs, T. T. & Farb, D. H. (1990). Inverse modulation of gamma-aminobutyric acid- and glycine-induced currents by progesterone. *Mol Pharmacol* **37**, 597-602.
- Wu, F. S., Gibbs, T. T. & Farb, D. H. (1991). Pregnenolone sulfate: a positive allosteric modulator at the N-methyl-D-aspartate receptor. *Mol Pharmacol* **40**, 333-336.
- Xiang, Z., Bo, X. & Burnstock, G. (1998a). Localization of ATP-gated P2X receptor immunoreactivity in rat sensory and sympathetic ganglia. *Neurosci Lett* **256**, 105-108.
- Xiang, Z., Bo, X. & Burnstock, G. (1999). P2X receptor immunoreactivity in the rat cochlea, vestibular ganglion and cochlear nucleus. *Hear Res* **128**, 190-196.
- Xiang, Z., Bo, X., Oglesby, I., Ford, A. & Burnstock, G. (1998b). Localization of ATP-gated P2X2 receptor immunoreactivity in the rat hypothalamus. *Brain Res* **813**, 390-397.
- Xiao, H. S., Huang, Q. H., Zhang, F. X., Bao, L., Lu, Y. J., Guo, C., Yang, L., Huang, W. J., Fu, G., Xu, S. H., Cheng, X. P., Yan, Q., Zhu, Z. D., Zhang, X., Chen, Z. & Han, Z. G. (2002). Identification of gene expression profile of dorsal root ganglion in the rat peripheral axotomy model of neuropathic pain. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 8360-8365.
- Xiong, K., Li, C. & Weight, F. F. (2000). Inhibition by ethanol of rat P2X(4) receptors expressed in Xenopus oocytes. *Br J Pharmacol* **130**, 1394-1398.
- Xu, H., Ramsey, I. S., Kotecha, S. A., Moran, M. M., Chong, J. A., Lawson, D., Ge, P., Lilly, J., Silos-Santiago, I., Xie, Y., DiStefano, P. S., Curtis, R. & Clapham, D. E. (2002). TRPV3 is a calcium-permeable temperature-sensitive cation channel. *Nature* **418**, 181-186.

- Yanagibashi K, Ohno Y, Nakamichi N, Matsui T, Hayashida K, Takamura M, Yamada K, Tou S, Kawamura M (1989) Peripheral-type benzodiazepine receptors are involved in the regulation of cholesterol side chain cleavage in adrenocortical mitochondria. *J Biochem (Tokyo)* **106**:1026-1029.
- Zhai, J., Peoples, R. W. & Li, C. (1998). Proton inhibition of GABA-activated current in rat primary sensory neurons. *Pflugers Arch* **435**, 539-545.
- Zhang, F. L., Luo, L., Gustafson, E., Lachowicz, J., Smith, M., Qiao, X., Liu, Y. H., Chen, G., Pramanik, B., Laz, T. M., Palmer, K., Bayne, M. & Monsma, F. J., Jr. (2001). ADP is the cognate ligand for the orphan G protein-coupled receptor SP1999. *J Biol Chem* **276**, 8608-8615.
- Zhang, F. L., Luo, L., Gustafson, E., Palmer, K., Qiao, X., Fan, X., Yang, S., Laz, T. M., Bayne, M. & Monsma, F., Jr. (2002). P2Y(13): identification and characterization of a novel G α hi-coupled ADP receptor from human and mouse. *J Pharmacol Exp Ther* **301**, 705-713.
- Zhu, W. J., Wang, J. F., Krueger, K. E. & Vicini, S. (1996). Delta subunit inhibits neurosteroid modulation of GABA A receptors. *J Neurosci* **16**, 6648-6656.
- Zhu, Y., Bond, J. & Thomas, P. (2003a). Identification, classification, and partial characterization of genes in humans and other vertebrates homologous to a fish membrane progesterin receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 2237-2242.
- Zhu, Y., Rice, C. D., Pang, Y., Pace, M. & Thomas, P. (2003b). Cloning, expression, and characterization of a membrane progesterin receptor and evidence it is an intermediary in meiotic maturation of fish oocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 2231-2236.
- Zimmerberg, B. & Brown, R. C. (1998). Prenatal experience and postnatal stress modulate the adult neurosteroid and catecholaminergic stress responses. *Int J Dev Neurosci* **16**, 217-228.
- Zimmermann, H. (2000). Extracellular metabolism of ATP and other nucleotides. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* **362**, 299-309.
- Zimmermann, H. & Braun, N. (1996). Extracellular metabolism of nucleotides in the nervous system. *J Auton Pharmacol* **16**, 397-400.

Annexe