

THESE

Présentée à

Université Louis Pasteur de Strasbourg

**Institut des Neurosciences Cellulaires et Intégratives
Département Nociception et Douleur**

Pour obtenir le grade de
DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE STRASBOURG 1

Mention : Sciences de la Vie
Option : Neurosciences

Par

Jean-Didier BRETON

Titre :

**Le contrôle descendant ocytocinergique
Modulation du système nociceptif et effet antinociceptif de l'ocytocine**

Soutenue le 8 septembre 2006 devant le jury composé de :

M. le Docteur Mario RAGGENBASS
M. le Professeur Daniel VOISIN
M. le Docteur Bernard POULAIN
M. le Professeur Rémy SCHLICHTER
M. le Professeur Pierrick POISBEAU

Rapporteur externe
Rapporteur externe
Rapporteur interne
Examineur
Directeur de thèse

Remerciements

Quand je suis arrivé dans l'équipe du Professeur Rémy Schlichter pour effectuer mon stage de DEA sous la direction du Professeur Pierrick Poisbeau, on m'a proposé, le temps de cette toute première année dans un laboratoire de recherche, de travailler sur l'ocytocine. Ce peptide a une histoire longue et riche dans ce laboratoire. Je dois avouer, qu'au départ j'étais un peu perplexe car je ne pensais pas travailler sur les peptides et surtout parce que je n'avais qu'une vague idée des rôles physiologiques de l'ocytocine. Donc, lier l'ocytocine, le système nerveux et la douleur représentait tout un programme pour moi qui n'avais que quelques notions sur le système nerveux. Toutefois, ce DEA a été très riche en résultats et il m'a permis de poser des bases solides afin de réaliser ce travail de thèse. Ce dernier étant l'aboutissement d'une collaboration étroite entre certaines personnes du laboratoire et l'équipe du Docteur Miguel Condés-lara.

Je tiens à remercier Monsieur le Docteur Bernard Poulain, Monsieur le Docteur Mario Raggenbass et Monsieur le Professeur Daniel Voisin pour avoir accepté spontanément de juger ce travail de thèse. J'espère avoir rendu la lecture de ce mémoire la plus agréable possible.

Je tiens à exprimer toute ma reconnaissance au Professeur Pierrick Poisbeau pour son encadrement, ses qualités humaines et scientifiques. Je tiens aussi à le remercier pour m'avoir supporté pendant presque cinq années. Cela n'a pas été tous les jours facile pour vous. Par ailleurs, je tiens à vous remercier pour l'attention, le soutien et la patience dont vous avez fait preuve dans les moments difficiles.

Une des autres personnes que je ne pourrai pas oublier dans ces remerciements est le Professeur Rémy Schlichter. Recevez toute ma gratitude pour ces nombreuses discussions de tous ordres (scientifiques surtout et d'une manière générale, sur tous les sujets de la vie) que nous avons eu. Merci aussi de m'avoir accordé de votre temps. Combien de fois suis-je venu vous "sortir de vos piles de papiers" lorsque j'enregistrais une cellule pour vous montrer en direct ce que ces neurones de la lamina II avaient à nous dire. A chaque fois vous répondiez "présent" et des cinq minutes que je vous demandais, cela se terminait en trente minutes voire plus, de discussion enrichissante.

J'ai été très privilégié d'avoir côtoyé les Professeurs Pierrick Poisbeau et Rémy Schlichter. Les nombreuses réunions que nous avons eues m'ont permis d'apprendre énormément à leurs côtés, même, si parfois, mes petits neurones ne fonctionnaient pas assez vite pour les suivre. Merci encore de m'avoir épaulé pendant toutes ces années.

Je remercie Monsieur le Docteur Jean-Luc Rodeau pour le temps passé à suivre mon travail, son aide sur l'analyse statistique de mes résultats et surtout pour la grande pertinence des questions qu'il pose. Vous avez l'œil pour poser le doigt sur ce qui fait "mal" et c'est très formateur. Merci d'avoir participé à la lecture et aux corrections de ce mémoire.

Je remercie aussi le professeur Marie-José Freund-Mercier de m'avoir accueilli dans son laboratoire et d'avoir pu partager une passion commune : l'ocytocine.

Je tiens ensuite à remercier Madame Francine Herzog, Madame Catherine Moreau, Madame le Docteur Bernadette Lutz-Bucher et Madame le Docteur Sandra Bronner-Uhl pour leur gentillesse, leur aide technique et leurs précieux conseils nécessaires à la réalisation de certaines parties expérimentales de ce travail de thèse.

Enfin, je remercie aussi les habitants du laboratoire présents et passés qui m'ont conseillé, encouragé et soutenu : Riad, Mathias, Sylvain, Mathieu, Oliva, Eriko, Malika, Déborah, Alexandre, Jennifer, Cédric, Viviane, Raymonde. Merci pour toute votre sympathie.

Une mention "spéciale" pour Adrien qui m'a sorti du labo pour crapahuter dans la boue (DJENOU ! TCHAP TÊLOOO ! PO ME SÆÆÆ ! NOIR ET BLANC ! PO ME SÆÆÆ ! ALLEZ CRIG !). Merci pour le temps que tu as consacré à la lecture de ce mémoire pour le corriger. Merci aussi pour ton soutien et ton amitié.

A mes amis Jacky et Mélanie ; Ysabelle ; Erwann, Florence et leur petit bout de chou ; Eve ; Silvère ; mes petites infirmières préférées : Agata, Elisabeth, Nadine, Bénédicte, Thien ; Clément et Claire ; Jérôme et Agnès, Cyrille et Elodie, Franck et Delphine ; merci de votre soutien tout au long de ces années.

*Ce travail est dédié
A mes parents,
Ma famille
Et mes amis*

Résumé

Les couches superficielles de la moelle épinière constituent le premier relais d'intégration des informations nociceptives périphériques véhiculées par les fibres sensorielles de type C et A δ . Ces afférences sensorielles réalisent des synapses excitatrices avec des interneurons de la lamina II. Après traitement, ces informations sont acheminées vers les neurones de projection qui réalisent des synapses avec des structures supramédullaires. Les neurones de la lamina II sont la cible de contrôles locaux et supramédullaires permettant la modulation de l'intégration des informations nociceptives. Parmi les contrôles supramédullaires, le contrôle hypothalamo-médullaire ocytocinergique jouerait un rôle antinociceptif. Cependant, la majeure partie des données actuelles, concernant une action antinociceptive de l'ocytocine (OT), implique une action indirecte sur les neurones médullaires. Une injection intrathécale ou intracisternale d'OT augmente les seuils d'hyperalgie mécanique et thermique, lui conférant un effet antinociceptif. Ces effets mettent en jeu l'activation d'un contrôle inhibiteur des opiacés endogènes qui agit sur les structures nerveuses impliquées dans le traitement de l'information douloureuse. Nous nous sommes intéressé aux rôles et aux effets de l'OT sur l'activité des neurones de la lamina II, siège du traitement précoce de l'information nociceptive.

Nos résultats électrophysiologiques *in vitro*, obtenus à partir des tranches aiguës de moelle épinière, montrent qu'une fraction des neurones de la lamina II ont une baisse importante de leur excitabilité conduisant à une diminution de la capacité à générer des potentiels d'action (PA). Cet effet est mis en parallèle avec une modification importante des conductances ioniques dépendantes du potentiel. Ainsi, nous avons observé une inhibition des courants K⁺ I_{KDR} et I_A qui peuvent expliquer en partie cette diminution de l'excitabilité. Par ailleurs, nous suspectons que l'OT est capable d'inhiber les canaux Na⁺ dépendants du potentiel, jouant eux aussi un rôle dans la modulation de l'excitabilité des neurones.

En plus de cet effet postsynaptique, nous avons observé les conséquences de l'OT sur les différentes entrées synaptiques des neurones de la lamina II. Nos résultats montrent qu'une sous-population de neurones glutamatergiques de la lamina II possède des récepteurs OT terminaux. Ceux-ci, suite à l'activation du récepteur OT, permettent d'augmenter le tonus GABAergique favorisant l'inhibition du réseau d'interneurones de la lamina II. A l'aide d'une approche électrophysiologique *in vivo*, nous avons pu mettre en évidence que la stimulation électrique du noyau paraventriculaire de l'hypothalamus (source de l'OT médullaire) induisait une inhibition du transfert de l'information nociceptive. Cet effet passe par la mise en jeu d'une activation des neurones GABAergiques de la lamina II.

Dans des conditions pathologiques, nous avons pu mettre en évidence que ce contrôle ocytocinergique était activé suite à la mise en place d'une inflammation périphérique associée à une sensation de douleur. Ceci se caractérise d'une part, par une augmentation des contenus en OT médullaire et à une reprise de l'hyperalgie induite par un blocage du récepteur OT médullaire suite à l'inflammation. Par ailleurs, des données électrophysiologiques, obtenues récemment au laboratoire, montrent que dans ces conditions inflammatoires, le tonus inhibiteur GABAergique était favorisé par une synthèse de neurostéroïdes médullaires (contrôle inhibiteur local). Nos données permettent de préciser que le contrôle descendant ocytocinergique est, au moins, un des acteurs de l'activation de ce contrôle local.

Ce travail de thèse a permis de mettre en évidence que le contrôle descendant ocytocinergique joue un rôle important dans l'inhibition du transfert des informations nociceptives et ce à plusieurs niveaux. Ce contrôle limiterait l'hyperexcitabilité du réseau de neurones de la lamina II dans des conditions pathologiques.

Sommaire

Résumé	1
Sommaire	2
Introduction	5
Préambule	5
Partie I : Le système nociceptif	8
I : Les entrées sensorielles cutanées du système nociceptif	9
1. Les nocicepteurs	9
2. Les différentes sensations de douleur	10
3. L'activation des nocicepteurs périphériques	11
3.1. Le rôle des « TRP »	11
3.2. Les substances algogènes et les médiateurs de l'inflammation	12
3.3. La sensibilité périphérique	13
4. La neurochimie des terminaisons centrales des fibres afférentes sensorielles	14
4.1. Les acides aminés excitateurs	14
4.2. Les peptides	15
II : L'intégration primaire du message nociceptif : implication des couches superficielles de la moelle épinière	17
1. L'organisation des projections des afférences sensorielles dans la moelle épinière	17
2. La caractérisation et la classification des neurones de la substance gélatineuse	17
2.1. La morphologie des neurones de la lamina II	18
2.2. L'identité neurochimique des neurones de la lamina II	19
3. Les propriétés fonctionnelles des neurones de la lamina II : décharge en potentiel d'action et canaux ioniques	23
3.1. Les profils de décharge en potentiel d'action	23
3.2. Les canaux ioniques dépendants du potentiel membranaire	25
a) Les canaux ioniques sodium dépendants du potentiel membranaire dans la corne dorsale de la moelle épinière	26
b) Les canaux ioniques calcium dépendants du potentiel membranaire dans la corne dorsale de la moelle épinière	27
c) Les canaux activés par l'hyperpolarisation membranaire dans la lamina II	28
d) Les canaux ioniques potassium dépendants du potentiel membranaire dans la lamina II	28
3.3. Les rôles fonctionnels des conductances ioniques dans le contrôle de l'excitabilité des neurones de la lamina II	33
4. L'organisation du réseau d'interneurones de la lamina II	36
4.1. Les principaux récepteurs ionotropiques rencontrés dans la lamina II	37
a) Les récepteurs du glutamate	37
b) Le récepteur GABA _A	40
c) Le récepteur de la glycine	42
4.2. L'organisation fonctionnelle du réseau d'interneurones de la lamina II	43
a) Les articulations des neurones de la lamina II avec les fibres sensorielles et les neurones de la lamina I	43
b) Le rôle de l'inhibition dans le système nociceptif médullaire	45
5. Les contrôles segmentaires et intersegmentaires	47
6. Le rôle des neurones de projection	49
III : Les voies de sortie de l'information douloureuse	51
1. Les voies de sortie des neurones de projection	51
1.1. Le tractus spino-thalamique	51
1.2. Le tractus spino-mésencéphalique	52
1.3. Le tractus spino-réticulaire	52
1.4. Autres voies de sortie	52
2. Le rôle des voies nociceptives dans la discrimination sensorielle et affective de la douleur	53
IV. Les contrôles descendants modulateurs de l'intégration du message nociceptif	54
1. Les différents contrôles descendants modulateurs de l'activité médullaire	54
1.1. Les contrôles descendants monoaminergiques	55
a) Le contrôle descendant noradrénergique	56
b) Le contrôle descendant dopaminergique	56
c) Le contrôle descendant sérotoninergique	56
1.2. Les autres types de contrôles descendants	56
2. Le rôle de la transmission volumique	57
Partie II : Le système ocytocinergique et la nociception	60
I. Historique et l'action humorale de l'ocytocine	61
1. L'ocytocine, peptide neurohypophysaire	61
2. Le rôle de l'ocytocine sur l'utérus lors de la parturition	61
3. Le rôle de l'ocytocine sur la glande mammaire dans le réflexe d'éjection du lait	62
II. L'ocytocine et son récepteur	64
1. L'ocytocine	64
2. Le récepteur de l'ocytocine	65

3. Structure et voie de signalisation intracellulaire du récepteur de l'ocytocine	66
III. Le noyau paraventriculaire de l'hypothalamus	69
1. L'organisation du noyau paraventriculaire	69
1.1. La division magnocellulaire	70
1.2. La division parvocellulaire	70
2. Les efférences du noyau paraventriculaire	71
IV. Les propriétés centrales de l'ocytocine	74
V. Le système ocytocinergique et le système nociceptif	78
1. Les conséquences de la stimulation du noyau paraventriculaire sur la sensibilité thermique et mécanique	78
2. Les conséquences de l'injection centrale d'ocytocine sur la douleur	79
3. L'analgésie induite par le stress et le système ocytocinergique	80
4. L'action directe de l'ocytocine sur le système nociceptif médullaire	81
Les Objectifs	83
Matériels et Méthodes	84
1. L'enregistrement <i>in vitro</i> des neurones de la lamina II par la technique de « patch-clamp » en configuration cellule entière	85
1.1. Les animaux utilisés	85
1.2. L'anesthésie	85
1.3. La procédure de dissection	85
1.4. La préparation des tranches	86
1.5. Le montage expérimental et l'enregistrement électrophysiologique	87
a) Le montage expérimental	87
b) L'enregistrement électrophysiologique	87
c) Stockage et acquisition des données	90
1.6. Les protocoles expérimentaux et l'analyse des enregistrements électrophysiologiques	90
a) Les protocoles de stimulation en mode courant imposé et l'analyse des données	90
b) Les protocoles de stimulation en mode potentiel imposé et l'analyse des données	91
c) L'enregistrement des courants postsynaptiques et l'analyse des données	94
1.7. La préparation et l'application des substances pharmacologiques	95
a) Le blocage des récepteurs ionotropiques impliqués dans une transmission synaptique rapide	95
b) Le blocage des canaux ioniques dépendants du potentiel membranaire	95
c) Le traitement chronique des tranches de moelle épinière	96
d) La préparation des substances pharmacologiques	96
2. L'enregistrement <i>in vivo</i> des neurones de la lamina II par la technique d'enregistrement extracellulaire	97
2.1. Les animaux utilisés	97
2.2. L'anesthésie et la procédure de dissection	97
2.3. L'enregistrement électrophysiologique et les procédures expérimentales	98
3. Le modèle d'animaux inflammatoire : inflammation périphérique induite par la λ-carragénine	99
4. L'immunocytochimie et la révélation de la biocytine à la suite des expériences de « patch-clamp »	100
5. Le dosage radio-immunologique de l'ocytocine dans la moelle épinière	100
6. L'évaluation de l'hyperalgie mécanique et la procédure d'injection intrathécale d'agoniste et d'antagoniste du récepteur de l'ocytocine	102
6.1. La procédure d'évaluation de l'hyperalgie mécanique	102
6.2. La procédure d'injection intrathécale	103
7. L'analyse statistique	104
Résultats	105
Partie I : Propriétés électrophysiologiques des neurones de la lamina II et la modulation de leur excitabilité par l'ocytocine	105
I. Caractéristiques des propriétés membranaires des neurones de la lamina II	106
1. Profil de décharge en potentiel d'action	106
2. Propriétés membranaires des neurones de la lamina II	108
2.1. Les caractéristiques du potentiel d'action	108
2.2. Cinétique de l'AHP des neurones de la lamina II	108
2.3. Propriétés des neurones lors de stimulations hyperpolarisantes	109
2.4. Propriétés membranaires passives	110
3. Corrélations entre le profil de décharge en potentiel d'action, la localisation spatiale du neurone et sa morphologie	111
II. Modulation de l'excitabilité des neurones de la lamina II par l'ocytocine	112
1. Effets de l'ocytocine sur les profils de décharges en potentiel d'action des neurones de la lamina II	112
2. Effet de l'ocytocine sur les propriétés membranaires passives et actives	114
III. Incidences fonctionnelles de l'ocytocine sur les conductances ioniques potassium des neurones de la lamina II	116
1. Modulation des conductances ioniques potassium par l'ocytocine	117
1.1. La conductance ionique maintenue	117
1.2. La conductance ionique transitoire	118

1.3. Effet de la 4-AP sur l'excitabilité des neurones de la lamina II	119
2. Incidences fonctionnelles du potentiel membranaire sur l'excitabilité des neurones et les conséquences de l'application de l'ocytocine	120
Partie II : Conséquences fonctionnelles de l'activation du récepteur de l'ocytocine sur l'activité du réseau d'interneurones de la lamina II	122
I. Les effets de l'ocytocine sur la transmission synaptique rapide glutamatergique	123
1. Les effets de l'ocytocine sur la transmission synaptique miniature médiée par le récepteur AMPA	123
2. Les effets de l'ocytocine sur la transmission synaptique spontanée médiée par le récepteur AMPA	125
II. Effet de l'ocytocine sur la transmission synaptique rapide glycinergique	127
III. Effet de l'ocytocine sur les transmission synaptique rapide GABAergique miniature médiée par le récepteur GABA_A	128
IV. Effet de l'ocytocine sur les transmission synaptique rapide GABAergique spontanée médiée par le récepteur GABA_A	129
V. Contribution des récepteurs ionotropiques du glutamate à la libération du GABA dans des conditions de libération spontanée	131
VI. Conséquences fonctionnelles de l'activation du récepteur ocytocine sur l'activité des neurones de la lamina II <i>in vivo</i> lors de stimulations nociceptives	132
Partie III : Conséquences fonctionnelles d'une inflammation périphérique sur les neurones de la lamina II	134
I. Caractérisation du modèle animal de douleur inflammatoire périphérique par un test de sensibilité mécanique	135
II. Les taux médullaires d'ocytocine sont augmentés lors d'une inflammation périphérique	136
III. Modulation de l'hyperalgie mécanique lors d'une inflammation périphérique	137
IV. Modification de l'excitabilité des neurones de la lamina II lors d'une inflammation périphérique	139
1. Changement des profils de décharge en potentiel d'action	139
2. Modification des propriétés membranaires	140
Partie IV : Perspectives des travaux en cours : effets chroniques de l'ocytocine sur le tonus inhibiteur GABAergique des neurones de la lamina II	141
I. Contexte scientifique	142
II. Méthodologie	142
III. Résultats	143
Discussion	145
I. Les effets postsynaptiques de l'ocytocine sur les neurones de la lamina II : l'ocytocine inhibitrice de l'excitabilité neuronale	146
1. Les propriétés électrophysiologiques des neurones de la lamina II	146
2. Rôle de l'OT dans la modulation de l'excitabilité des neurones de la lamina II	148
3. Les voies de signalisation intracellulaires et les seconds messagers impliqués dans le contrôle de l'excitabilité des neurones de la lamina II	154
II. Les effets de l'ocytocine sur le réseau de neurones de la lamina II : l'ocytocine potentialise la transmission GABAergique	157
1. La localisation des récepteurs OT	157
2. L'organisation fonctionnelle du réseau de neurones de la lamina II et les conséquences de l'activation du récepteur OT dans ce réseau	163
III. Les conséquences physiopathologiques de l'activation du contrôle descendant ocytocinergique	168
Bibliographie	172
Annexes	
Annexe 1 : Revue scientifique avec comité de lecture Fast nongenomic effects of steroids on synaptic transmission and role of endogenous neurosteroids in spinal pain pathways.	
Annexe 2 : Article scientifique avec comité de lecture Inflammatory pain upregulates spinal inhibition via endogenous neurosteroid production.	
Annexe 2 : Article scientifique avec comité de lecture Production of 5alpha-reduced neurosteroids is developmentally regulated and shapes GABA(A) miniature IPSCs in lamina II of the spinal cord.	

Introduction

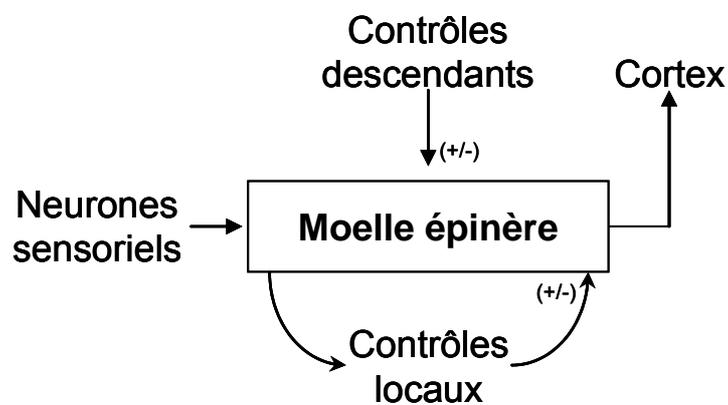


Figure 1 : La moelle épinière, premier centre d'intégration et de modulation des informations nociceptives dans le SNC.

Les informations nociceptives sont détectées par des neurones sensoriels spécialisés, puis transmises à la moelle épinière, premier centre de traitement de l'information nociceptive, avant d'être envoyées au cortex. La moelle épinière tient une place prépondérante par sa position dans la chaîne de structures impliquées dans l'intégration du message nociceptif. Les neurones de la moelle épinière sont sous la dépendance de contrôles descendants excitateurs et inhibiteurs. De plus, des contrôles médullaires locaux segmentaires, intersegmentaires sont capables de moduler l'activité des neurones médullaires du système nociceptif.

(+) : excitateur ; (-) inhibiteur.

Préambule

Le terme « **nociception** » provient du latin *nocere* qui signifie « nuire ». La nociception peut être définie comme la détection de stimuli intenses internes ou externes susceptibles de porter atteinte à l'intégrité de l'organisme. La **douleur**, quant à elle, correspond à une sensation désagréable qui survient en réponse à une atteinte tissulaire réelle ou potentielle (suivant la définition de l'« International Association for the Study of Pain »). Une vue d'ensemble, très générale (figure 1), confère à la moelle épinière une place importante dans le traitement précoce de l'information nociceptive. L'origine du stimulus nociceptif peut être externe (extéroception) : de nature mécanique (coupure, pression intense, pincement, ...), thermique (brûlure due à des températures inférieures à 10 °C et supérieures à 43 °C), chimique (substances irritantes, acides, bases, ...) et électrique. Le stimulus peut aussi être interne (intéroception) : de nature mécanique (forte distension d'un viscère), chimique (ischémie ou nécrose tissulaire). La détection de ces signaux est réalisée par des neurones sensoriels particuliers du système nerveux périphérique (SNP) : les **nocicepteurs**. Ce sont des neurones ayant une morphologie particulière (pseudo-unipolaire en T) avec des fibres sensorielles primaires qui constituent le lien entre la périphérie et la moelle épinière. Leurs terminaisons périphériques sont libres et possèdent des récepteurs spécialisés permettant la détection des divers stimuli nociceptifs.

La détection du stimulus nociceptif par le nocicepteur produit un potentiel d'action qui est transmis vers la moelle épinière où se situe le premier relais d'intégration. Lorsque le « message » nociceptif est acheminé jusqu'au cortex et/ou au système limbique, une sensation consciente de douleur peut être perçue. Il existe deux types de douleur avec des caractéristiques et des conséquences distinctes. La douleur aiguë ou douleur physiologique (à court terme) et la **douleur** « anormale » ou **pathologique** (à long terme) qui persiste parfois après récupération d'une lésion tissulaire ou en absence de celle-ci. La **douleur aiguë** joue un rôle important pour renseigner l'organisme sur la localisation de la zone stimulée et d'associer le stimulus nociceptif à une sensation désagréable de douleur. Elle permet, par ailleurs, de renseigner l'organisme sur l'état de récupération de la zone lésée. L'activation du système nociceptif induit souvent une activation du système nerveux autonome, dont la réponse est similaire à celle observée au cours d'un stress. Cette réponse se caractérise par une augmentation de la pression artérielle, de la fréquence cardiaque et par une réponse endocrine

(sécrétion de corticostérone). La mise en jeu des contrôles autonomes est accompagnée d'une stimulation de contrôle nerveux visant à réduire la sensation douloureuse. Sur le plan clinique, on parlera d'une **douleur chronique** si les douleurs persistent au-delà de 3 à 6 mois. Dans ces conditions, la douleur chronique n'exerce plus son rôle protecteur en s'inscrivant dans le temps, mais elle devient handicapante pour l'organisme. En effet, ce type de douleur, chez l'homme, constitue le contingent de douleurs rebelles aux traitements actuels. Elle s'accompagne souvent de la mise en jeu de processus inflammatoires consécutifs à la lésion. L'inflammation de la zone lésée, tout en favorisant la réparation tissulaire, est accompagnée d'une augmentation de l'activité du système nociceptif. Le maintien de cette sensation douloureuse, pendant la période de réparation tissulaire, permet à l'individu d'éviter d'exposer, à nouveau, la zone lésée à une stimulation douloureuse. Les symptômes douloureux pathologiques observés au cours de cette phase sont : l'hyperalgie et l'allodynie. L'**hyperalgie** se caractérise par une augmentation de la sensation douloureuse provoquée par une stimulation nociceptive donnée. Cependant, deux types d'hyperalgie se distinguent par leur localisation : l'hyperalgie primaire qui concerne le lieu de la zone lésée et l'hyperalgie secondaire qui implique les territoires entourant la lésion (ces deux types d'hyperalgie sont régies par des mécanismes différents). L'**allodynie**, quant à elle, est une douleur provoquée à la suite d'une stimulation non nociceptive.

Comme je l'ai indiqué précédemment, les **nocicepteurs** stimulés produisent des potentiels d'action qui sont acheminés à la **moelle épinière** pour subir un premier traitement par les neurones de la corne dorsale. Dans mon travail de thèse, je me suis intéressé plus particulièrement aux interneurones de la **lamina II**. Ces interneurones reçoivent directement et indirectement des projections des nocicepteurs et jouent un rôle important dans le traitement initial des informations nociceptives. Ils sont ensuite interconnectés aux neurones de projection qui vont à leur tour transmettre l'information aux centres supramédullaires. A chaque relais supramédullaire (et médullaire), il existe des **systèmes modulateurs** (intrinsèques ou extrinsèques) qui vont pouvoir favoriser ou inhiber le transfert de l'information vers l'étage supérieur. A côté des contrôles locaux (médullaires), de nombreux **contrôles descendants**, issus de structures supramédullaires, sont impliqués. Les interneurones de la lamina II sont la cible privilégiée de ces contrôles.

Dans ce travail, je me suis intéressé au rôle du contrôle descendant hypothalamo-médullaire, impliquant l'ocytocine (OT) dans la modulation de l'excitabilité du réseau d'interneurones de la lamina II. Une grande partie de ce travail a fait appel aux techniques classiques d'électrophysiologie afin de mieux appréhender les rôles de l'ocytocine dans la modulation de l'excitabilité des neurones de la lamina II et des transmissions synaptiques (excitatrices et inhibitrices), chez l'animal sain. De plus, en collaboration avec l'équipe de recherche du Docteur Miguel Condes-Lara¹, nous avons observé les conséquences fonctionnelles de l'activation du contrôle OT *in vivo* sur la transmission des messages nociceptifs véhiculés par les nocicepteurs C et A δ . Dans un deuxième temps, en développant un modèle animal de douleur inflammatoire, nous avons cherché à mettre en évidence l'implication de ce contrôle ocytocinergique en utilisant une approche comportementale (test nociceptif), pharmacologique (injection intrathécale) et en dosant directement l'OT médullaire.

L'introduction de ce mémoire de thèse, dans un premier temps, décrira le système nociceptif dans son ensemble. Loin de faire une revue exhaustive, je me contenterai de faire une synthèse des points les plus pertinents en rapport avec ce travail de thèse, afin de donner les informations nécessaires à une bonne compréhension de ce travail. Au sein de cette partie, je focaliserai mon attention sur la description du réseau d'interneurones de la lamina II qui a constitué mon modèle d'étude. Enfin, je ferai une description du système ocytocinergique hypothalamo-médullaire et une mise à jour du rôle de ce système dans la modulation de la nociception.

¹ Institut de Neurobiologie. Université Autonome de Mexico, Campus de Juriquilla, Queretaro, Mexique.

Partie I :

Le système nociceptif

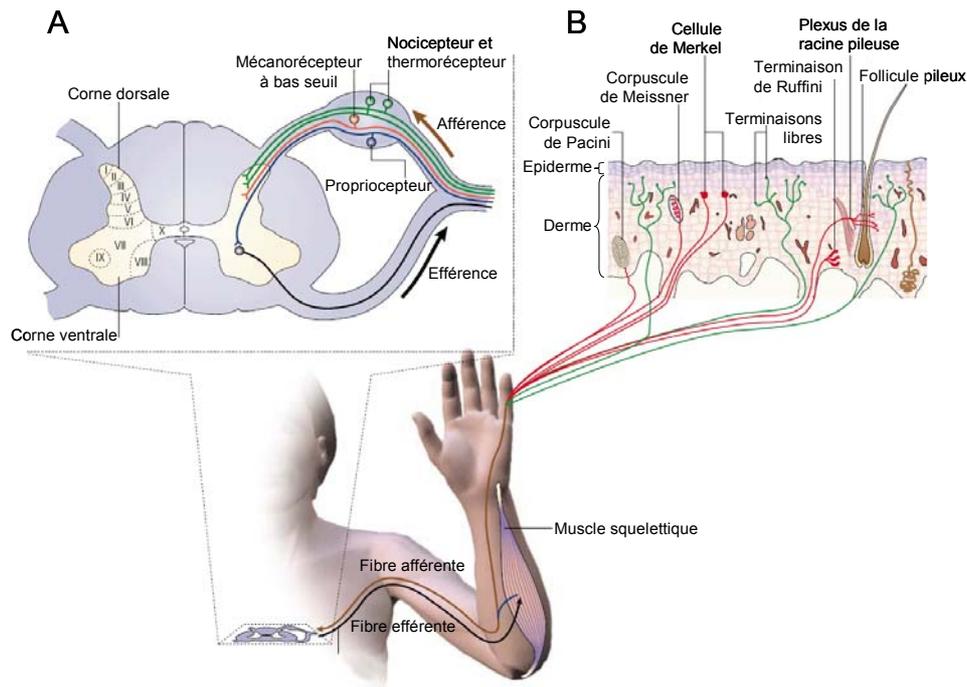


Figure 2 : Organisation anatomique et fonctionnelle de la sensibilité tactile jusqu'aux relais médullaires.

A : Le nerf spinal est formé de la jonction de la racine ventrale (motrice) et de la racine dorsale (sensitive) et permet l'innervation de la peau. Les flèches illustrent la direction de la propagation des informations nerveuses. Le corps cellulaire des neurones sensoriels est localisé dans le ganglion rachidien de la racine dorsale. Celui-ci comprend différentes classes de neurones sensoriels : propriocepteur (bleu), mécanorécepteur (rouge), nocicepteur et thermorécepteur (vert). La terminaison périphérique des afférences sensorielles primaires se projette dans la peau (derme et épiderme) alors que leur terminaison centrale se projette sur les laminæ I à VI de la moelle épinière.

B : Les terminaisons périphériques des mécanorécepteurs cutanés (rouge) sont spécialisées et permettent la détection de signaux non nociceptifs comme la pression, le frottement, etc. Dans le cas des nocicepteurs et des thermorécepteurs, les terminaisons périphériques sont libres et se déploient dans tout le derme. Ils sont activés par des stimulations intenses, nocives pour l'organisme.

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

Tableau 1 : Les différents types de fibres sensorielles cutanées.

Type	Diamètre (μm)	Myélinisation	Vitesse de conduction (m.s^{-1})
A β	6-20	importante	30 à 120
A δ	1-5	intermédiaire	4 à 30
C	0,3-1,5	non	0,4 à 2,0

Caractéristiques morphologiques et vitesses de conduction des afférences primaires des différents neurones sensoriels cutanés. Les données présentées sont issues de la revue de Guirimand et Le Bars (1996).

I. Les entrées sensorielles cutanées du système nociceptif

1. Les nocicepteurs

Les nocicepteurs sont des neurones spécialisés dans la détection des stimuli sensoriels externes ou internes, de nature physique ou chimique. Ces signaux encodés sous la forme de potentiels d'action (PA) par le nocicepteur, sont acheminés vers le système nerveux central (SNC) afin d'être intégrés. En réponse à cette stimulation, l'organisme va développer une réponse appropriée. Le corps cellulaire de ces neurones sensoriels est situé dans les chaînes de ganglions rachidiens disposées latéralement à la colonne vertébrale en ce qui concerne les informations issues des membres et du tronc.

Les nocicepteurs, comme les autres neurones sensoriels, sont des neurones pseudo-unipolaires en « T » dont les projections périphériques innervent un territoire cutané donné et les terminaisons centrales réalisent des synapses avec les neurones des cornes dorsales de la moelle épinière. Ces afférences sensorielles réalisent donc, un lien entre la périphérie et le SNC (figure 2). L'existence des nocicepteurs, c'est-à-dire, de neurones sensoriels pouvant être activés spécifiquement par une stimulation nocive pour l'organisme a été proposé par Sherrington (1906). Depuis, des études morphologiques et fonctionnelles ont permis de décrire les caractéristiques des afférences sensorielles primaires.

En ce qui concerne la sensibilité cutanée, trois types d'afférences sensorielles primaires sont observés : $A\beta$, $A\delta$ et C (Guirimand et Le Bars, 1996). Il est possible de classer les afférences sensorielles primaires en fonction de la modalité sensorielle véhiculée. D'autres critères peuvent être pris en compte afin de les distinguer. La vitesse de conduction, le diamètre et le degré de myélinisation des fibres constituent les critères classiques (tableau 1). Il est également possible de caractériser les nocicepteurs (types $A\delta$ et C) sur la base de critères neurochimiques (libération de peptides) ou selon l'expression de marqueur spécifiques (récepteurs, canaux ioniques, ...). Toutefois, ces deux critères ne sont pas stricts car ils évoluent souvent dans des conditions pathologiques de douleur inflammatoire et neuropathique.

Les afférences sensorielles cutanées de type $A\beta$ détectent exclusivement des stimulations non nociceptives, d'origine thermique (thermorécepteur) ou mécanique (mécanorécepteur à bas seuil d'activation). Leurs terminaisons périphériques possèdent des spécialisations

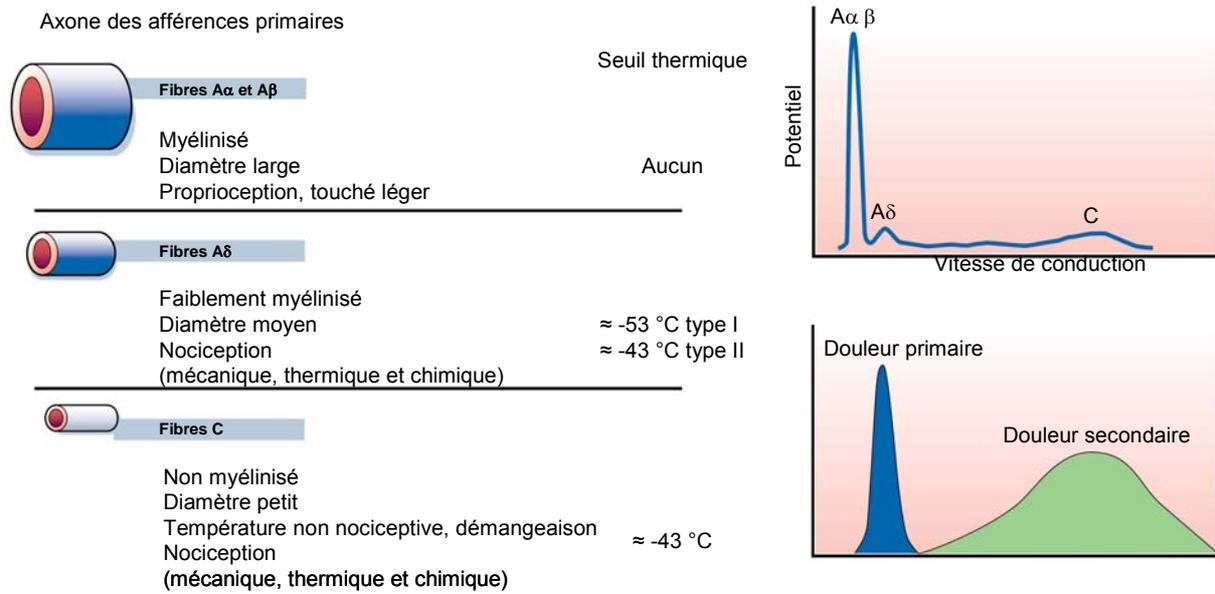


Figure 3 : Les modalités sensorielles des différentes fibres sensorielles et caractérisation de leurs réponses.

Les fibres sensorielles sont activées par différentes modalités sensorielles et la réponse est identifiable par leur vitesse de conduction : les fibres rapides (A δ) sont responsables de la douleur primaire alors que les fibres lentes sont responsables de la douleur secondaire. Les fibres sensorielles ont des vitesses de conduction directement liées à leur diamètre et à leur niveau de myélinisation.

Modifié d'après Julius et Basbaum (2001)

déterminant le type de modalité sensorielle détectée (pression, frottement, tapotement, ...) : corpuscules de Pacini, de Meisner, de Ruffini, disques de Merkel, etc. (figure 2 B). Les afférences sensorielles de type C et A δ , quant à elles, sont responsables de la transmission des informations nociceptives (mécaniques, thermiques, chimiques). Leurs terminaisons sont libres (figure 2 B). La répartition des terminaisons libres dans la peau est assez homogène d'un territoire à l'autre (200 terminaisons libres/cm²). Cette forte densité facilite la localisation et la délimitation de la zone lésée.

La peau comprend environ 70 % de fibres C, 20 % de fibres A δ et 20 % de fibres A β (Guirimand et Le Bars, 1996). Les afférences périphériques des nocicepteurs C sont polymodales, c'est-à-dire, qu'elles répondent à des stimulations de nature diverse : thermique, chimique et mécanique (figure 3, gauche). Certaines des afférences périphériques de type A δ sont elles aussi polymodales et ont des caractéristiques assez similaires aux fibres de type C. Du point de vue fonctionnel, une des caractéristiques propre aux nocicepteurs est leur capacité à répondre de manière linéaire à l'intensité de la stimulation alors que les neurones sensoriels non nociceptifs répondent linéairement jusqu'à un maximum à partir duquel se développe un plateau malgré l'augmentation de la stimulation (Meyer et Campbell, 1981).

2. Les différentes sensations de douleur

Chez le sujet éveillé, l'enregistrement de fibres sensorielles isolées par des microélectrodes insérées dans le nerf permet de faire une corrélation entre le type de fibres activées et la sensation perçue face à cette stimulation. Une stimulation de faible intensité provoque une sensation tactile localisée par l'activation des afférences primaires A β . L'augmentation de l'intensité de la stimulation active les afférences primaires A δ et la sensation devient douloureuse, localisée et de type picotements, fourmillement. Enfin pour des stimulations plus fortes, l'activation des afférences primaires C induit une douleur de type brûlure diffuse et mal localisée (Guirimand et Le Bars, 1996). D'une manière générale (figure 3, droite), lorsque la peau est soumise à une stimulation nociceptive, l'activation des afférences de type A δ est responsable de la première phase douloureuse rapide (douleur primaire) avec une sensation de piqûre localisée alors que la stimulation des afférences primaires de type C (non myélinisées) est associée à la phase douloureuse secondaire plus tardive, évoquant une douleur « sourde » ou de brûlure diffuse dont la localisation est moins

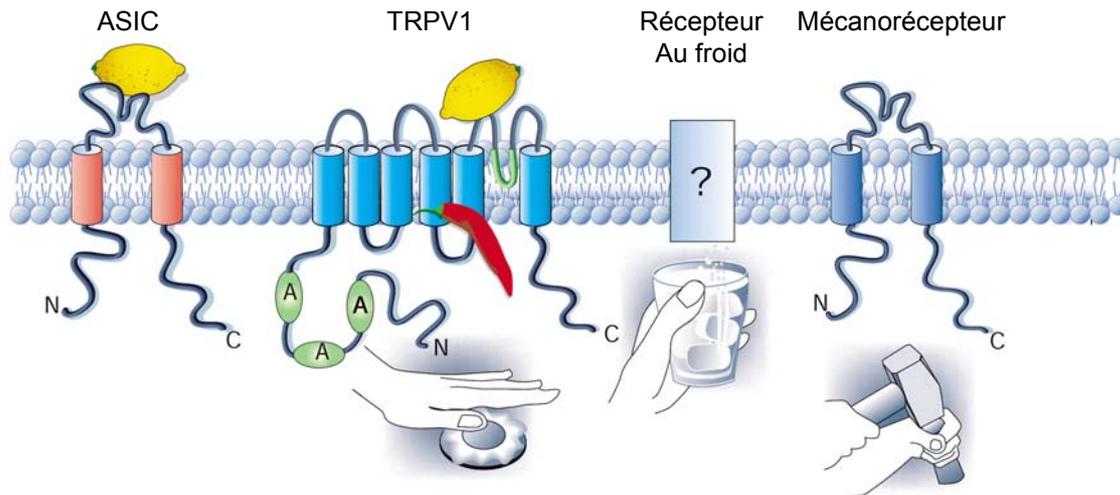


Figure 4 : Quelques récepteurs-canaux impliqués dans l'activation des nocicepteurs.

Les récepteurs-canaux sont constitués de l'assemblage de plusieurs sous-unités dont la structure est schématisée ci-dessus. Ils réalisent un pore dont l'ouverture est activée par une ou plusieurs modalités sensorielles. Le récepteur TRPV1 est sensible à la chaleur, l'acide et la capsaïcine. Les ASIC sont des récepteurs canaux sensibles aux variations de pH. La distension, la pression exercée sur le tissu active les mécanorécepteurs. A ce jour, le récepteur sensible au froid n'a pas été clairement identifié.

Modifié d'après Julius et Basbaum (2001)

Tableau 2 : Les canaux TRP des mammifères

Nom du canal	Distribution cellulaire	Modalité sensorielle
TRPV1	Ganglion rachidien, ganglion du nerf trijumeau, vessie	T>43 °C, acide, capsaïcine, ester de phorbol, N-arachidonyl dopamine, métabolites de l'acide arachidonique,
TRPV2	Ganglion rachidien, moelle épinière, cerveau, intestin, rate	T>52 °C
TRPV3	Ganglion rachidien, ganglion du nerf trijumeau, moelle épinière, cerveau, kératinocytes, langue	T>30-39 °C, camphre
TRPV4	Ganglion rachidien, ganglion du nerf trijumeau, cerveau, kératinocytes, rein, rate, testicule, endothélium, foie, cœur	T>25 °C, hypotonicité, stimulus nociceptif mécanique, acide, ester de phorbol, endocannabinoïdes, métabolites de l'acide arachidonique

Localisations tissulaires et activateurs de quelques canaux TRP. Données adaptées de Wang et Woolf (2005).

précise (Melzack et al., 1962; Guirimand et Le Bars, 1996; Millan, 1999). L'interprétation donne comme rôle aux afférences sensorielles de type A δ d'initier la mise en place des mécanismes moteurs afin de soustraire l'organisme à la stimulation nociceptive (Clark *et al.*, 1935), alors que les afférences sensorielles de type C joueraient un rôle dans l'activation des mécanismes neuro-végétatifs (modulation des systèmes respiratoire et cardiovasculaire par exemple). Il est intéressant aussi de noter que les champs récepteurs périphériques des différents neurones sensoriels se recouvrent très largement, de telle sorte qu'une stimulation très localisée aura quand même pour conséquence d'activer de manière concomitante de nombreuses afférences sensorielles de type A β , A δ et C (Guirimand et Le Bars, 1996; Millan, 1999).

3. L'activation des nocicepteurs périphériques

Les nocicepteurs sont très largement polymodaux, donc sensibles à des stimulations mécaniques (pincement, piqûre, frottement,...), thermiques (>43°C) et chimiques. En particulier, la chémoréception est très importante dans la perception de douleurs dues à une inflammation périphérique et lors d'une lésion tissulaire. En effet, lors de ce processus, de nombreux médiateurs sont libérés dans le liquide interstitiel suite aux dommages tissulaires. Ces substances dites algogènes, produites localement ou en provenance de la circulation systémique, jouent un rôle fondamental dans l'activation des nocicepteurs.

3.1. Le rôle des « TRP »

Les nocicepteurs sont équipés de protéines membranaires particulières, à leurs terminaisons périphériques, permettant la détection de différents stimuli nociceptifs (figure 4). Ces protéines sont, par exemple, de type TRP (« transient receptor potential ») codées par 28 gènes différents chez l'homme (Patapoutian et al., 2003; Numazaki et Tominaga, 2004; Wang et Woolf, 2005). Dans la grande majorité des cas, ces canaux sont constitués par l'assemblage de sous-unités possédant 6 domaines transmembranaires (Julius et Basbaum, 2001). Du point de vue structural, ils s'apparentent aux canaux activés par l'étirement et aux canaux Na⁺ épithéliaux. Les canaux TRP sont à la fois des chémorécepteurs et des thermorécepteurs qui se subdivisent en 6 familles. Parmi ces récepteurs, TRPV1, TRPV2, TRPV3, TRPV4 et TRPM8 sont des thermorécepteurs au chaud. TRPA1 serait sensible au froid, mais son rôle

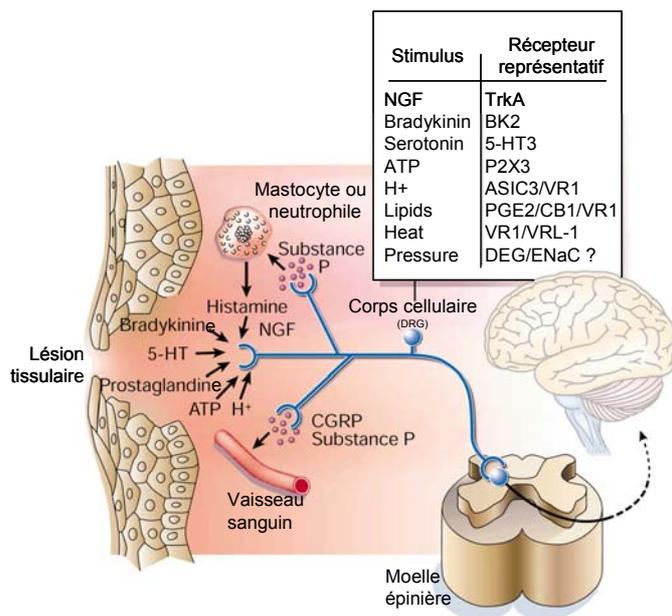


Figure 5 : La réponse inflammatoire périphérique.

Des peptides (bradykinine), lipides (prostaglandines), neurotransmetteurs (sérotonine et ATP) et des neurotrophines (NGF) sont libérés à la suite d'une lésion tissulaire. Ils vont activer, moduler et sensibiliser la terminaison périphérique des nocicepteurs. En se fixant sur leurs récepteurs spécifiques présents à la surface de la membrane des nocicepteurs, ils vont activer et moduler l'activité des nocicepteurs. Ces molécules participent aussi à la mise en place du processus d'inflammation neurogène par une communication cellulaire étroite entre le nocicepteur, les cellules de la peau et les "cellules de l'inflammation" (mastocytes). Dans le tableau, sont illustrés quelques facteurs et les cibles moléculaires intervenant dans cette signalisation.

5-HT : sérotonine ; NGF : "Nerve Growth Factor" ; CGRP : peptide associé au gène de la calcitonine.

Modifié d'après Julius et Basbaum (2001)

dans la détection de ce *stimulus* reste discuté. Lorsque l'on stimule les TRP par la chaleur, la courbe d'activation du canal est déplacée vers des potentiels plus négatifs de telle sorte que la probabilité d'ouverture du canal augmente alors que le potentiel de membrane reste stable (Voets *et al.*, 2004). Ceci favorise l'ouverture du canal, permettant une dépolarisation transitoire du potentiel membranaire. Le tableau 2 montre les différentes modalités pour lesquelles les canaux TRPV1-4 sont capables de répondre. TRPV1 est très exprimé à la membrane des nocicepteurs de type C et il est activé par des températures supérieures à 43 °C, par les composés vanilliques, comme la capsaïcine (Caterina *et al.*, 1997) et il est sensible à des diminutions de pH (Welch *et al.*, 2000). Le seuil d'activation de ce canal à la température est très proche de celui relevé dans les neurones sensoriels natifs (Tominaga *et al.*, 1998; Welch *et al.*, 2000). De plus, des souris déficientes pour le récepteur TRPV1 ne répondent plus à la capsaïcine et seulement à des températures supérieures à 52 °C (Caterina *et al.*, 2000; Davis *et al.*, 2000). Dans ce cas, c'est un autre membre de la famille des canaux TRP qui peut s'activer : le TRPV2 (Caterina *et al.*, 1999).

3.2. Les substances algogènes et les médiateurs de l'inflammation

Les nocicepteurs peuvent être activés directement par la stimulation nociceptive ouvrant les canaux spécialisés que nous venons de voir. Ils peuvent aussi être activés par d'autres récepteurs suite à la stimulation nociceptive. C'est le cas lors de la réponse inflammatoire douloureuse (Guirimand et Le Bars, 1996; Millan, 1999). En effet, lors d'une lésion tissulaire, la dégradation du tissu va libérer des médiateurs de l'inflammation (figure 5). A titre d'exemple, l'ATP va être libéré, par les cellules lésées, agissant ainsi sur les récepteurs purinergiques P2X (ionotropiques) et P2Y (métabotropiques). L'ATP peut aussi être libéré lors de la stimulation nociceptive par des cellules non lésées (cellules épithéliales, mastocytes, neurones sensoriels) et agir de façon autocrine et paracrine sur les terminaisons libres des nocicepteurs. En plus de l'ATP, sont libérés d'autres médiateurs : de type aminés (bradykinine, sérotonine, etc.) ainsi que des ions (K^+ , H^+). Au sein de la zone lésée, on observe une diminution de pH. Les H^+ peuvent activer des canaux cationiques non sélectifs sensibles au pH, les ASIC, qui vont dépolariser la terminaison libre du nocicepteur, augmentant ainsi l'excitabilité de ce dernier. Ce phénomène est à l'origine de l'extension de l'hyperalgie autour de la zone non lésée et de la formation d'un foyer primaire (zone lésée) et secondaire (zone saine) de l'hyperalgie.

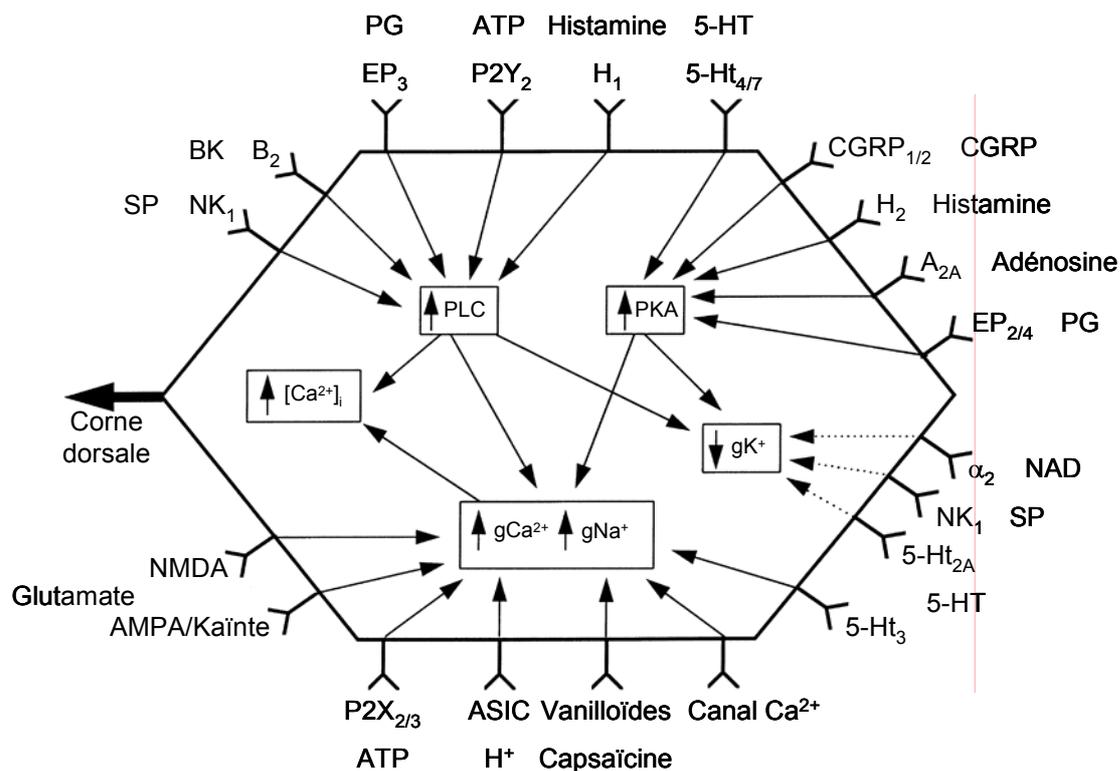


Figure 6 : Les divers récepteurs membranaires exprimés à la surface des nocicepteurs et leurs actions synergiques sur les voies de transductions impliquées dans la modulation des conductances ioniques.

Le schéma présente les différents médiateurs libérés localement lors d'une lésion tissulaire et leurs récepteurs spécifiques. Ces derniers sont capables de moduler les voies de transduction intracellulaires classiques activant PLC et PKA. Les effecteurs terminaux de ces voies sont des conductances ioniques membranaires, ainsi que les stocks intracellulaires de calcium. L'activation de ces récepteurs a pour conséquence d'augmenter l'excitabilité des nocicepteurs par une potentialisation des canaux Na⁺ et une inhibition des canaux K⁺. Par ailleurs, des mécanismes de contrôle génomique à plus long terme peuvent augmenter l'excitabilité des nocicepteurs par l'expression de protéines particulières, dont des canaux ioniques (non figuré).

SP : substance P ; BK : bradykinine ; PG : prostaglandines ; 5-HT : sérotonine ; CGRP : peptide associé au gène de la calcitonine ; NAD : noradrénaline ; PLC : phospholipase C ; PKA : protéine kinase AMPc dépendante ; gK⁺ : conductance ionique.

Modifié d'après Millan (1999)

3.3. La sensibilisation périphérique

Lors d'une inflammation ou d'un trauma, se met en place un mécanisme particulier appelé la sensibilisation périphérique (Cesare et McNaughton, 1997; Basbaum, 1999; Millan, 1999; Julius et Basbaum, 2001; Zimmermann, 2001; Wang et al., 2006). Ce phénomène fait intervenir les médiateurs présentés ci-dessus. Il correspond à un mécanisme d'auto-entretien de l'hyperexcitabilité des terminaisons périphériques des nocicepteurs qui permet d'étendre l'hyperalgie en dehors de la zone lésée, créant ainsi un foyer primaire (zone lésée) et un foyer secondaire (zone saine) de l'hyperalgie. Les médiateurs libérés, par leur action autocrine ou paracrine, vont activer leurs récepteurs spécifiques exprimés à la terminaison des nocicepteurs (figure 6). Ces récepteurs membranaires vont activer et/ou moduler les voies de transduction intracellulaires classiques médiées par les protéines kinases PKA et PKC (figure 6). En effet, par exemple, la prostaglandine E₂ (PGE₂) contribue à la sensibilisation périphérique lors des processus inflammatoires. Lors de la stimulation intense des nocicepteurs, l'adénylate cyclase est activée augmentant ainsi l'AMP cyclique (AMPc) intracellulaire. Ceci permet d'activer la PKA qui va inhiber les conductances K⁺ sensibles à cette kinase. Une telle inhibition peut être médiée par la PGE₂ et entraîner une augmentation de l'excitabilité des neurones sensoriels (Nicol et al., 1997; Evans et al., 1999; Jiang et al., 2003). D'un autre côté, la voie de la phospholipase C activant la PKC est aussi impliquée dans la sensibilisation périphérique. Par exemple, la bradykinine sensibilise la réponse des nocicepteurs à une stimulation thermique par cette voie en potentialisant l'ouverture des canaux Na⁺ afin de favoriser l'excitabilité du neurone (Cesare et McNaughton, 1997). De plus, il a été montré que l'action de la bradykinine sur les terminaisons des nocicepteurs facilite la libération de la substance P et de CGRP (Barber et Vasko, 1996; Frayer et al., 1999). Un tel mécanisme peut aussi faire intervenir la voie PKA par l'activation des récepteurs P2Y de l'ATP (Huang *et al.*, 2003) et les prostaglandines (PGE₂ et PGI₂) peuvent potentialiser la libération de substance P et de CGRP, induite par la bradykinine (Hingtgen *et al.*, 1995). Dans ces mécanismes de libération, les voies de transduction intracellulaires sont donc synergiques afin de renforcer et d'entretenir la sensibilisation des nocicepteurs.

4. La neurochimie des terminaisons centrales des fibres afférentes sensorielles

L'activation par une stimulation intense des terminaisons périphériques des nocicepteurs va générer des PA qui vont se propager vers la terminaison centrale. Cette projection centrale réalise des synapses avec les neurones de la corne dorsale de la moelle épinière. Le transfert de l'information est assuré par la libération de neurotransmetteurs « classiques » et de nombreux peptides. Cette première synapse du système nociceptif est excitatrice.

4.1. Les acides aminés excitateurs

L'acide aminé excitateur majeur intervenant entre la fibre sensorielle primaire et le neurone de la corne dorsale de la moelle épinière est le glutamate. De l'aspartate, de la sérine et de la taurine sont aussi libérés (Todd et Spike, 1993). La présence de glutamate dans les vésicules des terminaisons centrales des nocicepteurs et son rôle ont été confirmés dans la transmission des informations nociceptives. Ainsi, Battaglia et Rustioni (1988) ont mis en évidence par immunocytochimie, sur des coupes de ganglions rachidiens de rat la coexistence de substance P, de glutamate et de glutaminase dans une population de neurones sensoriels de petite taille qui est un des critères caractérisant les nocicepteurs. La révélation de l'expression de marqueurs spécifiques de la transmission glutamatergique est une autre stratégie employée actuellement avec l'utilisation d'anticorps dirigés contre les transporteurs vésiculaires du glutamate : les VGLUT. Il a été montré que le transporteur VGLUT2 était exprimé sur des nocicepteurs présentant le récepteur TRPV1, marqueur majoritairement exprimé par les afférences primaires de type C (Hwang *et al.*, 2004). Enfin, des études électrophysiologiques ont permis de confirmer que le glutamate est utilisé comme neurotransmetteur principal des neurones sensoriels. A partir d'une co-culture de neurones sensoriels et de neurones médullaires issus d'explants embryonnaires, les réseaux sensori-médullaires se reforment en culture. En stimulant les neurones sensoriels, la réponse synaptique évoquée a été enregistrée dans des neurones médullaires (Jessell *et al.*, 1986). 80 % des neurones médullaires reçoivent une entrée monosynaptique rapide glutamatergique, antagonisée par l'acide kynurénique (inhibiteur des récepteurs ionotropiques du glutamate) et cette transmission n'est pas médiée par le récepteur NMDA. Sur des tranches de moelle épinière de rat où les racines dorsales sont conservées, la stimulation électrique de ces racines active les fibres sensorielles nociceptives A δ et C qui réalisent des synapses avec les neurones de la lamina II (Yoshimura

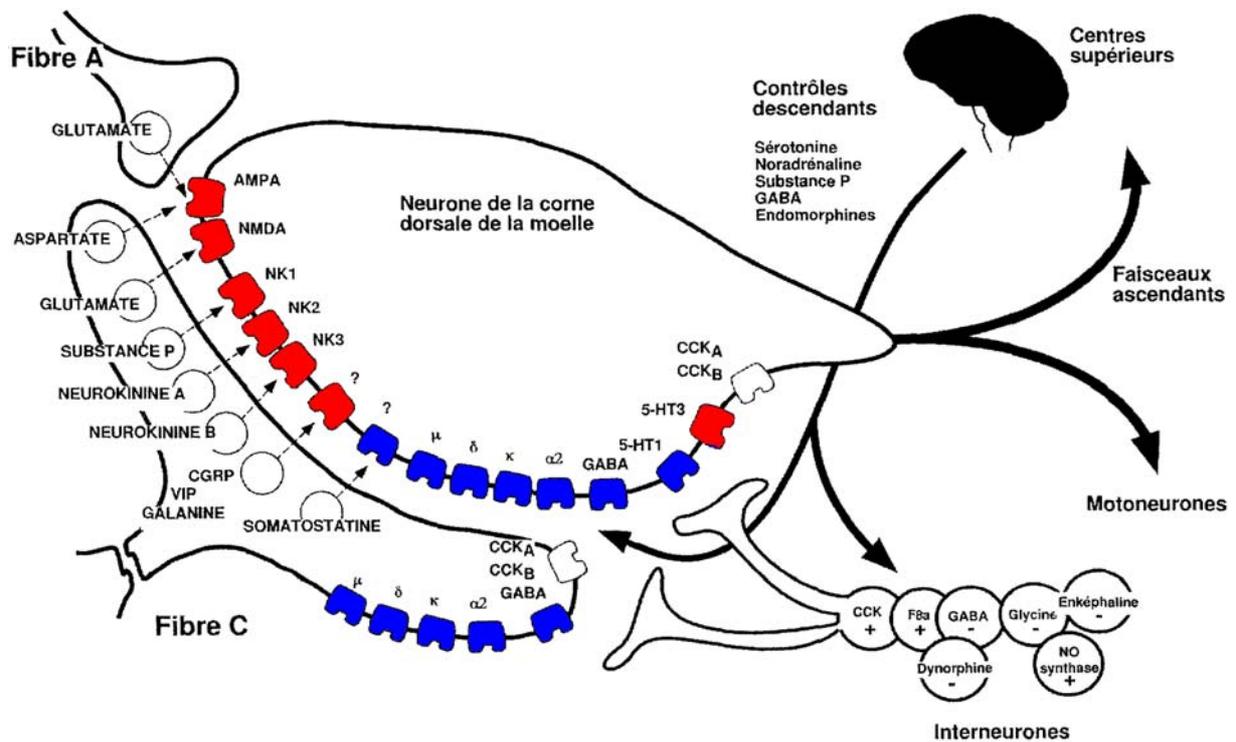


Figure 7 : Les neurotransmetteurs et neuromodulateurs peptidergiques impliqués dans la transmission sensori-médullaire.

Les fibres de type A libèrent des neurotransmetteurs excitateur tels que le glutamate principalement. Les fibres nociceptives de type C libèrent une grande diversité de médiateurs, dont des neurotransmetteurs classiques (glutamate et aspartate) et des neuropeptides qui peuvent co-localiser dans la même terminaison centrale. Ils sont capables d'activer des récepteurs spécifiques situés sur la membrane des neurones médullaires qui stimulent ou renforcent (rouge) la transmission synaptique. D'autres inhibent l'activité des neurones médullaires (bleu). Ceux-ci sont aussi capables de répondre à des modulateurs excitateurs ou inhibiteurs locaux libérés par des interneurons médullaires et des modulateurs libérés par les contrôles descendants supra-spinaux. Dans ce cas, la modulation peut être pré ou postsynaptique, modifiant soit la sécrétion de la fibre sensorielle, soit l'activité du neurone postsynaptique. La réponse du neurone stimulé par la fibre sensorielle dépend d'une balance entre l'excitation et l'inhibition de l'ensemble des protagonistes.

Modifié d'après Guirimand et Le Bars (1996).

et Jessell, 1990). La réponse évoquée enregistrée se présente sous la forme de potentiels postsynaptiques excitateurs (PPSE) rapides bloqués par l'application d'acide kynurénique ou de CNQX (antagoniste des récepteurs α -amino-3-hydroxy-5-méthyle-4-isoxazolepropionique -AMPA- et Kainate). Le récepteur N-méthyle-D-aspartate (NMDA) ne semble pas être impliqué dans cette transmission synaptique, car l'inhibition des récepteurs NMDA par de l'APV (antagoniste spécifique de ce récepteur) ne modifie pas la réponse des neurones médullaires.

4.2. Les peptides

De nombreux peptides ont été mis en évidence par immunohistochimie et ils sont libérés par la terminaison centrale des neurones sensoriels nociceptifs (Levine et al., 1993; Guirimand et Le Bars, 1996; Millan, 1999) ; (figure 7). La substance P, le peptide le plus étudié, agit sur les récepteurs de la famille des neurokinines. Ce peptide possède une sélectivité plus importante pour le récepteur NK1 que pour les récepteurs NK2 et NK3, sur lesquels se fixent respectivement les neurokinines A et B. Cependant, toutes les fibres sensorielles ne sont pas de nature peptidergique. Les fibres sensorielles nociceptives de type C qui innervent majoritairement la lamina II, se divisent en deux populations. Les terminaisons centrales de petits diamètres qui contiennent la substance P, co-localisent le CGRP et expriment le récepteur TrkA du NGF (Salt et al., 1983; Battaglia et Rustioni, 1988; Kai-Kai, 1989; Averill et al., 1995). Les nocicepteurs de type C non peptidergiques possèdent un site de liaison pour l'isolectine B4, expriment le récepteur du GDNF, ainsi que les récepteurs TRPV1 et P2X3 de l'ATP (Bennett *et al.*, 1998; Guo *et al.*, 1999). Nagy et Hunt (1982) ont pu mettre en évidence que la distribution des afférences nociceptives peptidergiques contenant la substance P et la somatostatine n'était pas homogène dans les couches superficielles de la moelle épinière. Les terminaisons peptidergiques se projettent plus préférentiellement dans la lamina I et la partie externe de la lamina II, tandis que les fibres non peptidergiques se projettent plus spécifiquement dans la lamina II interne.

La substance P a été identifiée tout d'abord comme agent vasodilatateur. Dans le cadre de la nociception, elle est considérée comme un modulateur important de la transmission synaptique entre les nocicepteurs et les neurones médullaires. Dans la moelle épinière, les sources de substance P sont les afférences sensorielles primaires de petit diamètre (type C). On la trouve aussi dans une population de neurones de la lamina II, où elle co-localise avec

des enképhalines, et dans les terminaisons axonales de certains contrôles descendants issus du noyau du raphé magnus, où elle co-localise avec la sérotonine (Guirimand et Le Bars, 1996). Les taux de substance P ont été mesurés dans l'espace sous-arachnoïdien et seules les stimulations nociceptives permettent d'augmenter la présence de la substance P. L'application de ce peptide par voie microélectrophorétique potentialise l'activité des neurones de la corne dorsale de la moelle épinière en renforçant l'efficacité synaptique lorsque les afférences primaires nociceptives sont stimulées (Guirimand et Le Bars, 1996). Ainsi, la substance P agit comme un neuromodulateur positif de la neurotransmission glutamatergique, où elle interviendrait dans les phénomènes de plasticité à moyen et à long terme, renforçant l'excitabilité. Dans des conditions pathologiques, comme l'inflammation périphérique, il a été montré que l'expression et la libération de ce peptide sont augmentées à partir des afférences sensorielles nociceptives immunoréactives à la substance P (Garry et Hargreaves, 1992; Hanesch et al., 1993; Mapp et al., 1993). De manière concomitante, cette surexpression de substance P est associée à une augmentation de CGRP, un autre peptide excitateur libéré par les nocicepteurs. De plus, l'augmentation d'expression de ces deux peptides est corrélée à une augmentation de leur taux d'ARNm dans les fibres afférentes sensorielles après stimulation. Ceci est sous la dépendance d'un facteur de croissance connu pour être libéré et agir sur les nocicepteurs dans des conditions pathologiques : le NGF (Lindsay et Harmar, 1989; Lindsay et al., 1989). En effet, ce facteur semble fortement impliqué dans les mécanismes de sensibilisation centrale, où il active ou suractive l'expression de gènes favorisant le maintien de l'excitabilité des nocicepteurs (Millan, 1999).

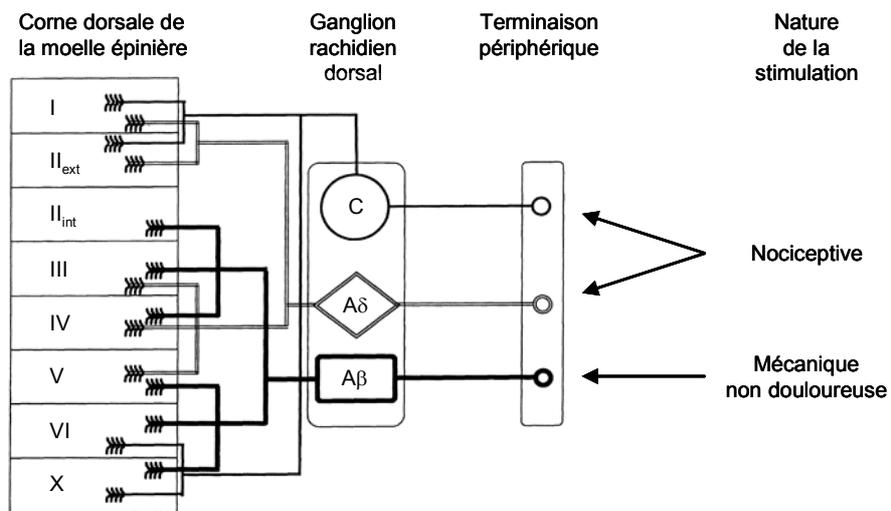


Figure 8 : L'organisation des projections centrales des afférences sensorielles primaires dans les couches de la corne dorsale de la moelle épinière.

I à X : numéro des laminae ; A β , A δ et C : types d'afférences sensorielles primaires.

Modifié d'après Millan (1999).

II. L'intégration primaire du message nociceptif : implication des couches superficielles de la moelle épinière

1. L'organisation des projections des afférences sensorielles dans la moelle épinière

La substance grise de la moelle épinière est organisée en différentes couches (laminæ) suivant la description de Rexed (1952) qui tient compte de la taille et de la densité des corps cellulaires. Tous les neurones sensoriels du ganglion rachidien établissent des contacts synaptiques avec les neurones de la substance grise de la moelle épinière. Les projections cutanées sensorielles s'organisent de manière topographique dans le plan horizontal de la moelle épinière de telle manière que toute la surface de l'organisme soit représentée. Lorsque les fibres sensorielles pénètrent dans la substance blanche, elles empruntent le tractus de Lissauer et progressent parfois jusqu'à six segments ascendants ou descendants, puis elles irradient dans la substance grise. Cette projection sur plusieurs segments d'une même fibre sensorielle est à la base du contrôle intersegmentaire (voir ci-après paragraphe 5.).

Les fibres non nociceptives A β se terminent préférentiellement dans les laminæ III-IV et de manière moins importante dans les laminæ V-VI. Il n'est pas exclu que certaines terminaisons s'étendent jusqu'aux laminæ I et II interne. Concernant les fibres nociceptives cutanées (figure 8), les fibres de type C (à bas seuil d'activation) se projettent de manière importante sur les laminæ I et II externe et moins importante sur la lamina II interne et la lamina V. Il est possible que quelques fibres établissent des contacts avec la lamina X. Pour leur part, les fibres nociceptives A δ cutanées (haut seuil d'activation) se terminent préférentiellement sur la lamina I et de manière plus éparse sur la lamina II externe (Light et Perl, 1979; Millan, 1999; Woodbury et al., 2000).

2. La caractérisation et la classification des neurones de la substance gélatineuse

La substance grise de la moelle épinière est subdivisée en différentes parties, décrites par Rexed (1952). La structure qui nous intéresse est la lamina II ou substance gélatineuse, une des couches superficielles de la moelle épinière. Cette structure apparaît comme un croissant « argenté » en microscopie optique, en lumière transmise, du fait du faible nombre de fibres et de la forte densité des corps cellulaires présents.

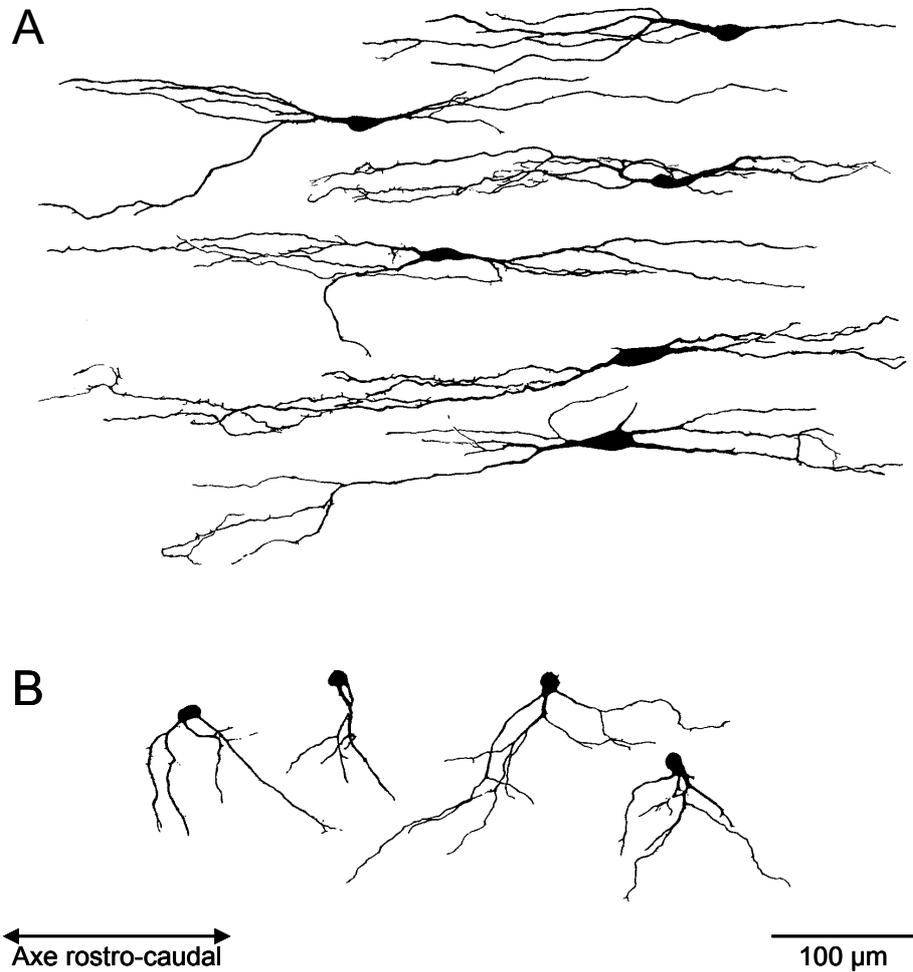


Figure 9 : Quelques exemples représentatifs des deux principales morphologies des neurones rencontrés dans la lamina II.

La morphologie des neurones est obtenue suivant la méthode de marquage de Golgi sur des coupes parasagittales de moelle épinière de rat adulte et dessinée à la caméra lucida. Deux types de morphologies rencontrés dans la lamina II, les cellules en îlot (A) et les cellules en tige (B). Les cellules en îlot se caractérisent par une arborisation dendritique plus développée et dans l'axe rostro-caudal. Par contre, les cellules en tige sont plus "ramassées" avec un arbre dendritique qui s'étale peu et leur corps cellulaire est rond.

Modifié d'après Todd et Spike (1993)

Comme nous le verrons, de nombreuses études ont tenté des corrélations entre la morphologie des neurones de la lamina II et leur identité neurochimique, voire leurs propriétés fonctionnelles. Jusqu'à ce jour, aucune corrélation stricte n'a pu être mise en évidence. Cependant, les données obtenues permettent de mieux appréhender ce réseau d'interneurones.

2.1. La morphologie des neurones de la lamina II

L'utilisation des techniques histologiques de coloration de Golgi ou de la révélation du marquage par la peroxydase ont permis de classer les neurones de la lamina II. Il semble que ces neurones sont hétérogènes et qu'il existe des différences entre les espèces. Ramon y Cajal (1909) décrivait trois types de morphologie chez le chat : les cellules limitrophes à orientation dendritique dorso-ventrale, les cellules centrales possédant une arborisation dendritique rostro-caudale et les cellules transverses dirigées médio-latéralement. Gobel (1975; 1978) décrivait quatre grands types de morphologie chez le chat (lamina II du noyau trijumeau) : les cellules en îlot (arbre dendritique à orientation rostro-caudale), les cellules en tige (dendrites orientées dans le plan dorso-ventral et rostro-caudal), les cellules étoilées et les cellules bordantes.

Dans la moelle épinière de rat (Todd et Lewis, 1986), les deux populations majoritairement retrouvées sont les cellules en îlot (« islet cells ») et les cellules en tige (« stalked cells »), comme chez le singe (Price *et al.*, 1979).

Les cellules en îlot sont distribuées de manière homogène au sein de la lamina II (Todd et Spike, 1993). Le soma est fusiforme d'une taille d'environ 30 μm (dans le grand axe), cependant, une sous-population dont la taille du corps cellulaire est d'environ 10 μm est également décrite (figure 9 A). L'arbre dendritique s'étend dans la lamina II dans le plan rostro-caudal sur plusieurs centaines de micromètres et reste confiné dans cette couche, la largeur de l'arbre est de 20 à 50 μm . Des branches récurrentes se terminent à proximité du soma, tout comme les boutons terminaux des axones.

Les cellules en tige sont principalement localisées dans la partie externe de la lamina II (Todd et Spike, 1993). Le soma de forme ronde (10 μm de diamètre) s'étend par une arborisation axonale et dendritique qui s'effectue à proximité du corps cellulaire (figure 9 B).

Tableau 3 : Neurochimie des neurones des couches superficielles I à III.

Lamina	Pourcentage des neurones			
	Contenant du GABA	Contenant du GABA et de la glycine	Contenant du GABA mais pas de glycine	Contenant du glutamate (principalement)
I	28	9	19	72
II	31	14	17	69
III	46	30	16	54

Modifié d'après Todd et Spike (1993).

Les dendrites sont orientées dans l'axe rostro-caudal et s'étendent dans la lamina III sur une distance de 100 à 500 µm. L'axone, lui, présente des terminaisons au niveau de la lamina I.

Il est à noter que Grudt et Perl (2002) décrivent deux autres types en plus de ceux décrits par Todd et Spike :

Les cellules centrales : en position centrale dans la lamina II. Elles ont une morphologie de type cellules en îlot avec un l'arbre dendritique plus court.

Les cellules verticales : l'arbre dendritique s'étend dans l'axe dorso-ventral et la forme de cet arbre ressemble aux cellules en tige mais avec une arborisation plus petite.

2.2. L'identité neurochimique des neurones de la lamina II

Les neurones des couches superficielles de la corne dorsale et plus particulièrement ceux de la lamina II synthétisent et libèrent les neurotransmetteurs classiques rencontrés dans de nombreuses autres structures du système nerveux central (SNC). De plus, de nombreux neuromodulateurs, tels des peptides, sont aussi libérés. Ici, nous établissons un résumé de la présence de ces différents médiateurs dans la lamina II, pour revue voir Todd et Spike (1993).

L'utilisation des techniques immunocytochimiques a permis de mettre en évidence la présence de neurones GABAergiques dans la corne dorsale de la moelle épinière. Des anticorps, dirigés contre la « glutamic acid decarboxylase » (GAD) ; (McLaughlin et al., 1975; Barber et al., 1978) ou contre le GABA lui même, ont montré un marquage important de neurones dans les laminae I à III par rapport au reste de la substance grise, et ceci sur tous les segments de la moelle épinière de rat (Magoul *et al.*, 1987). Des résultats similaires ont été obtenus chez d'autres mammifères : le chat (Maxwell *et al.*, 1991), le singe (Carlton et Hayes, 1990) et l'homme (Waldvogel *et al.*, 1990). Todd et McKenzie (1989) ont étudié la morphologie des neurones de la lamina II immunoréactifs pour le GABA chez le rat. Leurs résultats montrent que les cellules en tige ne sont pas immunoréactives. Les cellules en îlot, quant à elles, se divisent en deux groupes : les grosses cellules semblent être des cellules GABAergiques, alors qu'aucune des petites cellules ne révèle la présence de GABA. Ces cellules positives pour le GABA représentent 31% de la population de neurone de la lamina II et 14 % des neurones colocalisent le GABA et la glycine (tableau 3) ; (Todd et Sullivan, 1990). L'observation de l'ultrastructure en microscopie électronique montre que

l'organisation des terminaisons GABAergiques est très majoritairement de type axo-dendritique ou axo-somatique. Quelques synapses axo-axoniques ont été observées. Elles interviendraient dans un mécanisme d'inhibition présynaptique des afférences sensorielles.

Des données plus récentes utilisant des souris transgéniques ont permis d'observer la présence de neurones GABAergiques dans les couches superficielles de la moelle épinière. Heinke *et al.* (2004) ont étudié les caractéristiques des neurones de la lamina II exprimant la « green fluorescent protein » (GFP), gène rapporteur sous le contrôle du promoteur de l'isoforme GAD67 de l'enzyme de synthèse du GABA. Leurs résultats montrent qu'un tiers de la population de neurones immunopositifs pour le GABA expriment la GFP. De plus, 72 % de neurones exprimant la GFP ont une morphologie de type en îlot, alors que les cellules n'exprimant pas cette protéine ont des morphologies plus variables. Par ailleurs, chez le rat, la lamina II bulbaire, qui est en certains points (anatomiques et fonctionnels) comparable à celle de la moelle épinière, présente une immunoréactivité pour le GABA qui est très souvent co-localisé avec la glycine (Wang *et al.*, 2000). Par microscopie électronique, ces auteurs ont mis en évidence la présence de synapses axo-dendritiques entre des afférences sensorielles primaires immunoréactives à la substance P et les neurones GABAergiques. Un résultat similaire a été observé précédemment par Sakamoto et Atsumi (1995) dans la lamina II du poulet. Il existe donc un contact direct entre certains nocicepteurs et les neurones GABAergiques de la lamina II qu'ils activent.

Comme pour le GABA, la distribution des neurones glycinergiques a été révélée par l'utilisation d'anticorps dirigés spécifiquement contre ce neurotransmetteur dans de nombreuses structures du SNC et l'immunoréactivité glycinergique a été observée dans la corne dorsale de la moelle épinière (Campistron *et al.*, 1986; van den Pol et Gorcs, 1988; Todd et Sullivan, 1990). La glycine est révélée dans le corps cellulaire et dans les prolongements axonaux et dendritiques des neurones. Le marquage est relativement éparé dans les laminæ I et II par rapport aux autres couches de la corne dorsale, suggérant une faible densité de neurones glycinergiques dans les couches superficielles (tableau 3). Todd et Sullivan (1990) ont comparé les immunoréactivités GABA et glycine dans la corne dorsale de rat. Le GABA est confiné aux laminæ I à III, tandis que la présence de la glycine est révélée dans toute la substance grise médullaire. La morphologie des neurones immunoréactifs pour la glycine a été étudiée par la technique de marquage de Golgi et appartient à la population des grandes cellules en îlots. Par contre, pour les neurones GABA-glycine, aucune différence

de morphologie n'a pu être mise en évidence avec les neurones GABAergiques. Comme le GABA, l'étude ultrastructurale des synapses glycinergiques rend difficile la localisation des sources de glycine. En effet, les corps cellulaires des neurones glycinergiques se projetant sur les neurones des couches superficielles de la corne dorsale peuvent provenir de projections supramédullaires, de neurones locaux, voire des couches plus profondes de la moelle épinière. Cependant, des données morphologiques permettent d'envisager que les cellules en îlots de la lamina II présentent une arborisation axonale à proximité du corps cellulaire (Gobel, 1978) et quelques neurones de ce type sont immunoréactifs pour la glycine chez le rat (Todd et Sullivan, 1990). De plus, l'immunoréactivité glycinergique des terminaisons dans les laminae I et III semble correspondre avec les cellules glycinergiques de ces couches. Ainsi, il apparaît que les neurones glycinergiques des couches superficielles proviennent en grande majorité d'un réseau local médullaire. Les boutons synaptiques dans la lamina II sont en grande majorité des synapses de type axo-dendritique ou axo-somatique. On observe, de manière comparable aux terminaisons GABAergiques, quelques synapses axo-axoniques qui joueraient un rôle dans l'inhibition présynaptique, certainement au niveau de la terminaison centrale des fibres sensorielles primaires.

Comme le montre le tableau 3, la majorité des neurones des couches superficielles ne semble pas contenir de GABA ou de glycine (Todd et Sullivan, 1990). De plus, cette population de cellules inclue les cellules en tiges et les petites cellules en îlots. On pourrait donc supposer que ces cellules sont excitatrices et utilisent comme neurotransmetteur le glutamate ou l'aspartate. L'injection au niveau médullaire de D-aspartate tritié, qui par un mécanisme de recapture au niveau des terminaisons, intègre le soma, permet d'identifier les neurones glutamatergiques par autoradiographie. L'utilisation de cette méthode par Rustioni et Cuenod (1982) et Antal *et al.* (1991) permet de conclure que les laminae superficielles I à III présentent des neurones marqués susceptibles d'être des neurones excitateurs glutamatergiques. Il est à noter que le marquage est plus important dans la substance gélatineuse.

Comme nous le montrent ces études, dans le cadre de l'identification des neurones excitateurs, les conclusions ne sont pas aussi tranchées que pour l'identification des neurones inhibiteurs. Les techniques utilisées manquent de spécificité. Cependant, les arguments présentés par toutes ces études (identifications des neurones inhibiteurs et excitateurs), nous suggèrent fortement la présence majoritaire de neurones glutamatergiques dans la lamina II.

Tableau 4 : La présence de neuropeptides en fonction de la morphologie des neurones de la lamina II

Morphologie	Enképhalines	Dynorphines	Neurotensines	Tachykinine	STT	NPY
Tige	++	++		+ ?	+	
Ilôt	+	+	+	+ ?	+	+

STT : somatostatine ; NPY : neuropeptide Y ; ? : la morphologie n'a pas pu être déterminée clairement. D'après Todd et Spike, 1993

La lamina II est très riche en peptides et les terminaisons peptidergiques observées sont issues des terminaisons centrales des afférences primaires sensorielles, des contrôles descendants ainsi que des neurones de la moelle épinière (Todd et Spike, 1993). Pour observer les peptides dans la moelle épinière, l'immunohistochimie a été utilisée principalement après incubation du tissu avec de la colchicine afin d'abolir le transport axonal. Ceci permet de concentrer les peptides dans le corps cellulaire afin de les détecter plus aisément. Cependant, certains peptides sont synthétisés à partir du même précurseur protéique, bien souvent inactif lui-même, ce qui rend plus difficile leur localisation cellulaire (Met et Leu-enképhalines sont issues de la préproenképhaline). Mais il est suspecté que, dans ce cas, ces peptides sont co-localisés. La grande majorité des peptides rencontrés dans la moelle épinière est concentrée dans les couches superficielles de la moelle épinière (laminæ I-III). La corrélation entre le type de morphologie et le contenu en peptide fait appel, bien souvent, au recouplement de données issues de la localisation des morphologies des neurones de la lamina II (partie interne ou externe) et du contenu en peptide des neurones observés par immunohistochimie ou hybridation *in situ*. Les principaux peptides rencontrés sont les enképhalines (Leu et Met-enképhalines), les tachykinines (dont la substance P), les dynorphines A et B, la somatostatine et le neuropeptide Y. Le tableau 4 montre les contenus en peptides des neurones de la lamina II en fonction de leur morphologie (Todd et Spike, 1993). La plupart de ces peptides sont retrouvés dans le corps cellulaire ainsi que dans des fibres de la lamina II. De plus, de nombreux neurones de la lamina sont capables de synthétiser et de co-localiser plusieurs peptides en plus d'un neurotransmetteur classique. C'est le cas par exemple des neurones immunopositifs pour les enképhalines, qui co-localisent avec la substance P (Ribeiro-da-Silva *et al.*, 1991). Ceci a été observé dans les varicosités de neurones de la partie externe de la lamina II. Ces neurones sont suspectés d'appartenir à la population de neurones en tige situés principalement dans la lamina II externe. Par ailleurs, 69 % des neurones (laminæ II-III) immunoréactifs pour la Met-enképhaline le sont aussi pour le GABA et appartiennent à la population de neurones en îlot (Todd *et al.*, 1992). De plus, les auteurs ont montré que les neurones Met-enképhaliques ne présentent pas d'immunoréactivité pour la glycine et qu'il existe une population de neurones Met-enképhaline non GABAergiques qui ont une morphologie de type en tige qui pourraient appartenir à la population de neurones qui colocalisent la substance P et la Met-enképhaline. Enfin, Todd et Spike (1992) ont montré que les neurones de la lamina II pouvaient co-localiser la Met-enképhaline avec la somatostatine. Ainsi, les neurones de la lamina II sont capables de libérer des neurotransmetteurs classiques accompagnés de peptides.

Tableau 5 : Récapitulatif des proportions des différents profils de décharge en potentiel d'action enregistrés dans la lamina II.

Auteurs	Type de préparation (approche électrophysiologique)				Type de rongeur			Proportion des profils de décharge en potentiel d'action (%)					
	<i>In vivo</i> (Patch-clamp)	<i>In vitro</i>			Souris	Rat	Hamster	Répétitif ou type A	Phasique ou type AB	Retardé	Bouffées	Simple PA ou type B	Type C
		Tranches (Patch-clamp)	Culture (Patch-clamp)	Moelle hémisectionnée (intracellulaire)									
Thomson et al. (1998)			X		X								
Lopez-Garcia et King (1994)			X		X								
Grudt et Perl (2002)		X					X						
Hu et Gereau (2003)				X				49	18	29		4	
Jo et Schlichter (1998a)				X				16	37			33	14
Ruscheweyh et Sandkuhler (2002)		X			X			0	26	39	24	11	
Graham et al. (2004)	X						X	23	28	23		16	

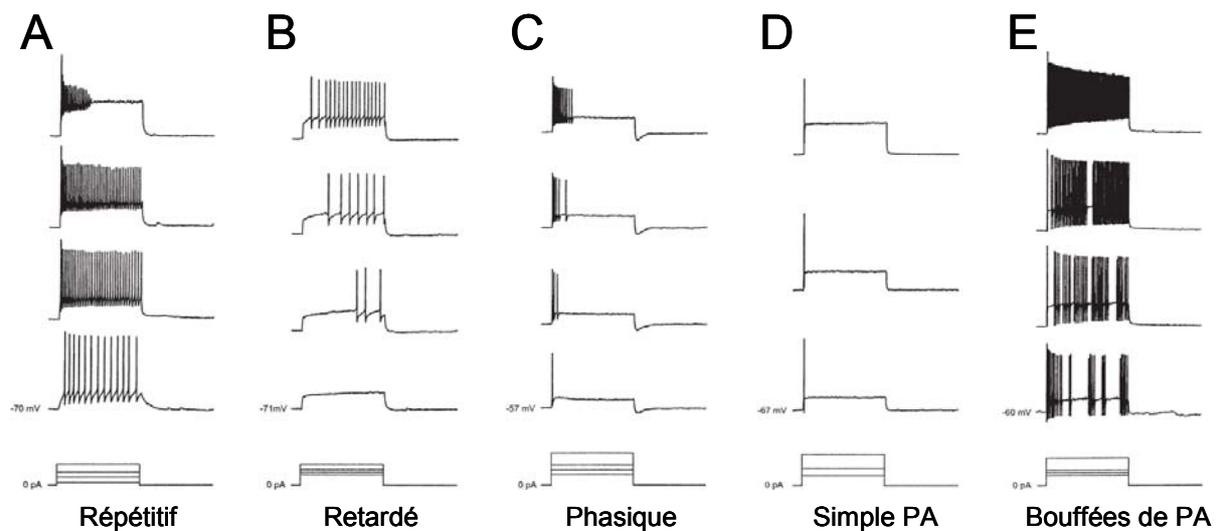


Figure 10 : Les différents profils de décharge enregistrés dans la corne dorsale de la moelle épinière de rat.

Les enregistrements électrophysiologiques ont été effectués sur des tranches transversales de moelle épinière de rat âgés de 18 à 28 jours par la technique de "patch-clamp" en configuration cellule entière. Les profils de décharge en PA ont été obtenus par l'injection de créneaux courant dépolarisants (d'amplitude comprise entre 25 et 350 pA pendant 1 s) au potentiel membranaire indiqué.

Modifié d'après Ruscheweyh et Sandkuhler (2002).

3. Les propriétés fonctionnelles des neurones de la lamina II : décharge en potentiel d'action et canaux ioniques

Des études électrophysiologiques ont caractérisé les propriétés fonctionnelles des neurones de la lamina II. Des techniques d'enregistrement et des préparations biologiques diverses ont été employées. Dans cette section, nous présenterons les études les plus pertinentes, afin de simplifier la compréhension des mécanismes membranaires utilisés par ces neurones pour intégrer l'information sensorielle en provenance des nocicepteurs.

3.1. Les profils de décharge en potentiel d'action

Les premières études ont permis de décrire les propriétés membranaires fondamentales des neurones de la corne dorsale et en particulier de la lamina II de rat (voir le tableau 5 pour un résumé). Ces études ont utilisé la technique d'enregistrement intracellulaire afin d'enregistrer les variations du potentiel de membrane résultant soit des entrées synaptiques excitatrices ou inhibitrices à l'origine des potentiels postsynaptiques excitateurs (PPSE) ou inhibiteurs (PPSI), soit de stimulations calibrées appliquées pour observer les propriétés membranaires passives et actives de ces neurones (figure 10). Thomson *et al.* (1989) ont décrit trois types de profil de décharge en PA suite à des dépolarisations suffisantes des neurones des couches superficielles de la corne dorsale hémisectionnée. Un profil de décharge en PA *répétitif* est caractérisé par une décharge tonique de PA pendant toute la durée de la stimulation supraliminaire. Deuxièmement, le profil *phasique* présente une décharge en PA, suivie par une phase silencieuse malgré le maintien de la stimulation. Enfin, le dernier profil enregistré est défini par un unique PA durant toute la stimulation et ceci quelle que soit l'amplitude supraliminaire des courants appliqués à la membrane du neurone. La stimulation électrique des racines dorsales induit des réponses des neurones enregistrés sous la forme de PPSE et PPSI polysynaptiques. De plus, la décharge en PA des neurones médullaires observée suite à la stimulation de la racine dorsale est corrélée au profil de décharge en PA. Ainsi, les neurones à décharge *répétitive* répondent par une bouffée de PA lors de la stimulation de la racine. Les neurones de type *phasique* et *simple PA* ne répondent pas ou répondent par l'émission d'un PA. Ces résultats suggèrent que le profil de décharge en PA et la réponse évoquée des neurones des couches superficielles sont sous la dépendance des propriétés membranaires de ces neurones. Lopez-Garcia et King (1994) ont utilisé une préparation

Tableau 6 : Corrélacion entre la classification physiologique et le type de profil de décharge en PA des neurones de la corne dorsale de la moelle épinière de rat adulte.

Classification physiologique	Type de profil de décharge en PA			
	Répétitif ou A	Phasique ou AB	Simple PA ou B	C
WDR	Très majoritairement			
NS		Majoritairement		
LT	Distribué entre ces deux profils			
SUB-THR	En partie		En partie	
IN				Tous

Les neurones de la corne dorsale sont classés en fonction du type de réponse observée lors d'une stimulation cutanée. A ces catégories sont associés un ou plusieurs types de profil de décharge en PA.

Suite à une stimulation cutanée nociceptive ou non, les neurones médullaires sont classés en cinq catégories : les « wide dynamic range » (WDR), les neurones « nociceptifs spécifiques » (NS), les neurones « à bas seuil » (LT), les neurones « infraliminaires » (SUB-THR) et les neurones « inhibés » (IN). Les neurones WDR ont la caractéristique de répondre à une large gamme de modalités sensorielles et se retrouvent très majoritairement dans les couches profondes de la corne dorsale. Les neurones NS répondent spécifiquement à une stimulation nociceptive. Les neurones LT répondent à une stimulation mécanique non nociceptive. Les neurones SUB-THR répondent à des intensités de stimulation inférieures aux autres catégories de neurones. Enfin, les neurones IN répondent par une inhibition (observation de PPSI ou arrêt de la décharge en PA du neurone médullaire) suite à la stimulation cutanée.

D'après Lopez-Garcia et King (1994).

particulière (patte-moelle épinière) où l'intégrité des afférences sensorielles primaires est conservée. Il est donc possible de stimuler directement les champs récepteurs cutanés et d'enregistrer la réponse évoquée des neurones médullaires. Tout comme Thomson *et al.* (1989), trois types de profil de décharge en PA ont pu être mis en évidence par des injections de courant intracellulaire. Ces profils sont nommés : type A (*répétitif*), type AB (*phasique*) et type B (*simple PA*). En plus, ils ont observé un quatrième type de profil de décharge qui, à la différence des autres, n'est pas basé sur la forme de la bouffée de PA générée lors de la stimulation, mais sur la présence d'une hyperpolarisation membranaire transitoire excessive appelée « sag » lors de stimulations hyperpolarisantes. Ce type de profil est appelé type C. Ces types de profil de décharge ont été obtenus à partir de neurones enregistrés dans la corne dorsale de la moelle épinière (des laminæ I à V). Ils ont pu corrélérer les profils de décharge avec les propriétés physiologiques de neurones médullaires, c'est-à-dire avec le type de réponse évoquée observé en fonction du type de stimulation cutané exercé. Les résultats sont résumés dans le tableau 6.

D'autres études électrophysiologiques ultérieures ont caractérisé les profils de décharges en PA des neurones de la lamina II, utilisant la technique de « patch-clamp » (Jo *et al.*, 1998a; Grudt et Perl, 2002; Ruscheweyh et Sandkuhler, 2002; Hu et Gereau, 2003; Graham *et al.*, 2004). Jo *et al.* (1998a), sur les bases de la classification de Lopez-Garcia et King (1994), ont enregistré, en culture, en configuration « patch-perforée », les neurones des couches superficielles de la corne dorsale de rat et ils ont observé des profils de décharge similaires. Ruscheweyh et Sandkuhler (2002) ont identifié les propriétés membranaires des neurones de la corne dorsale (laminæ I-V) de la moelle épinière de rat en configuration « cellule entière ». Ils ont mis en évidence 5 types de profils de décharges : des profils déjà décrits (*répétitif*, *phasique* et *simple PA*), plus un profil *retardé* (caractérisé par une phase silencieuse précédant la bouffée de PA) et un profil en *bouffées* successives pendant la stimulation. Quelle que soit l'étude, d'une manière générale on retrouve quatre profils de décharge en PA dans la lamina II (*répétitif*, *phasique*, *retardé* et *simple PA*), dans des proportions différentes en fonction du type d'animaux utilisé, de l'âge, du type de préparation (*in vivo*, tranche ou culture de tissu médullaire). Cependant, Ruscheweyh et Sandkuhler (2002) n'observent pas de neurone de type *répétitif* dans la lamina II, dans leurs conditions expérimentales.

Grudt et Perl (2002) ont caractérisé les profils de décharge des neurones de la lamina II de hamster et ont tenté de les corrélérer avec leur morphologie, le type de réponse évoquée lors d'une stimulation électrique de la racine dorsale et les courants membranaires développés lors de l'application de créneaux de potentiel. La grande majorité de neurones de la lamina II

possèdent des entrées sensorielles monosynaptiques, comme cela a pu être décrit auparavant. Cependant, il est difficile de corrélérer un profil de décharge à une morphologie précise ou à la présence d'une conductance membranaire spécifique. Il existe pour chaque type de morphologie des sous-populations qui présentent préférentiellement un type de profil de décharge associé ou non à la présence d'un courant K^+ transitoire (courant I_A). Ainsi, la corrélation des critères morphologiques et fonctionnels ne permet pas clairement d'identifier le type de neurones. Cependant, il semble que les neurones qui présentent un profil de décharge *phasique* co-localisent préférentiellement le GABA et la Met-enképhaline par rapport aux autres profils de décharge dans des culture de neurones de corne dorsale (Jo et al., 1998a). Il est intéressant de noter que Lopez-Garcia et King (1994) ont décrit ces neurones *phasiques* (type AB) comme étant « nociceptifs spécifiques » et que Todd *et al.* (1992) ont montré que les neurones GABAergiques immunoréactifs pour la Met-enképhaline appartiennent à la population de neurones de morphologie en îlot. Enfin, il existe certaines évidences fonctionnelles et morphologiques qui suggèrent que les neurones GABAergiques de la lamina II sont en contact direct avec des afférences sensorielles nociceptives (Sakamoto et Atsumi, 1995; Wang et al., 2000; Lu et Perl, 2003). Cependant aucune donnée ne permet, pour l'instant, de donner une signification claire de l'impact des neurones GABAergiques sur l'intégration de l'information nociceptive. Par ailleurs, toutes ces données ne permettent pas définir des corrélations strictes entre la morphologie, la neurochimie et les aspects fonctionnels des neurones de la lamina II.

3.2. Les canaux ioniques dépendants du potentiel membranaire

Les propriétés membranaires passives et actives résultent de la présence de canaux ioniques spécifiques. Comme nous le verrons, il existe une très grande diversité de canaux ioniques dont les propriétés fonctionnelles sont à la base de l'excitabilité neuronale et jouent un rôle primordial dans la modulation de cette excitabilité. Le décours du PA résulte de l'ouverture successive de deux grandes famille de canaux ioniques: le canal Na^+ et le canal K^+ .

- a) Les canaux ioniques sodium dépendants du potentiel membranaire dans la corne dorsale de la moelle épinière

L'ion Na^+ joue un rôle majeur dans l'excitabilité des cellules excitables. L'application de tétrodotoxine (TTX ; bloqueur des canaux Na^+ dépendants du potentiel membranaire) dans le milieu extracellulaire entraîne une suppression de la phase ascendante du PA enregistré dans la corne dorsale de la moelle épinière (Murase et Randic, 1983). Dans ce cas, la phase de dépolarisation membranaire rapide du PA est portée par une conductance ionique Na^+ sensible à la TTX. Les données actuelles permettent, cependant, de différencier trois types de canaux ioniques par rapport à leurs propriétés d'inactivation (Safronov et al., 1997; Safronov, 1999) : des canaux non inactivant, à inactivation rapide ou lente. Les canaux à inactivation rapide représentent 80 à 90 % du courant total enregistré en configuration entière par la technique du « patch-clamp ». Ces différences électrophysiologiques seraient le résultat de l'expression de canaux ioniques avec des propriétés électrophysiologiques propres. Par ailleurs, jusqu'à ce jour, aucun courant Na^+ insensible à la TTX n'a pu être mis en évidence dans la corne dorsale de la moelle épinière (Safronov, 1999) à la différence des neurones sensoriels de petite taille du ganglion rachidien, où leur sur-expression joue un rôle important dans les mécanismes de sensibilisation périphérique lors de douleurs neuropathiques, par exemple.

Du point de vue structural, dans le cerveau de rat, le canal Na^+ est constitué d'une grosse sous-unité α principale, qui, à elle seule, est suffisante pour former un canal fonctionnel, et de deux sous-unités β (1 et 2) régulatrices (Safronov, 1999). La sous-unité α possède les propriétés d'ouverture, de fermeture, d'inactivation et de sensibilité à la TTX. Cependant, la sous-unité β_1 accélère la cinétique d'inactivation du courant macroscopique et déplace la courbe d'inactivation vers des potentiels plus négatifs, résultats observés dans des systèmes d'expression hétérologue. Ces caractéristiques sont similaires à celles observées pour les canaux natifs. La sous-unité β_2 modifie la probabilité d'ouverture du canal, elle serait impliquée aussi dans la localisation spatiale des canaux Na^+ . Les études électrophysiologiques menées par le groupe de Boris Safronov, utilisant la technique de « patch-clamp » excisé et des neurones intacts isolés issus de tranches, ont permis de mieux comprendre la localisation spatiale des canaux Na^+ , ainsi que leur contribution dans la génération des PA (Safronov *et al.*, 1997). Les résultats obtenus sont en faveur de la présence des canaux Na^+ à inactivation rapide au niveau du soma et de l'axone : ils joueraient un rôle crucial dans l'initiation et dans la phase ascendante du PA. Les canaux Na^+ non-inactivables seraient confinés au niveau des

dendrites et participeraient essentiellement à la durée de la phase de dépolarisation précédant le PA jusqu'au seuil d'activation du PA. En effet, le seuil d'activation de ce type de canaux se révèle plus hyperpolarisé que celui du courant Na^+ transitoire (-60 à -50 mV contre -50 à -40 mV respectivement). La densité des canaux est estimée à environ $1 \mu\text{m}^{-2}$ au niveau des dendrites et du soma (densité moins importante que dans d'autres types neuronaux comme les neurones CA1 de l'hippocampe) ; alors qu'elle serait de $60 \mu\text{m}^{-2}$ au niveau du cône axonal des neurones de la corne dorsale. De plus, il semble que le cône axonal soit essentiel pour permettre la génération de PA. En effet, l'ablation des dendrites par la méthode d'isolement du soma et/ou de l'axone utilisant la technique de « patch-clamp » montre que les dendrites ne sont pas nécessaires pour obtenir des PA pendant une stimulation électrique du soma et que le soma isolé est insuffisant pour générer des PA, vraisemblablement à cause de la faible densité de canaux Na^+ . Ceci confère un rôle primordial au cône axonal dans la genèse du PA.

b) Les canaux calcium dépendants du potentiel membranaire dans la corne dorsale de la moelle épinière

Dans la corne dorsale de la moelle épinière, plusieurs types de canaux ioniques Ca^{2+} dépendant du potentiel membranaire ont été décrits (Murase et Randic, 1983; Huang, 1989; Ryu et Randic, 1990; Westenbroek et al., 1998). Ainsi, un courant transitoire à bas seuil d'activation (type T, seuil d'activation de -60 mV) et deux courants à haut seuil d'activation (type L et N, seuil d'activation compris entre -40 et -30 mV) ont pu être identifiés sur la base de leurs cinétiques d'inactivation et de leurs propriétés pharmacologiques (Huang, 1989). Lorsque les canaux ioniques Na^+ et K^+ sont spécifiquement bloqués, suite à des stimulations dépolarisantes, en mode courant imposé, des dépolarisations lentes transitoires de nature Ca^{2+} (« PA calcium ») sont observables par la technique d'enregistrement intracellulaire de neurones de la corne dorsale à partir de tranches aiguës (Murase et Randic, 1983). En effet, cette dépolarisation transitoire est inhibée lorsque la concentration extracellulaire en Ca^{2+} est diminuée ou que des bloqueurs des canaux Ca^{2+} comme le Co^{2+} ou le Mn^{2+} sont appliqués à la membrane. Ce résultat indique une implication possible des conductances Ca^{2+} dans la génération des PA. De plus, il est à noter que ces canaux Ca^{2+} peuvent aussi jouer un rôle important dans la modulation des conductances ioniques K^+ sensibles au Ca^{2+} intracellulaire et ainsi moduler indirectement l'excitabilité des neurones (Melnick *et al.*, 2004b).

c) Les canaux activés par l'hyperpolarisation membranaire dans la lamina II

L'enregistrement des neurones de la lamina II par la technique d'enregistrement intracellulaire sur des tranches aiguës montre l'existence de deux types de conductances ioniques à rectification entrante (Yoshimura et Jessell, 1989). La première de ces conductances présente une rectification dépendante du temps (observée dans 66 % des neurones enregistrés) ; elle est sensible à l'application extracellulaire de Cs^+ , alors que le Ba^{2+} n'a aucun effet. Ce type de courant est comparable au courant I_h que l'on rencontre dans les neurones sensoriels primaires des racines dorsales de la moelle épinière et dans les motoneurones médullaires (Mayer et Westbrook, 1983; Takahashi, 1990). Dans peu de neurones, une rectification entrante non dépendante du temps peut être observée et elle est sensible à l'application de Ba^{2+} . Le courant de type I_h est caractérisé par le fait qu'il s'active lors de l'hyperpolarisation membranaire. Il possède, de plus, des propriétés d'inactivation qui lui donnent cette dépendance vis-à-vis du temps. Les canaux ioniques responsables de ce courant ont une perméabilité non sélective pour les cations. Cependant, sa perméabilité est plus importante pour le Na^+ que les autres espèces ioniques. Lors d'une hyperpolarisation membranaire, l'ouverture des canaux provoque une dépolarisation. Ainsi, I_h est responsable d'un décours particulier du potentiel membranaire nommé « sag », qu'il est possible d'observer dans les neurones de la lamina II *in vitro* (Yoshimura et Jessell, 1989; Lopez-Garcia et King, 1994; Jo et al., 1998a) et *in vivo* (Graham *et al.*, 2004). A la fin d'une hyperpolarisation membranaire, le courant de type I_h produit une dépolarisation transitoire, sous la forme d'un rebond. Ce rebond est le résultat de l'activation de canaux Ca^{2+} dépendants du potentiel. Ceux-ci vont dépolariser la membrane jusqu'à atteindre le seuil de déclenchement des PA, si le rebond est suffisant (Yoshimura et Jessell, 1989). Ainsi, le courant de type I_h favorise l'excitabilité des neurones de la lamina II.

d) Les canaux ioniques potassium dépendant du potentiel membranaire dans la lamina II

Les canaux K^+ sont ubiquitaires et observables dans tous les types neuronaux. Cependant, ils possèdent une grande variété fonctionnelle qui les fait entrer dans de nombreux mécanismes de l'activité neuronale (potentiel membranaire de repos, repolarisation membranaire, régulation de la fréquence de décharge en PA, initiation du PA, etc.). Les canaux ioniques perméables au K^+ et dépendants du potentiel membranaire constituent une famille très large de protéines canaux. La protéine-canal est constituée par l'assemblage de quatre sous-unités formant un homotétramère ou un hétérotétramère (figure 11 A). Chacune des sous-unités est constituée de six segments transmembranaires (en hélice α) où le segment

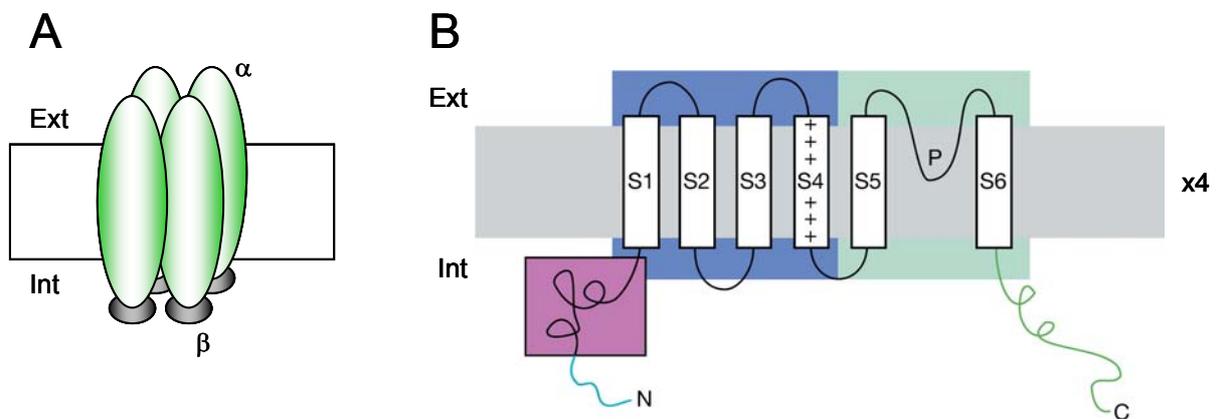


Figure 11 : L'organisation structurale des canaux potassium

A : Le canal K^+ est constitué de quatre sous-unités α qui délimitent le pore et forment un canal fonctionnel. Des sous-unités régulatrices β peuvent se lier aux sous-unités α .

B : La sous-unité α des canaux K^+ est constituée de 6 domaines transmembranaires, les extrémités N et C terminales étant intracellulaires. Les segments S5 et S6 délimitent le pore du canal et la boucle P à la jonction de ces deux segments donne la sélectivité du pore pour le K^+ . Le segment S4, qui présente des résidus aminés chargés positivement, est le détecteur des variations de potentiel membranaire. Ce segment est associé aux segment S1-S3 et le changement de conformation de ce domaine va modifier le perméabilité du pore, faisant passer le canal d'un état fermé à un état ouvert, et inversement. L'extrémité N terminale est le site de liaison des sous-unités α et sa séquence va déterminer le type de sous-unité α qui peuvent s'associer entre elles. Modifié d'après Yellen G (2002).

S4, par sa séquence de résidus aminés particulière, constitue le détecteur des variations de potentiel membranaire à l'origine des modifications conformationnelles de la protéine canal permettant l'ouverture et la fermeture du pore (figure 11 B). Les segments S5 et S6 délimitent le pore et la boucle reliant ces deux domaines transmembranaires, ou boucle P, confère la sélectivité ionique de ce canal pour le K^+ (Yellen, 2002). A partir du clonage des quatre gènes codant pour les canaux K^+ dépendant du potentiel membranaire chez la drosophile, 29 sous-unités différentes ont été identifiées par clonage chez les mammifères, à ce jour. Elles sont divisées en 8 familles et constituent les sous-unités α : K_v1 ($K_v1.1$ - $K_v1.8$), K_v2 ($K_v2.1$ et $K_v2.2$), K_v3 ($K_v3.1$ - $K_v3.4$), K_v4 ($K_v4.1$ - $K_v4.3$), $K_v5.1$, K_v6 ($K_v6.1$ - $K_v6.4$), K_v8 ($K_v8.1$ - $K_v8.3$), K_v9 ($K_v9.1$ - $K_v9.3$). Les familles K_v1 à K_v4 peuvent former des canaux homo ou hétéromériques avec des sous-unités appartenant à la même famille (Coetzee *et al.*, 1999). Les K_v5 , K_v6 , K_v8 et K_v9 ne sont pas capables de former des canaux homomériques fonctionnels et constituent les familles « silencieuses électriquement » (Coetzee *et al.*, 1999; Pongs, 1999). Cependant, elles peuvent s'assembler avec les familles K_v1 -4 pour former des hétéromères fonctionnels.

Du point de vue électrophysiologique, les canaux K^+ jouent des rôles importants dans le SNC : dans le maintien du potentiel membranaire de repos, lors de la phase de repolarisation du PA (Hodgkin et Huxley, 1952), dans le contrôle de l'excitabilité postsynaptique (Stansfeld *et al.*, 1986; Bekkers et Delaney, 2001), dans la régulation de la fréquence de décharge en PA et dans des phénomènes de décharge tonique en PA (Connor et Stevens, 1971; Nisenbaum *et al.*, 1994; Hu et Gereau, 2003; Hu *et al.*, 2003). La grande diversité de sous-unités exprimées sous-tend une grande diversité fonctionnelle à la base de la formation de canaux ioniques aux propriétés électrophysiologiques et pharmacologiques diverses. Ces canaux sont exprimés sur toute la surface du neurone. On les trouve sur le soma, les dendrites, les nœuds de Ranvier et la terminaison axonale. La localisation spatiale, la densité et la composition en sous-unités des canaux K^+ jouent un rôle important dans l'intégration synaptique, la mise en forme du PA, sa propagation et dans la libération des neurotransmetteurs. A la différence d'autres structures du SNC, le nombre d'études concernant les canaux K^+ dans la corne dorsale de la moelle épinière est relativement faible. Cependant, elles ont permis de décrire deux grands types de conductances ioniques. Ainsi, il a été montré qu'il existait un courant à inactivation rapide (I_A), un courant de type retardé rectifiant ($I_{K_{DR}}$).

Le courant de type I_A transitoire possède des propriétés d'inactivation qui vont imposer un état non conducteur au canal après son ouverture et ceci malgré le maintien d'une stimulation électrique suffisante pour activer le canal. De plus, ce courant est dépendant du potentiel membranaire, possède un seuil d'activation et il est caractérisé par une rectification sortante. Ce type de courant peut être observé dans de nombreux types neuronaux (neurones sensoriels, pyramidaux du cortex et de l'hippocampe, etc.) et les propriétés fonctionnelles peuvent varier de manière importante. L'expression des sous-unités K^+ dans des systèmes d'expression hétérologues a permis de préciser quelles sont les sous-unités capables de former un courant K^+ transitoire à inactivation rapide (Pongs, 1999; Song, 2002). Ainsi, les sous-unités de types $K_v1.4$, $K_v3.4$, $K_v4.1-3$ constituent des canaux transitoires à inactivation rapide dont les propriétés fonctionnelles peuvent être corrélées aux courants observés dans des neurones natifs. Cependant, dans les neurones, la répartition spatiale de ces sous-unités n'est pas la même, donnant au courant I_A des fonctionnalités différentes. Dans le compartiment somatodendritique des neurones, on observe les sous-unités $K_v4.1-3$ qui forment un courant dépendant du potentiel membranaire (constante de temps d'inactivation de l'ordre de 100 ms). Ce courant I_A limite l'initiation de PA dans les dendrites ainsi que leur propagation dans ces prolongements (Hoffman *et al.*, 1997). La présence de PPSE dans les dendrites va inactiver les canaux K^+ responsables du courant I_A et ceci va favoriser la propagation d'un PA le long de la dendrite, accompagnée par une augmentation importante du Ca^{2+} intracellulaire. L'inactivation du courant I_A a une influence importante dans les mécanismes d'intégration sous-tendant la potentialisation à long terme, l'apprentissage et la mémorisation (Pongs, 1999). Au niveau des terminaisons axonales, on trouve les sous-unités de types $K_v1.4$ et $K_v3.4$ qui sont à l'origine d'un courant I_A dont l'inactivation est plus lente que celle observée avec les sous-unités de la famille K_v4 (constante de temps d'inactivation de 0,5 à 5 s pour $K_v1.4$). Dans ce cas, le courant I_A jouerait un rôle important dans la régulation de la libération vésiculaire. En effet, une bouffée de PA à faible fréquence serait freinée par la présence de I_A activé. Alors qu'une bouffée à plus forte fréquence inactiverait le courant I_A , allongeant ainsi la durée des PA. Ceci favorisera l'accumulation de Ca^{2+} dans la terminaison présynaptique pour augmenter la libération de neurotransmetteur.

Dans la moelle épinière, et plus particulièrement dans la lamina II, il existe peu d'études sur la composition en sous-unités des canaux K^+ . Toutefois, il apparaît que les sous-unités $K_v3.4$, $K_v4.2$ et $K_v4.3$ sont exprimées par une partie des neurones de la lamina II. Une immunoréactivité pour la sous-unité $K_v3.4$ est observée sous la forme de points correspondant à des appositions membranaires au niveau des neurones de la lamina II de rat (Brooke *et al.*,

2004). Par ailleurs, cette immunoréactivité est associée avec la présence du marqueur des vésicules synaptiques SV2. Enfin, dans la corne ventrale de la moelle épinière, la sous-unité $K_v3.4$ serait exprimée à la fois par les neurones excitateurs et inhibiteurs. La révélation de cette sous-unité par immunohistochimie montre qu'elle est présente au niveau d'appositions membranaires où elle serait présente sur les terminaisons axonales et jouerait un rôle dans la régulation de la libération des neurotransmetteurs (Brooke *et al.*, 2004). La lamina II exprime aussi les sous-unités $K_v4.2$ et $K_v4.3$. Au stade embryonnaire précoce, ces sous-unités sont absentes des couches superficielles de la moelle épinière. Cependant, au cours du développement, il apparaît une immunoréactivité pour ces deux protéines dans les laminae I-III. Au stade adulte chez le rat, la densité de marquage est similaire pour $K_v4.2$ et $K_v4.3$ et l'immunoréactivité est très forte dans les laminae I et II, et relativement faible, voire nulle, dans les autres régions de la substance grise médullaire (Huang *et al.*, 2006). Il apparaît que les sous-unités $K_v4.2$ et $K_v4.3$ sont préférentiellement exprimées par les neurones de la lamina II interne, où $K_v4.2$ est observée dans les dendrites, alors que $K_v4.3$ est exprimée sur le soma et les dendrites. Toutefois, des neurones de la lamina II externe sont aussi immunoréactifs pour ces protéines. Par ailleurs, certains neurones de la lamina II coexpriment ces deux sous-unités, que l'on retrouve aussi dans une sous-population de neurones excitateurs dont la morphologie est apparentée à celle des cellules centrales (Huang *et al.*, 2005). Du point de vue fonctionnel, les sous-unités K_v4 sont capables de former des canaux dont le courant est similaire au courant I_A : ceci a été observé dans les neurones de la lamina II de souris transgéniques dont le gène codant pour la sous-unité $K_v4.2$ est supprimé (Hu *et al.*, 2006). Les neurones des couches superficielles de la corne dorsale de rat possèdent un courant I_A dont les propriétés fonctionnelles sont similaires à celles observées dans d'autres types neuronaux (Wolff *et al.*, 1998; Ruscheweyh et Sandkuhler, 2002; Hu *et al.*, 2003; Ruscheweyh *et al.*, 2004). Enfin, ce courant I_A enregistré dans la lamina II de rat est sensible à la 4-aminopyridine (4-AP ; bloqueur des canaux K^+ transitoires) comme observé dans d'autres types neuronaux (Ruscheweyh et Sandkuhler, 2002; Melnick *et al.*, 2004b). Les canaux ioniques responsables du courant I_A sont distribués principalement dans le cône axonal et les dendrites des neurones de la lamina II de rat. Cette localisation a été obtenue par la méthode d'isolement de neurone (Wolff *et al.*, 1998). Les caractéristiques (amplitude et courbe d'activation) du courant ionique étudié sont comparées entre un neurone intact en tranche et le même neurone après ablation des dendrites voire de l'axone obtenu par éloignement de la pipette de « patch-clamp » de la tranche.

Le deuxième type de courant K^+ que l'on peut enregistrer dans les neurones de la lamina II est ubiquitaire (Rudy, 1988). Ce courant appelé IK_{DR} présente une rectification sortante et il est retardé. Lorsque les canaux de ce courant sont activés, l'amplitude du courant augmente (activation) jusqu'à un plateau qui se maintient jusqu'à la fin de la dépolarisation, puis l'amplitude du courant diminue rapidement (déactivation). Le courant IK_{DR} n'est pas inactivable ou peu. Dans la moelle épinière, les études portant sur la caractérisation des propriétés pharmacologiques et fonctionnelles sont très pauvres et il n'existe pas de données sur le type de sous-unités entrant dans la composition des canaux K^+ du courant IK_{DR} . Cependant, dans la lamina II, Melnick *et al.* (2004b) suggèrent que IK_{DR} est dû à une population homogène de canaux K^+ retardés et rectifiant. En effet, la sensibilité à diverses concentrations de tétraéthylammonium (TEA) et l'étude du courant de queue reflétant les propriétés de déactivation ne montrent pas l'existence de sous-populations de canaux. La présence des sous-unités K_v1 , K_v2 et K_v3 dans des systèmes d'expression hétérologues permet de former un canal K^+ fonctionnel dépendant du potentiel membranaire de type IK_{DR} (Song, 2002). Cependant, dans un système d'expression hétérologue, la sous-unité $K_v1.1$ seule développe un courant K^+ soutenu, mais la coexpression de celle-ci avec la sous-unité $\beta 1.1$ induit un courant K^+ transitoire (Robertson, 1997). Ainsi, les sous-unités β associées à la sous-unité α du canal K^+ jouent aussi un rôle important dans les propriétés électrophysiologiques du canal. Ce courant intervient dans la propagation et la durée de la phase de repolarisation membranaire du PA. L'amplitude et la cinétique d'activation de ce courant vont influencer de manière importante la durée du PA. Toute modulation de ce courant induit une modification de l'excitabilité des neurones qui peut se répercuter sur la libération de neurotransmetteurs. Du point de vue pharmacologique, ce type de courant est sensible au (TEA ; bloqueur des canaux K^+ soutenus). Les canaux K^+ responsables du courant IK_{DR} sont situés principalement sur le cône axonal. La densité de ces canaux sur le soma des neurones semble très faible (Wolff *et al.*, 1998).

3.3. Les rôles fonctionnels des conductances ioniques dans le contrôle de l'excitabilité des neurones de la lamina II

Comme nous l'avons vu, en réponse à des injections de courant supraliminaire et soutenues, les neurones de la lamina II peuvent être répartis en quatre types selon leur profil de décharge en PA en fonction de leur propriété d'adaptation en fréquence de décharge en PA. De plus, Thomson *et al.* (1989) ont montré que les neurones à profil de décharge *répétitif* répondent de manière soutenue à une stimulation électrique des afférences sensorielles primaires, alors que les autres profils émettent peu ou pas de PA. Il semble donc que les propriétés membranaires des neurones de la lamina II jouent un rôle primordial dans les aspects fonctionnels des neurones de la lamina II.

La conductance Na^+ dépendante du potentiel membranaire joue un rôle important dans les caractéristiques fonctionnelles des neurones de la lamina II. Melnick *et al.* (2004a) ont montré que la modulation des canaux Na^+ a une incidence fonctionnelle importante dans la régulation de la décharge des neurones à profil de décharge *répétitif*. En effet, l'application d'une faible concentration de TTX (40 nM) sur des neurones de ce type dans des tranches de moelle épinière de rat, modifie réversiblement leurs propriétés d'adaptation en fréquence de décharge en PA. Au cours du temps, le profil de décharge est converti successivement en type *phasique* puis *simple PA*. Le blocage partiel des canaux Na^+ contribue donc aux propriétés d'adaptation en fréquence de décharge en PA. Melnick *et al.* (2004a) ont simulé, à l'aide d'un ordinateur, le comportement électrophysiologique des neurones de la lamina II. Ils ont observé l'évolution du profil de décharge *répétitif* en modifiant la conductance Na^+ et en déplaçant les courbes d'activation et d'inactivation. La diminution de la conductance globale Na^+ modifie le profil de décharge en profil *phasique* et le déplacement de la courbe d'activation vers des potentiels plus positifs ne module pas le comportement du neurone. Par contre, le déplacement de la courbe d'inactivation vers des potentiels plus positifs restaure le profil de décharge *répétitif*. Il apparaît que la conductance des canaux Na^+ est un élément important dans les propriétés d'adaptation des neurones de la lamina II, observées lors du blocage des canaux Na^+ par la TTX. Cependant, selon Melnick *et al.* (2004a), l'état d'inactivation des canaux intervient aussi dans le contrôle de l'adaptation en fréquence des PA mais dans une moindre mesure. Par ailleurs, l'application de DAMGO (agoniste spécifique des récepteurs μ des opiacés) sur des neurones de type *répétitif* de la lamina II de rat en tranche, est capable de

mimer l'effet observé par l'application exogène de TTX (Santos *et al.*, 2004). Cette substance inhibe la réponse des neurones *répétitifs* à une stimulation électrique sans modifier le profil de décharge en PA des neurones de type *phasique* et *retardé*. Il apparaît que la modulation de l'adaptation en fréquence des PA de neurones de type *répétitif* est plus complexe. L'activation des récepteurs μ des opiacés, couplés à une protéine G, active une voie de signalisation intracellulaire. Celle-ci semble affecter des conductances ioniques de type GIRK (canaux K^+ couplés aux protéines G) induisant une hyperpolarisation membranaire modulée positivement par le baclofen (agoniste spécifique du récepteur $GABA_A$) et négativement par le Ba^{2+} et le Cs^+ (Santos *et al.*, 2004). L'hyperpolarisation induite par l'activation des récepteurs μ des opiacés peut en partie expliquer la diminution d'excitabilité des neurones de type *répétitif*. En effet, pour générer des PA, il est nécessaire de stimuler plus fortement les neurones. Cependant, il semble que la modulation de l'adaptation en fréquence de décharge des PA résulterait de mécanismes cellulaires plus complexes, qui peuvent faire intervenir les GIRK et impliqueraient une modulation de conductances membranaires dépendantes du potentiels (Na^+ et K^+) par l'activation de protéines G stimulant les voies de la PKA et/ou de la PKC. Par ailleurs, l'absence d'effet du DAMGO sur les neurones de type *phasique* et *retardé* permet de supposer que ceux-ci possèdent des canaux Na^+ différents de ceux exprimés par les neurones de type *répétitif* ou possèdent des voies de signalisations intracellulaires différentes (Santos *et al.*, 2004).

Le courant I_A , lorsqu'il est exprimé dans les neurones, est décrit pour avoir un rôle déterminant dans le contrôle de la fréquence de décharge en PA lors de stimulation électrique soutenue. L'inhibition de ce courant induit une augmentation de la fréquence de décharge en PA (Hu et Gereau, 2003). La modulation d'un tel courant ionique peut induire des changements importants dans l'excitabilité des neurones. Le courant $I_{K_{DR}}$ joue un rôle important dans la phase de repolarisation du PA. L'inhibition par l'application de TEA, sur les neurones de la lamina II, allonge la durée de cette phase (Olschewski *et al.*, 2001). Dans la lamina II, l'inactivation du courant I_A augmente l'excitabilité des neurones de la lamina II (Hu et Gereau, 2003; Hu et al., 2003). Les auteurs ont montré que la modulation des canaux ioniques responsables de ce courant passe par l'activation de la voie des ERK (« extracellular signal-regulated kinase ») qui est sous la dépendance de MEK (appartenant à la famille des « mitogen activated protein kinase »), elle-même activée par les voies de transduction intracellulaires faisant intervenir PKA et PKC. L'activation de ERK induit une

phosphorylation des sous-unités K_v4 formant le canal K^+ . Du point de vue électrophysiologique, il en résulte un déplacement de la courbe d'inactivation vers des potentiels membranaires plus positifs, ce qui inactive le courant I_A sur une plus grande plage de potentiel membranaire. Les neurones de la lamina II génèrent donc plus de PA lorsque le courant I_A est inactivé pour une même intensité de courant injecté dans le neurone. Par ailleurs, Yoshimura et Jessell (1989), ainsi que Ruscheweyh et Sandkuhler (2002), ont montré que certains neurones de la lamina II présentent un délai avant l'apparition d'une bouffée de PA (profil de type *retardé*). Ce délai est sensible à la 4-AP et serait dû à la présence du courant I_A . Ainsi, l'excitabilité des neurones de la lamina II est régulée par le courant I_A qui va contrôler la fréquence de décharge en PA et limiter l'apparition des PA en « freinant » la dépolarisation membranaire lors d'une stimulation supraliminaire. Cependant, le courant IK_{DR} joue aussi un rôle dans le contrôle de l'excitabilité des neurones de la lamina II. En effet, l'application de TEA sur les neurones de la lamina II induit une diminution de la fréquence de décharge en PA tout en ralentissant la phase de repolarisation du PA (Olschewski et al., 2001; Melnick et al., 2004b). Cependant, la sélectivité pharmacologique de la 4-AP et du TEA n'est pas stricte. En effet, bien que la 4-AP bloque plus particulièrement les conductances ioniques K^+ transitoires, elle est capable de bloquer partiellement les conductances de type IK_{DR} . Inversement, le TEA peut interagir avec les canaux ioniques de type transitoire.

Ainsi, il apparaît que les propriétés d'accommodation en fréquence de décharge des PA des neurones de la lamina II sont principalement sous la dépendance des propriétés fonctionnelles des canaux Na^+ . La régulation de la fréquence de décharge en PA serait liée à l'activité des canaux K^+ . Par ailleurs, l'initiation du PA fait intervenir les canaux Na^+ pour générer le PA, toutefois, le courant I_A intervient dans le délai d'apparition du PA. La modulation de ces canaux ioniques par des médiateurs intracellulaires va modifier l'activité des neurones en réponse à une stimulation dépolarisante ainsi que l'intégration du message nociceptif. En effet, Hu *et al.* (2006) ont quantifié les réponses comportementales de souris par l'utilisation de tests nociceptifs permettant d'observer les modifications des seuils d'hyperalgie mécanique et thermique ainsi que l'allodynie mécanique. Des animaux présentent une suppression de la sous-unité $K_v4.2$ ($K_v4.2^{-/-}$). Du point de vue électrophysiologique, les neurones des couches superficielles en culture $K_v4.2^{-/-}$ possèdent un courant I_A mais son amplitude est fortement diminuée, résultat de la diminution de

l'expression de canaux I_A fonctionnels dépendant de la sous-unité $K_v4.2$. Le courant K^+ maintenu n'est pas affecté. Ceci induit une augmentation de l'excitabilité des neurones par une augmentation de la fréquence de décharge en PA. De plus, les souris $K_v4.2^{-/-}$ présentent une augmentation de la sensibilité à des stimulations tactiles non nociceptives (test de von Frey) comme de l'hyperalgie thermique et mécanique (tests de la plaque chauffante, du retrait de la queue par pression). Ainsi, la modulation du courant I_A , des neurones de la lamina II, tient une place importante dans l'intégration de l'information douloureuse.

4. L'organisation du réseau d'interneurones de la lamina II

Nous préciserons quelles sont les transmissions synaptiques rapides mises en jeu dans le transfert de l'information nociceptive et comment s'organise le réseau de neurones de la lamina II entre les afférences sensorielles primaires et les neurones de la lamina I.

Les neurones de la lamina II reçoivent des afférences sensorielles primaires nociceptives d'origine cutanée. Ces fibres, comme nous l'avons vu précédemment, sont de type C (haut seuil d'activation) principalement et de type $A\delta$ (haut seuil d'activation). Un certain nombre d'évidences montre que les neurones de la lamina II répondent sélectivement à des stimulations thermiques nociceptives ou non (Christensen et Perl, 1970; Kumazawa et Perl, 1978; Light et Perl, 1979). Comme nous l'avons vu ci-dessus, les afférences primaires nociceptives libèrent un neurotransmetteur excitateur : le glutamate. La transmission synaptique est médiée par deux types de récepteurs qui seront décrits ci-après : les récepteurs AMPA et NMDA. Le récepteur AMPA interviendrait dans la transmission de l'information et le récepteur NMDA jouerait un rôle dans la modification de l'efficacité de cette transmission par la mise en jeu de phénomènes de plasticité synaptique. Ainsi, la première synapse établie entre les nocicepteurs et les neurones de la lamina II est une synapse excitatrice. Des études électrophysiologiques, utilisant des tranches de moelle épinière afin d'enregistrer la réponse évoquée des neurones de la lamina II suite à une stimulation de la racine dorsale, ont permis de déterminer que les fibres $A\delta$ et C établissent un contact synaptique avec les neurones de la substance gélatineuse (Yoshimura et Jessell, 1990; Yoshimura et Nishi, 1993; Grudt et Perl, 2002; Lu et Perl, 2003, , 2005). Il est intéressant de noter, que des fibres $A\delta$ empruntent la

colonne dorsale, parallèlement au tractus de Lissauer, pour établir des contacts synaptiques avec les neurones de la lamina II, alors qu'aucune afférence de type C ne semble parcourir cette colonne (Baba *et al.*, 1994). De plus, la stimulation de la colonne dorsale induit une inhibition des neurones de la lamina II médiée le GABA et la glycine. Cet effet provient certainement de l'activation des neurones inhibiteurs des couches médullaires superficielles stimulés par ces fibres A δ . Du point de vue fonctionnel, les résultats de Pan et Pan (2004) montrent que les neurones de la lamina II externe sont tous sensibles à la capsaïcine (cette substance active les afférences de type C qui possèdent les récepteurs vanilloïdes), alors que 41 % des neurones de la lamina II interne répondent à la stimulation de la racine dorsale par la capsaïcine. Ainsi, la répartition des fibres de type C est différente au sein de la lamina II. De plus, l'amplitude des PPSE spontanés enregistrés suite à l'activation des afférences sensorielles nociceptives est plus importante dans la lamina II externe. Au contraire l'amplitude des PPSI spontanés est plus petite dans cette partie de la lamina II. Cette différence d'efficacité synaptique entre l'inhibition et l'excitation pourrait jouer un rôle important dans l'intégration des messages nociceptifs périphériques en fonction du type d'entrée sensorielle activé. Cependant, encore aujourd'hui, il y a peu de données concernant l'organisation du réseau d'interneurones de la lamina II.

4.1. Les principaux récepteurs ionotropiques rencontrés dans la lamina II

Les neurones de la lamina II constituent un réseau complexe d'interneurones excitateurs et inhibiteurs qui libèrent du glutamate, du GABA et de la glycine. A ce jour le nombre et la nature neurochimique des articulations entre la première synapse nocicepteur-neurone de la lamina II et la dernière synapse neurone de la lamina II-neurone de la lamina I, ne sont pas connus. Cependant, de nombreuses données permettent de préciser la nature des transmissions synaptiques mises en jeu dans le transfert de l'information nociceptive et la nature des récepteurs membranaires sensibles aux neurotransmetteurs libérés. La description qui suit s'intéresse uniquement aux récepteurs canaux impliqués dans la transmission synaptique rapide au sein de la lamina II.

a) Les récepteurs du glutamate

Les neurones de la lamina II reçoivent tous des entrées glutamatergiques issues des neurones de la lamina II eux-même mais aussi des afférences sensorielles primaires

nociceptives. Les neurones de la lamina II possèdent des récepteurs glutamatergiques ionotropiques (récepteurs canaux) et des récepteurs métabotropiques (récepteurs couplés aux protéines G, qui ne seront pas détaillé ici). Les récepteurs ionotropiques exprimés par les neurones de la lamina II sont les récepteurs l'acide AMPA et NMDA. Le récepteur kainate, exprimé à la terminaison centrale des nocicepteurs et des neurones de la lamina II, module la libération des vésicules synaptiques (Nagy et al., 1994; Hwang et al., 2001; Lu et al., 2005). La revue de Coggeshall et Carlton (1997) donne une bonne description des récepteurs glutamatergiques dans la moelle épinière et les afférences sensorielles primaires, en référant les études qui ont permis de déterminer leur localisation cellulaire par les techniques d'hybridation *in situ*, immunocytochimiques et d'autoradiographie. Pour résumer, la densité des récepteurs ionotropiques du glutamate est plus importante dans la lamina II, par rapport aux autres couches de la moelle épinière, et les trois types de récepteurs sont exprimés. Cette observation conforte l'intervention de cette transmission synaptique dans la diffusion des informations nociceptives par les afférences sensorielles de type C et A δ qui se projettent sur les neurones de la lamina II. De plus, il est intéressant de noter que les « cellules en tige » expriment préférentiellement le récepteur AMPA alors que les « cellules en îlots » expriment le récepteur NMDA.

- Le récepteur AMPA

Le récepteur AMPA est un récepteur ionotropique qui présente 4 types de sous-unités (GluR1-4) codées par différents gènes. Le récepteur fonctionnel nécessite un assemblage tétramérique de sous-unités (Rosenmund *et al.*, 1998) dont la composition est très souvent hétéromérique (Kew et Kemp, 2005). L'assemblage des sous-unités va former un pore dont l'ouverture est obtenue par la liaison du glutamate. Le récepteur activé permet un flux de cation qui va dépolariser la cellule permettant la genèse d'un PPSE, en effet la perméabilité relative du canal pour le Na⁺ est supérieure à celle du K⁺ et du Ca²⁺. La sous-unité GluR2 joue un rôle particulier dans la perméabilité au Ca²⁺ du pore de ce récepteur ionotropique. L'absence de cette sous-unité rend le récepteur perméable au Ca²⁺. Cette perméabilité au Ca²⁺ jouerait un rôle dans des mécanismes de plasticité synaptique. Le récepteur montre une rectification interne qui est le résultat d'un blocage du canal dépendant du potentiel membranaire par les polyamines (Bowie et Mayer, 1995).

Des expériences d'hybridation *in situ* des transcrits des gènes codant pour les sous-unités GluR1-4 ont été réalisées chez des rats durant le développement depuis 7 jours postnataux au stade adulte (Jakowec *et al.*, 1995). Les résultats obtenus montrent que la lamina II exprime

les ARNm des 4 types de sous-unités. De plus, le taux des transcrits de GluR1, 2 et 4 tendent à diminuer jusqu'à l'âge adulte, alors que le taux du transcrit de GluR3 ne semble pas être modifié. Furuyama *et al.* (1993), par des expériences d'hybridation *in situ* et de quantification des niveaux protéiques des sous-unités GluR1-4 chez le rat adulte, ont mis en évidence une expression différente des sous-unités. GluR2 est fortement exprimé dans la lamina II, GluR1 modérément et GluR4 très faiblement. Il est à noter que ces niveaux d'expression sont comparés à ceux observés dans la corne ventrale où l'on observe une inversion des niveaux d'expression. Ainsi, il semble que la composition en sous-unités des récepteurs AMPA soit régulée différemment en fonction de leur localisation dans la moelle épinière et que les récepteurs AMPA de la lamina II soient peu perméables au Ca^{2+} .

De nombreuses expériences électrophysiologiques menées *in vivo* et *in vitro* confirment la présence des récepteurs AMPA sur les neurones de la lamina II. De nombreuses données ont été obtenues *in vitro* par le groupe de Yoshimura (Yoshimura et Jessell, 1990; Yoshimura et Nishi, 1993; Baba *et al.*, 1994). La stimulation des fibres sensorielles A δ et C libère du glutamate et active des récepteurs présents à la surface des neurones de la lamina II. Cette transmission synaptique est médiée par le récepteur NMDA (voir ci-après) et des récepteurs AMPA bloqués spécifiquement par le CNQX (antagoniste compétitif du récepteur AMPA et Kaïnate). De plus, dans une culture de neurones de corne dorsale de rat, une transmission glutamatergique médiée par le récepteur AMPA peut être enregistrée (Jo *et al.*, 1998b).

Albuquerque *et al.* (1999), en utilisant la technique capture du Co^{2+} induite par le kaïnate sur des culture de neurones de corne dorsale de rats, ont précisé que les neurones GABAergiques, ainsi que les neurones exprimant le récepteur NK1 de la substance P expriment aussi le récepteur AMPA perméable au Ca^{2+} . Les neurones exprimant le récepteur NK1 appartiendraient aux neurones de projection de la lamina I. Spike *et al.* (1998) ont montré sur des tranches de moelle épinière qu'une majorité de neurones GABAergiques exprime la sous-unité GluR1, où quelques uns sont immunoréactifs pour la glycine. Presque tous les neurones non GABAergiques et non glycinergiques ne possèdent pas d'immunoréactivité pour GluR2/3. En résumé, il semble que ce soit les neurones excitateurs des couches superficielles qui possèdent des récepteurs AMPA perméable au Ca^{2+} .

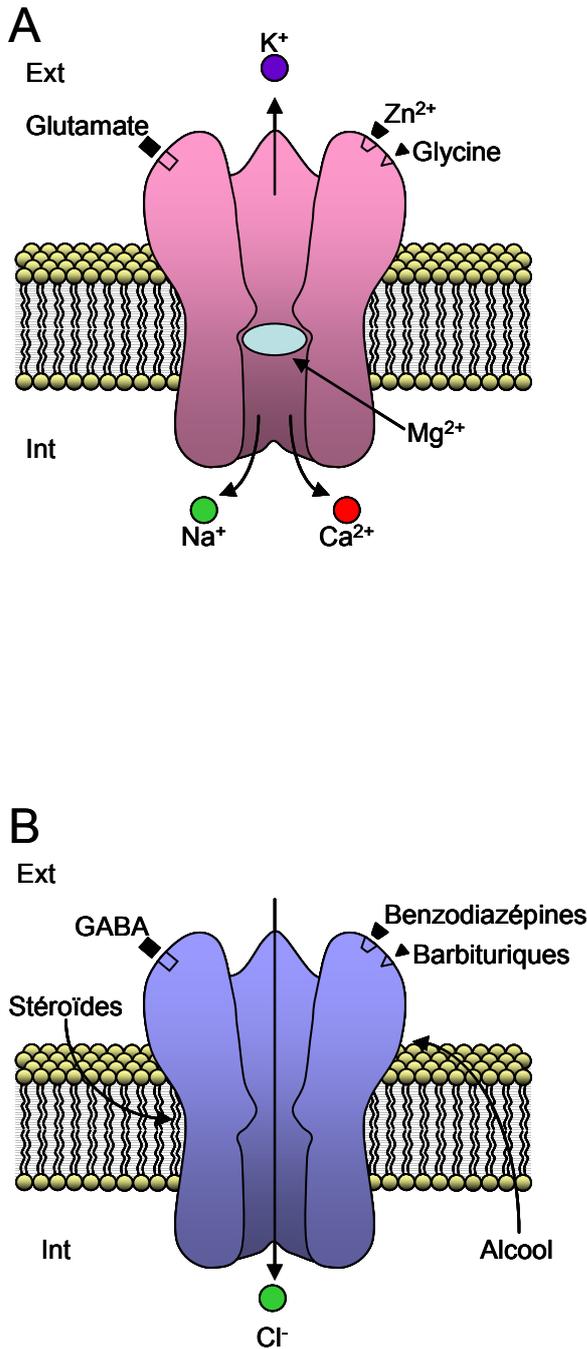


Figure 12 : Les récepteurs NMDA et GABA_A.

A : Le récepteur NMDA est constitué de 4 sous-unités. Il possède deux sites de liaison du glutamate. Un site de fixation pour la glycine est présent sur ce récepteur. Cet acide aminé est nécessaire pour le fonctionnement de ce récepteur. En effet, il agit comme un co-agoniste nécessaire à l'action du glutamate sur le récepteur. Il existe en plus des modulateurs allostériques des stéroïdes, le Zn²⁺ et les polyamines. Le Mg²⁺ agit comme un bloqueur du récepteur NMDA. Il bloque le canal empêchant la diffusion des ions Na⁺, K⁺ et Ca²⁺. Cependant, lorsque la membrane est dépolarisée à des valeurs supérieures à -40 mV, le Mg²⁺ est éliminé du pore rendant le récepteur fonctionnel.

B: le récepteur GABA_A est constitué de l'assemblage de 5 sous-unités. Il possède deux sites de liaison pour le GABA, ainsi que des sites de modulation allostérique (sites des benzodiazépines, des barbituriques et des stéroïdes).

Ext : externe ; Int : interne.

- Le récepteur NMDA

Le récepteur NMDA est composé de 7 sous-unités différentes (NR1, NR2A-D, NR3A-B), produits de gènes différents (Kew et Kemp, 2005). Il existe différentes isoformes de ces sous-unités, résultats d'épissages alternatifs. Le récepteur serait constitué de l'assemblage de 5 sous-unités, conférant des propriétés fonctionnelles et pharmacologiques diverses. Afin de former un récepteur fonctionnel, la composition du récepteur doit comprendre une sous-unité NR1 et au moins une sous-unité NR2. Les sous-unités NR3 jouent un rôle dans la régulation du récepteur. Il est intéressant de noter que le récepteur NMDA est bloqué par le Mg^{2+} extracellulaire (figure 12 A). Cependant, lors d'une dépolarisation membranaire suffisante (supérieure à -40 mV), le Mg^{2+} quitte le canal et, si du glutamate vient se lier au récepteur, celui-ci s'ouvre permettant l'entrée de cations (Na^+ et Ca^{2+}). Ce récepteur-canal va dépolariser le neurone tout en faisant entrer du Ca^{2+} qui va pouvoir induire l'activation de mécanismes de transduction intracellulaires à plus ou moins long terme. Le rôle fonctionnel du récepteur NMDA est très largement étudié à la fois dans des conditions normales et de douleurs pathologiques. Ainsi, il serait impliqué dans les processus moléculaires de l'hyperalgie, de l'allodynie et de la douleur chronique. De nombreuses revues font état de ce récepteur dans ces mécanismes (Coggeshall et Carlton, 1997; Sandkuhler, 2000; Willis, 2002; Ji et al., 2003).

Pour la moelle épinière, des études, utilisant des techniques d'hybridation *in situ* ou d'immunocytochimie, ont tenté de mettre en évidence la distribution de l'expression des sous-unités de ce récepteur afin de mieux comprendre le rôle de celui-ci dans la transmission glutamatergique. Cependant, ces études montrent des résultats controversés concernant sa distribution au sein des laminae de la moelle épinière. Une étude de Nagy *et al.* (2004) utilisant des anticorps dirigés contre les sous-unités NR1, NR2A et NR2B de tranches lombaires de moelle épinière de rat adulte, montre que la sous-unité NR1 est exprimée de manière ponctiforme dans toute la substance grise. NR2A est concentrée dans les laminae III-IV, alors que NR2B est observée dans les laminae I-II. Dans la lamina II, la sous-unité NR2B est co-exprimée avec NR1 dans une grande majorité des cas et ces neurones sont pour la plupart de type glutamatergique.

b) Le récepteur GABA_A

Les neurones de la lamina II expriment le récepteur ionotropique GABA_A. Il est activé par la libération de GABA et il est perméable aux ions Cl^- . Ce récepteur-canal joue un rôle important dans l'inhibition des neurones de la lamina II et le potentiel d'équilibre de l'ion Cl^- est tel qu'il induit une hyperpolarisation membranaire.

Le récepteur GABA_A appartient à la superfamille du récepteur à l'acétylcholine. Il est constitué par l'assemblage de cinq sous-unités. Deux molécules de GABA se fixant sur le récepteur sont nécessaires pour l'activer (Sakmann *et al.*, 1983). A ce jour, sept types de sous-unités ont été clonées (α 1-6 ; β 1-3 ; δ , γ 1-4 ; ϵ ; π ; ρ 1,2) codées par différents gènes (McKernan et Whiting, 1996), sur plusieurs chromosomes (4, 5, et 15 chez l'homme). Dans la lamina II de la moelle épinière, seules quelques sous-unités sont exprimées : α 2,3 ; β 2,3 ; γ 2 (Bohlhalter *et al.*, 1996).

Le récepteur GABA_A possède de nombreux sites de modulation allostériques comme ceux des benzodiazépines et des neurostéroïdes (figure 12 B). Le site de liaison des benzodiazépines est différent du site de fixation du GABA (Macdonald et Olsen, 1994). Deux types de récepteurs GABA_A peuvent se différencier par leur affinité relative pour les benzodiazépines (type I : forte affinité, type II : faible affinité). Cette différence d'affinité est associée à une combinaison particulière des sous-unités afin de former le récepteur GABA_A. Ainsi, la présence de α 1 confèrera au récepteur une forte affinité (type I), alors que la présence des sous-unités α 2,3,5 dans la composition du récepteur donnera un type II (Luddens *et al.*, 1991; Luddens et Korpi, 1995; Luddens *et al.*, 1995). Le récepteur de type I est localisé dans le SNC et surtout dans le cervelet, alors que le type II est rencontré préférentiellement dans le striatum, l'hypothalamus, l'hippocampe et la moelle épinière. Du point de vue fonctionnel, d'une manière générale, les benzodiazépines potentialisent les courants GABA_A, même si certaines agissent comme des antagonistes ou des agonistes inverses. L'action de ces molécules provoque une augmentation de la fréquence d'ouverture du récepteur sans modifier sa conductance. Cet effet résulterait d'une augmentation de l'affinité du GABA pour son récepteur au niveau d'un seul site de liaison (Twyman *et al.*, 1989).

Un des autres sites de modulation, largement étudié en ce moment, est celui des stéroïdes. C'est l'usage des stéroïdes comme anesthésiques de part leurs propriétés sédatives, en clinique, qui a permis de mettre en évidence, puis de caractériser les propriétés de ces dérivés du cholestérol sur le récepteur GABA_A (Belelli *et al.*, 1999). Le site de liaison n'est pas encore décrit à ce jour. Cependant, très récemment, la localisation du récepteur s'est précisée (Akk *et al.*, 2005). Il semble que les stéroïdes accèdent au récepteur par diffusion latérale dans la membrane plasmique pour contacter les parties hydrophobes des domaines transmembranaires du récepteur et non les domaines hydrophiles intra et extracellulaires. L'enregistrement de courants unitaires GABA_A, par la technique de « patch-clamp », montre

que les stéroïdes sont capables d'augmenter le temps d'ouverture et la durée de la bouffée des transitions état ouvert-état fermé du récepteur-canal, sans modifier la conductance du canal Cl⁻.

c) Le récepteur de la glycine

Tout comme le récepteur GABA_A, le récepteur de la glycine est impliqué dans l'inhibition des neurones de la lamina II. Ce récepteur a été purifié par la liaison de la strychnine (antagoniste sélectif) au début des années 1980 (Pfeiffer et Betz, 1981; Pfeiffer et al., 1982). Il est constitué par l'assemblage de sous-unités α et β transmembranaires formant un canal perméable au Cl⁻. Il est associé à la géphyrine, protéine impliquée dans l'adressage et l'ancrage membranaire du récepteur glycine. Tout comme le récepteur GABA_A, ce récepteur appartient à la superfamille du récepteur de l'acétylcholine. Il résulte de l'assemblage de cinq sous-unités (Langosch *et al.*, 1988) dont la stoechiométrie supposée est de 3 sous-unités α (isoformes α_1 , 2, 3) et de 2 sous-unités β (une seule isoforme). Tout comme le récepteur GABA_A, celui de la glycine nécessite la liaison de deux molécules de cet acide aminé pour être activé. L'antagoniste sélectif de ce récepteur, la strychnine, ne possède pas le même site de liaison que la glycine, mais il implique des résidus aminés communs.

Comme nous venons de le voir, les neurones de la lamina II possèdent des récepteurs des neurotransmetteurs excitateurs (glutamate) et inhibiteurs (GABA et glycine). Ces récepteurs sont impliqués dans la transmission synaptique rapide, où ils vont induire l'ouverture d'un récepteur canal spécifique. Cependant, il ne faut pas oublier qu'il existe aussi des récepteurs métabotropiques de ces neurotransmetteurs (récepteurs GABA_B et mGluR du glutamate) qui interviennent dans la modulation de la transmission synaptique par l'activation de voies de transduction intracellulaires. Ce type de récepteurs n'ayant pas fait l'objet d'une étude dans ce travail, j'ai choisi de ne pas les décrire.

4.2. L'organisation fonctionnelle du réseau d'interneurones de la lamina II

a) Les articulations des neurones de la lamina II avec les fibres sensorielles et les neurones de la lamina I

Les neurones de la lamina II reçoivent des entrées issues des fibres afférentes nociceptives, des neurones propriospinaux et des contrôles descendants supramédullaires. Les neurones de la lamina II s'articulent en un réseau complexe d'interneurones qui intègrent les informations issues des fibres sensorielles. Cependant, à ce jour, le nombre et la nature neurochimique des articulations de ce réseau (entre le nocicepteur et le neurone de la lamina I) restent mal connus. Toutefois, quelques études récentes ont permis de mieux appréhender la relation entre les neurones sensoriels primaires et les neurones de la lamina II qui y sont connectés. En enregistrant des paires de neurones, les travaux de Lu et Perl (2003; 2005) montrent que le pourcentage de neurones connectés les uns aux autres à l'intérieur de la lamina II est relativement faible (11 %). Il en est de même pour les connections entre les neurones de la lamina II externe et les neurones de la lamina I (10 %). Ceci suggère donc que les neurones des couches superficielles de la corne dorsale, dans la grande majorité des cas, ne sont pas directement reliés synaptiquement et que plusieurs articulations, impliquant certainement des neurones de nature neurochimique diverse (neurotransmetteurs excitateurs et inhibiteurs), sont impliquées.

La grande majorité des neurones interconnectés (un neurone de lamina II interne connecté à un neurone de la lamina II externe) possèdent des entrées monosynaptiques issues des fibres sensorielles de type C (Lu et Perl, 2003). Leurs résultats semblent indiquer que les neurones inhibiteurs GABAergiques (situés dans la lamina II interne) appartiendraient à la morphologie de type cellule en îlot, en accord avec les études précédentes (Todd et McKenzie, 1989; Todd et Spike, 1993). Ces neurones GABAergiques sont connectés aux neurones de la lamina II externe (morphologie de type centrale à l'interface des lamina II interne et externe, suivant la classification établie chez le hamster par Grudt et Perl, 2002). En se référant aux données actuelles, Lu et Perl (2003) spéculent sur le fait que les neurones de la lamina II interne de type en îlot GABAergique reçoivent les terminaisons des fibres C de gros diamètre qui véhiculeraient préférentiellement des informations non nociceptives (mécaniques voire thermiques). Les neurones centraux (postsynaptiques) qui sont connectés à ces neurones GABAergiques (présynaptiques) recevraient quant à eux préférentiellement des fibres sensorielles de type C de petit diamètre véhiculant les informations nociceptives (thermiques). En effet, Lu et Perl (2003) ont remarqué que la vitesse de conduction des entrées de ces deux

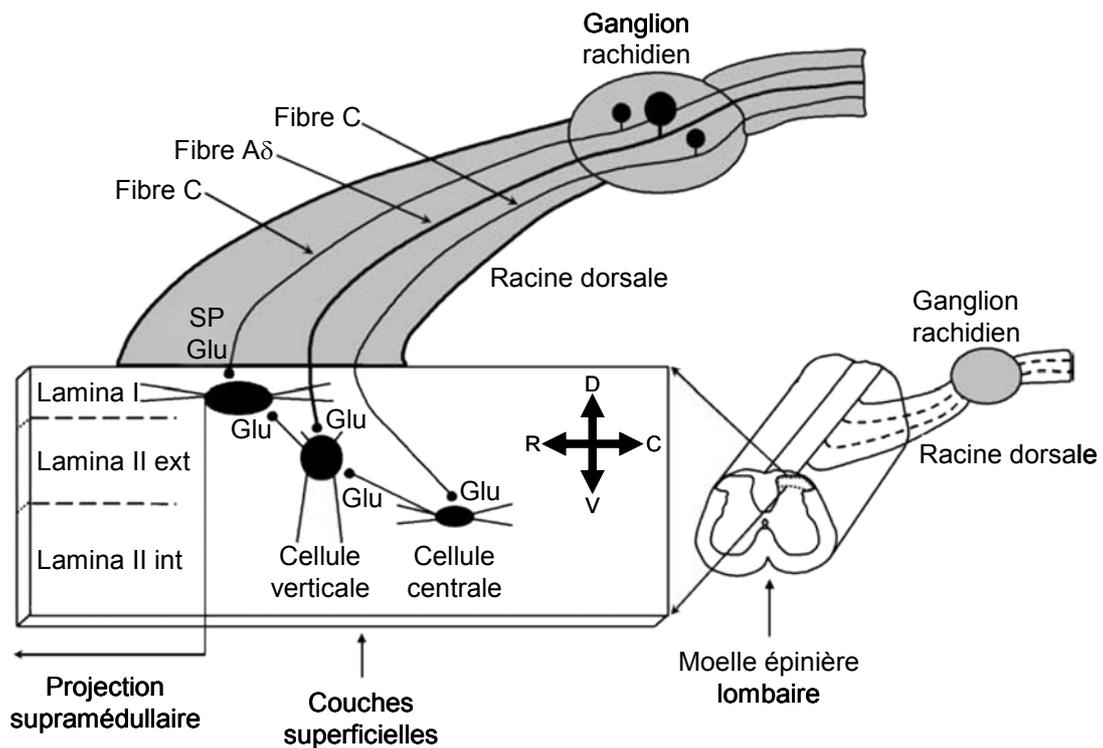


Figure 13 : Schéma de l'organisation de la transmission synaptique excitatrice glutamatergique dans les couches superficielles de la moelle épinière.

Les neurones de projection de la lamina I reçoivent des afférences directes à partir des fibres C. Le réseau local de neurones de la lamina II connecte les neurones de projection par des neurones glutamatergiques qui reçoivent des entrées nociceptives par les fibres A δ et C. Les neurones de la lamina II interne recevraient préférentiellement des afférence de type C alors que les neurones de la lamina II externe recevraient également des fibres de type A δ . Les résultats obtenus dans cette étude semblent indiquer l'existence d'un module particulier comprenant un neurone de la lamina II interne (cellule centrale) qui va établir un contact synaptique excitateur avec un neurone glutamatergique de la lamina II externe (cellule verticale). Ce dernier va à son tour se connecter à un neurone de projection de la lamina I.

Glu : glutamate ; D : dorsal ; V : ventral ; R : rostral ; C : caudal ; ext : externe ; int : interne.

Modifié d'après Lu et Perl (2005)

types de neurones était différente et qu'elle était plus rapide pour les neurones en flot. Dans cette configuration, l'organisation du circuit de neurones de la lamina II montre que des stimulations non nociceptives seraient capables d'inhiber la propagation de messages nociceptifs. Il existerait donc dans la lamina II un module de connection particulier impliquant deux populations de neurones qui pourrait jouer un rôle important dans le traitement médullaire des informations nociceptives. On peut émettre l'hypothèse que ce module se répète à des endroits clés de la lamina II. De plus, ceci permettrait d'envisager une organisation somatotopique du traitement des informations d'origine cutanée dans des aires particulières de la lamina II. Cependant, peu de neurones de la lamina II sont interconnectés. Ainsi, ce réseau s'organiserait de manière complexe avec à l'intérieur des articulations particulières bien définies.

D'un autre côté, Lu et Perl (2005) ont enregistré des paires de neurones situés dans la lamina II et des neurones interconnectés entre les laminae II et I. Ici, ils se sont concentrés sur la transmission glutamatergique (figure 13). Le nombre de neurones interconnectés représente un faible pourcentage des neurones. Leurs observations montrent que l'enregistrement de paires de neurones connectés dans la lamina II fait intervenir deux populations que l'on discrimine par leur morphologie. Les neurones centraux, recevant des entrées sensorielles de type C, sont situés dans la lamina II interne et sont connectés directement aux neurones verticaux, recevant des entrées sensorielles de type A δ , situés dans la lamina II externe. Enfin, ces derniers établissent un contact synaptique direct avec les neurones de projection de la lamina I qui reçoivent uniquement des entrées sensorielles de type C. Les neurones de projections sont sensibles à la substance P. Les neurones insensibles à la substance P, ne se projetant pas sur des structures supramédullaires, reçoivent quant à eux les terminaisons centrales des nocicepteurs de type C et A δ . Il est intéressant de noter, aussi, que les neurones de la lamina II externe ne semblent pas être reliés entre eux par des synapses glutamatergiques. Ici encore, Lu et Perl (2005) montrent qu'il existe au sein de la lamina II des articulations particulières de neurones excitateurs (glutamatergiques) qui vont jouer un rôle important dans l'intégration du message nociceptif acheminé par les fibres sensorielles primaires nociceptives. De plus, chacun des intervenants situés dans la lamina II reçoit préférentiellement des afférences sensorielles particulières. Ceci permet aux neurones de projection ou non de la lamina I d'intégrer les informations nociceptives issues de différentes modalités sensorielles (mécaniques, thermiques, etc.) et/ou issues de fibres sensorielles possédant des seuils de sensibilité différents. Enfin, Lu et Perl (2005) semblent suggérer que les résultats obtenus lors de l'étude précédente (Lu et Perl, 2003) pourrait être reliés. En effet,

les neurones GABAergiques de type en îlot pourraient être reliés aux neurones de type central (glutamatergique) situés dans la lamina II interne. Ainsi, ce schéma permet de faire entrer dans ce circuit excitateur une composante inhibitrice. Enfin, il ne faut pas oublier que ce neurone GABAergique reçoit des entrées sensorielles d'origine non nociceptive. Un tel circuit permettrait ainsi, pour partie, d'inhiber les neurones excitateurs de la lamina II connectés aux neurones de projection de la lamina I. L'existence de ces articulations de neurones pourraient constituer des cibles privilégiées de contrôles locaux ou extra-médullaires afin de moduler la voie de sortie des neurones de la lamina II constituée par les neurones de projection de la lamina I.

b) Le rôle de l'inhibition dans le système nociceptif médullaire

Les paragraphes précédents nous ont montré que les neurones de la lamina II sont organisés en un réseau complexe. De plus, les neurones de la lamina II reçoivent des entrées excitatrices issues des afférences sensorielles primaires de type C et A δ . Par ailleurs, les neurones de la lamina II présentent une diversité neurochimique conférant aux neurones un rôle excitateurs et inhibiteurs (Todd et Spike, 1993). Enfin, ces neurones possèdent des récepteurs aux transmissions synaptiques rapides classiques que nous avons décrits ci-dessus. Chaque neurone de la lamina II est placé sous le contrôle d'une balance excitation-inhibition qui détermine le transfert de l'information nociceptive vers les centres supramédullaires. Dans des conditions pathologiques, cette balance est déséquilibrée en faveur de l'excitation : soit par une augmentation de l'excitation, soit par une diminution de l'inhibition, soit les deux.

Afin de mieux comprendre le rôle de l'inhibition dans le système nociceptif, des expériences de blocage des transmissions synaptiques rapides médiées par les récepteurs GABA_A et glycine ont été effectuées par l'injection intrathécale des inhibiteurs spécifiques (bicuculline et strychnine, respectivement) *in vivo* (Yaksh, 1989; Sivilotti et Woolf, 1994). Dans ces conditions, les animaux présentent des symptômes d'hyperlagie et d'allodynie. Parallèlement, les neurones médullaires présentent une hyperexcitabilité et une sensibilisation centrale des afférences sensorielles primaires est observée, lors d'une stimulation tactile de la patte (Sivilotti et Woolf, 1994). Reeve *et al.* (1998) ont enregistré la réponse évoquée de neurones des couches profondes de la corne dorsale de la moelle épinière suite à la stimulation électrique des afférences primaires A β , A δ et C. Leurs résultats montrent que les réponses évoquées des fibres A δ et C sont facilitées lorsque de la bicuculline est perfusée et les neurones médullaires sont sur-activés. En parallèle, aucune modification de la réponse

évoquée des neurones suite à la stimulation des fibres A β n'a été observée. La transmission synaptique GABAergique joue un rôle spécifique dans le contrôle des informations nociceptives dans ce cas. Par ailleurs, la stimulation électrique de la moelle épinière chez le rat produit une libération de GABA mesurée par microdialyse (Linderoth *et al.*, 1994). Enfin, Lind *et al.* (2004) ont effectué des injections intrathécales de baclofen (agoniste sélectif du récepteur métabotropique GABA_B) en absence ou en présence d'une stimulation électrique de la moelle épinière chez des patients présentant un syndrome de douleur neuropathique d'origine périphérique. Les résultats suggèrent que le récepteur GABA_B est impliqué en partie dans l'inhibition observée. Des résultats identiques ont été observés chez un modèle de rat neuropathique (Cui *et al.*, 1996). Ainsi, le GABA libéré dans des conditions pathologiques favoriserait l'inhibition des afférences sensorielles primaires nociceptives qui expriment le récepteur GABA_B à leur terminaison centrale. Cet effet favorise l'analgésie et diminue l'allodynie. Ishikawa *et al.* (2000) ont effectué des expériences de quantification par dialyse de la libération des acides aminés excitateurs (glutamate, sérine, taurine) libérés dans la moelle épinière après injection intrathécale de NMDA, de bicuculline ou de strychnine, voire une combinaison de NMDA avec de la bicuculline ou de la strychnine. Les résultats indiquent que la libération de glutamate dans la moelle épinière serait sous le contrôle de neurones GABAergiques connectés aux neurones glutamatergiques.

Par ailleurs, le tonus GABAergique peut être favorisé par un contrôle local impliquant la synthèse et la libération de neurostéroïdes dans la lamina II lors d'une inflammation périphérique. Ces neurostéroïdes vont moduler positivement le récepteur GABA_A par une augmentation de son affinité relative pour le GABA (voir les annexes 1, 2 et 3 situées à la fin de ce document).

La transmission synaptique glycinergique est aussi sollicitée dans la modulation des informations nociceptives (Harvey *et al.*, 2004). En effet, la PGE₂, médiateur important de l'inflammation, est capable d'inhiber les récepteurs glycinergiques par un mécanisme de phosphorylation du récepteur. La sous-unité $\alpha 3$ est exprimée spécifiquement dans la lamina II. Des souris « knock-out » pour le gène de la sous-unité $\alpha 3$ montrent que le récepteur glycine est insensible à l'application de la PGE₂ dans la lamina II et que les souris « knock-out » sont moins sensibles à des stimulations nociceptives.

Ces études permettent ainsi de montrer que la transmission synaptique inhibitrice médiée par la libération de GABA et de glycine joue un rôle important dans le contrôle de l'activité

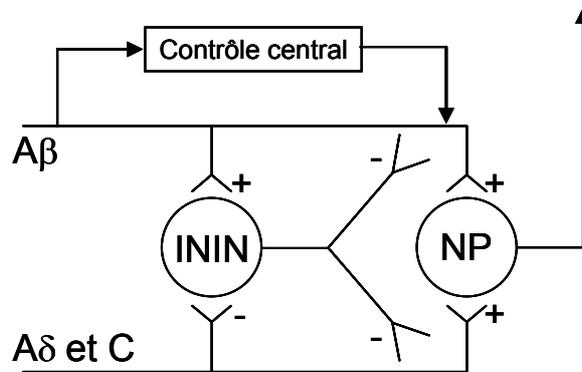


Figure 14 : Schéma du contrôle du portillon.

Les afférences sensorielles nociceptives vont faciliter les transferts de l'information nociceptive vers les structures supramédullaires par l'activation des neurones de projection (NP). Ceci est facilité par l'inhibition concomitante des interneurons inhibiteurs (ININ). A l'opposé, l'activation des afférences sensorielles non nociceptives va s'opposer à la transmission de l'information nociceptive par la potentialisation de l'inhibition. En retour, l'activation des interneurons inhibiteurs induit l'inhibition des afférences sensorielles et par la suite celle des neurones de projection.

Modifié d'après Melzack et Wall (1965)

des neurones médullaires impliqués dans l'intégration et la mise en forme du message nociceptif.

5. Les contrôles segmentaires et intersegmentaires

Très classiquement et comme nous l'avons décrit jusqu'à présent, l'organisation de la moelle épinière est vue en deux dimensions où les neurones se connectent dans le plan transversal, c'est-à-dire suivant un agencement segmentaire. Toutefois, l'organisation de la moelle épinière fait intervenir l'interaction de plusieurs segments entre eux, soit un agencement tridimensionnel. Ainsi, les neurones des couches superficielles sont sous la dépendance d'un contrôle faisant intervenir des neurones propriospinaux (intralaminaires, interlaminaires, intra/intersegmentaires).

Le contrôle segmentaire est supporté par la théorie du « contrôle du portillon » (« gate control ») proposée par Melzack et Wall (1965). Cette théorie (figure 14) repose sur l'existence à l'étage médullaire d'influences excitatrices et inhibitrices qui contrôlent l'activité des neurones de projection de la corne dorsale (laminæ I et V). Les entrées excitatrices sur les neurones de projection auraient une origine essentiellement périphérique alors que les entrées inhibitrices seraient médullaires (laminæ I à V) via une activation des afférences sensorielles et/ou supramédullaires. De plus, les afférences primaires non nociceptives A β peuvent avoir une action inhibitrice sur les réponses nociceptives des neurones médullaires (Guirimand et Le Bars, 1996). Cet effet résulte de l'organisation des champs récepteurs cutanés. La zone centrale du champ est excitatrice, alors que la zone périphérique est inhibitrice et généralement plus large que la première. L'activation mécanique légère de la zone périphérique active les afférences sensorielles non nociceptives et augmente l'activité des interneurons inhibiteurs (Hillman et Wall, 1969). Cette théorie permet d'expliquer comment les neurones de projection sont modulés par les entrées sensorielles et quel rôle joue l'inhibition, mise en jeu par les interneurons inhibiteurs des laminæ II et V, dans la modulation de la transmission de l'information nociceptive. Cependant, comme nous l'avons vu précédemment, l'organisation des neurones de la lamina II, ainsi que celle des projections périphériques sur les neurones des couches superficielles de la moelle épinière, est bien plus complexe. Les nombreuses données obtenues depuis 1965, en se basant sur ce schéma, ont permis de mieux préciser le rôle fonctionnel des neurones médullaires du système nociceptif.

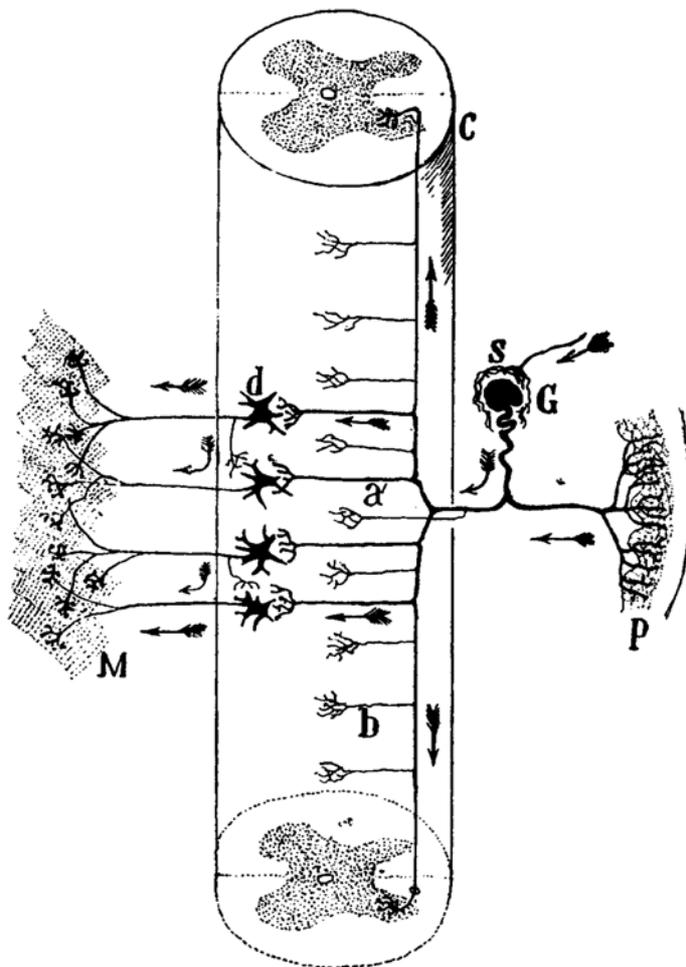


Figure 15 : Les projections des afférences sensorielles primaires issues de la peau.

Ce schéma présente les projections centrales des terminaisons des afférences sensorielles primaires dans les cornes dorsales de la moelle épinière. A l'entrée dans la substance blanche, le neurone sensoriel émet de nombreuses collatérales, dans le plan rostro-caudal, pour irradier plusieurs segments de la moelle épinière. L'activation d'un champ récepteur donné va activer un neurone sensoriel. Celui-ci transmet l'information aux neurones médullaires en regard de l'entrée de la terminaison centrale du neurone sensoriel. Il peut aussi innover dans l'axe rostro-caudal des neurones appartenant à plusieurs segments médullaires. Par ailleurs, l'activation de ce circuit peut aussi moduler l'activité de neurones médullaires situés dans un autre segment et sous la dépendance d'un autre champ récepteur.

P : peau ; M : muscle ; a : collatérale vers les motoneurones ; b courtes collatérales ; d : motoneurones.

D'après Ramón y Cajal (1904).

Les afférences sensorielles nociceptives se projetant sur les couches superficielles de la moelle épinière irradient rostro-caudalement sur plusieurs segments, à partir du point d'entrée de la racine dorsale (figure 15). L'activation des afférences sensorielles primaires d'un territoire cutané va principalement activer le segment de moelle épinière en regard de la racine dorsale qui comprend les afférences sensorielles de ce champ récepteur. Mais la stimulation de ce champ récepteur peut également stimuler et/ou moduler des neurones des couches superficielles sur plusieurs segments de moelle épinière (Rudomin, 1999; Rudomin et Schmidt, 1999). D'autre part, l'arborisation dendritique des neurones des laminae I et II est principalement dans le plan rostro-caudal et peut s'étendre sur plusieurs centaines de micromètres (Chery *et al.*, 2000; Kato *et al.*, 2004). Ainsi, un neurone d'une de ces couches superficielles peut moduler l'activité des neurones des couches superficielles du segment voisin (Sandkuhler, 1996). Par conséquent, la réponse des neurones d'un segment médullaire lors de l'activation de leur champ récepteur peut être modulée par l'activation d'un autre champ récepteur via un segment médullaire plus ou moins éloigné. Il existe peu d'études concernant les conséquences de l'activation des contrôles intersegmentaires. Très récemment, Kato *et al.* (2004) ont enregistré les réponses excitatrices et inhibitrices des neurones de la lamina II, le long de l'axe rostro-caudal (de L2 à S1) suite à une stimulation électrique de la racine dorsale L5. Ils ont utilisé la technique de « patch-clamp » sur des tranches parasagittales de moelle épinière de rats de 6 à 8 semaines postnataux. Leurs observations montrent qu'en fonction de la distance, le nombre de neurones de la lamina II générant des PPSE suite à l'activation de la racine L5 diminue en fonction de la distance du site d'initiation de la stimulation. De plus, les réponses observées suite à l'activation des afférences sensorielles de type A δ sont restreintes à des segments médullaires juxtaposés au segment L5 alors que les terminaisons centrales des afférences sensorielles de type C intéressent plusieurs segments de part et d'autre de la racine stimulée. Le pourcentage de neurones de la lamina II qui répondent par des PPSI suite à la stimulation de cette même racine dorsale, reste cependant identique quelque soit le segment médullaire observé. L'amplitude des réponses des neurones de la lamina II tend à diminuer en fonction de la distance du point de stimulation de la racine dorsale, et induit aussi des mécanismes polysynaptiques. Au regard de ces résultats, il semble que les afférences sensorielles nociceptives de type C contribuent de manière plus importante à l'activation des contrôles intersegmentaires. Ceci peut avoir des conséquences fonctionnelles importantes dans l'intégration médullaire des informations nociceptives issues de champs récepteurs cutanés différents. Ainsi, un « portillon » peut être modulé par un autre plus ou moins éloigné.

Des études anatomiques et fonctionnelles ont permis de mettre en évidence l'existence de neurones propriospinaux (Chung et Coggeshall, 1983) et leur implication dans les voies du réflexe moteur médullaire suite à une stimulation périphérique des afférences sensorielles primaires (Skinner et al., 1980; Schomburg et al., 1986). Un certain nombre des neurones propriospinaux est originaire de la corne dorsale de la moelle épinière et s'y terminent. En effet, il est possible d'observer une inhibition de la réponse nociceptive des neurones de la corne dorsale du segment lombaire lorsqu'on effectue une stimulation des afférences sensorielles de différents territoires cutanés (Cadden *et al.*, 1983). Ceci peut être observé chez un animal intact mais aussi chez des animaux ayant subi une section complète de la moelle épinière au niveau cervical (Sandkuhler et al., 1993; Pitcher et al., 1995). En effet, les neurones propriospinaux issus du renflement cervical ont une action antinociceptive sur les neurones de la corne dorsale lombaire (Sandkuhler *et al.*, 1993). Les neurones propriospinaux peuvent être activés par différentes modalités sensorielles : stimulation mécanique de la peau, mouvement des articulations, pression des tissus profonds par extension forcée de la patte par exemple, et stimulation électrique du champ récepteur cutané (Skinner *et al.*, 1980). Par ailleurs, ces neurones peuvent être aussi activés par des contrôles descendants originaires du cortex, du tectum et de la formation réticulée (Alstermark *et al.*, 1991). Ce type de contrôle implique donc l'existence d'une boucle médullaire-supramédullaire.

Ainsi, le « contrôle du portillon » qui implique la mise en jeu de neurones médullaires d'un même segment peut être finement modulé par des neurones médullaires d'un autre étage. Ceci suggère que la réponse de neurones médullaires lors de l'activation de leur champ récepteur par une stimulation nociceptive peut être profondément modifiée par l'activation d'un autre champ récepteur qui peut intéresser un territoire différent. De plus, l'activation des contrôles descendants directs ou indirects (via l'activation du contrôle propriospinal) peut elle aussi moduler finement la réponse des neurones médullaires à une stimulation nociceptive.

6. Le rôle des neurones de projection

La lamina I encore appelée zone marginale constitue une couche très fine de neurones (30 à 40 μm) comprise entre la substance blanche et la lamina II. L'orientation dendritique suit l'axe rostro-caudal (Chery *et al.*, 2000). Cette couche est la voie de sortie principale des informations intégrées par les neurones de la lamina II. Cependant, des neurones de la lamina II qui reçoivent des informations sensorielles de nocicepteurs non peptidergiques se

projetent sur la lamina V (autre voie de sortie supramédullaire) ; (Braz *et al.*, 2005). La lamina I est constituée de neurones de projection vers le thalamus, l'aire parabrachiale et la substance grise périaqueducule principalement (Bernard *et al.*, 1995; Craig, 1995; Craig *et Dostrovsky*, 2001; Spike *et al.*, 2003). Cependant, la grande majorité des neurones de cette lamina sont des neurones à terminaisons locales (Dahlhaus *et al.*, 2005). Seulement 5 % des neurones de la lamina I sont des neurones de projection vers la substance grise périaqueducule (Spike *et al.*, 2003). Un certain nombre d'évidences permet d'affirmer que les neurones de la lamina I jouent un rôle pivot dans l'intégration des informations nociceptives. Tout d'abord par la présence de neurones de projection qui acheminent les informations vers les structures supramédullaires (composante sensori-motrice, autonome, émotionnelle, mémorisation, etc.). Les neurones de projection sont nécessaires dans l'expression de l'hyperalgie, des douleurs inflammatoires et neuropathiques (Mantyh *et al.*, 1997; Nichols *et al.*, 1999; Khasabov *et al.*, 2002). L'utilisation de substance P conjuguée à la saporine induit une mort des neurones de projection qui se caractérise par une diminution de l'hyperalgie thermique et de l'allodynie mécanique (Nichols *et al.*, 1999). De plus, il a été mis en évidence que les neurones de projection possèdent des entrées sensorielles monosynaptiques provenant de fibres A δ et C. Ils peuvent répondre à des stimulations nociceptives (Craig *et al.*, 2001; Seagrove *et al.*, 2004). Des études rapportent que ces neurones de projection répondent à de fortes stimulations mécaniques. Toutefois, certaines études suggèrent la présence d'entrées nociceptives sensorielles polymodales à haut seuil d'activation capables de transmettre aux neurones de la lamina I des informations mécaniques, thermiques (chaud et froid) et ces neurones sont sensibles à l'histamine (Bester *et al.*, 2000; Andrew *et Craig*, 2001b, 2001a; Craig *et al.*, 2001; Andrew *et Craig*, 2002; Craig *et Andrew*, 2002). Enfin, ces neurones expriment le récepteur NK-1 de la substance P, libérée par les fibres nociceptives de type C (Chery *et al.*, 2000).

Pour conclure, les neurones de la lamina I, par leur localisation dans le système nociceptif, jouent un rôle majeur dans l'intégration et la mise en forme du message nociceptif, où ils sont directement ou indirectement (par la lamina II) à l'interface entre le système périphérique et les structures supramédullaires.

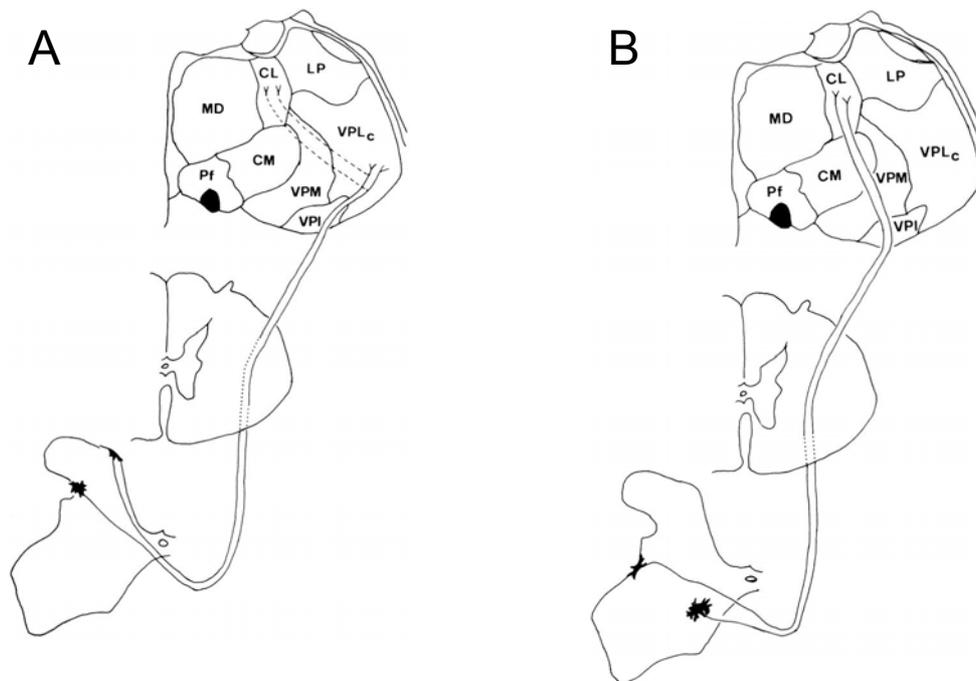


Figure 16 : Le trajet de la projection spinothalamique chez le macaque.

Les neurones médullaires qui se projettent sur le thalamus sont concentrés dans les laminæ I et V principalement. Les axones traversent horizontalement la ligne médiane de la moelle épinière au niveau de la commissure ventrale pour rejoindre le quadrant ventrolatéral où ils remontent en direction du tronc cérébral par le funiculus latéral. Après avoir traversé celui-ci, les axones se projettent sur le thalamus. A : les neurones des laminæ I et V se projettent sur le noyau thalamique ventropostérolatéral (VPLc) et le noyau inférieur postérieur (VPI) qui constituent le thalamus latéral. Certains axones peuvent émettre des collatérales qui se terminent dans le thalamus médian (noyau central-latéral – CL). B : les neurones de projection de la lamina V et certains présents dans la corne ventrale suivent un parcours similaire et se terminent dans la partie intralaminare du thalamus (le noyau central-latéral).

Modifié d'après Willis et Westlund (1997)

III. Les voies de sortie de l'information douloureuse

1. Les voies de sortie des neurones de projection

Les neurones de la lamina I constituent la sortie principale des informations traitées par les neurones de la lamina II. Parmi ces neurones, on observe des neurones de projection qui émettent des axones vers des structures supramédullaires. Ceci permet de renseigner l'organisme, de manière consciente, d'une sensation douloureuse lorsque ces informations sont traitées par le cortex somato-sensoriel. De plus, ces projections peuvent activer différents contrôles descendants excitateurs et inhibiteurs, dont le rôle est de moduler l'activité des réseaux de neurones médullaires impliqués dans le traitement de l'information sensorielle. Enfin, ces projections permettent d'élaborer des réponses motrices, humorales, etc. adaptées à la stimulation nociceptive. Les données anatomiques concernant les voies de projection ont été obtenues chez l'homme, notamment par l'étude de déficits dus à des traumatismes ou des lésions médullaires. Par ailleurs, des données ont été obtenues lors d'études du changement du comportement suite à une stimulation nociceptive avant et après lésion médullaire chez le primate. Enfin, des expériences de marquages rétrogrades ont largement été utilisées chez les primates et les rongeurs. Ces résultats sont corrélés avec ceux observés chez l'homme (Willis et Westlund, 1997; Millan, 1999). Dans le cas des neurones des couches superficielles, les voies de sortie empruntent le cadran antérolatéral de la moelle épinière. Cependant, il existe une autre composante, le cadran dorsal, qui intéresse les neurones de projection de la voie spino-cervico-thalamique (origine : lamina I ; cible : noyau cervical latéral) et la voie de la colonne dorsale qui véhicule notamment les informations nociceptives viscérales (origine : laminae III et X ; cibles : noyau de la colonne dorsale, noyau gracile, lemnie médian et thalamus). Les origines, voies empruntées et cibles sont décrites dans le tableau 7.

1.1. Le tractus spino-thalamique

Chez le singe, une large fraction de ce tractus est issue des segments lombaires et sacrés et les neurones de projection sont situés dans les laminae I, IV-VI, quelques uns étant issus de la lamina X et de la corne ventrale de la moelle épinière. Les neurones de projection de la lamina I vont contacter largement le thalamus latéral, alors que les autres origines de cette voie vont contacter le thalamus médian. Le neurone de projection réalise un décussation

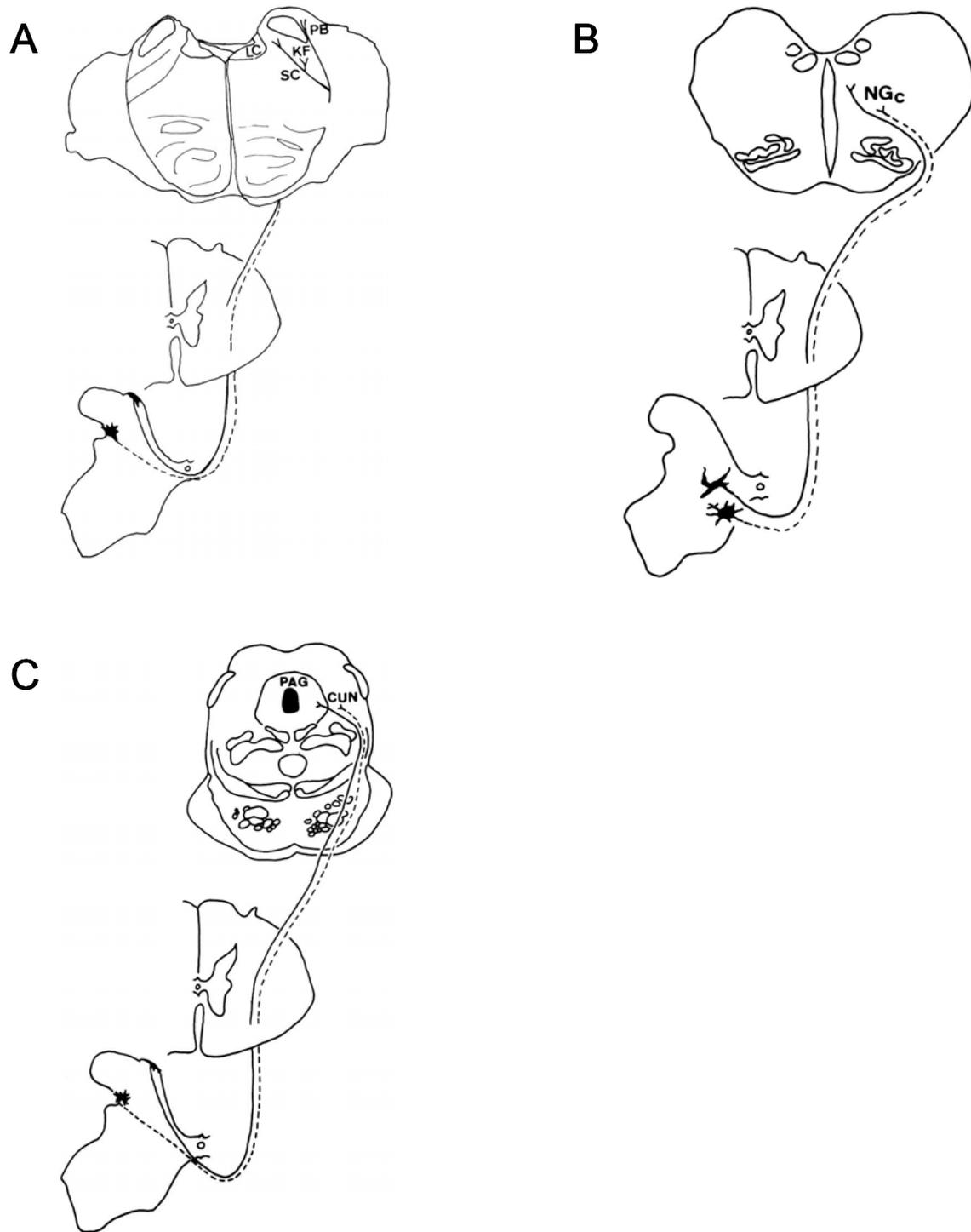


Figure 17 : Les trajets des projections spinoréticulées et spinomésencéphaliques chez le macaque.

A et B : La voie de projection spinoréticulée. Des neurones de projection issus des laminæ I et V (A) se projettent sur l'aire parabrachiale, dont le locus cœruleus (LC), le noyau de Kölliker-Fuse (KF) et le noyau parabrachial (PB). Par ailleurs, des neurones de projection des laminæ VII et VIII (B) se projettent sur le tronc cérébral, incluant la formation réticulée bulbaire et pontique, dont le noyau gigantocellulaire (NGc). La décussation des axones est immédiate dans la moelle épinière, puis ceux-ci cheminent dans le funiculus latéral.

C : Les neurones de projection de la voie spinomésencéphalique sont originaires des lamina I et V. Ils effectuent une décussation médullaire et se projettent sur le mésencéphale en empruntant le funiculus latéral. Les projections principales intéressent la substance grise périaqueducale (PAG) et le noyau cunéiforme.

Modifié d'après Willis et Westlund (1997)

médullaire au niveau de la commissure ventrale de la substance blanche, à une courte distance du corps cellulaire, pour rejoindre le cadran antérolatéral (figure 16). L'arrangement des fibres dans le tractus est somatotopique.

1.2. Le tractus spino-réticulaire

Les neurones de projection de ce tractus sont issus des couches profondes de la corne dorsale et de la corne ventrale de la moelle épinière (laminæ V, VII et VIII). Les neurones de projection, là aussi, effectuent une décussation médullaire de même type et les fibres s'organisent de manière somatotopique dans le tractus (figures 17 A et B). Les terminaisons se projettent sur la formation réticulée et en partie sur le noyau gigantocellulaire (voir tableau 7). Cependant, quelques neurones de projection issus de la lamina I empruntent ce tractus pour se projeter sur les neurones catécholaminergiques du tronc cérébral.

1.3. Le tractus spino-mésencéphalique

La distribution des neurones de projection constituant la voie spino-mésencéphalique (figure 17 C) est très similaire à celle de la voie spino-thalamique (laminæ I, IV-VI principalement). Les projections se terminent dans différents noyaux du tronc cérébral dont la substance grise périaqueducale, le noyau rouge, le colliculus supérieur (voir tableau 7). Tout comme la projection spino-thalamique, les fibres réalisent une décussation médullaire et elles présentent une organisation somatotopique dans la substance blanche de la moelle épinière. Les projections vers la substance grise périaqueducale jouent un rôle important dans la mise en forme du comportement aversif face à la stimulation nociceptive et aussi dans l'activation du contrôle descendant analgésique faisant intervenir cette structure supramédullaire.

1.4. Autres voies de sortie

Il existe d'autres voies de projection qui sont multisynaptiques, intéressant plusieurs structures sous-corticales et zones corticales. Elles font intervenir des structures du système limbique et l'hypothalamus. Ainsi, une projection spino-hypothalamique permet de moduler

Tableau 7 : Caractéristiques anatomiques des différentes voies ascendantes nociceptives à partir de la moelle épinière.

Voies	Origines médullaires	Types neuronaux	Innervation des tissus	Trajet des voies ascendantes	Cibles principales	Noyaux	Rôles possibles
Spino-thalamique	I						
	II IV V, VI VII, VIII	NS WDR Non-N (peu)	Peau, viscères, articulations et muscles	Surtout FVL et FDL controlatéral	Thalamus	VPL, VPM, VPMo, VPI, MDve	Discrimination sensorielle, composante motivationnelle et affective, inhibition descendante
Spino-réticulaire	I						
	V, VI VII, VIII X	NS (surtout) WDR Non-N (peu)	Peau, viscères et muscles	Surtout FVL controlatéral et ipsilatéral	Formation réticulée	NPGC, NGC	Composante motivationnelle et affective (?), inhibition descendante
Spino-mésencéphalique	I						
	II	NS (lamina I)	Peau, viscères, articulations et muscles	Surtout FVL et FDL controlatéral	Tronc cérébral et PAG		Composante motivationnelle et affective, réponse autonome et motrice
	IV, V VII	WDR Non-N					
	X						
Spino-parabrachio-amygdaloïde	I						
	II	NS	Peau, viscères, articulations et muscles	FDL et FL controlatéral	Aire parabrachiale	Amygdale et strie terminale	Composante motivationnelle et affective, réponse autonome
Spino-parabrachio-hypothalamique	I						
	II	NS	Peau, viscères, articulations et muscles	FDL et FL controlatéral	Aire parabrachiale	hypothalamus	Composante motivationnelle et affective, réponse endocrine
Spino-hypothalamique	I						
	V X	NS WDR Non-N (peu)	Peau, viscères	FVL controlatéral	Hypothalamus et thalamus		Sommeil, fonction autonome et endocrine, thermorégulation
Spino-cervicale	I						
	III, IV V	WDR Non-N (surtout)	Peau, articulations et muscles	FDL ipsilatéral puis controlatéral	Relais dans le NCD au niveau C1 et C3	Thalamus controlatéral et PAG	Discrimination sensorielle, composante motivationnelle et affective, réponse autonome
Voie de la colonne dorsale	III-V	NS	Peau, viscères, articulations et muscles	FDL et FD ipsilatéral puis controlatéral	Relais dans le NCD de la moelle caudale	Thalamus controlatéral, colliculus supérieur et moelle épinière	Discrimination sensorielle, composante motivationnelle et affective
	VI	WDR					
	VII	Non-N					

NS : nociceptif spécifique ; Non-N : non nociceptif ; WDR : neurone à large modalité d'activation ; FL : funiculus latéral ; FD : funiculus dorsal ; FVL : funiculus ventro-latéral ; FDL : funiculus dorso-latéral ; VPL et VPM : noyaux ventro-postéro latéral et ventro-postéro médian du thalamus ; VPMo : noyaux ventro-médial postérieur du thalamus ; VPI : noyau ventro-postéro inférieur du thalamus ; MDve : thalamus médian dorsal, partie ventrale ; NPGC et NGC : noyaux (paro) gigantocellulaires ; PAG : substance grise périaqueducale.

Adapté de Millan, 1999.

l'activité de plusieurs noyaux de l'hypothalamus, permettant d'initier une réponse humorale suite à la stimulation nociceptive. Par ailleurs, une voie spino-parabrachio-amygdaloïde interviendrait dans la composante émotionnelle et affective de la douleur (Gauriau et Bernard, 2002). Une des cibles terminales de cette voie est l'hypothalamus. Cette connection anatomique permet de montrer l'importance des relations fonctionnelles entre les structures impliquées dans les composantes émotionnelles et affectives avec les structures humorales du SNC.

2. Le rôle des voies nociceptives dans la discrimination sensorielle et affective de la douleur

L'anatomie des voies de projection présentée dans les paragraphes précédents indique une organisation complexe de la transmission du message nociceptif : de nombreuses structures supramédullaires sont impliquées dans le traitement de l'information douloureuse. Il est évident que ces structures participent aux aspects motivationnels et affectifs de la douleur, ainsi qu'à l'adaptation des fonctions autonomes en réponse au stimulus nociceptif. Afin de mieux comprendre le rôle respectif des neurones médullaires dans l'intégration et la modulation du message nociceptif, il semble important de pouvoir corréler chacune des voies de projection avec l'une des deux composantes fondamentales de la douleur : la composante discriminative sensorielle et la composante cognitive et affective (Millan, 1999). La composante discriminative sensorielle permet de détecter la nature du stimulus nociceptif, son intensité, sa localisation et sa durée. La composante cognitive et affective met en relation la douleur avec l'humeur, l'attention, la mémorisation de l'expérience et sa rationalisation. Toutefois, les cibles multiples de chacune des voies de projection rendent cette tâche difficile du fait que certaines peuvent intégrer les deux composantes (tableau 7).

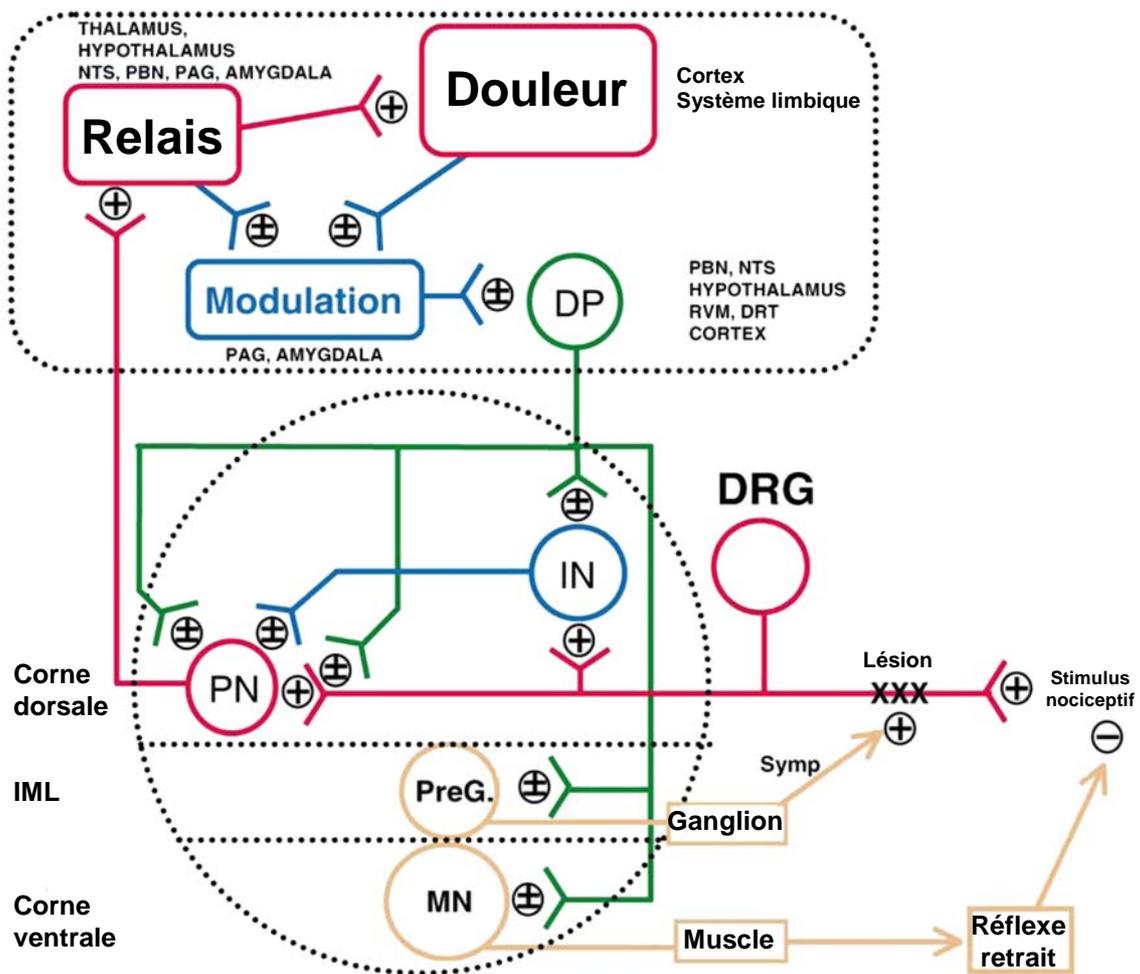


Figure 18 : Schéma des relations entre les contrôles descendants et les neurones médullaires impliqués dans la transmission et la modulation des informations nociceptives.

Les contrôles descendants (DP) issus de l'aire parabrachiale (PBN), de l'hypothalamus, du noyau du tractus solitaire (NTS), du noyau réticulé dorsal (DRT), du noyau rostroventral (RVM) et du cortex interagissent avec les neurones de projection (PN), les afférences sensorielles primaires (DRG) et les interneurons de la corne dorsale (IN). L'activation des neurones de projection stimule des structures relais (thalamus, hypothalamus, NTS, PBN, amygdale, et substance grise périaqueducale). Par la suite, ces structures modulent les contrôles descendants par la mise en jeu de diverses structures supramédullaires, dont le cortex somatosensoriel. Par ailleurs, le système autonome sympathique peut moduler l'activité des afférences sensorielles primaires par la mise en jeu des neurones sympathiques pré-ganglionnaires de la colonne intermédiaire latérale (IML), qui peuvent être modulés par ces contrôles descendants. De plus, indirectement, les contrôles descendants peuvent moduler la réponse motrice par une action sur les motoneurons situés dans la corne ventrale de la moelle épinière, afin d'initier un comportement moteur approprié.

PAG : substance grise périaqueducale.

Modifié d'après Millan (2002)

IV. Les contrôles descendants modulateurs de l'intégration du message nociceptif

Depuis 1965, la théorie du contrôle du portillon (Melzack et Wall) a énoncé que des afférences sensorielles non nociceptives étaient capables de moduler l'intégration du message nociceptif par les neurones de projection, par l'intermédiaire d'un mécanisme d'inhibition médullaire. De plus, de nombreuses études ont permis de mettre à jour l'existence de contrôles descendants, issus de diverses structures supramédullaires, capables de moduler l'activité des réseaux de neurones médullaires du système nociceptif. Ainsi, il apparaît que certains sont capables d'inhiber ces réseaux (contrôles descendants inhibiteurs) et d'autres peuvent au contraire faciliter la transmission du message nociceptif vers les neurones de projection (contrôles descendants facilitateurs) ; (Millan, 2002). Comme nous l'avons vu, l'activation des neurones de projection suite à une stimulation nociceptive stimule des structures relais supramédullaires (thalamus, hypothalamus, noyau du tractus solitaire, aire parabrachiale, amygdale, substance grise périaqueducule) afin de mettre en forme une réponse comportementale adaptée, qui met en jeu le cortex somatosensoriel et les structures du système limbique. En retour, ces structures vont activer ou moduler d'autres structures qui constituent ces contrôles descendants (figure 18). Il existe donc une communication étroite entre la moelle épinière et les structures supramédullaires, qui a pour but de moduler la mise en forme du message nociceptif intégré au niveau de la moelle épinière et d'initier un comportement moteur adapté à la situation.

1. Les différents contrôles descendants modulateurs de l'activité médullaire

Comme le montre la figure 19, les contrôles descendants se divisent en deux familles : les contrôles inhibiteurs et les contrôles facilitateurs de la transmission du message nociceptif (Millan, 2002). Ces contrôles agissent directement sur les neurones de projection ou ils renforcent l'activité des interneurones médullaires. Par ailleurs, comme résumé sur la figure 19, il existe une grande diversité de médiateurs (neurotransmetteurs et neuromodulateurs tels que des peptides et le monoxyde d'azote ou NO) contribuant à la mise en forme du message nociceptif au niveau médullaire. Les interneurones médullaires, ainsi que les neurones de projection, expriment à la surface de leur membrane plasmique les récepteurs de ces médiateurs. Cependant, un même médiateur peut appartenir aux deux types

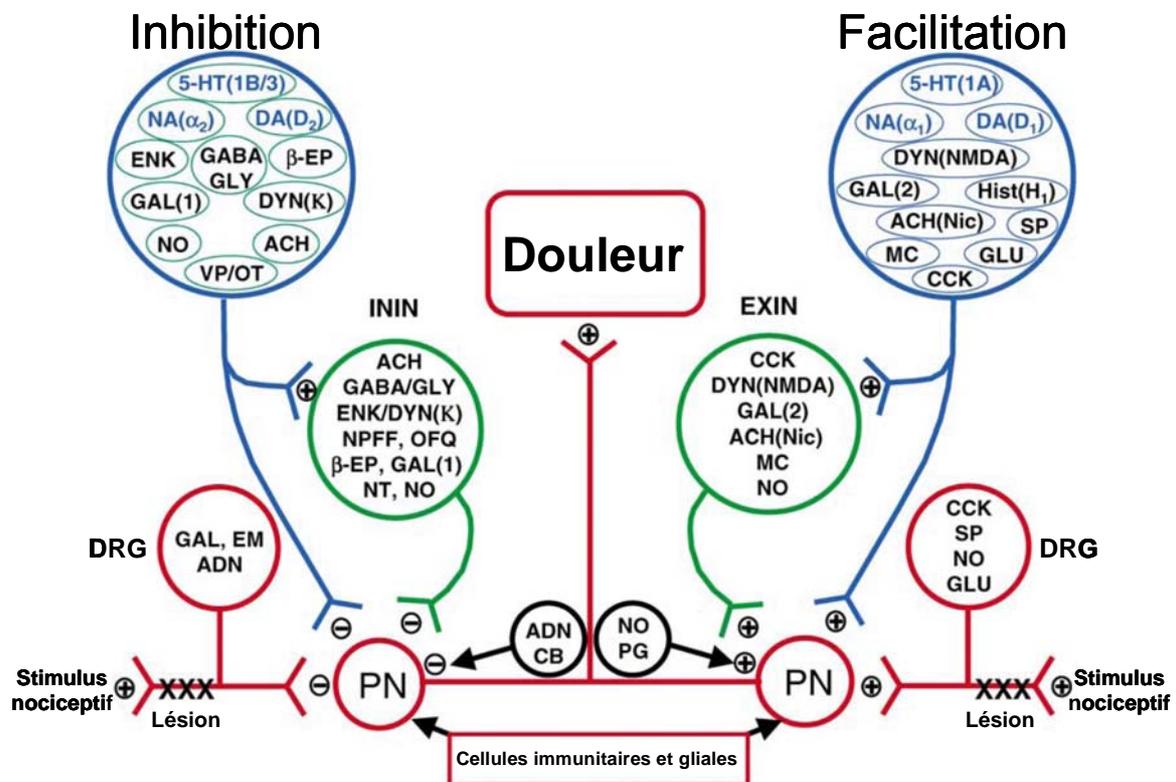


Figure 19 : La neurochimie et l'organisation fonctionnelle des contrôles descendants inhibiteurs et facilitateurs.

Chacun des deux types de contrôles descendants (bleu) libère une grande variété de modulateurs (neurotransmetteurs : GABA, 5-HT, NA, DA ; et peptides : ENK, GAL, DYN,...). Les contrôles ont une action modulatrice directe sur les neurones de projection ou par l'activation des interneurones excitateurs et inhibiteurs (vert). En plus de ces contrôles extramédullaires, l'activité des neurones de projection est modulée localement par des médiateurs (ADN, CB, NO et PG) ainsi que par la libération de médiateurs par les cellules immunitaires et gliales.

5-HT : sérotonine ; NA : noradrénaline ; DA : dopamine ; ENK : enképhaline ; β-EP : β-endorphine ; GAL : galanine ; DYN : dynorphine ; ACH : acétylcholine ; VP : vasopressine ; OT : ocytocine ; Hist : histamine ; SP : substance P ; MC : mélanocortine ; CCK : cholécystokinine ; Gly : glycine ; Glu : glutamate ; NPFF : neuropeptide FF ; OFQ : nociceptine ; ADN adénosine ; CB : canabinoïdes ; PG : prostaglandines ; EM : endomorphines ; NO : oxyde nitrique. PN : neurone de projection ; DRG : neurone sensoriel.

Modifié d'après Millan (2002)

de contrôles descendants. C'est le cas, par exemple, du contrôle noradrénergique, où, en fonction du type de récepteur exprimé à la surface des neurones médullaire, l'action de la noradrénaline sera excitatrice (récepteur de type α_1) ou inhibitrice (récepteur de type α_2). En effet, les voies de transduction intracellulaires activées suite à la stimulation de ces deux types de récepteurs vont moduler en sens opposé l'excitabilité du neurone. Par ailleurs, un même médiateur peut avoir des effets opposés s'il agit sur des classes de neurones fonctionnellement distinctes (excitateur/inhibiteur) qui possèdent le même récepteur. Tout ceci laisse présager que l'action de ces contrôles descendants est complexe. Cependant, elle est à l'origine des modulations variées et fines de la réponse des neurones médullaires suite à l'activation des afférences sensorielles primaires.

Au regard des données fonctionnelles de l'action de ces contrôles descendants, il n'existe pas de séparation anatomique absolue entre les contrôles facilitateurs et les contrôles inhibiteurs. D'une manière générale, on peut distinguer les contrôles descendants par le type de médiateur libéré et par le type de récepteur membranaire exprimé par les neurones médullaires.

Dans le cadre de ce travail, nous nous sommes intéressé au rôle fonctionnel du contrôle descendant ocytocinergique dans le contrôle de l'excitabilité du réseau de neurones de la lamina II. Ce contrôle fait l'objet d'une description détaillée dans la partie II de cette introduction. Un résumé des autres contrôles descendants est présenté ci-dessous.

1.1. Les contrôles descendants monoaminergiques

Parmi les contrôles descendants, certains libèrent des mono-amines (noradrénaline, dopamine et sérotonine). Ces neurotransmetteurs peuvent faciliter ou inhiber la transmission du message nociceptif en fonction du type de récepteur exprimé à la surfaces des neurones de projection, des neurones de la lamina II ou des afférences sensorielles primaires (figure 19). Comme le montre la figure 18, ces contrôles descendants sont activés par diverses structures supramédullaires par des voies mono ou polysynaptiques. La substance grise périaqueducale (PAG) joue un rôle pivot dans l'activation des contrôles descendants inhibiteurs. En effet, l'activation de cette structure induit une inhibition de l'activité des neurones médullaires par activation de contrôles inhibiteurs ou par inhibition des contrôles facilitateurs. Elle reçoit des entrées directes ou indirectes issues des neurones de projection de la corne dorsale de la moelle épinière, ainsi que des connexions réciproque avec l'hypothalamus, l'aire

parabrachiale, le noyau du tractus solitaire et diverses structures corticolimbiques (cortex frontal et amygdale) qui jouent un rôle clé dans le contrôle émotionnel, en particulier la peur et l'anxiété. Des liens directs existent entre la PAG et les contrôles descendants sérotoninergiques et non sérotoninergiques issus de la substance réticulée ventromédiane.

a) Le contrôle descendant noradrénergique

Les sources de noradrénaline sont situées dans le locus cœruleus et dans quelques noyaux du pont du tronc cérébral. Les laminæ qui reçoivent les informations nociceptives (lamina I, II, V et X) révèlent la présence de varicosités dont la densité est intense. De plus, les terminaisons noradrénergiques sont juxtaposées avec des neurones des laminæ I-II qui présentent des ARNm qui codent pour les récepteurs α_1 et α_2 et les synapses sont très majoritairement de type axo-dendritique et axo-somatique. Très peu de synapses axo-axoniques et de contacts avec les afférences sensorielles nociceptives ont pu être observées. Le type de transmission synaptique implique une transmission de type classique (synapse fermée) et de type volumique (voir ci-après paragraphe 2.). La noradrénaline est très souvent colocalisée dans les vésicules présynaptiques avec d'autres neuromédiateurs tels que le GABA, le glutamate, la galanine, les enképhalines. Ceux-ci vont moduler positivement ou négativement l'action de la noradrénaline sur ses cibles cellulaires.

b) Le contrôle descendant dopaminergique

Les régions périventriculaire et postérieure de l'hypothalamus sont les principales sources médullaires de dopamine. Cependant, une composante mineure issue de la substance noire *pars compacta* et du noyau paraventriculaire de l'hypothalamus projette sur la moelle épinière. Les fibres dopaminergiques irradient dans la colonne intermédiolatérale et sont observées dans la corne dorsale et la lamina X principalement.

c) Le contrôle descendant sérotoninergique

L'innervation sérotoninergique observée dans la moelle épinière provient majoritairement de la formation réticulée ventromédiane ainsi que du noyau du *Raphe Magnus*. Un réseau intense de fibres sérotoninergiques est observable dans toute la moelle épinière, mais les varicosités de ces fibres sont très abondantes dans les laminæ I et II. Les contacts synaptiques sont de type axo-dendritique et axo-somatique et certains de ces contacts sont observés avec des neurones de projection. Il est suggéré que la sérotonine peut être libérée suivant un mode de transmission volumique afin de moduler l'activité des afférences sensorielles primaires

(voir ci-après paragraphe 2). La sérotonine peut être co-localisée avec d'autres médiateurs tels que la substance P, les enképhalines, les dynorphines et le GABA, qui eux aussi jouent un rôle important dans la modulation des neurones du système nociceptif à l'étage médullaire.

1.2. Les autres types de contrôles descendants

D'autres contrôles monosynaptiques entre les structures supramédullaires (principalement l'hypothalamus) et la corne dorsale sont capables de moduler l'activité des neurones médullaires dans le traitement de l'information nociceptive (Millan, 2002). L'histamine libérée par le noyau tubéromammillaire a une action pro-nociceptive sur les neurones médullaires en activant les récepteurs H_1 . La vasopressine libérée par le noyau paraventriculaire de l'hypothalamus a une action anti-nociceptive en agissant sur les récepteurs V_{1a} . La stimulation du noyau arqué induit un effet anti-nociceptif par la libération de β -endorphine (récepteur μ des opiacés) et une action pro-nociceptive par une libération de mélanocortine (récepteur MC_4). La substance grise périaqueducale, en libérant la cholécystokinine et la substance P, a une action pro-nociceptive (récepteurs CCK2 et NK1).

2. Le rôle de la transmission volumique

Très classiquement, la libération de médiateurs tels que les neurotransmetteurs est effectuée dans une structure anatomique clairement identifiée, la synapse. Cette libération, à partir des vésicules de sécrétion situées dans la terminaison axonale, est confinée dans un espace étroit (la fente synaptique) favorisant le maintien élevé d'une concentration de neurotransmetteurs dans cet espace pour agir sur les récepteurs membranaires situés sur la membrane postsynaptique, voire présynaptique. Cependant, il existe un autre mode de transmission, la transmission volumique dont, le rôle fonctionnel peut avoir des incidences majeures dans la modulation de l'activité des cellules environnantes (Zoli et Agnati, 1996; Duggan, 2000).

Ce type de transmission permet de propager un médiateur à distance de son lieu de libération et elle peut avoir plusieurs origines, anatomiques et fonctionnelles (Zoli et Agnati, 1996). Par exemple, la largeur de la fente synaptique, la disposition des sites de libération des vésicules ou le niveau de confinement de la fente synaptique assuré par les cellules gliales

peuvent être à l'origine de cette transmission. Ainsi, lors de la libération des vésicules, le produit de sécrétion peut fuir hors de la fente synaptique et agir de manière paracrine sur les cellules environnantes. Un tel mécanisme de libération peut être sous la dépendance de modulateurs externes qui peuvent modifier l'architecture de l'environnement du site de libération. Du point de vue fonctionnel, la densité, la cinétique d'activité et la localisation des transporteurs membranaires et des enzymes de dégradation des médiateurs libérés sont aussi des éléments essentiels pouvant intervenir dans cette transmission volumique. Dans cette configuration, il peut y avoir un engorgement de la fente synaptique tel qu'il va se créer un gradient de concentration favorisant la diffusion du médiateur hors de la fente. Deux rôles sont proposés pour cette transmission volumique. Elle crée un délai entre la libération et l'action cellulaire ; elle permet de prolonger l'effet cellulaire par la diffusion. Ainsi, cette transmission offre une modulation de l'excitabilité des neurones différente de la transmission synaptique classique, qui elle, s'effectue dans un espace défini pour une cible donnée et pour une très courte durée (de l'ordre de la milliseconde).

Cette transmission a été observée dans de nombreuses structures du SNC et du SNP pour certains neurotransmetteurs classiques tels que le glutamate, l'acétylcholine, le GABA (Zoli et Agnati, 1996; Coggeshall et Carlton, 1997). Par contre, la transmission volumique peptidergique est moins bien connue, bien qu'il existe certaines évidences (Zoli et Agnati, 1996). Les varicosités observables sur les terminaisons peptidergiques contiennent de grandes vésicules à cœur dense stockant les peptides. Par ailleurs, celles-ci peuvent être localisées en position parasynaptique ou non synaptique. Ces vésicules peuvent donc être libérées en dehors de la synapse et le peptide peut donc diffuser à distance dans l'espace extracellulaire. De plus, à la différence des neurotransmetteurs classiques, les peptides ne possèdent pas de mécanismes de recapture qui jouent un rôle important dans la vidange de la fente synaptique afin de limiter dans le temps l'action des neurotransmetteurs. Dans le cas des peptides, les mécanismes d'atténuation font appel à l'action de protéases et de peptidases qui peuvent être à distance du lieu de libération du peptide. Ceci favorise donc sa diffusion dans le liquide céphalorachidien (LCR), dans lequel on peut révéler la présence de nombreux peptides. De plus, un autre mécanisme cellulaire peut expliquer la faible clairance du LCR. Bien souvent, les peptides agissent sur des récepteurs membranaires couplés aux protéines G. Lors de la liaison du peptide sur son récepteur, il y a internalisation de ce complexe, permettant l'élimination du médiateur. Cependant, ce mécanisme est limité dans l'élimination du peptide. Tout d'abord, l'internalisation met un certain temps à s'établir. Par ailleurs, lorsqu'il n'y a plus de récepteurs exprimés à la membrane de la cellule, le peptide peut toujours être présent

dans l'espace extracellulaire, au niveau de la synapse ou non. Ceci favorise donc la diffusion à distance du peptide voire jusqu'au LCR, où son action peut se faire à plusieurs centimètres du lieu de libération.

La transmission volumique peptidergique et non peptidergique est proposée au niveau de la moelle épinière. En effet, certaines évidences montrent que le glutamate, la substance P, le CGRP et la neurokinine A, libérés par les afférences sensorielles nociceptives dans les couches superficielles de la moelle épinière diffusent en dehors des synapses constituées par ces afférences et les neurones médullaires (Zoli et Agnati, 1996; Coggeshall et Carlton, 1997). La revue de Coggeshall et Carlton (1997) montre, par des données anatomiques, que cette transmission volumique peut intéresser d'autres neuromédiateurs. Par exemple, la localisation des récepteurs sérotoninergiques 5-HT_{1B}, 5-HT_{1C}, 5-HT₂ sur les dendrites et les somas des neurones des couches dorsales de la moelle épinière est non-synaptique. Il en est de même pour les récepteurs des opiacés exprimés par les neurones des couches superficielles de la corne dorsale de la moelle épinière. Les auteurs suggèrent que les transmissions sérotoninergiques et opioïdes pourraient faire intervenir une transmission volumique. D'autres études suggèrent l'existence d'une telle transmission dans la moelle épinière par les terminaisons de certains contrôles descendants. En effet, plus de 60 % des varicosités sérotoninergiques et noradrénergiques sont non synaptiques dans la corne dorsale de la moelle épinière (Ridet *et al.*, 1993). De plus, la proportion de cellules gliales présentes autour de ces varicosités est supérieure à celle observée autour des synapses, et ceci serait un facteur déterminant dans l'hypothèse d'une transmission volumique. Par ailleurs, un gaz, le NO, est libéré par les fibres descendantes ainsi que par les neurones et cellules gliales médullaires (Millan, 2002). Ce gaz est hautement diffusible et peut agir à distance malgré une demi-vie très courte. Le NO peut inhiber l'activité des transporteurs membranaires des mono-amines (Kiss et Vizi, 2001). Ainsi, le NO peut agir comme modulateur de la transmission synaptique de telle manière qu'il induit une fuite des neurotransmetteurs hors de la fente synaptique.

Partie II :

Le système ocytocinergique et la nociception

I. Historique et l'action humorale de l'ocytocine

1. L'ocytocine, peptide neurohypophysaire

L'ocytocine (OT), hormone neurohypophysaire, est le premier peptide dont la séquence a été déterminée et synthétisée chimiquement sous forme active (Du Vigneaud *et al.*, 1953). Le nom de cette hormone vient du grec $\omega\kappa\upsilon\sigma$ (rapide) $\tau\omicron\kappa\omicron\sigma$ (accouchement) dû à ses propriétés utérotoniques (Dale, 1906). Classiquement, l'OT est libérée dans la circulation systémique à partir de l'hypophyse qui, par une action humorale va agir sur divers organes cibles périphériques, comme l'utérus lors de la parturition induisant les contractions utérines et les glandes mammaires où elle est mise en jeu dans le réflexe d'éjection du lait. Cependant, en plus de ces deux rôles très bien décrits, l'OT possède de nombreuses autres implications physiologiques. Ces cibles périphériques sont les organes génitaux mâles et femelles (l'utérus, le testicule, l'ovaire, la prostate et le corps lutéal), les glandes mammaires (lors de l'allaitement), le rein, le système cardiovasculaire, le thymus, le pancréas, le tissu adipeux, les glandes surrénales, et, dans certains cas pathologiques, les cellules tumorales (Gimpl et Fahrenholz, 2001). Par ailleurs, elle peut agir comme modulateur sur diverses structures du SNC que nous décrirons plus tard. Dans cette partie, nous ferons un bref résumé du système ocytocinergique (l'OT, son récepteur et lieu de synthèse) afin de nous recentrer sur l'implication physiologique de l'OT dans le SNC et plus particulièrement sur les interactions entre l'OT et le système nociceptif.

2. Le rôle de l'ocytocine sur l'utérus lors de la parturition

L'OT est libérée par les neurones magnocellulaires du noyau paraventriculaire (NPV) et du noyau supra-optique (NSO) de l'hypothalamus dans la circulation systémique via le système porte hypophysaire. La première cible physiologique décrite de l'OT a été l'utérus. L'action utérotonique d'extrait hypophysaire a été décrite chez la chatte gestante, il y a un siècle (Dale, 1906). En 1911, des extraits de neurohypophyse ont été utilisés pour induire le travail lors de la parturition. En effet, ce peptide joue un rôle majeur dans la délivrance en favorisant les contractions utérines et il est très utilisé en clinique afin de faciliter l'accouchement chez la femme. Bien que l'OT déclenche les contractions utérines, les taux

d'OT plasmatiques et placentaires ne semblent pas augmenter avant le travail chez la femme. Au moment du travail, la sensibilité de l'utérus vis-à-vis de l'OT est fortement augmentée. Ceci est le résultat d'une élévation concomitante de l'expression de l'ARNm du récepteur OT et de la densité de ce récepteur exprimé à la surface du myomètre (Kimura et al., 1992; Fuchs et al., 1995). Un tel mécanisme est observable à la fois chez la ratte et chez la femme où l'on observe une augmentation de la densité des récepteurs de 200 fois (Fuchs et Fuchs, 1984). Ainsi, une concentration d'OT plasmatique constante au cours du temps est suffisante pour activer la contraction du myomètre par cette augmentation de la densité des récepteurs membranaires. A la suite de la délivrance, la densité des récepteurs décline rapidement : elle diminue de sept fois en 24 heures chez la ratte (Zingg *et al.*, 1995). Cette régulation rapide serait nécessaire pour éviter toute contraction utérine indésirable d'une part lors de la lactation et d'autre part éviter des hémorragies *postpartum*. La régulation de l'expression du récepteur de l'OT utérin lors de la parturition est sous le contrôle des stéroïdes sexuels produits par les gonades. Chez la plupart des mammifères, les concentrations plasmatiques en stéroïdes changent dramatiquement, de telle manière que le rapport progestérone/œstrogène chute dans les jours qui précèdent la naissance par une augmentation des taux plasmatiques d'œstrogènes qui stimulent l'expression du récepteur OT (Gimpl et Fahrenholz, 2001).

3. Le rôle de l'ocytocine sur la glande mammaire dans le réflexe d'éjection du lait

La deuxième cible de l'OT la plus étudiée est la glande mammaire. En 1910, Ott et Scott (1910) ont montré que des extraits hypophysaires provoquent l'éjection du lait, tout comme des extraits du corps lutéal, du thymus et de la glande pinéale. C'est en 1941 que, pour la première fois, est énoncé le concept de réflexe neuroendocrinien à propos du réflexe d'éjection du lait. Aujourd'hui, de très nombreuses études ont permis de décrire clairement les mécanismes impliqués dans ce réflexe (Cunningham et Sawchenko, 1991; Gimpl et Fahrenholz, 2001). La sécrétion du lait est déclenchée lorsque l'enfant stimule le mamelon par succion. La stimulation des récepteurs sensoriels de cette zone engendre des informations transmises à la moelle épinière, puis aux neurones magnocellulaires ocytocinergiques du NSO et du NPV. L'activation de ces neurones produit des bouffées de PA synchronisées à haute fréquence durant trois à quatre secondes toute les cinq à quinze minutes. Chacune de ces bouffées provoque une libération massive d'OT dans la circulation systémique permettant l'acheminement de l'OT jusqu'aux glandes mammaires. Ceci permet la contraction des

cellules myoépithéliales de ces glandes favorisant ainsi la sécrétion du contenu des cellules glandulaires dans les acini. Chez la femme, ce phénomène apparaît trente secondes à une minute après la stimulation du mamelon. Ainsi, les neurones ocytocinergiques sont nécessaires pour l'initiation et le maintien de la lactation. Cependant, chez la femme, la libération d'OT peut être favorisée par des stimulations d'ordre psychologique comme le cri du bébé (McNeilly *et al.*, 1983). Le rôle de l'OT dans le réflexe d'éjection du lait a été confirmé grâce au développement de souris transgéniques déficientes pour le gène de l'OT. Les femelles déficientes pour ce gène sont incapable d'allaiter leur progéniture et présentent des désordres du comportement social. Cependant, aucune modification du comportement maternel ou de reproduction n'est observable chez le mâle et la femelle (Nishimori *et al.*, 1996; Young *et al.*, 1996; Gross *et al.*, 1998; Ferguson *et al.*, 2000). L'absence d'allaitement provoque un décès rapide de la portée et une injection postpartum d'OT restaure la fonction d'éjection du lait chez ces femelles déficientes pour le gène de l'OT.

II. L'ocytocine et son récepteur

1. L'ocytocine

L'OT est un nonapeptide dont la structure primaire est très semblable aux autres peptides de cette famille, comme la vasopressine (VP) qui ne diffère de l'OT que par deux acides aminés en positions 3 et 8¹. Malgré la très forte similitude de séquence entre ces deux peptides, leurs effets biologiques sont assez distincts du fait des acides aminés qui les distinguent. Les peptides de cette famille sont caractérisés par la présence d'un pont disulfure entre les acides aminés 1 et 6 leur conférant ainsi une structure cyclique. L'OT est un peptide très abondamment retrouvé dans ses sites de synthèse (NPV et NSO) en comparaison des autres peptides synthétisés par ces structures (Gautvik *et al.*, 1996) : l'ARNm de l'OT est le plus abondant par rapport aux autres transcrits identifiés.

L'ensemble des vertébrés exprime un peptide appartenant à la famille de la VP et de l'OT. Dans toutes ces espèces, les gènes de l'OT et de la VP sont situés sur le même chromosome mais transcrits en direction opposée. L'expression du gène de l'OT, situé chez l'homme sur le chromosome 20 locus p13 (Rao *et al.*, 1992), conduit à la synthèse d'une pré-pro-protéine de grand poids moléculaire : l'ocytocine-neurophysine I. Celle-ci subit un certain nombre de modifications post-traductionnelles et de clivages dans les vésicules lors du transport axonal antérograde (Brownstein *et al.*, 1980). Ces modifications conduisent à la formation d'OT et de neurophysine matures dans les terminaisons axonales des neurones hypothalamiques qui se projettent sur la posthypophyse. Ces deux polypeptides sont stockées jusqu'à leur libération induite par l'activation du neurone (Renaud et Bourque, 1991). La neurophysine a pour rôle de faciliter l'adressage, l'empaquetage et le stockage de l'OT avant la libération des granules de sécrétion dans la circulation systémique. Des interactions faibles favorisent la formation du complexe OT-neurophysine. Ces interactions faibles sont favorisées par le pH acide des granules de sécrétion (pH~5,5). Lorsque le contenu des granules est libéré dans la circulation (pH plasmatique~7,4), ces interactions cessent ce qui permet à l'OT d'agir sur son récepteur.

¹ Séquences peptidiques de l'ocytocine et de la vasopressine :

OT : Cys¹-Tyr-Ile-Gln-Asn-Cys⁶-Pro-Leu-Gly⁹(NH₂)

VP : Cys¹-Tyr-Phe-Gln-Asn-Cys⁶-Pro-Arg-Gly⁹(NH₂)

En gris sont illustrés les résidus aminés distincts. Les cystéines en position 1 et 6 vont former un pont disulfure donnant à ces peptides une structure secondaire cyclique.

2. Le récepteur de l'ocytocine

Le récepteur de l'OT a été séquencé par l'utilisation de la technique de clonage tout d'abord chez l'homme (Kimura *et al.*, 1992) puis chez d'autres mammifères dont le rat (Rozen *et al.*, 1995). Le gène de ce récepteur est présent en une seule copie dans le génome humain et il est situé entre les locus chromosomiques 3p25 et 3p26.2 (Kimura *et al.*, 1992; Inoue *et al.*, 1994; Simmons *et al.*, 1995). Jusqu'à ce jour, une seule isoforme de ce récepteur a pu être mise à jour et il appartient à la superfamille des récepteurs membranaires couplés aux protéines G (RCPG) de classe I. La régulation de la transcription du gène de ce récepteur utilise un certain nombre de facteurs de transcription qui, pour certains, dépendent de l'espèce mais aussi du tissu. Chez le rat, le promoteur du gène du récepteur périphérique possède plusieurs éléments de réponse (Rozen *et al.*, 1995; Breton *et al.*, 1996) : l'élément de réponse aux interleukines, NF IL-6, et un site APRE (« acute-phase response element ») activé par des médiateurs inflammatoires et immunitaires. La région 5' flanquante de ce gène révèle la présence de l'élément de réponse à l'AMPc (CRE) et d'un élément de réponse aux œstrogènes (ERE) ainsi que d'une moitié du site de réponse aux stéroïdes. Ces derniers expliquent la régulation d'expression du récepteur par les stéroïdes sexuels décrite lors de la parturition par exemple.

Dans le SNC, la distribution du récepteur OT est variable d'une espèce à l'autre. Il faut aussi remarquer que la régulation de l'expression de ce récepteur par les stéroïdes sexuels est aussi variable d'une région à l'autre du cerveau (Insel *et al.*, 1993; Insel *et al.*, 1997).

Jusqu'à présent, l'existence d'autres isoformes du récepteur OT n'a pas été mise en évidence (Verbalis, 1999). Cependant, certaines études en suggèrent la présence dans l'utérus (Chan *et al.*, 1993), le rein (Arpin-Bott *et al.*, 1997) et le cerveau (de Wied *et al.*, 1993). En effet, en fonction du type tissulaire, il existe des différences pharmacologiques et immunoréactives. Cependant, des techniques à résolution fine comme la réaction de polymérisation en chaîne (PCR) et le « Southern blot » sur un certain nombre de tissus possédant le récepteur OT n'ont pas permis d'identifier la présence de différents sous-types (Verbalis, 1999).

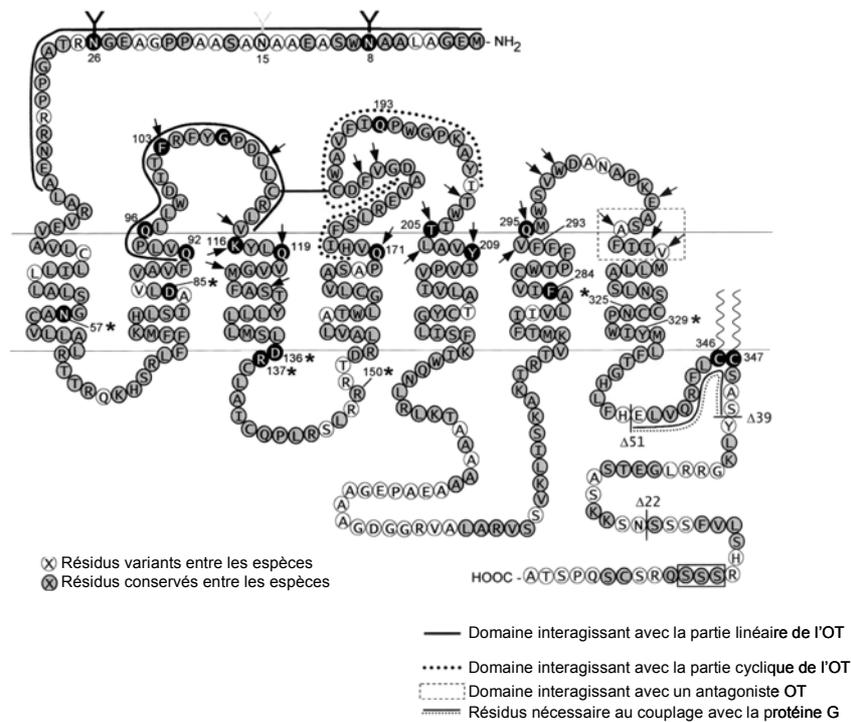


Figure 20 : La structure, la séquence et l'organisation fonctionnelle du récepteur oxytocine périphérique

Le récepteur OT est un récepteur couplé aux protéines G. Il possède sept domaines transmembranaires. L'extrémité N terminale est extracellulaire alors que l'extrémité C terminale est intracellulaire. Le site de liaison est constitué par l'extrémité N terminale, les boucles 2 et 4 ainsi qu'une partie des domaines transmembranaires 2 et 4. Le site de liaison de la protéine G est constitué par une partie de l'extrémité C terminale.

D'après Gimpl et Fahrenholz (2001).

3. Structure et voie de signalisation intracellulaire du récepteur de l'ocytocine

Le récepteur OT est un récepteur transmembranaire de la famille des RCPG de la classe I, possédant sept domaines transmembranaires en hélice α comme le montre la figure 20 (Gimpl et Fahrenholz, 2001). Le site de liaison de l'OT (relativement bien conservé entre les différents membres de la famille OT) est constitué par les boucles extracellulaires 2 et 4 et d'une partie des domaines transmembranaires 2 et 4.

La plupart des données pharmacologiques sur le récepteur OT ont été obtenues à partir des tissus périphériques (utérus, glande mammaire) ou nerveux (hippocampe, amygdale, hypothalamus) grâce à des études biochimiques de liaison utilisant des préparations subcellulaires. Pour le SNC, l'utilisation de la technique autoradiographique de liaison *in vitro* sur coupe de cerveau a permis non seulement de localiser les sites de liaison de l'OT mais aussi d'en étudier les caractéristiques pharmacologiques. Ainsi, l'OT possède une forte affinité (1-10 nM) pour son récepteur (Freund-Mercier *et al.*, 1988). Concernant l'affinité des autres représentants de la famille des peptides OT-VP pour le site de liaison au récepteur OT, il est intéressant de noter que ce récepteur est peu sélectif et son affinité pour l'OT est seulement dix fois supérieure à son affinité pour la VP. Cependant, la concentration de VP nécessaire pour reproduire les mêmes effets que l'OT est 100 fois plus importante. Ainsi, la VP agit comme un agoniste partiel du récepteur OT (Kimura *et al.*, 1994; Chini *et al.*, 1996).

Le récepteur OT périphérique est activé par la liaison de son agoniste sur le site actif. Cette liaison va être à la base d'un changement de conformation du récepteur qui va activer la protéine G couplée à celui-ci. Une fois activées, les protéines G hydrolysent en GDP le GTP lié à leur sous-unité α via leur activité GTPasique intrinsèque et se scindent en deux : la sous-unité α d'une part et les sous-unités $\beta\gamma$ d'autre part. Le récepteur OT est couplé à une protéine $G_{q/11\alpha}$ qui stimule l'activité de la phospholipase C. Cette dernière permet la dégradation de phosphatidyl-4,5-biphosphate (PIP_2) membranaire en diacylglycérol (DAG) et en inositol-1,4,5-triphosphate (IP_3). Ces deux derniers vont respectivement pouvoir activer les PKC et libérer les stocks intracellulaires de Ca^{2+} (contenu dans le système endomembranaire) afin d'interagir avec de nombreux effecteurs protéiques. Ces mécanismes entraînent des réponses cellulaires qui peuvent être plus ou moins longues. Cependant, d'autres mécanismes peuvent entretenir et soutenir cette réponse. En effet, au niveau du myomètre chez la ratte, l'OT inhibe l'activité Ca^{2+}/Mg^{2+} -ATPase de la membrane des sarcolèmes induisant un soutien transitoire de la concentration de Ca^{2+} dans le cytosol qui prolonge les effets de l'OT (Soloff et Sweet,

1982). De plus, l'IP₃ peut être métabolisé en 1,3,4,5-tétrakisphosphate (IP₄) qui pourrait, lui aussi, soutenir la réponse cellulaire. L'ensemble des mécanismes cellulaires mis en jeu est progressivement désactivé et le Ca²⁺ intracellulaire retrouve une concentration basale par expulsion vers le système endomembranaire et le milieu extracellulaire ; l'IP₃ est dégradé, ainsi que le DAG, et les différentes kinases activées retrouvent une activité de base.

Dans le SNC, le récepteur OT apparaît peu ou pas différent du récepteur OT utérin du point de vue pharmacologique. Par ailleurs, le récepteur central n'a pas été à ce jour cloné, ainsi, le degré d'homologie entre le récepteur périphérique et le récepteur central n'est pas encore connu. Enfin, la ou les voies des seconds messagers impliqués suite à l'activation du récepteur OT central ne sont pas clairement identifiées. Par une approche électrophysiologique, Robinson *et al.* (2002) ont pu mettre en évidence que l'effet inhibiteur de l'OT sur la transmission synaptique excitatrice des neurones de la lamina II faisait intervenir un couplage entre le récepteur OT et une protéine G. Alberi *et al.* (1997) ont caractérisé en partie les voies de transduction intracellulaires impliquées suite à l'activation du récepteur OT sur des motoneurones du nerf vague par une approche électrophysiologique. Dans ces motoneurones, l'OT induit un courant entrant Na⁺ persistant insensible à la TTX. Lorsque le milieu intracellulaire est dialysé par le GTP- γ -S, le courant persistant est inhibé montrant ainsi que l'OT implique l'activation de protéines G couplées au récepteur OT. Les résultats obtenus suggèrent que la réponse évoquée lors de l'application exogène d'OT ne fait pas intervenir le Ca²⁺ intracellulaire (l'utilisation de BAPTA ne modifie pas la réponse évoquée). Les résultats suggèrent que la voie de la PKC-phospholipase C n'est pas mobilisée dans cette réponse. Par ailleurs, l'activation ou l'inhibition de l'adénylate cyclase réduit de moitié la réponse évoquée par l'OT. Enfin, l'activation spécifique de la PKA ne modifie pas la réponse évoquée par l'OT. Il semble, dans les motoneurones du nerf vague, que l'activation du récepteur OT stimule une voie dépendante de l'AMPC, mais indépendante de l'activation de la PKA. D'autre part, une autre voie non identifiée, indépendante de l'AMPC et de la phospholipase C, semble être impliquée. Dans des cultures de neurones issus du NSO (Lambert *et al.*, 1994), il a été montré qu'une sous population de neurones sont sensibles à l'activation du récepteur OT qui induit une augmentation de la concentration de Ca²⁺ intracellulaire. Ceci mobilise les stocks de Ca²⁺ intracellulaires sensibles à la thapsigargine sans faire intervenir le Ca²⁺ extracellulaire. Des résultats similaires sur des astrocytes hypothalamiques en culture ont été observés (Di Scala-Guenot *et al.*, 1994). Par ailleurs, sur des neurones du NSO en culture, l'application exogène de VP induit des variations de concentration du Ca²⁺ intracellulaire issus des stocks intracellulaires et du milieu

extracellulaire (Dayanithi *et al.*, 1996; Sabatier *et al.*, 1997). Les données actuelles ne permettent pas de déterminer quels sont les seconds messagers mobilisés suite à l'activation du récepteur OT. Il semble que les voies utilisées dépendent du type de cellules sensibles à l'OT ainsi que de l'approche expérimentale utilisée : *in situ* ou culture de cellules du SNC.

III. Le noyau paraventriculaire de l'hypothalamus

L'hypothalamus est une structure du diencephale située à la base du cerveau qui constitue une interface importante entre le SNC d'une part et la périphérie d'autre part. En effet, il connecte une grande variété de structures cérébrales avec les systèmes endocriniens, autonomes et somatiques. Ceci confère à l'hypothalamus un rôle dans le contrôle et la régulation d'un grand nombre de fonctions (Brooks, 1988). Cette structure constitue un centre d'intégration essentiel dans l'homéostasie de l'organisme et la reproduction. Ainsi, il intervient dans les systèmes somatiques et autonomes ; hydrominéaux ; le métabolisme et la thermorégulation ; la prise de nourriture et la satiété ; la reproduction ; le système endocrinien ; le contrôle émotionnel et le stress. Face à cette impressionnante diversité je centrerai ma présentation sur le NPV de l'hypothalamus et plus particulièrement sur le système ocytocinergique.

1. L'organisation du noyau paraventriculaire

L'hypothalamus est formé d'un ensemble de noyaux distincts situés dans la moitié ventrale du diencephale, de part et d'autre du troisième ventricule et sous le thalamus. L'hypothalamus, est étroitement lié à l'hypophyse (lieu de synthèse et de sécrétion d'hormones et de libération des neurohormones) par la tige pituitaire. Les noyaux hypothalamiques peuvent être classés en quatre grandes régions d'un point de vue topographique : préoptique, antérieure, tubérale et mamillaire. De plus, chacune de ces régions peut être subdivisée en zones périventriculaires, médianes et latérales. Parmi les noyaux hypothalamiques, le NPV est situé de chaque côté du troisième ventricule dans la région antérieure périventriculaire. Il se divise, chez le rat, en trois subdivisions magnocellulaires et cinq subdivisions parvocellulaires (Armstrong et al., 1980; Swanson et Sawchenko, 1980). Les divisions magnocellulaires et parvocellulaires se différencient par un certain nombre de critères (morphologiques, biochimiques, fonctionnels).

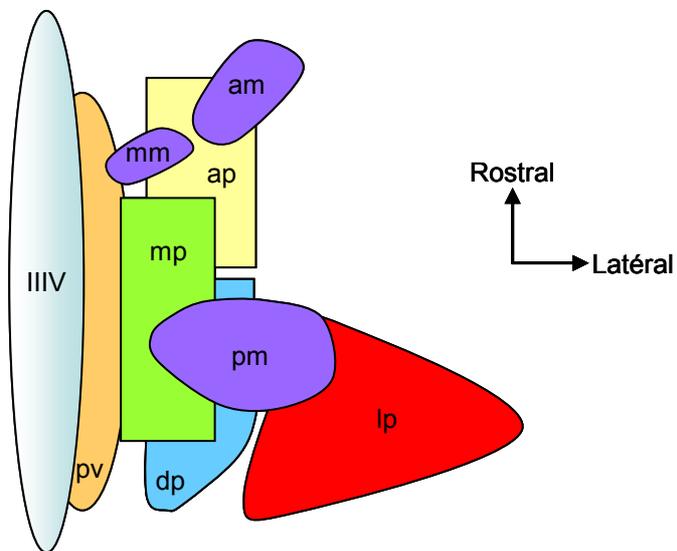


Figure 21 : L'architecture et les subdivisions anatomiques du noyau paraventriculaire

Le NPV est situé de part et d'autre du 3^{ème} ventricule. Il est constitué d'une division magnocellulaire comprenant 3 subdivisions (am, mm et pm) et d'une division parvocellulaire comprenant 5 subdivisions (ap, dp, lp, mp et pv). Ces subdivisions sont délimitées par des critères morphologiques, biochimiques et fonctionnels.

am : division magnocellulaire antérieure ; mm : division magnocellulaire médiane ; pm : division magnocellulaire postérieure ; ap : division parvocellulaire antérieure ; dp : division parvocellulaire dorsale ; lp : division parvocellulaire latérale ; mp : division parvocellulaire médiane ; pv : division parvocellulaire périventriculaire ; IIIIV : troisième ventricule.

Modifié d'après Swanson et Sawchenko (1980).

1.1. La division magnocellulaire

Les neurones magnocellulaires sont encore aujourd'hui les plus étudiés (Leng *et al.*, 1999). Ces neurones sont situés dans trois subdivisions du NPV (magnocellulaire antérieure, médiane et postérieure, figure 21). La cytoarchitecture des neurones magnocellulaires est parfaitement détaillée (Armstrong *et al.*, 1980). Le diamètre du soma est compris entre 20 et 35 μm , l'arborisation dendritique est peu développée et elle se compose de deux à trois dendrites. L'axone émis à partir du soma ou du neurite primaire quitte le NPV latéralement en direction des couches internes de l'éminence médiane pour rejoindre le lobe postérieur de l'hypophyse, où seront libérés des peptides comme l'OT et la VP dans la circulation systémique. L'ensemble des neurones magnocellulaires libère le contenu des vésicules de sécrétion dans la circulation générale, à la différence des neurones parvocellulaires. Du point de vue biochimique, les neurones magnocellulaires synthétisent et sécrètent majoritairement de l'OT (subdivision magnocellulaire postérieure) et de la VP (subdivision magnocellulaire médiane). Cependant, ces deux peptides ne sont pas co-localisés dans les mêmes neurones (Cechetto et Saper, 1988) sauf dans des conditions physiologiques particulières comme par exemple la lactation dans le noyau supraoptique (Mezey et Kiss, 1991; Calas *et al.*, 1994). Un certain nombre de peptides est aussi synthétisé par ces neurones. Ainsi, il a été montré que la dynorphine et la galanine co-localisent principalement avec la VP, alors que la cholécystokinine (CCK) et l'hormone de libération de la corticolibérine (CRH) co-localisent avec l'OT (Beinfeld *et al.*, 1980; Watson *et al.*, 1982; Burlet *et al.*, 1984; Rokaeus *et al.*, 1988). Certains neurones, organisés sous la forme de groupes denses de cellules, présentent une immunoréactivité vis-à-vis des enképhalines (Cechetto et Saper, 1988).

1.2. La division parvocellulaire

Les neurones parvocellulaires sont plus petits (10 à 12 μm de diamètre) que les neurones magnocellulaires (Armstrong *et al.*, 1980). On les retrouve dans cinq zones du NPV (figure 21) où ils constituent les groupes parvocellulaires antérieur, dorsal, latéral, médian et périventriculaire (Swanson et Kuypers, 1980). Autres différences avec les neurones magnocellulaires, les neurones parvocellulaires ne projettent pas vers le lobe postérieur de l'hypophyse. Par contre, les projections de ces neurones sont beaucoup plus diffuses, comme nous le verrons ci-dessous. Les neurones parvocellulaires synthétisent et libèrent une grande

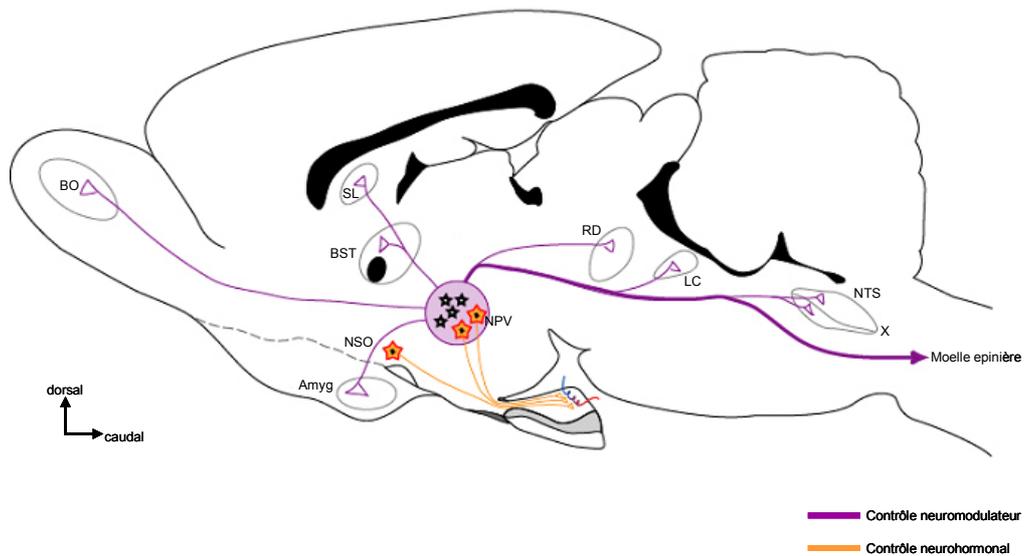


Figure 22 : Les projection centrales ocytocinergiques des divisions parvocellulaires du noyau paraventriculaire

Le noyau paraventriculaire possède deux types de projections ocytocinergiques: une projection périphérique vers la posthypophyse (orange) libérant l'OT dans la circulation générale (contrôle humoral) et des projections centrales (violet) vers diverses structures sous-corticales diencephaliques, bulbaires et médullaires. Le schéma représente une partie des projections centrales décrites à ce jour.

Amyg : amygdale ; BO : bulbe olfactif ; BST : le noyau du lit de la strie terminale ; LC : locus coeruleus ; NPV : noyau paraventriculaire ; NSO : Noyau supraoptique ; NTS : noyau du tractus solitaire ; RD : noyau du raphé dorsal ; SL : système limbique ; X : noyau moteur du nerf vague.

variété de peptides (Cechetto et Saper, 1988). La présence de VP est révélée dans les neurones parvocellulaires par immunocytochimie et elle montre un marquage moins intense pour les neurones parvocellulaires que pour les neurones magnocellulaires. Ce marquage se retrouve dans les subdivisions médiane, latérale et dorsale. Les neurones immunoréactifs à l'OT sont observés dans ces mêmes subdivisions médiane, latérale et dorsale (Cechetto et Saper, 1988). Les neurones parvocellulaires révèlent une diversité biochimique plus importante que les neurones magnocellulaires. De nombreux autres médiateurs peptidiques et non peptidiques sont libérés par ces neurones, dont certains peuvent être co-localisés : l'angiotensine II, le peptide atrial natriurétique, la CCK, la CRH, l'hormone de libération de l'hormone de croissance (GHRH), la tyrosine hydroxylase, le GABA, le NO, la galanine, la neurotensine, la somatostatine, le peptide intestinal vasoactif (VIP), la dynorphine et l'enképhaline, pour exemples (Armstrong et al., 1980; Sawchenko et Swanson, 1982; van den Pol, 1982; Cechetto et Saper, 1988; Hallbeck et Blomqvist, 1999; Hallbeck et al., 2001; Nysten et al., 2001).

2. Les afférences du noyau paraventriculaire

Comme nous l'avons vu ci-dessus, les neurones magnocellulaires projettent exclusivement sur la neurohypophyse afin de libérer le contenu des vésicules sécrétoires dans la circulation systémique via le système porte hypophysaire. Ainsi, ces neurones participent à la fonction endocrine de l'hypothalamus. Par contre, les projections des neurones parvocellulaires sont beaucoup plus diffuses et concernent plusieurs structures du SNC (figure 22). Une partie des projections s'effectue sur l'antéhypophyse favorisant ainsi la libération de corticolibérine (ACTH). Ces neurones parvocellulaires sont de nature ocytocinergique et co-localisent dans leurs vésicules de sécrétions la CRH. Cette projection participe aux réponses humorales face aux situations de stress et implique une activation des afférences noradrénergiques du NPV (Lang et al., 1983b; Whitnall, 1993; Nishioka et al., 1998; Sands et Morilak, 1999). Les autres projections se dirigent vers de nombreuses autres structures du SNC : le noyau hypothalamique dorso-médian, certains noyaux thalamiques, l'hippocampe latéral et dorsal, le subiculum, le cortex enthorinal, le noyau septal latéral et médian, l'amygdale, le bulbe olfactif, la substance noire, le *locus caeruleus*, le noyau du raphé, le noyau du tractus solitaire et le noyau moteur dorsal du nerf vague. Enfin, certaines de ces fibres ocytocinergiques en provenance du NPV se projettent au cervelet et à la moelle épinière (Sawchenko et Swanson, 1982; Cechetto et Saper, 1988; Gimpl et Fahrenholz, 2001).

L'ensemble de ces projections ocytocinergiques est accompagné de la présence de récepteurs OT clairement identifiés dans la majorité des cas, par l'utilisation de la technique d'autoradiographie sur plan film (Tribollet et al., 1997; Gimpl et Fahrenholz, 2001; Uhl-Bronner et al., 2005).

La mise en évidence des projections hypothalamo-médullaires impliquant le NPV a utilisé des expériences de transport de marquage rétrograde de substances fluorescentes combinées avec de l'immunohistochimie (Sawchenko et Swanson, 1982; Cechetto et Saper, 1988). Les injections ont été effectuées dans la moelle épinière (segment thoracique) et dans le complexe vagal dorsal. Les résultats montrent que les cinq subdivisions parvocellulaires du NPV contribuent à la formation de ces projections sur la moelle épinière. De plus, les neurones impliqués dans cette projection, du point de vue biochimique, sont immunoréactifs pour l'OT, la VP, la Met-enképhaline, par exemple. Il semble cependant que les fibres issues du NPV parvocellulaire sont principalement ocytocinergiques (Nilaver et al., 1980; Sofroniew et al., 1981; Sawchenko et Swanson, 1982; Hallbeck et al., 2001), bien que Cechetto et Saper (1988) estiment pour leur part que les fibres ocytocinergiques et vasopressinergiques soient en proportion équivalente. Des expériences de traçage antérograde ont permis de déterminer le trajet des fibres issues du NPV jusqu'au tronc cérébral impliquant notamment les structures autonomes supramédullaires et la moelle épinière. Ainsi les fibres restent majoritairement ipsilatérales à partir du NPV et présentent plusieurs points de décussation récemment décrits : supramamillaire, tegmentum pontique, partie commissurale du noyau du tractus solitaire et la lamina X de la moelle épinière (Toth *et al.*, 1999). Ainsi, il semble que l'hypothalamus soit impliqué dans le contrôle et la modulation de certaines zones de la moelle épinière dont les structures autonomes médullaires, telles que la lamina X et la colonne intermédio-latérale (Saper *et al.*, 1976). Enfin, la destruction du NPV conduit à une disparition quasi totale dans la moelle épinière de la présence d'OT quantifiée par dosage radio-immunologique, alors qu'il est encore possible de détecter la VP (Lang *et al.*, 1983a). Ainsi, l'OT médullaire est libérée à partir de fibres issues du NPV parvocellulaire, où elle est synthétisée. Ceci est renforcé par le fait qu'à ce jour aucune étude n'a mis en évidence dans les somas médullaires une synthèse d'OT ou de neurophysine, protéine chaperonne de l'OT (Swanson, 1977; Nilaver et al., 1980; Sawchenko et Swanson, 1982; Hallbeck et al., 2001).

Les données actuelles (Swanson et McKellar, 1979) montrent que les fibres immunoréactives pour l'OT empruntent le funiculus latéral et innervent principalement les couches superficielles de la corne dorsale (laminæ I et II) tout le long de la moelle, la lamina X, les colonnes inter-médio-latérales (niveaux thoracique, lombaire et sacré) et les

neurones parasympathiques pré-ganglionnaires de la moelle épinière. Cependant, quelques fibres ocytocinergiques se ramifient dans les cornes ventrales de la moelle épinière. Ces fibres ocytocinergiques réalisent des contacts étroits avec les neurones des couches superficielles et la lamina X de la moelle épinière, et, dans une moindre mesure avec la colonne intermédiolatérale (niveau thoracique et lombaire). Ceci a pu être mis en évidence par la technique de microscopie électronique sur des tranches de moelle épinière, où les fibres immunoréactives pour l'OT et la neurophysine réalisent des synapses axo-dendritiques clairement identifiées avec les neurones de ces zones médullaires (Rousselot *et al.*, 1990). Enfin, il est remarquable aussi de voir qu'il existe une superposition parfaite entre les sites de liaison de l'OT et la présence des terminaisons des fibres immunoréactives à l'OT. En effet, on observe un marquage dense des sites de liaison de l'OT dans les couches superficielles des cornes dorsales de la moelle épinière (laminæ I et II), de la lamina X et dans une moindre mesure les colonnes intermédiolatérales (Reiter *et al.*, 1994; Tribollet *et al.*, 1997; Jo *et al.*, 1998b). Ceci a pu être mis en évidence par l'utilisation de la technique d'autoradiographie après liaison d'un antagoniste : $d(CH_2)_5$ -[Tyr(Me)², Thr⁴, Tyr-NH₂⁹]-Ornithine Vasotocine ; du récepteur OT couplé à l'isotope 125 de l'iode. De plus, le marquage des récepteurs OT des neurones des couches superficielles de corne dorsale de la moelle épinière en culture montre par autoradiographie que des neurones expriment à leur surface membranaire ces récepteurs (Jo *et al.*, 1998b). Dans ces études, on observe une expression très dense des récepteurs OT dans les laminæ I et II, alors que, dans la lamina X et les colonnes inter-médiolatérales, la densité du marquage est beaucoup plus faible et ceci tout le long de la moelle épinière. Par contre, le récepteur VP est quant à lui exprimé de manière homogène et modérée dans toute la substance grise médullaire (Tribollet *et al.*, 1997).

Ainsi, le NPV parvocellulaire projette des fibres immunoréactives pour l'OT sur les neurones des couches superficielles de la moelle épinière. Ceux-ci réalisent avec ces fibres des synapses clairement identifiées. Des vésicules contenant de l'OT sont présentes dans les terminaisons de ces fibres et, en regard, des récepteurs à ce peptide sont exprimés sur les neurones médullaires.

IV. Les propriétés centrales de l'ocytocine

Comme nous l'avons vu plus haut, les projections des neurones parvocellulaires ocytocinergiques du NPV sont diffuses et le récepteur OT est observé dans de nombreuses régions du SNC : le bulbe olfactif, le noyau olfactif antérieur, le néocortex, le cortex piriforme, le noyau du lit de la strie terminale, le noyau préoptique, les ganglions de la base, le système limbique, le thalamus, l'hypothalamus, le tronc cérébral et la moelle épinière (Yoshimura et al., 1993; Barberis et Tribollet, 1996). Dans cette section, je me concentrerai à décrire succinctement les effets physiologiques généraux de l'OT au niveau central ainsi que ces effets cellulaires sur les structures cérébrales supramédullaires impliquées.

Des fibres ocytocinergiques se projettent sur un certain nombre de noyaux du tronc cérébral du rat dont ceux impliqués dans la régulation du système cardiovasculaire. De fortes concentrations d'OT sont retrouvées dans le noyau du tractus solitaire, qui reçoit des informations sensorielles viscérales issues en partie des barorécepteurs cardiovasculaires, cependant, des microinjections d'OT dans ce noyau n'induisent pas de variation de pression vasculaire ou du rythme cardiaque, à la différence de la VP (Vallejo *et al.*, 1984). Toutefois, des injections d'OT dans le noyau dorsal du nerf vague (composante du système autonome parasympathique) réduisent le rythme cardiaque alors que la VP n'a aucun effet (Rogers et Hermann, 1985). Par ailleurs, il semble que l'effet de l'OT sur le système cardiovasculaire implique les neurones ocytocinergiques du NPV. En effet, l'injection dans le NPV d'un oligonucléotide anti-sens OT diminue à la fois la pression artérielle et le rythme cardiaque suite à une stimulation par injection intracérébro-ventriculaire de substance P (Maier *et al.*, 1998). Une telle injection d'un oligonucléotide anti-sens OT diminue aussi la tachycardie induite lors du stress (Morris *et al.*, 1995). L'OT est impliquée aussi dans la thermorégulation. En effet, des injections intracisternale et intracérébro-ventriculaire d'OT induisent une hyperthermie (Lipton et Glyn, 1980; Mason et al., 1986). A la différence de la VP, l'OT ne possède pas d'effet antipyrétique chez le chat (Naylor *et al.*, 1986). En plus de ces effets centraux autonomes (régulation cardiovasculaire, thermique, gastrique, hydrique et osmotique) (Gimpl et Fahrenholz, 2001), l'OT est impliquée dans certains comportements : sexuel, maternel, social, prise de nourriture, stress, agressivité, mémorisation, apprentissage. Récemment, le développement de lignées de souris transgéniques, pour lesquelles l'expression de l'OT est rendue impossible (Nishimori *et al.*, 1996; Young *et al.*, 1996), a

permis de mieux appréhender le rôle de ce peptide dans la reproduction chez la souris. Celles-ci sont viables et fertiles et leur comportement reproducteur est normal. Cependant, en l'absence d'OT plasmatique, la femelle est incapable d'allaiter sa progéniture qui décède rapidement.

Il ne semble pas chez la souris que l'OT soit nécessaire lors de l'accouplement, la parturition, la délivrance et le comportement maternel. Par contre, chez la ratte, l'OT est nécessaire pour initier ce comportement maternel, c'est-à-dire « l'attachement » de la femelle à sa progéniture. Ceci a été observé suite à la destruction des structures hypothalamiques ocytocinergiques, l'injection centrale d'antagoniste du récepteur OT, où il y a une inhibition du comportement maternel précoce juste après la délivrance (Fahrbach *et al.*, 1985; van Leengoed *et al.*, 1987). De plus, l'OT n'intervient pas dans le maintien du comportement maternel « d'attachement », car un déficit d'OT suite à l'initiation de ce comportement ne le modifie pas (Fahrbach *et al.*, 1985; Insel et Harbaugh, 1989). L'OT est aussi impliquée dans le contrôle de l'agressivité, de la peur et de la confiance. Ceci a été observé chez l'humain que des souris transgéniques pour lesquelles le gène codant pour l'OT ou son récepteur est supprimé (Winslow *et al.*, 2000; Kirsch *et al.*, 2005; Kosfeld *et al.*, 2005; Takayanagi *et al.*, 2005). Enfin, la reconnaissance sociale est un bon modèle d'étude de l'apprentissage et de la mémorisation. Les tests utilisés sont basés sur l'investigation olfactive (reniflements, poursuite d'un congénère, etc.). L'injection intracérébro-ventriculaire d'OT chez le rat mâle adulte facilite l'investigation sociale à des concentrations faibles, alors que de fortes concentrations d'OT tendent à inhiber ce comportement (Benelli *et al.*, 1995). Il semble qu'il existe un dimorphisme sexuel dans la reconnaissance sociale, en effet, chez la femelle l'injection centrale d'OT ne modifie pas le comportement de reconnaissance de ses petits alors que l'administration d'un antagoniste du récepteur OT perturbe la capacité de reconnaissance sociale (Engelmann *et al.*, 1998). Ainsi, l'OT et son récepteur interviennent dans la régulation du système autonome et aussi dans certains aspects du comportement liés à la mémorisation, l'agressivité, la peur.

En parallèle de ces études, l'utilisation de techniques d'enregistrements électrophysiologiques sur tranche de tissu nerveux effectuées dans certaines des régions exprimant le récepteur OT ont précisé le rôle fonctionnel de l'OT. Ce peptide est impliqué de manière importante dans la modulation de l'excitabilité neuronale. Des enregistrements extracellulaires sur tranches de neurones de l'aire CA1 de l'hippocampe de rat montrent que les interneurons inhibiteurs ont leur activité spontanée renforcée par une application exogène d'OT et que cet effet excitateur est maintenu en absence de transmission synaptique. Par contre les neurones pyramidaux ne sont pas affectés ou sont inhibés indirectement par les interneurons inhibiteurs (Muhlethaler *et al.*, 1984). Il est à noter que cet effet semble être dépendant de l'espèce. En effet, aucun site de liaison de l'OT et aucun effet de l'application d'OT n'a pu être observé sur les neurones non pyramidaux de l'aire CA1 de l'hippocampe du cochon d'Inde (Raggenbass *et al.*, 1989). L'amygdale, une autre structure du système limbique, présente une forte densité de récepteurs OT. Condes-Lara *et al.* (1994) ont montré *in vivo*, par des enregistrements extracellulaires unitaires, qu'une population de neurones de cette structure situés dans le noyau central répond par une augmentation de la fréquence de décharge en PA lors d'une application iontophorétique d'OT. Ainsi, les récepteurs OT observés par autoradiographie dans cette structure semblent être fonctionnels. Par ailleurs, Huber *et al.* (2005) ont observé des récepteurs OT fonctionnels sur des neurones GABAergiques des divisions latérale et capsulaire du noyau central de l'amygdale du rat. Ces neurones GABAergiques sont excités par l'OT et inhibent des neurones situés dans la division médiane. Ces derniers expriment le récepteur V1a de la VP qui favorise leur excitabilité. Ainsi, la VP et l'OT ont des effets opposés sur les neurones de la division médiane de l'amygdale et peuvent affecter différemment l'intégration des entrées synaptiques de l'amygdale (corticales et sous-corticales), structures connues pour intervenir dans la modulation des réponses autonomes induites par des stimulations de types anxieuses et de peur.

Dans l'hypothalamus, là aussi, l'activation du récepteur OT induit une augmentation de l'excitabilité d'une population de neurones du NSO. Cet effet concerne principalement les neurones à activité de décharge spontanée de PA tonique ou irrégulière, alors que les neurones possédant une activité spontanée phasique ne sont pas ou très peu affectés (Yamashita *et al.*, 1987). Cependant, un dimorphisme lié aux stéroïdes sexuels semble à la base d'effets opposés de l'OT sur les neurones du NPV et de NSO qui possèdent des récepteurs OT fonctionnels (Kuriyama *et al.*, 1993; Murai *et al.*, 1998). En effet, chez la ratte vierge, l'application d'OT sur les neurones de ces structures hypothalamiques induit une inhibition de la décharge en PA

alors que chez la femelle ovariectomisée ou chez le mâle, il est observé une augmentation de l'excitabilité ou aucun effet. Ces effets opposés sont liés à une augmentation de la conductance membranaire, suggérant que l'OT augmente une conductance dépolarisante chez le mâle et augmente une conductance hyperpolarisante chez la femelle.

Enfin, dans le noyau moteur dorsal du nerf vague, des sites de liaisons à l'OT ont été observés. Là encore, l'application d'OT sur des tranches de tronc cérébral induit une augmentation de l'excitabilité qui se caractérise par une augmentation de la fréquence de décharge spontanée en PA d'une grande partie des motoneurones pré-ganglionnaires parasympathiques (Charpak et al., 1984; Raggenbass et al., 1987; Dubois-Dauphin et al., 1992). L'application exogène d'OT développe un courant entrant insensible à la TTX et soutenu (Raggenbass et Dreifuss, 1992). Ce courant est dépendant du Na^+ extracellulaire. Il augmente donc l'excitabilité des motoneurones. Enfin, ce courant est modulé par le Ca^{2+} extracellulaire.

V. Le système ocytocinergique et le système nociceptif

1. Les conséquences de la stimulation du noyau paraventriculaire sur la sensibilité thermique et mécanique

Kupers *et al.* (1988) ont implanté une électrode de stimulation dans les noyaux hypothalamiques et les seuils de sensibilité thermique ont été mesurés en utilisant les tests classiques (« hot plate » et « tail flick »). Les résultats indiquent que les temps de réaction sont prolongés à la suite de la stimulation de ces noyaux, résultat d'un effet analgésique sur la douleur aiguë. Sur ces mêmes animaux, après avoir induit une polyarthrite par injection d'une bactérie (*Mycobacterium butyricum*), la stimulation électrique des noyaux réduit profondément les effets comportementaux anormaux de la polyarthrite. Ces effets sont spécifiques de la stimulation des noyaux hypothalamiques car aucune modification du comportement des animaux n'est observable lorsqu'une structure adjacente est stimulée. Dans les années 1990, deux études ont montré que la stimulation électrique directe du NPV provoque un effet analgésique. Des expériences ont été menées chez des rats qui présentent une implantation chronique d'une électrode de stimulation dans les divisions parvocellulaires ou magnocellulaires du NPV (Yirmiya *et al.*, 1990). Sur ces animaux, les auteurs ont examiné le rôle de la VP et des opiacés par l'utilisation de tests nociceptifs thermiques (« hot plate » et « tail flick ») afin de déterminer la valeur seuil de l'hyperalgie thermique. Les résultats indiquent que la stimulation du NPV produit une inhibition du système nociceptif, résultat d'une analgésie marquée indépendante à la fois de la VP et des peptides opiacés. De plus, l'intensité de la stimulation du NPV nécessaire pour observer cette analgésie est moins importante pour la division parvocellulaire du NPV que pour la division magnocellulaire. Dans une étude similaire (Shiraishi *et al.*, 1995), les effets de la stimulation électrique du NPV ont été testés sur la sensibilité mécanique. Ici, on mesure la pression mécanique qu'il faut appliquer à la patte pour provoquer son retrait. Les conclusions des auteurs sont similaires à celles de Yirmiya *et al.* (1990).

Ces études montrent que l'activation de la division parvocellulaire du NPV est responsable d'une inhibition du système nociceptif. Les résultats indiquent que ni le système des opiacés, ni la libération de VP ne sont impliqués dans ces effets analgésiques. Il se pourrait que de l'OT soit libérée suite à l'activation électrique du NPV et aurait des effets analgésiques sur des structures cibles qui interviendraient dans le système nociceptif.

2. Les conséquences de l'injection centrale d'ocytocine sur la douleur

Plusieurs études ont été réalisées sur des rats pour lesquels des injections d'OT ont été effectuées : intrapéritonéales, intrathécales et intracérébro-ventriculaires. Sur ces animaux, des tests classiques de mesures des seuils de douleurs aiguës mécaniques et thermiques ont été effectués afin de quantifier toute variation des sensibilités mécaniques ou thermiques. La plupart de ces études constituent des arguments supplémentaires pour donner un rôle antinociceptif à l'OT.

Par exemple, l'injection intracérébro-ventriculaire d'OT diminue significativement le seuil de sensibilité nociceptive et cet effet est bloqué lors de l'administration d'un antagoniste du récepteur OT. Enfin, l'effet antinociceptif peut être reproduit lors d'une injection intrapéritonéale d'OT à une dose supérieure de 10 à 200 fois (Arletti *et al.*, 1993). Les auteurs ont aussi montré que cet effet dépend de l'activation du système des opiacés endogène. En effet, l'administration de naltrexone (antagoniste des récepteurs à la morphine) inhibe l'effet antinociceptif dû à l'OT, alors que celle-ci potentialise et prolonge la durée de l'effet antinociceptif de la morphine. Par ailleurs, des injections d'OT dans la substance grise périaqueducale, dans le noyau du raphé magnus ou intrathécale induisent une analgésie dépendante de la dose d'OT qui se caractérise par une diminution du seuil des sensibilités thermiques et mécaniques (Yang, 1994; Ge *et al.*, 2002; Wang *et al.*, 2003). Ici, encore, le système des opiacés est impliqué car les effets observés par l'administration d'OT sont antagonisés par l'administration concomitante d'antagonistes des récepteurs opiacés. De plus, dans un modèle de douleur inflammatoire périphérique par injection intraplantaire de carragénine chez le rat, l'injection intrathécale lombaire d'OT induit, en fonction de la dose, une augmentation de la latence de retrait de la patte suite à une stimulation thermique et mécanique (Yu *et al.*, 2003). Cet effet analgésique mobilise là encore les opiacés endogènes car cet effet est bloqué spécifiquement par des antagonistes des récepteurs μ et κ . Par ailleurs, chez ces rats inflammatoires, l'injection intrathécale d'atéziban (antagoniste OT) seul induit une hyperalgie, montrant que les taux médullaires endogènes d'OT lors de l'inflammation sont impliqués fonctionnellement dans la modulation tonique et la transmission des messages nociceptifs. Ces études montrent que l'OT possède un effet analgésique conduisant à une stimulation du système opiacé endogène à la fois au niveau médullaire comme au niveau supramédullaire comprenant le noyau du raphé magnus et la substance grise périaqueducale (qui constituent un des contrôles descendant médullaire inhibiteur).

Cependant, toutes les études ne donnent pas à l'OT un effet analgésique. En effet, Millan *et al.* (1984) ont effectué des destructions du NPV chez le rat. Il en résulte une diminution de l'immunoréactivité de l'OT dans la moelle éminière. Cependant, aucune modification des seuils de sensibilité nociceptive n'est observée. Par ailleurs, dans leurs conditions expérimentales, ils n'observent aucun effet de l'injection intrathécale d'OT sur la sensibilité nociceptive tout comme sur l'action antinociceptive de la morphine, à la différence de Yu *et al.* (2003). Enfin, Xu et Wiesenfeld (1994) ont montré que des doses croissantes d'OT injectées intrathécalement facilitent le réflexe de retrait de la patte sur des rats décérébrés, qui présentent une section de la moelle épinière et des rats intacts non anesthésiés. D'où une action pronociceptive de l'OT dans leurs conditions expérimentales.

En résumé, la majorité des études semblent indiquer que l'injection d'OT dans le SNC induit un effet analgésique qui se traduit par une mise en jeu des opiacés endogènes agissant sur les neurones nociceptifs médullaires.

3. L'analgésie induite par le stress et le système ocytocinergique

Dans le NPV, les neurones ocytocinergiques sont activés lors de différentes conditions stressantes. Ceci est observé par l'expression de gènes précoces dans cette région comme le gène FOS (marqueur de l'activité cellulaire) lors de stress induit par contention par exemple (Ceccatelli *et al.*, 1989; Hatakeyama *et al.*, 1996). Par ailleurs, les effets antinociceptifs induits par le stress sont bien documentés, aujourd'hui, et peuvent faire intervenir ou non les opiacés (Hayes *et al.*, 1978; Porro et Carli, 1988; Mogil *et al.*, 1996). Enfin, les lésions du NPV réduisent l'analgésie induite par le stress lors de la mise en jeu du réflexe médullaire du retrait de la queue suite à une stimulation nociceptive (« tail flick ») (Truesdell et Bodnar, 1987). Ces études concourent à une participation de l'OT dans le contrôle de la transmission de l'information douloureuse. Par ailleurs, récemment, Robinson *et al.* (2002) ont caractérisé les conséquences fonctionnelles de l'activation du contrôle descendant ocytocinergique sur la transmission synaptique médullaire lors d'une analgésie induite par le stress. Ils ont utilisé une souche de souris déficiente pour le gène de l'OT (OT^{-/-}) comparée à une souche sauvage (OT^{+/+}). Leurs résultats montrent que les souris OT^{-/-} ont une analgésie induite par le stress (bain froid et contention) réduite significativement (diminution des seuils de sensibilité thermique et mécanique), alors qu'en absence de stress les sensibilités thermiques, mécaniques, ainsi que, l'analgésie induite par la morphine ne sont pas modifiées. Les effets

observés sont, de plus, corrélés à une activation des neurones hypothalamiques ocytocinergiques qui expriment, alors, c-FOS chez les souris OT^{+/+}. Par contre, aucune immunoréactivité pour l'OT n'est observable chez les souris OT^{-/-}, bien qu'une immunoréactivité pour c-FOS soit présente suite à un stress. Par la technique d'enregistrement intracellulaire, ils ont enregistré la réponse des neurones de la lamina II en tranches aiguës lors d'une stimulation électrique de la racine dorsale. L'application exogène d'OT induit une inhibition (dépendant de la concentration) de la réponse excitatrice glutamatergique des neurones de la lamina II chez la souris OT^{+/+}. Par contre, aucun effet de l'application exogène d'OT n'est observable sur les souris OT^{-/-}. Cette observation pourrait être le résultat d'une expression du récepteur OT régulée par la présence d'OT libérée par les fibres ocytocinergiques issues du NPV, à la différence des récepteurs μ et δ des opioïdes qui sont sur-exprimés dans le cas de souris transgéniques dont le gène codant pour les enképhalines est supprimé (Brady *et al.*, 1999).

De plus, quelques études font état d'une activation des neurones parvocellulaires de l'hypothalamus et d'une accumulation d'OT dans la moelle épinière, induite par le stress (Miaskowski *et al.*, 1988; Cullinan *et al.*, 1995). En effet, suite à un stress de contention, les contenus en OT mesurés par dosage radio-immunologique dans l'hypothalamus et le tronc cérébral sont fortement diminués. Parallèlement, les contenus en OT sont augmentés dans toute la moelle épinière. De plus, les contenus médullaires en VP sont augmentés sans modification des taux hypothalamiques mesurés après le stress. Ainsi, ces études confèrent à l'OT un rôle important dans l'analgésie induite par le stress, où elle serait libérée pour agir sur les neurones des couches superficielles des cornes dorsales de la moelle épinière afin d'inhiber la transmission des informations nociceptives.

4. L'action directe de l'ocytocine sur le système nociceptif médullaire

Comme nous l'avons vu précédemment, Robinson *et al.* (2002) ont montré que dans des conditions particulières (l'analgésie induite par le stress), les neurones parvocellulaires ocytocinergiques du NPV étaient recrutés. De plus, il apparaît que l'effet analgésique de l'OT proviendrait en partie d'une inhibition de la transmission du message nociceptif dans les neurones de la lamina II par l'activation du contrôle descendant ocytocinergique. Cependant, il ne faut pas oublier que l'effet analgésique dû à l'OT passe indirectement par une activation du système opiacé comme cela a été décrit par Yang (1994), Ge *et al.* (2002) et Wang *et al.*

(2003) au niveau supramédullaire et par Yu *et al.* (2003) au niveau lombaire de la moelle épinière. Par ailleurs, chez le rat, il semble aussi que l'activation du NPV produise une analgésie par une inhibition de la transmission glutamatergique (Condes-Lara *et al.*, 2003). En effet, la réponse des neurones lombaires de la corne dorsale lors d'une stimulation nociceptive obtenue par enregistrement extracellulaire est inhibée lors d'une application d'OT *in vivo* à proximité du neurone enregistré. De plus, récemment, le même groupe de recherche a montré que dans les couches superficielles de la corne dorsale, la réponse nociceptive des neurones médullaires était inhibée par une stimulation électrique du NPV, reproduite par une administration locale d'OT et antagonisée par l'application locale et concomitante d'un antagoniste du récepteur OT à proximité du neurone enregistré (Condes-Lara *et al.*, 2006). Cette inhibition provient d'une diminution de la réponse des neurones médullaires lors de l'activation des afférences sensorielles nociceptives (fibres A δ et C). En parallèle, sur des animaux présentant une ligature lâche du nerf sciatique (modèle de douleur neuropathique), les seuils de l'hyperalgie au froid (test de l'acétone) et de l'allodynie mécanique (test de von Frey) sont augmentés lorsqu'une injection intrathécale d'OT est pratiquée. Ainsi, il semble que la stimulation de NPV induise une libération d'OT dans les couches superficielles de la moelle épinière. En conséquence, l'OT induit un effet analgésique rapide *in vivo* qui peut être reproduit par une injection locale d'OT. Cet effet concerne une modulation de l'hyperalgie thermique, mécanique et l'allodynie par une modification de la transmission synaptique glutamatergique.

Les objectifs de ce travail

Les couches superficielles de la corne dorsale de la moelle épinière et plus particulièrement le réseau de neurones de la lamina II intègrent les informations nociceptives acheminées par les afférences sensorielles cutanées A δ et C. Par ailleurs, les neurones de la lamina II reçoivent des afférences issues de contrôles descendants dont le rôle est de moduler l'activité électrique de ces neurones. Certaines évidences sont en faveur d'un effet antinociceptif du contrôle hypothalamo-médullaire ocytocinergique sur les neurones de la lamina II. Cependant, il existe peu de données sur les mécanismes cellulaires mis en jeu dans le contrôle de l'excitabilité des neurones de la lamina II.

Dans ce travail de thèse, je me suis intéressé au rôle de l'ocytocine et du contrôle ocytocinergique dans la modulation de l'excitabilité des neurones de la lamina II. Ainsi, j'ai observé les effets tant post que présynaptiques de l'activation du récepteur OT sur des tranches aiguës de moelle épinière en utilisant la technique de « patch-clamp ». De plus, dans un contexte physiologique, il m'a semblé intéressant de voir, *in vivo*, quel est le rôle du contrôle descendant ocytocinergique et comment s'articule le réseau de neurones de la lamina II. Enfin, mes résultats permettent-ils d'attribuer un rôle antinociceptif au contrôle descendant ocytocinergique.

Afin de répondre aux objectifs de ce travail, nous avons utilisé deux approches d'électrophysiologie. Nous avons pu enregistrer les neurones dans leur environnement natif en utilisant d'une part la technique du « patch-clamp » sur des tranches aiguës de moelle épinière et d'autre part une approche extracellulaire chez l'animal anesthésié.

L'enregistrement des neurones de la lamina II a été effectué au niveau du renflement lombaire de la moelle épinière. En effet, cette partie médullaire est le lieu de projection des fibres sensorielles primaires qui empruntent le nerf sciatique (nerf mixte sensori-moteur) acheminant à la fois les informations motrices et sensorielles de la patte postérieure. L'induction d'une inflammation périphérique dans la voûte plantaire de la patte postérieure active des mécanismes de sensibilisation centrale et périphérique à l'origine de la modification d'activité des circuits nociceptifs. Ainsi, pour étudier les mécanismes cellulaires mis en jeu lors d'une inflammation périphérique, nous avons utilisé dans cette étude un modèle animal d'inflammation périphérique induite par l'injection dans la patte postérieure d'une substance irritante. L'étude d'un tel modèle permet de mieux comprendre à la fois le rôle des neurones de la lamina II et les conséquences fonctionnelles de la modulation de cibles cellulaires dans des conditions pathologiques par des médiateurs endogènes comme l'OT.

Pour compléter ces études fonctionnelles cellulaires, nous avons aussi utilisé une technique de dosage radio-immunologique de peptides. Elle nous a permis d'évaluer les quantités d'OT présentes dans la moelle épinière lors de douleurs inflammatoires. Enfin, nous avons testé les effets d'agonistes et d'antagonistes du récepteur OT sur l'animal vigile en mesurant le seuil de sensibilité mécanique dans des conditions pathologiques.

Matériels et Méthodes

1. L'enregistrement *in vitro* des neurones de la lamina II par la technique de « patch-clamp » en configuration cellule entière

1.1 Les animaux utilisés

Les animaux utilisés dans cette étude sont des rats mâles de souche Sprague-Dawley âgés de 15 à 30 jours postnataux, élevés au laboratoire. Ils reçoivent boisson et nourriture *ad libitum* et sont soumis à un cycle jour-nuit de 12 h/12 h. L'utilisation des animaux dans le cadre de ce travail répond aux critères définis par les directives du conseil de l'Union Européenne (86/69/EEC du 24 novembre 1986) et du Ministère Français de l'Agriculture (licence n° 67-116 fournie au Professeur Pierrick Poisbeau).

1.2 L'anesthésie

Les animaux sont anesthésiés à l'aide d'une injection intra-péritonéale (i.p.) d'Imalgène 1000[®] (Mériel, Lyon, France) dont le principe actif est la kétamine, un antagoniste du récepteur NMDA du glutamate. L'injection est réalisée à raison de 150 mg/kg. L'obtention d'une anesthésie profonde est vérifiée par l'absence de réflexes moteurs suite au pincement de la queue.

1.3 La procédure de dissection

L'ensemble de la dissection est pratiqué dans une version modifiée du liquide céphalo-rachidien artificiel appelée « Sucrose-Artificial Cerebrospinal Fluid » (S-ACSF) et dont la composition est la suivante (en mM) : 248 saccharose, 11 glucose, 2 NaHCO₃, 2 KCl, 1,25 KH₂PO₄, 2 CaCl₂, 2 MgSO₄. Cette solution est maintenue en permanence au froid (4°C) et saturée par un mélange gazeux (95 % O₂, 5 % CO₂). Comme indiqué, cette solution est faiblement concentrée en ions Na⁺. Ceci a pour but de limiter la mort neuronale par le phénomène d'excitotoxicité lors de la coupe des tranches. Après décapitation et section de la jonction lombo-sacrée de la colonne vertébrale, la moelle épinière est prélevée par l'application d'une pression hydraulique au niveau de la partie lombaire de la colonne

vertébrale (Keller *et al.*, 2001) à l'aide d'une seringue surmontée d'une canule. La moelle est recueillie du côté cervical et ensuite placée dans cette même solution afin d'isoler le renflement lombaire. Cette technique offre plusieurs avantages : les méninges restent collées au canal vertébral et la moelle épinière est prélevée très rapidement après la décapitation pour être placée dans un milieu favorisant la survie des neurones. En effet, la moelle épinière est un tissu fragile et très sensible à l'hypoxie. Il est à noter que, dans la grande majorité des cas, les racines dorsales et ventrales sont complètement sectionnées. Si l'on souhaite préserver celles-ci, il est préférable d'utiliser la technique de laminectomie.

1.4 La préparation des tranches

Le tissu médullaire est un tissu souple et de petit diamètre qui nécessite un support afin de réaliser des coupes transversales. Une fois que la moelle épinière est prélevée et que le segment lombaire est isolé à l'aide d'un scalpel, ce segment est placé dans une gouttière réalisée dans un cube de gel d'agarose (5,5 % poids/volume, DNA-agarose, Euromedex). Ce cube est maintenu sur la platine d'un vibratome (Micro-Cut H1200, Bio-Rad, Royaume-Uni) grâce à une colle cyanoacrylique (Superglue[®]), de telle manière que le segment médullaire soit orienté verticalement. Le cube est immergé dans la solution de S-ACSF froide et continuellement saturée par le mélange gazeux (95 % O₂-5 % CO₂). Des tranches de 600 µm d'épaisseur sont réalisées successivement en prenant soin d'éliminer le premier et le dernier millimètre du segment lombaire. Les tranches sont stockées à température ambiante (22-26°C) dans une solution saline (ACSF) et incubées ou non avec des substances pharmacologiques de manière chronique en fonction des expériences menées. La solution ACSF a pour composition (en mM) : 126 NaCl, 26 NaHCO₃, 1.25 NaH₂PO₄, 2.5 KCl, 2 CaCl₂, 2 MgCl₂, 10 Glucose (pH=7,35 ± 0,05 à température ambiante et saturé en permanence par un mélange gazeux : 95 % O₂ et 5 % CO₂). La composition de ce milieu de stockage des tranches est proche de la composition du liquide céphalorachidien. L'ACSF est continuellement saturé par le même mélange gazeux que précédemment. Enfin, une fois les tranches obtenues, les enregistrements électrophysiologiques sont effectués au minimum une heure après la réalisation des coupes.

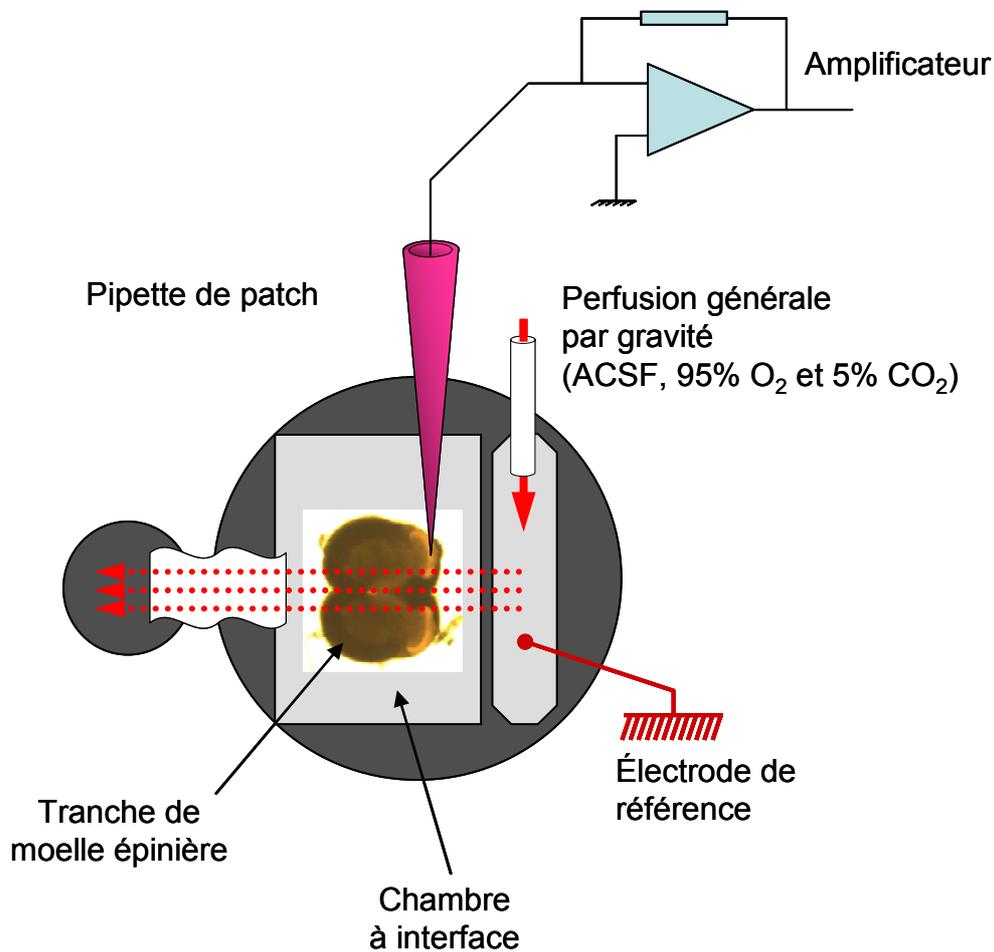


Figure 23 : Schéma de la chambre d'enregistrement

Ce schéma représente la chambre d'enregistrement utilisée pour enregistrer les neurone de la lamina II par la technique de "patch-clamp" en aveugle. La tranche de moelle épinière est positionnée de telle manière que les cornes dorsales sont en contact direct avec l'arrivée de la solution perfusée. Le niveau de liquide est réglé de telle façon que le ménisque solution soit au contact de la tranche.

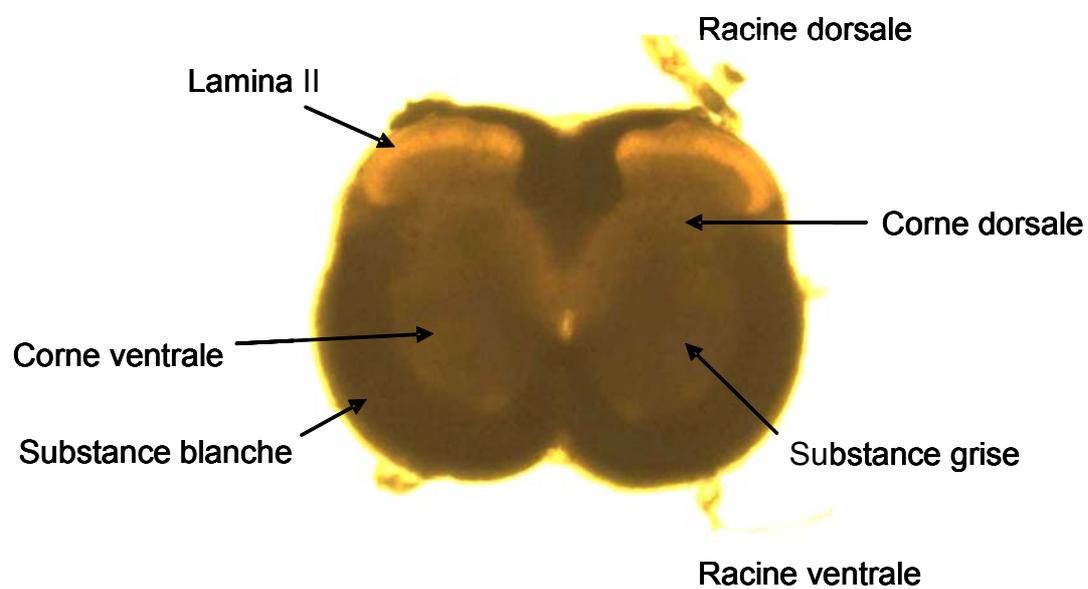


Figure 24 : Observation photographique d'une tranche transversale de moelle épinière en lumière transmise.

La lamina II apparaît comme un croissant translucide, aisément identifiable. C'est grâce à la réfringence importante de cette structure, qu'il nous est possible d'utiliser la technique de "patch-clamp" en aveugle sur cette structure.

1.5 Le montage expérimental et l'enregistrement électrophysiologique

a) Le montage expérimental

La figure 23 présente le montage expérimental utilisé pour enregistrer l'activité électrique des neurones par la technique de patch-clamp sur tranche aiguë de tissu nerveux (Stuart *et al.*, 1993). Nous avons fait des enregistrements en aveugle, c'est-à-dire, sans observer directement les neurones de la lamina II (Yoshimura et Nishi, 1993). L'ensemble des enregistrements a été réalisé à température ambiante (22-26°C). La chambre à interface est usinée dans un bloc de PVC (chlorure de poly-vinyle). La tranche de moelle épinière est maintenue par une « harpe » (fil de platine en « U » sur lequel sont fixés des fils de nylon). Cette chambre communique avec une pré-chambre où arrive la solution de perfusion. La tranche est continuellement perfusée par gravité avec de l'ACSF, additionné ou non de substances pharmacologiques, à raison de 3 ml/min. Le volume de solution entourant la tranche dans la chambre est de 0,5 ml. La tranche est observée à la loupe binoculaire (Leitz, Allemagne) à un grossissement de 1,6 (figure 24). La lamina II est visible aisément par réfringence lorsqu'elle est illuminée en lumière blanche. Cette propriété permet le positionnement de la pipette d'enregistrement.

b) L'enregistrement électrophysiologique

La technique de patch-clamp est basée sur la propriété qu'a une pipette de verre de former un contact de très forte résistance électrique (supérieure à $10^9 \Omega$) par apposition de la pointe de la pipette avec la membrane plasmique (Hamill *et al.*, 1981). Ainsi, des variations de courant au travers des membranes peuvent être observées du fait du mouvement de charges électriques au travers de pores protéiques (canaux ioniques).

Dans ce travail, les neurones ont été enregistrés en configuration « cellule entière ». Cette configuration est atteinte à partir de la configuration « cellule attachée » (où la pointe de la pipette d'enregistrement remplie de solution intrapipette est accolée à la membrane plasmique de la cellule), en créant par succion une dépression à l'intérieur de la pipette afin de déchirer la portion de membrane sous cette pipette. Le volume de la cellule étant très petit par rapport au volume de solution dans la pipette, la dialyse du milieu intracellulaire est obtenue en quelques minutes, permettant ainsi d'imposer des conditions connues de concentration et de composition du milieu intracellulaire. De plus, ceci permet de faire pénétrer à l'intérieur de la cellule un marqueur que l'on peut révéler *a posteriori*, comme la biocytine (voir ci-après).

Tableau 8 : Composition des différentes solutions intrapipettes utilisées.

Composés	K ₂ SO ₄	Cs ₂ SO ₄	KCl	CsCl	MgCl ₂	HEPES	Biocytine	E _{K⁺}	E _{Cl⁻}
Solution 1	80		8		2	10	10	-106	-60
Solution 2		80		8	2	10	10		-60
Solution 3				130	2	10	10		0

Les concentrations des différents composés sont exprimées en mM. Les solutions sont ajustées avec KOH (pour la solution à base de K⁺) ou avec CsOH (pour les solutions à base de Cs⁺), à un pH de 7,3. Les potentiels d'équilibres électrochimiques (E_{K⁺} et E_{Cl⁻}) sont exprimés en mV.

- Les pipettes d'enregistrement et la composition des milieux intrapipettes

Les pipettes utilisées lors de nos enregistrements sont obtenues par l'étirement de capillaires en borosilicate (diamètre externe de 1,2 mm ; diamètre interne de 0,69 mm avec un filament interne ; Harvard Apparatus, USA) par plusieurs chauffages successifs et calibrés à l'aide d'une étireuse à laser horizontale (P-2000, Sutter Instrument, USA). Lorsque les pipettes sont remplies de leur solution intrapipette et plongées dans la chambre à interface perfusée par la solution d'ACSF, la valeur de la résistance de ces pipettes est comprise entre 3,5 et 4,5 MΩ et le potentiel de jonction est compensé pour atteindre la valeur de 0 mV. Les pipettes sont montées sur un porte-électrode solidaire de la tête de l'amplificateur (CV 230 BU) reliée à un amplificateur (Axopatch 200 B, Axon Instrument, Foster City, USA), dont la fréquence de coupure du filtre passe-bas est ajustée à 5 kHz. La pipette de « patch » est positionnée verticalement au dessus de la zone d'intérêt. Puis elle est descendue progressivement au contact de la tranche à l'aide d'un micromanipulateur à crémaillère (Leitz, Allemagne). Quand la pipette est en contact avec la tranche, les cellules se trouvant à moins de 50 à 100 μm de la surface ne sont pas testées afin de s'assurer de la meilleure qualité d'enregistrement. En effet, plus la cellule est en profondeur, moins elle a subi de traumatisme lors de la coupe et l'arbre dendritique est mieux conservé. De plus, la quantité de cellules vivantes augmente avec la profondeur, la surface présentant beaucoup de débris et de cellules mortes (observables en microscopie optique).

Lors de ce travail, plusieurs compositions de solution intrapipette ont été utilisées. La configuration cellule entière du « patch-clamp » permet de contrôler la composition du milieu intracellulaire et à l'aide de la loi de Nernst, il nous est possible de fixer aisément le potentiel d'équilibre des espèces ioniques utilisées dans nos conditions d'enregistrements.

Les compositions des différents milieux intrapipettes utilisés sont résumées dans le tableau 8. Dans nos conditions expérimentales, nous avons fait le choix de ne pas introduire de calcium ni de maintenir sa concentration par l'ajout d'un chélateur (EGTA et BAPTA) dans la pipette. Nos expériences ont montré que la dialyse du Ca²⁺ intracellulaire n'influçait pas les propriétés membranaires des neurones, observées au cours du temps par l'enregistrement des profils de décharge en PA dès l'obtention de la configuration cellule entière. Il en est de même pour l'enregistrement des diverses transmissions synaptiques rapides (glutamatergiques, GABAergiques et glycinergiques). En l'absence d'application de modulateur exogène de ces transmissions synaptiques, aucun phénomène de « run-down » n'a pu être observé pendant l'enregistrement.

Lors de l'utilisation de la solution où $E_{Cl^-} = 0$ mV (solution 3, tableau 8), lorsque le potentiel membranaire est imposé à -60 mV, les courants synaptiques enregistrés sont orientés vers le bas et correspondent à une entrée de cations pour les courants postsynaptiques excitateurs et à une sortie d'anions pour les courants postsynaptiques inhibiteurs. Afin de pouvoir discriminer ces deux composantes, nous utiliserons leurs propriétés pharmacologiques différentes en ajoutant dans la solution extracellulaire des inhibiteurs spécifiques.

- La procédure d'enregistrement

Une pression positive est appliquée à l'intérieur de la pipette et le potentiel de jonction est compensé à 0 mV lorsque la pipette est au contact de la solution extracellulaire. Lorsque la pipette est au contact d'une cellule, la pression à l'intérieur de la pipette est relâchée pour se rééquilibrer avec la pression atmosphérique. Ceci crée une dépression collant la membrane de la cellule à la pipette permettant d'obtenir la configuration « cellule attachée ». Le potentiel dans la pipette est progressivement amené à -60 mV. La configuration cellule entière est obtenue en mode potentiel imposé où le potentiel membranaire est maintenu à -60 mV. Cette configuration est obtenue en effectuant de courtes dépressions dans la pipette afin de casser la membrane de la cellule sous la pointe de la pipette, établissant ainsi un contact électrique et un espace de diffusion entre l'intérieur de la pipette et de la cellule. Les résistances et capacités séries sont compensées. A ce stade, nous nous sommes assurés qu'un certain nombre de paramètres étaient stables au cours du temps et qu'ils étaient compris dans une gamme de valeur correcte afin de garantir une bonne qualité d'enregistrement et de l'intégrité de la cellule. Les neurones dont la résistance série est supérieure à 20 M Ω et dont le courant de fuite est supérieur à 50 pA sont écartés de l'analyse. De plus, ce courant de fuite doit être stable au cours du temps en condition contrôle. Lorsque l'on enregistre les neurones en mode courant imposé en n'injectant aucun courant dans la cellule, on observe la valeur de potentiel membranaire de repos. Toutes les cellules dont le potentiel membranaire de repos est supérieur à -45 mV sont elles aussi écartées de l'analyse. Celui-ci est obtenu en l'absence d'injection de courant en mode courant imposé. Dans ce mode, lorsqu'on stimule suffisamment le neurone afin qu'il génère des PA en condition contrôle, la valeur du potentiel membranaire au pic du PA doit dépasser 0 mV (« overshoot »). Aucun enregistrement, que ce soit en mode courant imposé ou en mode potentiel imposé n'est conservé si ces différents paramètres ne sont pas stables au cours du temps. Enfin, les valeurs de la résistance série, du

courant de fuite et du potentiel membranaire de repos sont régulièrement vérifiées au cours de l'enregistrement (sauf le potentiel de repos lorsqu'on utilise les solutions intrapipettes 2 et 3).

c) Stockage et acquisition des données

Les signaux électriques recueillis par l'électrode et acheminés jusqu'à l'amplificateur sont visualisés sur un oscilloscope (Tektronix 22AA). Les données brutes sont enregistrées après amplification et digitalisation (fréquence d'échantillonnage de 48 kHz,) sur cassette vidéo grâce à un magnétoscope. En parallèle, un enregistrement des données est réalisé sur un ordinateur à l'aide du logiciel d'acquisition pClamp 6.0.2. (Axon Instrument, Foster City, USA). Le module Clampex est utilisé pour enregistrer, mais aussi pour stimuler électriquement le neurone soit en mode potentiel imposé (enregistrements de conductances ioniques), soit en mode courant imposé (enregistrements des profils de décharge en PA) grâce aux protocoles de stimulation décrits ci-dessous. Le module Fetchex permet de faire une acquisition des courants postsynaptiques recueillis par l'électrode en temps réel. Avant l'acquisition des données sur l'ordinateur, celles-ci sont numérisées par l'intermédiaire d'une interface analogique/numérique (Digidata 1200, Axon Instrument, Foster City, USA). Les données sont échantillonnées à une fréquence de 13 kHz pour les enregistrements réalisés en mode courant imposé et à 10 kHz pour les enregistrements effectués en mode potentiel imposé.

1.6 Les protocoles expérimentaux et l'analyse des enregistrements électrophysiologiques

Lors de ce travail les deux modes du « patch-clamp » ont été utilisés pour l'enregistrement de l'activité électrique des neurones de la lamina II : le mode courant imposé et le mode potentiel imposé.

a) Les protocoles de stimulation en mode courant imposé et l'analyse des données

Comme nous le verrons dans la partie Résultats, nous avons étudié les propriétés membranaires des neurones de la lamina II obtenues en mode courant imposé. Après avoir vérifié la stabilité du potentiel membranaire de repos, une injection continue (de 0 à ± 150 pA) de courant est appliquée afin d'ajuster le potentiel de membrane à la valeur de -60 mV. Nous avons ensuite injecté par la pipette des créneaux de courant d'une durée de 900 ms dont l'amplitude est comprise entre -80 et +200 pA avec un incrément de 10 pA. Les stimulations

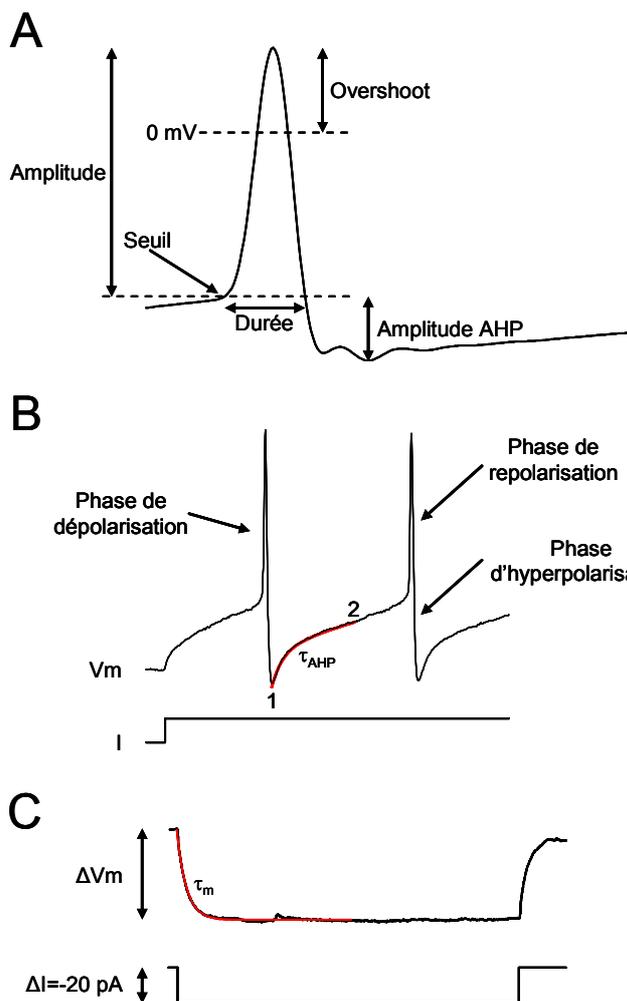


Figure 25 : Les différents paramètres des propriétés membranaires des neurones observés.

A : Les paramètres concernant les propriétés membranaires actives sont précisés sur le potentiel d'action (PA). L'amplitude est obtenue à partir du seuil de déclenchement du PA. L'"overshoot" est mesuré de 0 mV à la pointe du PA. La durée du PA est obtenue comme le temps où le potentiel membranaire est supérieur au seuil de déclenchement du PA. L'amplitude de l'AHP est la variation maximale de potentiel membranaire mesurée entre le seuil et la phase d'hyperpolarisation.

B : La cinétique de l'AHP (τ_{AHP}) est obtenue par l'ajustement d'une fonction exponentielle (trace rouge) entre la valeur minimale du potentiel membranaire lors de l'hyperpolarisation (1) et la phase de repolarisation membranaire (2) précédant le deuxième PA.

C : Les propriétés membranaires passives ont été obtenues pour une variation de potentiel membranaire induite par un saut de courant de -20 pA à partir d'un potentiel membranaire ajusté à -60 mV. L'amplitude de la variation de potentiel enregistrée permet de déduire la valeur de la résistance membranaire R_m à l'aide de la loi d'Ohm ($\Delta V_m = R_m \cdot \Delta I$). L'ajustement d'une fonction monoexponentielle sur le déroulement de la variation de potentiel membranaire (rouge) permet de déduire la constante de temps membranaire (τ_m).

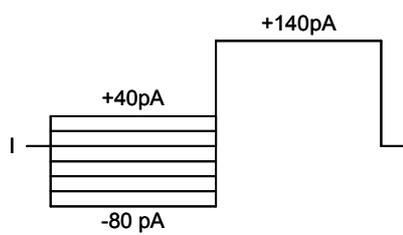


Figure 26 : Protocole de conditionnement du potentiel membranaire en mode courant imposé.

En mode courant imposé, à partir d'un potentiel membranaire ajusté à -60 mV, un créneau de courant d'amplitude comprise entre -80 et +40 pA (incrément de 20 pA, durée 250 ms) est appliqué à la membrane. Celui-ci est suivi par un saut de courant test de +140 pA d'une durée de 250 ms afin d'observer l'état d'inactivation des conductances ioniques sur l'excitabilité des neurones.

sont séparées de 20 secondes afin de retrouver un potentiel de membrane stable et aussi afin d'éviter tout phénomène d'accumulation du calcium dans le cytosol, lors des dépolarisations soutenues.

Les traces obtenues permettent d'étudier les différents paramètres membranaires passifs et actifs des neurones de la lamina II décrits dans la figure 25 C. Les paramètres passifs sont mesurés par l'analyse de la trace obtenue pour un créneau de courant de -20 pA. La résistance membranaire (R_m en $M\Omega$) est déduite de la loi d'Ohm¹ (figure 25 C). La constante de temps membranaire (τ_m en ms) est obtenue par l'ajustement d'une fonction monoexponentielle² au décours du potentiel membranaire pendant le créneau de courant hyperpolarisant. La capacité membranaire (C_m en pF) est déduite de la relation suivante :

$$\tau_m = R_m \cdot C_m$$

Les paramètres actifs pris en compte sont les suivants (figure 25 A et B) :

le seuil de déclenchement du PA (mV), l'amplitude du PA (mV), l'« overshoot » (mV), la durée du PA (ms), l'amplitude de l'AHP (mV), la cinétique de l'AHP et le courant dépolarisant minimum supraliminaire (Iseuil en pA).

Un protocole de conditionnement de la membrane des neurones enregistrés a été effectué de la manière suivante pour observer les effets du potentiel membranaire sur les propriétés membranaires et le profil de décharge en PA (figure 26). Le potentiel membranaire est ajusté à -60 mV. Transitoirement, des créneaux de courant conditionnants d'une durée de 250 ms (de -80 à +40 pA avec un incrément de 20 pA) précèdent un créneau test de +140 pA d'une durée de 250 ms.

b) Les protocoles de stimulation en mode potentiel imposé et l'analyse des données

Il est possible d'enregistrer deux types de courant K^+ dépendant du potentiel au niveau de la membrane des neurones de la lamina II : la conductance K^+ retardée et rectifiante ($I_{K_{DR}}$), la conductance K^+ transitoire (I_A) ; et le courant de fuite. Il est possible de distinguer ces deux conductances K^+ par leurs propriétés électrophysiologiques différentes. En effet, le courant I_A

¹ Expression de la loi d'Ohm :

$$\Delta V_m = R_m \cdot \Delta I$$

où ΔV_m est la variation de potentiel membranaire suite au créneau de courant appliquée à la membrane (mV) ; R_m est la résistance membranaire ($M\Omega$) ; ΔI est le créneau de courant de -20 pA appliqué.

² Expression de la fonction monoexponentielle :

$$V_m(t) = V_m(0) + \Delta V_{m_{max}} \cdot (1 - e^{-t/\tau_m})$$

Où, $V_m(t)$ est la valeur du potentiel membranaire à l'instant t considéré (mV) ; $\Delta V_{m_{max}}$ est l'amplitude de variation maximale du potentiel membranaire (mV) ; t est le temps à l'instant considéré (ms) ; τ_m est la constante de temps membranaire (ms).

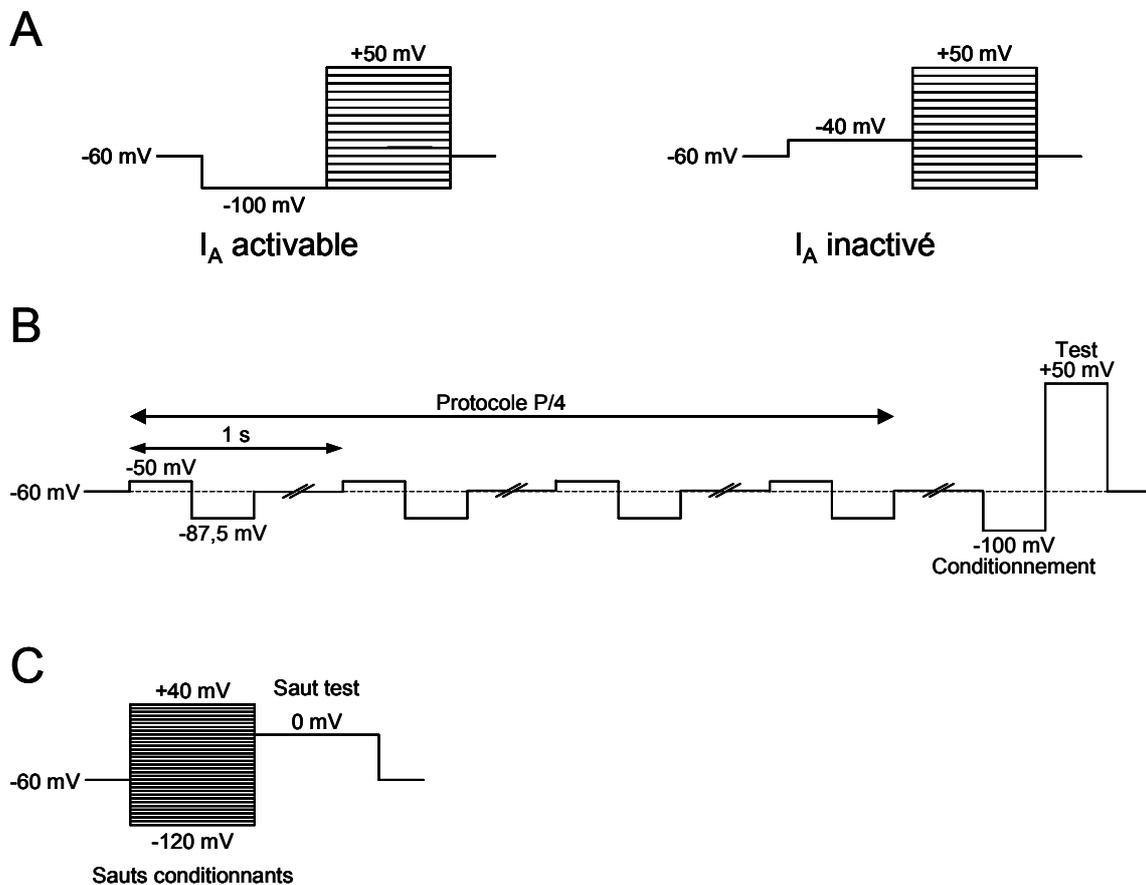


Figure 27 : Protocoles de stimulation utilisés pour l'enregistrement des courants potassium en mode potentiel imposé.

A : Les deux protocoles de stimulation électrique sont successivement appliqués à la membrane du neurone. Le potentiel de membrane imposé à -60 mV est transitoirement amené à -100 ou -40 mV afin de conditionner la membrane (durée 250 ms) pour rendre le courant I_A activable ou inactivé, respectivement. Puis on applique le saut de potentiel test, dont l'amplitude est comprise entre -100 et $+50$ mV (incréments de 10 mV, durée de 250 ms).

B : Le courant de fuite est éliminé du courant enregistré à l'aide d'un protocole de stimulation appelé P/4 précédant le protocole cité en A. Des sauts de potentiel, dont le décours est opposé au saut conditionnant et de test, sont appliqués à la membrane. Cette opération est répétée quatre fois et l'amplitude des variations de potentiel membranaire représente le quart des variations de potentiel du saut conditionnant et de test. Les cycles sont espacés de 500 ms.

C : Le protocole d'inactivation à l'état stable consiste à conditionner le potentiel membranaire au préalable (amplitude de -120 à $+40$ mV, incrément de 5 mV, durée 250 ms) à partir d'une potentiel imposé de -60 mV. L'état d'inactivation du courant enregistré est testé pour une valeur de potentiel membranaire de 0 mV pendant 250 ms. Dans ce cas-ci, le courant de fuite est éliminé de la trace de courant enregistré par un protocole P/4.

présente des propriétés d'inactivation qui dépendent du potentiel membranaire. Il est complètement inactivé pour des valeurs de potentiel membranaire supérieures à -40 mV. Cependant, pour enregistrer ces courants K^+ , il est nécessaire de les isoler pharmacologiquement du courant Na^+ dépendant du potentiel membranaire en ajoutant dans la solution d'enregistrement de la tétrotoxine. A partir d'un potentiel membranaire de -60 mV, le potentiel membranaire est imposé durant 250 ms à -100 mV. Ce créneau de courant conditionnant précède l'ensemble des sauts tests. Ceux-ci ont une durée de 250 ms et leur amplitude est comprise entre -100 et +50 mV et l'incrément est de 10 mV. Les stimulations tests sont espacées de 5 sec. Ce protocole de stimulation permet d'enregistrer le courant K^+ total (figure 27 A, gauche).

Lors de ces stimulations électriques, le courant enregistré est constitué par le courant K^+ activé par les variations de potentiel membranaire et par le courant de fuite, dont l'amplitude varie linéairement avec l'intensité de la stimulation. Ce courant de fuite est soustrait au courant total grâce à un protocole P/4 décrit dans la figure 27 B. Ici, des sauts de potentiel d'une durée identique à l'impulsion conditionnement-test sont effectués. L'amplitude de ces sauts est égale au quart et opposées à l'impulsion conditionnement-test. Ces sauts sont appliqués 4 fois de suite à la membrane avant l'impulsion conditionnement-test. Les moyennes des amplitudes des quatre sauts sont effectuées puis cette moyenne est multipliée par quatre et soustraite à l'amplitude de l'impulsion conditionnement-test.

Un autre protocole est appliqué à la membrane du neurone. A la différence du précédent, le potentiel membranaire est amené à -40 mV pour inactiver le courant I_A lors du saut de potentiel conditionnant (figure 27 A, droite). Ainsi, seule la composante IK_{DR} est enregistrée. A partir des courants obtenus, il sera possible de construire la courbe issue de la relation courant/potentiel membranaire (courbe I/V) et la courbe d'activation du courant IK_{DR} . De nouveau, le courant de fuite est soustrait par un protocole P/4.

Le courant I_A est obtenu *a posteriori* en faisant une soustraction des traces de courant obtenues lorsque le potentiel membranaire est conditionné à -40 mV aux traces obtenues lorsque le potentiel membranaire est conditionné à -100 mV grâce au module d'analyse Clampfit 9.0 du logiciel pClamp 9.0 (Axon Instrument, Foster City, USA). Les courbes I/V et d'activation sont construites à partir des traces du courant I_A .

Enfin, un dernier protocole de stimulation électrique a été effectué sur les neurones de la lamina II afin d'étudier la dépendance des propriétés d'inactivation des courants K^+ vis-à-vis du potentiel imposé à la membrane du neurone (figure 27 C). Il correspond à un protocole classique de double stimulation. A partir d'un potentiel membranaire imposé à -60 mV, le

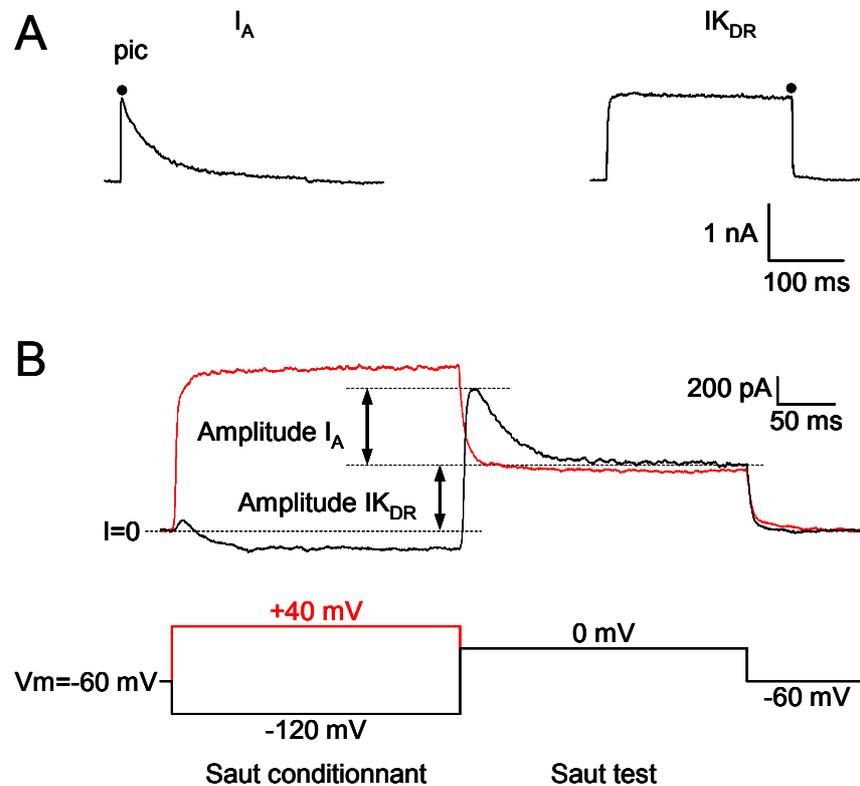


Figure 28 : Méthode d'isolement et d'analyse des courants potassium dépendant du potentiel.

A : A partir des protocoles de stimulation décrits dans la figure 5 (A et B), les courants I_A et $I_{K_{DR}}$ sont obtenus isolés. La mesure de l'amplitude maximale (●) au pic pour I_A et à la fin du plateau pour $I_{K_{DR}}$ permet de construire a posteriori la courbe I/V et la courbe d'activation de ces courants.

B : Le protocole de double stimulation décrit dans la figure 5 (C) permet de construire la courbe d'inactivation à l'état stable des courants I_A et $I_{K_{DR}}$. Lors de ce protocole de stimulation, les deux courants sont enregistrés simultanément. Les amplitudes des deux courants sont relevées lors du saut de potentiel test, de telle manière que l'amplitude de I_A correspond à celle mesurée entre le pic de courant et la fin du plateau, alors que l'amplitude de $I_{K_{DR}}$ correspond à celle obtenue entre $I=0$ pA et la valeur maximale du plateau de courant. Ici, sont illustrées les traces de courants obtenues pour les valeurs de saut de potentiel conditionnant les plus amples (-120 mV en noir et $+40$ mV en rouge). On remarque que pour un saut conditionnant hyperpolarisant, les deux types de courants K^+ sont présents, alors que, lorsque le saut conditionnant est très dépolarisé, seul $I_{K_{DR}}$ persiste et I_A est complètement inactivé.

premier saut de potentiel est un saut conditionnant dont l'amplitude varie de -120 à +40 mV avec une incrémentation de 5 mV et une durée de 250 ms. Ce créneau conditionnant est suivi par un créneau test où le potentiel membranaire est amené à 0 mV pendant 250 ms. Ici aussi, le courant de fuite est éliminé de l'enregistrement par un protocole de type P/4. Ce protocole permet de construire la courbe d'inactivation à l'état stable¹ des courants $I_{K_{DR}}$ et I_A en fonction de potentiel membranaire appliqué lors du saut conditionnant.

A partir des traces de courant K^+ obtenues par ces protocoles de stimulation, il est possible d'établir :

- La courbe I/V qui correspond à la valeur maximale de courant obtenue en fonction du potentiel membranaire imposé. Ainsi, le courant maximum est mesuré au pic du courant I_A et à la fin du saut test pour $I_{K_{DR}}$ (figure 28 A).
- La courbe d'activation (G_{K^+}/G_{K^+max}) en fonction du potentiel membranaire imposé est obtenue, quant à elle, à partir de la relation suivante²:

$$I_{K^+} = G_{K^+} \cdot (E_m - E_{K^+})$$

où G_{K^+} est ensuite normalisé par rapport à la valeur maximale (G_{K^+max}) de la conductance. La courbe d'activation peut être ajustée en utilisant l'équation simplifiée de Boltzmann³.

- La courbe d'inactivation à l'état stable :

Comme le montre la figure 28 B, l'amplitude de I_A est mesurée entre le pic et la fin du plateau obtenu lors du saut de potentiel test et l'amplitude de $I_{K_{DR}}$ est mesurée entre $I=0$ pA et la fin du plateau lors de ce même saut. Ici, les deux courants K^+ ne sont pas séparés. On mesure les amplitudes de I_A et $I_{K_{DR}}$ en fonction de la valeur du potentiel membranaire conditionnant pour construire la courbe d'inactivation à l'état stable. Le protocole de stimulation employé pour obtenir la courbe d'inactivation à l'état stable, décrit précédemment, utilise des créneaux

¹ L'état stable : correspond au maintien du potentiel imposé suffisamment longtemps pour que l'ensemble des canaux ioniques étudiés soient dans un même état d'inactivation. L'obtention de cet état est nécessaire pour décrire le rapport canaux activables/canaux inactivés pour chaque potentiel de la courbe d'inactivation. Cet état est obtenu lors du saut de potentiel conditionnant dont la valeur varie, précédant le saut de potentiel test de valeur fixe.

² I_{K^+} : courant transmembranaire mesuré pour la valeur de potentiel considérée (pA) ; G_{K^+} : conductance globale du courant potassium pour la valeur de potentiel considérée (pS) ; E_m : potentiel membranaire imposé (mV) ; E_{K^+} : potentiel d'équilibre électrochimique du potassium (mV).

³ Expression de l'équation simplifiée de Boltzmann :

$$G/G_{max} = 1 / \{1 + \exp[(E_m - E_{0,5})/k]\}$$

G : conductance ionique associée aux canaux, au potentiel membranaire imposé considéré (pS) ; G_{max} : conductance ionique maximale (pS) ; $E_{0,5}$: valeur du potentiel membranaire pour lequel la moitié des canaux ioniques est activée (mV) ; k : représente la dépendance de l'ouverture des canaux par rapport au changement de potentiel, décrit dans la littérature comme étant la "constante de pente" (mV).

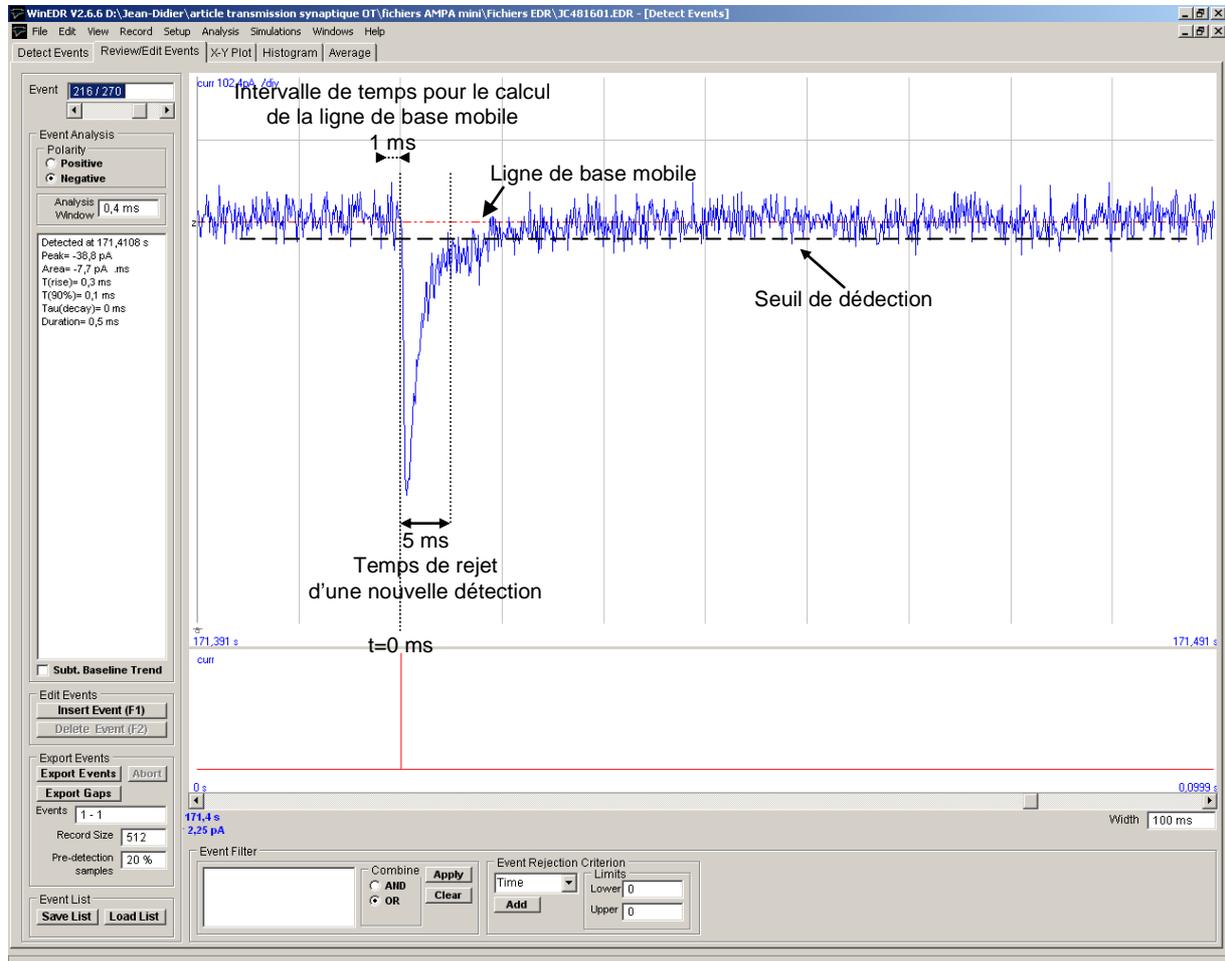


Figure 29 : Principe de la détection des événements synaptiques par le logiciel WinEDR.

Capture d'écran du logiciel WinEDR utilisé pour la détection des courants synaptiques. Sur cette fenêtre est représenté un courant synaptique miniaturé médié par le récepteur AMPA. Afin de minimiser la détection d'artéfacts, le logiciel est paramétré de la manière suivante. Le seuil de détection est fixé à $-2,5$ pA et toute déflexion du courant enregistré dépassant cette ligne virtuelle sera considéré comme un événement synaptique si le temps du dépassement du seuil est supérieur à 1 ms. La ligne de base mobile est calculée comme étant la moyenne des valeurs du courant sur la milliseconde précédente, ce qui permet de fixer $t=0$ ms et de calculer l'amplitude du courant. Enfin, à partir de $t=0$, 5 ms seront nécessaires pour réarmer la détection d'un nouvel événement synaptique.

de potentiel conditionnant allant de -120 à +40 mV. L'amplitude de I_A est maximale pendant le saut de potentiel test lorsque le saut conditionnant est de -120 mV, alors que $I_{K_{DR}}$ semble peu affecté par la valeur du potentiel membranaire lors du saut conditionnant. Ainsi, les amplitudes des courants mesurées pour chaque valeur de potentiel membranaire conditionnant seront normalisées par rapport au courant observé pour un saut de potentiel conditionnant de -120 mV. La courbe d'inactivation à l'état stable ($I_{K^+}/I_{K^+_{max}}$) peut elle aussi être ajustée par l'équation simplifiée de Boltzmann. Les valeurs d'amplitude des courants mesurés ont été obtenues en utilisant le module d'analyse Clampfit du logiciel pClamp 9.0 (Axon Instrument, Foster City, USA).

c) L'enregistrement des courants postsynaptiques et l'analyse des données

Les courants postsynaptiques excitateurs et inhibiteurs ont été enregistrés en mode potentiel imposé à partir d'un potentiel membranaire constant de -60 ou 0 mV en fonction des conditions expérimentales. La détection des événements synaptiques et l'analyse cinétique a été effectuée en utilisant les logiciels WinEDR 2.4.9 et WinWCP 3.5.2 (Strathclyde Electrophysiology Software développés par Dr John Dempster, Université de Strathclyde, Glasgow, Royaume-Uni). La détection automatique des événements synaptiques nécessite un paramétrage du logiciel WinEDR de telle manière que l'on minimise la détection d'événements non synaptiques. Ainsi, comme le montre la figure 29, le seuil de détection est fixé à une valeur de -2,5 pA en dessous de la ligne de base. Toute variation du courant en dessous de ce seuil et d'une durée supérieure à 1 ms sera considérée comme un événement synaptique. Le calcul de la ligne de base est effectué pendant la milliseconde précédant le début de l'événement détecté et correspond à la valeur moyenne du courant pendant cette milliseconde. Cette ligne de base est mobile car recalculée pour chaque événement détecté. Enfin, à partir du début de l'événement détecté ($t=0$), aucune nouvelle détection ne pourra être faite si le temps entre deux événements est inférieur à 5 ms. L'ensemble de ces paramètres permet ainsi de détecter les événements synaptiques qui sortent du bruit de fond. Ces événements synaptiques sont systématiquement réexaminés manuellement avant d'être retenus pour l'analyse finale. En effet, des artéfacts peuvent être présents et doivent être éliminés et, dans certains cas, $t=0$ est mal positionné et doit être recalé.

A partir de cette détection, quatre paramètres ont été utilisés afin d'étudier les différentes transmissions synaptiques rencontrées dans notre préparation. La fréquence d'apparition des événements synaptiques (en Hz) est obtenue directement à partir des événements détectés. L'amplitude (en pA), le temps au pic (en ms) et la constante de temps de désactivation (τ_D)

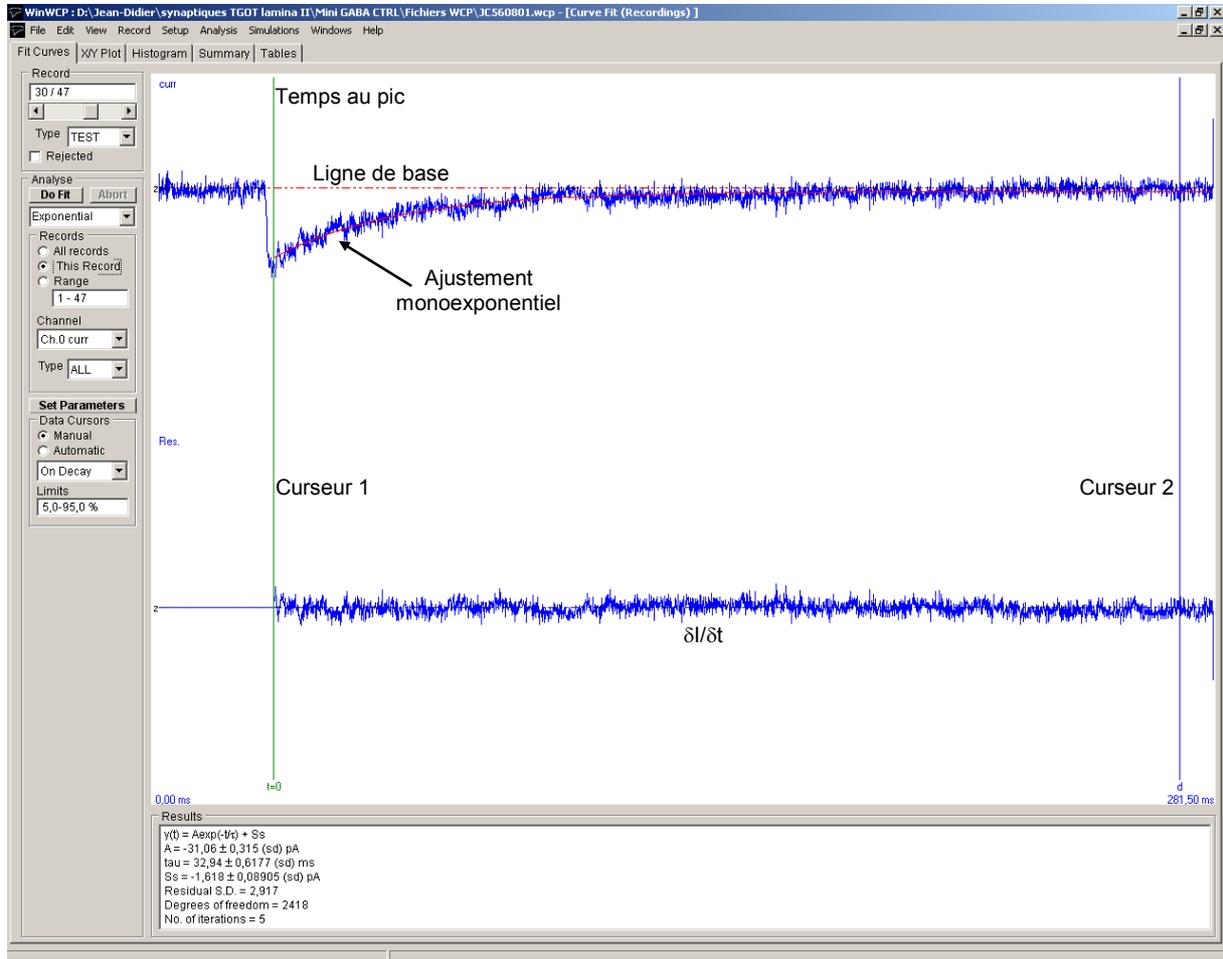


Figure 30 : Principe de l'ajustement d'une fonction monoexponentielle sur la phase de déactivation d'un courant synaptique par le logiciel WinWCP.

Capture d'écran du logiciel WinWCP utilisé pour l'ajustement d'une fonction monoexponentielle sur la phase de déactivation du courant synaptique. A partir du pic du courant (curseur vert, $t=0$) défini manuellement, un deuxième curseur (bleu) est positionné de telle manière que lorsque l'on réalise l'ajustement, le décours de celui-ci se confonde au mieux avec le courant synaptique et qu'en fin de fenêtre, l'ajustement rejoigne la ligne de base. La trace du bas ($\delta I / \delta t$) représente la dérivée en fonction du temps de l'écart entre la valeur du courant mesuré point par point et sa valeur idéalisée par l'ajustement monoexponentielle. Une bonne linéarité de cette trace permet de valider un bon ajustement de la fonction monoexponentielle.

en ms) sont obtenus à partir d'événements synaptiques isolés. Le temps au pic est mesuré comme le temps entre $t=0$ et l'amplitude maximale. La phase de désactivation des courants synaptiques peut être ajustée automatiquement par une fonction monoexponentielle¹ à l'aide du logiciel Win WCP (figure 30). Cette constante de temps est calculée sur 5-95 % de l'amplitude totale de l'événement synaptique. Un réexamen de l'ensemble des ajustements est réalisé afin de s'assurer que l'ajustement de τ_D est correct, sinon il est fait manuellement.

1.7 La préparation et l'application des substances pharmacologiques

a) Le blocage des récepteurs ionotropiques impliqués dans une transmission synaptique rapide

Dans un certain nombre d'expériences, les transmissions synaptiques rapides ont été bloquées par l'ajout dans la solution d'enregistrement extracellulaire d'antagonistes des récepteurs ionotropiques. Ces substances sont appliquées pendant 5 minutes de manière à obtenir une concentration stable et une inhibition totale avant tout enregistrement. Ainsi, la transmission synaptique rapide glutamatergique médiée par les récepteurs ionotropiques du glutamate a été bloquée par l'application d'acide kynurénique (2 mM), un antagoniste à large spectre des récepteurs AMPA, kaïnate et NMDA du glutamate. Le CNQX (10 μ M) a été utilisé pour inhiber plus spécifiquement la transmission synaptique médiée par le récepteur AMPA. Les transmissions synaptiques inhibitrices médiées par le récepteur de la glycine et le récepteur GABA_A ont été bloquées respectivement par la strychnine (1 μ M) et la bicuculline (10 μ M).

b) Le blocage des canaux ioniques dépendants du potentiel membranaire

Les canaux Na⁺ dépendants du potentiel membranaire ont été spécifiquement bloqués par la perfusion constante de tétrodotoxine (TTX ; 0,5 μ M). Les conductances K⁺ dépendantes du potentiel membranaire ont, quant à elles, été inhibées par l'ajout dans la solution d'enregistrement de tétraéthylammonium (TEA ; 10 mM) pour la composante maintenue et de 4-aminopyridine pour la composante transitoire. La 4-AP a été perfusé à raison de 2 mM pour

¹ Expression de la fonction monoexponentielle :

$$I(t) = \Delta I_{\max} \cdot e^{(-t/\tau_D)}$$

Où, $I(t)$ est la valeur du potentiel membranaire à l'instant t considéré (pA) ; ΔI_{\max} est l'amplitude maximale du potentiel membranaire (pA) ; t est le temps à l'instant considéré (ms) ; τ_D est la constante de temps de désactivation (ms).

Tableau 9 : Composition des milieux extracellulaires de stockage des tranches lors de traitements chroniques.

Nom du milieu	ACSF	TGOT (100 nM)	TTX (0,5 μ M)	dOVT (1 μ M)	PK (10 μ M)	FIN (50 μ M)	Durée minimale d'incubation
CTRL	x						3h
TGOT	x	x					3h
TGOT+TTX	x	x	x				3h
TGOT+dOVT	x	x		x			3h
TGOT+PK+FIN	x	x			x	x	3h
Préincubation				1h	3h	3h	

La durée d'incubation représente le temps minimum avant l'enregistrement. Dans certains cas, les tranches sont préincubées avec des antagonistes pendant la durée indiquée, avant d'être incubées en présence de TGOT.

PK : PK11195 ; FIN : finastéride

Tableau 10 : Solvant, concentration et températures de conservation des substances pharmacologiques utilisées.

Composés	Solvant de dilution	Concentration stock	Concentration finale	Température de conservation (°C)
Bicuculline	eau distillée	10 mM	10 µM	-21
Strychnine	eau distillée	1 mM	1 µM	-21
TTX	eau distillée (pH 4,5 ajusté avec acide acétique 1M)	1 mM	0,5 µM	-21
CNQX	DMSO	10 mM	10 µM	+4
Acide kynurénique	solution d'enregistrement		2 mM	
OT	eau distillée additionnée d'acide acétique (1M ; 0,25 % v/v)	1 ; 0,1 et 0,01 mM	1 ; 0,1 et 0,01 µM	-21
TGOT	Idem	1 mM	1 µM	-21
dOVT	Idem	1 mM	1 µM	-21
PK11195	éthanol absolu	10 mM	10 µM	+4
Finastéride	Idem	50 mM	50 µM	+4
TEA	solution d'enregistrement		10 mM	
4-AP	eau distillée acidifiée par HCl (voir texte)	0,5 M	2 et 0,5 mM	+4
λ-carragénine	NaCl 9 ‰		3 % p/v	+4

bloquer complètement les canaux K^+ transitoires lors d'enregistrement en mode potentiel imposé et à raison de 0,5 mM afin d'observer le blocage de ces canaux sur le profil de décharge en PA en mode courant imposé.

c) Le traitement chronique des tranches de moelle épinière

Les neurostéroïdes réduits en position 3 et 5 α sont de puissants modulateurs allostériques du récepteur $GABA_A$. Dans ce travail, nous avons fait des expériences utilisant un traitement chronique des tranches de moelle épinière afin d'observer une éventuelle modulation de la production médullaire des neurostéroïdes en utilisant comme détecteur le récepteur $GABA_A$. Les conditions et les temps d'incubation sont résumés dans le tableau 9. Des enregistrements de neurones incubés pendant 3 h minimum dans de l'ACSF, nous ont servi de contrôle. Un agoniste spécifique du récepteur OT (TGOT, 100 nM) et un antagoniste spécifique de ce même récepteur (dOVT, 1 μ M) ont été additionnés au milieu d'incubation durant 3 heures au minimum. Enfin, des bloquants de la neurostéroïdogenèse ont été utilisés avant un traitement chronique par TGOT. Ceux-ci sont le finastéride (50 μ M ; inhibiteur de la 5 α -réductase, une enzyme intervenant dans la synthèse des modulateurs stéroïdiens du récepteur $GABA_A$) ; et le PK11195 (10 μ M ; inhibiteur du récepteur périphérique des benzodiazépines (PBR) qui réalise la translocation du cholestérol -précurseur des stéroïdes- dans la mitochondrie).

d) La préparation des substances pharmacologiques

A l'exception de la TTX et de la 4-AP, la plupart des substances pharmacologiques sont préparées sous forme de solutions stocks 1000 fois concentrées par rapport à la concentration finale souhaitée. Les solvants, les concentrations et les températures de conservation utilisés pour la préparation et la conservation de ces substances sont résumés dans le tableau 10. Les différentes substances utilisées dans cette études sont : la bicuculline et la strychnine (Sigma, Saint-Louis, Mo, USA) ; la TTX (Latoxan, Rosans, France) ; le 6-cyano-7-nitroquinoxaline-2,3-dione (CNQX) ; l'acide kynurénique (Fluka, Buchs, Suisse) ; l'ocytocine (Sigma, Saint-Louis, MO, USA) ; l'agoniste spécifique du récepteur OT : [Thr⁴,Gly⁷]-ocytocine ou TGOT (Sigma, Saint-Louis, Mo, USA) ; l'antagoniste du récepteur OT : d(CH₂)₅-[Tyr(Me)²,Thr⁴,Orn⁸,des-Gly-NH₂⁹]-vasotocin ou dOVT (Bachem, Germany) ; le PK11195 ou le 1-(2-Chlorophenyl)-N-méthyl-N-(1-méthylpropyl)-3-isoquinolinecarboxamide (Tocris, Bioblock, Illkirch, France) ; le finastéride ou le N-(1,1-diméthyléthyl)-3-oxo-4-aza-5 alpha-androst-1-ène-17 bêta-carboxamide (finastéride ; Roche, Bâle, Suisse) ; TEA (Fluka, Buchs, Switzerland) ; la 4-AP (Sigma, Saint-Louis, MO, USA).

La préparation de la 4-AP nécessite une dilution préalable dans un milieu très acide constitué par HCl (7,8 M) avant dilution dans de l'eau distillée pour obtenir une concentration finale de 0,5 M de 4-AP.

La substance utilisée dans cette étude pour induire une inflammation périphérique est de la λ -carragénine (Sigma, Saint-Louis, MO, USA) diluée dans une solution de NaCl 9 ‰ stérile et préparée 24 h avant l'injection intraplantaire.

2. L'enregistrement *in vivo* des neurones de la lamina II par la technique d'enregistrement extracellulaire

Les expériences *in vivo* présentées dans ce travail ont été réalisées en collaboration avec le groupe du Dr Miguel Condés-Lara (Instituto de Neurobiología, Universidad Nacional Autónoma de México, Campus UNAM-Juriquilla, Querétaro, Mexico). La méthode est décrite brièvement dans ce manuscrit, cependant des informations complémentaires peuvent être obtenues dans les articles suivants : Condés-Lara *et al.* (2003; 2006).

2.1. Les animaux utilisés

Les animaux utilisés pour réaliser ces expériences *in vivo* sont des rats mâles adultes de souche Wistar (poids de 280 à 300 g). Ils sont placés individuellement dans une cage où la nourriture et l'eau sont fournies à volonté. Les animaux sont soumis à un cycle jour-nuit de 12 h pour chacune de ces périodes.

2.2. L'anesthésie et la procédure de dissection

Les rats sont anesthésiés à l'aide d'un mélange gazeux à base d'halothane 3 %, de N₂O 65 % et d'O₂ 32 % dans une boîte hermétique. Une fois l'animal endormi, une trachéotomie est pratiquée permettant à l'animal d'être ventilé artificiellement par un mélange gazeux dont la composition est précisée ci-après.

L'animal endormi profondément est placé dans un cadre stéréotaxique. La boîte crânienne est mise à jour en ouvrant le plan cutané et deux électrodes sont mises en place pour

enregistrer l'électroencéphalogramme afin de suivre l'état de sommeil du rat. De plus, une ouverture est pratiquée dans la boîte crânienne pour placer une électrode de stimulation électrique bipolaire dans le noyau paraventriculaire (NPV) de l'hypothalamus aux coordonnées stéréotaxiques suivantes (en se référant au Bregma) : antéro-postériorité 7,12 mm ; latéralité 0,45 mm et profondeur 2 mm (Paxinos et Watson, 1998).

La colonne vertébrale est maintenue stable à l'aide de pinces de part et d'autre de la zone d'intérêt. La moelle épinière est mise à jour au niveau des vertèbres L3-L4 par laminectomie. Le rythme cardiaque est suivi par l'enregistrement de l'électrocardiogramme et la température corporelle est régulée (38-39 °C) tout au long de l'expérience grâce à une couverture chauffante. Une fois la préparation de l'animal terminée, le taux d'halothane inhalé par l'animal est réduit à 1,5 % et les proportions des autres gaz sont : 1/3 O₂ et 2/3 N₂O. La quantité de CO₂ expirée (environ 1,5 %) est suivie continuellement afin de s'assurer que le taux de CO₂ sanguin soit constant durant toute l'expérience.

2.3. L'enregistrement électrophysiologique et les procédures expérimentales

Une micropipette en verre étirée par chauffage est remplie de solution de KCl 1 M additionnée d'un colorant vital, le bleu ciel de pontamine (3 % p/v). Cette électrode est placée dans la corne dorsale ipsilatérale à l'électrode de stimulation du NPV. Sa résistance est comprise entre 8 et 10 MΩ. L'électrode d'enregistrement est couplée à trois pipettes d'application par pression afin de perfuser localement différentes substances pharmacologiques. Ces pipettes sont montées sur la pipette d'enregistrement manuellement. Leur pointe est à une distance de 5 à 10 μm de la pointe de la pipette d'enregistrement et leur diamètre interne est de 3 à 5 μm. L'application des substances est effectuée par l'intermédiaire d'une picopompe (PV830, WPI) reliée aux pipettes d'application, permettant d'ajuster la durée et la pression de l'application.

L'activité électrique recueillie par la pipette d'enregistrement est amplifiée, numérisée et acquise par le logiciel Spike 2 (Cambridge Electronic Design Limited, Cambridge, Royaume-Uni). Lorsque l'activité électrique du neurone de la moelle épinière enregistrée est stable et que le champ récepteur de la patte postérieure ipsilatérale est déterminé, deux électrodes de stimulation sont placées sur ce champ récepteur afin de stimuler les fibres sensorielles primaires qui activent le neurone enregistré (durée de la stimulation : 1 ms ; fréquence de stimulation 0,5 Hz). L'amplitude de la stimulation électrique de la patte est

augmentée progressivement jusqu'à l'activation des fibres C. A partir de cette valeur de stimulation, une stimulation identique, égale à trois fois le seuil d'activation des fibres C est utilisée pour la suite des expériences.

L'électrode bipolaire placée dans le NPV permet de le stimuler électriquement par des créneaux de courant d'une durée de 1 ms, à une fréquence de 60 Hz, pendant 6 s.

A la fin de l'enregistrement, le neurone enregistré est marqué en laissant diffuser par iontophorèse du bleu ciel de pontamine dans la cellule. Un courant cathodique de 10 à 15 μA est appliqué dans la pipette pendant 25 min. La position de la pointe de la pipette est marquée par lésion électrolytique en appliquant un courant de 100 μA pendant 10 s. Par la suite, l'animal est perfusé à l'aide d'un milieu de fixation tissulaire. Des sections congelées des tissus cérébraux et médullaires sont effectuées afin de vérifier le bon emplacement de l'électrode de stimulation dans le NPV et celui de la pipette d'enregistrement dans la lamina II de la moelle épinière.

3. Le modèle d'animaux inflammatoires : inflammation périphérique induite par la λ -carragénine

Certaines expériences ont utilisé un modèle animal de douleur inflammatoire périphérique. Ici, cette inflammation périphérique a été obtenue par l'injection intraplantaire de λ -carragénine (Sigma, Saint-Louis, Mo, USA). Cette substance appartenant à la famille des carragénanes est extraite d'une algue appelée « mousse d'Irlande » que l'on a trouvée initialement à proximité du village de Carrageen. Les carragénanes sont des polysaccharides sulfatés qui sont utilisés comme gélifiant dans l'industrie agroalimentaire. Lorsque la λ -carragénine est injectée en sous-cutané, elle déclenche l'activation du complément, initiant ainsi le début de la réponse immunitaire et inflammatoire.

La λ -carragénine est diluée dans une solution saline stérile de NaCl à 9 % afin d'obtenir une solution concentrée à 3 mg pour 100 μl . L'injection est réalisée en sous-cutané au niveau de la voûte plantaire de la patte postérieure de l'animal grâce à une aiguille de 26 gauge. Pendant cette procédure, l'animal est anesthésié par l'inhalation d'halothane (3 %) diffusé par un mélange gazeux constitué par du protoxyde d'azote (48,5 %) et de l' O_2 (48,5 %). Après le réveil de l'animal, on s'assure qu'il ne présente pas de troubles moteurs et on le replace dans l'animalerie. En parallèle, un groupe d'animaux reçoit une injection intraplantaire du véhicule

Tableau 11: Composition du milieu de fixation « Zamboni »

Composé	Volume (ml)	Concentration
Formaldéhyde	50	37 % v/v
Tampon phosphate	500	0,2 M
Acide picrique	150	0,06 M
Eau de Volvic	qsp 1 l	

Le tableau donne le volume et les concentrations des différents composés nécessaires pour obtenir 1 l de milieu de fixation.

Tableau 12 : Composition du tampon phosphate 0,2 M

Composé	Volume (ml)	Concentration
$\text{NaH}_2\text{PO}_4, \text{H}_2\text{O}$	195	27,602 (g/l)
$\text{Na}_2\text{HPO}_4, 12 \text{H}_2\text{O}$	305	71,6 (g/l)
Eau de Volvic	qsp 1 l	

Le tableau donne le volume et les concentrations des différents composés nécessaires pour obtenir 1 l de tampon phosphate.

seul afin de constituer le groupe contrôle. Le volume injecté dans la patte arrière est de 150 μ l pour des animaux adultes (>250 g) et de 75 μ l pour les animaux de moins de 30 jours postnataux. Dans le cadre de l'étude de ce modèle inflammatoire par la technique de « patch-clamp » et pour les dosages radio-immunologiques d'OT, l'injection intraplantaire est bilatérale dans les pattes postérieures, alors que, dans le cadre de l'étude de ce modèle inflammatoire par un test de sensibilité mécanique, une injection unilatérale dans la patte postérieure droite est pratiquée.

4. L'immunocytochimie et la révélation de la biocytine à la suite des expériences de « patch-clamp »

Le contenu intracellulaire des neurones enregistrés *in vitro* par la technique de « patch-clamp » est dialysé par la solution intrapipette contenant de la biocytine (10 μ M ; Sigma, Saint-Louis, Mo, USA). Lorsque la durée de l'enregistrement est suffisante pour permettre une diffusion de ce marqueur vital dans l'arbre dendritique (>20 min), la tranche est ensuite fixée à la fin de l'expérience dans un milieu fixateur, appelé Zamboni (voir le tableau 11 pour la composition) et conservée à 4°C jusqu'à la révélation. Celle-ci nécessite une première étape de quatre rinçages successifs de la tranche avec du tampon phosphate/Volvic (PBS ; voir tableau 12). Elle est ensuite incubée pendant 12 heures en présence du marqueur fluorescent, mélangé avec un diluant pour microscope (PBS, triton x100, merthiolate 0,5 % v/v ; Sigma, Saint Louis, Mo, USA). Le marqueur utilisé est l'isothiocyanate de fluorescéine (FITC, à la dilution finale de 1/400) conjugué à l'extravidine (Sigma, Saint Louis, Mo, USA). La tranche est enfin montée entre lame et lamelle (milieu de montage Vectashield), pour une observation au microscope à fluorescence (DMRD, Leica, Suisse). Les neurones ainsi révélés peuvent être enregistrés sous forme d'images numériques au moyen de la caméra (CoolSnap) montée sur le microscope et du logiciel CoolSnap version 1.2 (Roper Scientific, USA).

5. Le dosage radio-immunologique de l'ocytocine dans la moelle épinière

Les dosages radio-immunologiques ont été réalisés sur des rats mâles adultes (âgés de 3 à 5 mois) de souches Sprague-Dawley et Wistar pour le groupe d'animaux contrôle et Sprague-Dawley uniquement pour les deux autres groupes d'animaux, à savoir les groupes Salin et

Carragénine. Aucune différence n'a pu être observée entre les deux souches d'animaux utilisées dans les conditions contrôles. Le groupe Salin comprend des animaux pour lesquels on a pratiqué une injection bilatérale intraplantaire de solution saline stérile de NaCl 9 ‰ et le groupe Carragénine est constitué d'animaux pour lesquels une injection bilatérale intraplantaire de λ -carragénine 3 % est pratiquée dans la voûte plantaire. Après anesthésie par injection intrapéritonéale d'Imalgène 1000, le prélèvement de la moelle épinière du rat est effectué par pression hydraulique (voir paragraphe 1.3. plus haut). Des tronçons de 1 mm d'épaisseur sont obtenus à l'aide d'un « tissue chopper » (Mc Ilwain, Royaume-Uni) puis placés dans 60 μ l de HCl à 0,1 N. Les tranches de moelle épinière sont broyées aux ultra-sons (30 s environ) et l'homogénat obtenu est centrifugé 15 min à 12000 tours/min. Le dosage d'OT est effectué sur une fraction aliquote de 5 μ l. L'ensemble des manipulations est réalisé sur glace fondante.

Le principe du dosage repose sur la compétition entre l'OT endogène non marquée et l'OT marquée à l'iode 125 (OT-I¹²⁵) pour un anticorps spécifique anti-OT. L'ocytocine marquée est obtenue au laboratoire par réaction d'oxydoréduction entre l'OT et l'iode 125, catalysée par la chloramine T. Le produit est purifié par chromatographie liquide à haute pression (HPLC). L'anticorps anti-OT est un anticorps α -16 obtenu au laboratoire chez le lapin. Pour plus de précision sur la procédure de la préparation de l'OT-I¹²⁵, voir les articles de Elands *et al.* (1988) et de Stoeckel et Freund-Mercier (1989) pour les modifications.

A chaque échantillon, on ajoute un mélange anticorps anti-OT et OT-I¹²⁵ tel que anti-OT lie 50 % de OT-I¹²⁵. Le peptide endogène non marqué va déplacer le peptide marqué par la loi d'action de masse. L'incubation est effectuée dans un tampon barbital (barbital de sodium 0,05 M ; pH= 8,6 ; sérumalbumine 2,5 g/l ; merthiolate de sodium 0,02 %) pendant 6 jours à 4°C. Une fois l'équilibre atteint, le complexe peptide-anticorps est séparé du peptide libre, en adsorbant ce dernier sur du charbon (12,5 ‰)-dextran (T70 ; 2,5 ‰). Après centrifugation (4000 tours/min pendant 20 min), le surnageant contenant l'OT liée à l'anticorps est éliminé et la radioactivité de l'OT libre fixée sur le charbon est mesurée à l'aide d'un compteur γ (Packard). Le contenu en OT est évalué par rapport à une gamme étalon établie avec des quantités connues d'OT non marquée (de 1 à 256 pg ; Sigma, Saint Louis, Mo, USA). Le compteur est programmé de manière à calculer automatiquement la concentration en OT des échantillons.

6. L'évaluation de l'hyperalgie mécanique et la procédure d'injection intrathécale d'agoniste et antagoniste du récepteur de l'ocytocine

6.1. La procédure d'évaluation de l'hyperalgie mécanique

L'évaluation du seuil de sensibilité nociceptive utilise classiquement des tests comme celui du retrait de la queue (« tail flick »), de la plaque chaude (« hot plate »), de « Hargraves », et de von Frey. Dans notre étude, nous avons utilisé un test de mesure de l'hyperalgie mécanique dont le protocole d'utilisation a été mis au point et validé dans le laboratoire (Luis-Delgado *et al.*, 2006). Ce test utilise des pinces calibrées dont la pression exercée sur la patte arrière de l'animal est mesurée par un appareillage numérique développé et fourni par la société BIOSEB (France).

Les expériences ont été réalisées sur des rats mâles adultes (250-300 g ; Janvier, Le Genest Saint Isle, France) de souche Sprague-Dawley. Les animaux (au nombre de trois par cage) sont nourris et reçoivent de l'eau à volonté et sont maintenus à température constante de 22°C ; le cycle jour/nuit est de 12 heures pour chaque période. Après leur entrée dans l'animalerie, les animaux connaissent une période d'habituation d'une semaine dans la salle expérimentale, de façon à limiter au maximum les effets dûs au stress. Les animaux sont pesés chaque matin avant la réalisation des premiers tests journaliers.

Lors du test, le rat est placé sur un plan de travail et il est légèrement maintenu en utilisant un tissu pour masquer ses yeux, afin de limiter l'influence des stimulations environnementales. Les pointes de la pince sont placées sur les faces dorsales et ventrales de la patte postérieure de l'animal et l'expérimentateur positionne de manière identique la pince par rapport à la patte à chaque essai. La force appliquée manuellement sur la pince est augmentée progressivement à une vitesse approximative de 200 g toutes les trois secondes jusqu'au retrait de la patte. La mesure est recueillie par un dynamomètre à affichage numérique qui permet de suivre la pression appliquée en temps réel et d'enregistrer la valeur maximale appliquée lors du retrait de la patte. Les mesures sont répétées trois fois par patte arrière et par animal pour chaque session de tests afin de déterminer la moyenne des trois essais.

Avant la réalisation des tests expérimentaux, les animaux sont habitués à être manipulés et à être testés avec la pince durant cinq jours, avec une mesure réalisée le matin et une l'après-midi. Les valeurs seuils de l'hyperalgie mécanique sont relevées à chaque fois afin d'observer

la stabilisation des mesures pour chacun des animaux. Dans nos conditions expérimentales, cette phase d'habituation est obtenue en trois jours.

Ce test mécanique a été effectué sur des animaux chez lesquels on a induit une inflammation périphérique par une injection de λ -carragénine 3 % dans la patte droite (150 μ l). Le suivi du développement du phénotype inflammatoire est réalisé par la mesure de l'hyperalgie 1, 3, 5, 7, 12 et 24 h après l'injection de la substance inflammatoire. A partir de cette dernière mesure, les animaux sont séparés en trois groupes à l'intérieur desquels les animaux ont un poids similaire. Chacun des groupes d'animaux reçoit par la suite une injection intrathécale de solution stérile (solution saline, dOVT, TGOT) et les mesures d'hyperalgie mécanique sont répétées : 1, 3, 5, 7, 12, 24, 36 h et 2, 5 et 9 jours après l'injection intrathécale.

6.2. La procédure d'injection intrathécale

L'injection intrathécale effectuée dans nos expériences utilise la méthode décrite par De la Calle et Paino (2002) et Mestre *et al.* (1994). L'animal est rasé sur sa face dorsale entre le milieu du dos et la base de la queue, 12 heures avant l'injection intrathécale afin de limiter le stress avant la mesure du seuil d'hyperalgie. Le rat est anesthésié par inhalation d'halothane à 3 % comme indiqué plus haut (paragraphe 3.). Une fois le rat profondément endormi, le taux d'halothane dans le mélange gazeux est abaissé à 1,5 % jusqu'à la fin de l'injection. La vertèbre L7 est repérée au toucher grâce à la présence d'un processus épineux plus proéminent que sur les autres vertèbres lombaires. Ceci permet de repérer l'espace intervertébral L4-L5 où sera effectuée l'injection. L'injection est réalisée à l'aide d'une seringue Hamilton surmontée d'une aiguille de 26 gauges. La pointe de l'aiguille est placée en face de l'espace intervertébral d'intérêt, puis, l'aiguille est délicatement guidée dans cet espace jusqu'à l'obtention du réflexe moteur de la queue. Ce réflexe, qui est caractérisé par un mouvement de débattement brusque de la queue de l'animal, permet de préciser que la pointe de l'aiguille a atteint l'espace sous-arachnoïdien, lieu d'injection des substances pharmacologiques. Un volume stérile de 10 μ l est injecté dans cet espace. Les animaux sont séparés en trois groupes : injection de solution stérile saline NaCl 9 %, injection de TGOT (10 ng dans NaCl 9 %) et injection de dOVT (10 ng dans NaCl 9 %). Le réveil de l'animal est surveillé pour contrôler la récupération motrice, puis il est replacé dans la pièce de stockage et de test.

Des expériences utilisant l'injection intrathécale de bleu de méthyle (colorant vital) ont permis de confirmer post-mortem l'exactitude du site d'injection, de visualiser la zone de diffusion du colorant dans le tissu, ainsi que le long de la moelle épinière, et de vérifier l'absence de lésion tissulaire (n=4).

7. L'analyse statistique

Les résultats obtenus sont exprimés en moyenne \pm l'erreur-type. L'analyse statistique des différences entre les groupes a été effectuée en utilisant différents tests statistiques précisés ci-dessous. Le seuil de significativité a été fixé à 0,05. Les barres d'erreur des graphiques illustrés dans la section Résultats représentent l'erreur-type.

Résultats

Partie I :

Propriétés électrophysiologiques des
neurones de la lamina II et modulation de
leur excitabilité par l'ocytocine

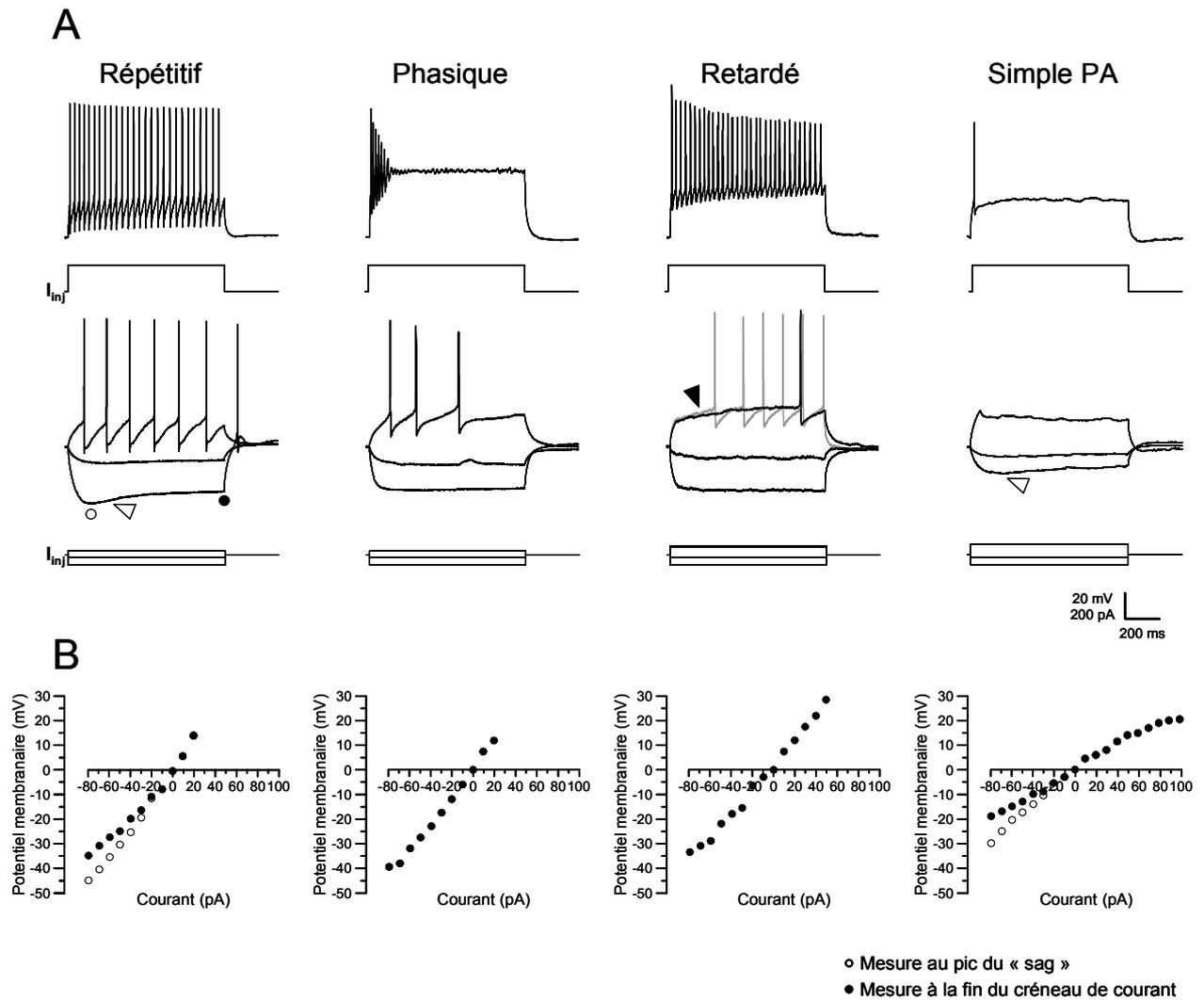


Figure 31 : Les quatre familles de profils de décharge en PA rencontrées dans la lamina II.

A : Les quatre profils de décharge en PA de neurones représentatifs enregistrés dans la lamina II sont figurés à partir de quatre ou cinq créneaux de courant. Quatre créneaux de courants (I_{inj}) représentatifs pour chacun des profils sont figurés. A gauche, le profil *répétitif* se caractérise par une décharge tonique de PA tout au long de la stimulation supraliminaire. Le profil *phasique* montre une bouffée de PA suivie d'une phase silencieuse malgré le maintien de la dépolarisation. Les neurones appartenant au profil de type *retardé* présentent une phase silencieuse, dont la durée diminue avec l'intensité de la stimulation (flèche noire), avant l'apparition d'une bouffée de PA. Enfin, le profil de type *simple PA* se caractérise par l'apparition d'un ou deux PA avant l'établissement d'une phase silencieuse jusqu'à la fin de la stimulation. Pour des stimulations hyperpolarisantes, certains neurones présentent un décours particulier du potentiel membranaire appelée « sag » (flèches blanches) dépendante à la fois du temps et de l'intensité de l'injection de courant hyperpolarisant.

B : Les courbes potentiel membranaire/intensité de courant représentatives de chacun des profils ci-dessus. Les points représentent les valeurs de potentiel pour des créneaux de courant infraliminaires. Les valeurs de potentiel membranaire ont été obtenues à la fin du créneau de courant (●) et à l'amplitude maximale du « sag » (○) pour des stimulations infraliminaires. Le potentiel membranaire de maintien est ajusté à -60 mV. Des injections de courant d'une durée de 900 ms de -80 à +200 pA (incrémentés de 10 pA) sont appliquées à la membrane des neurones enregistrés.

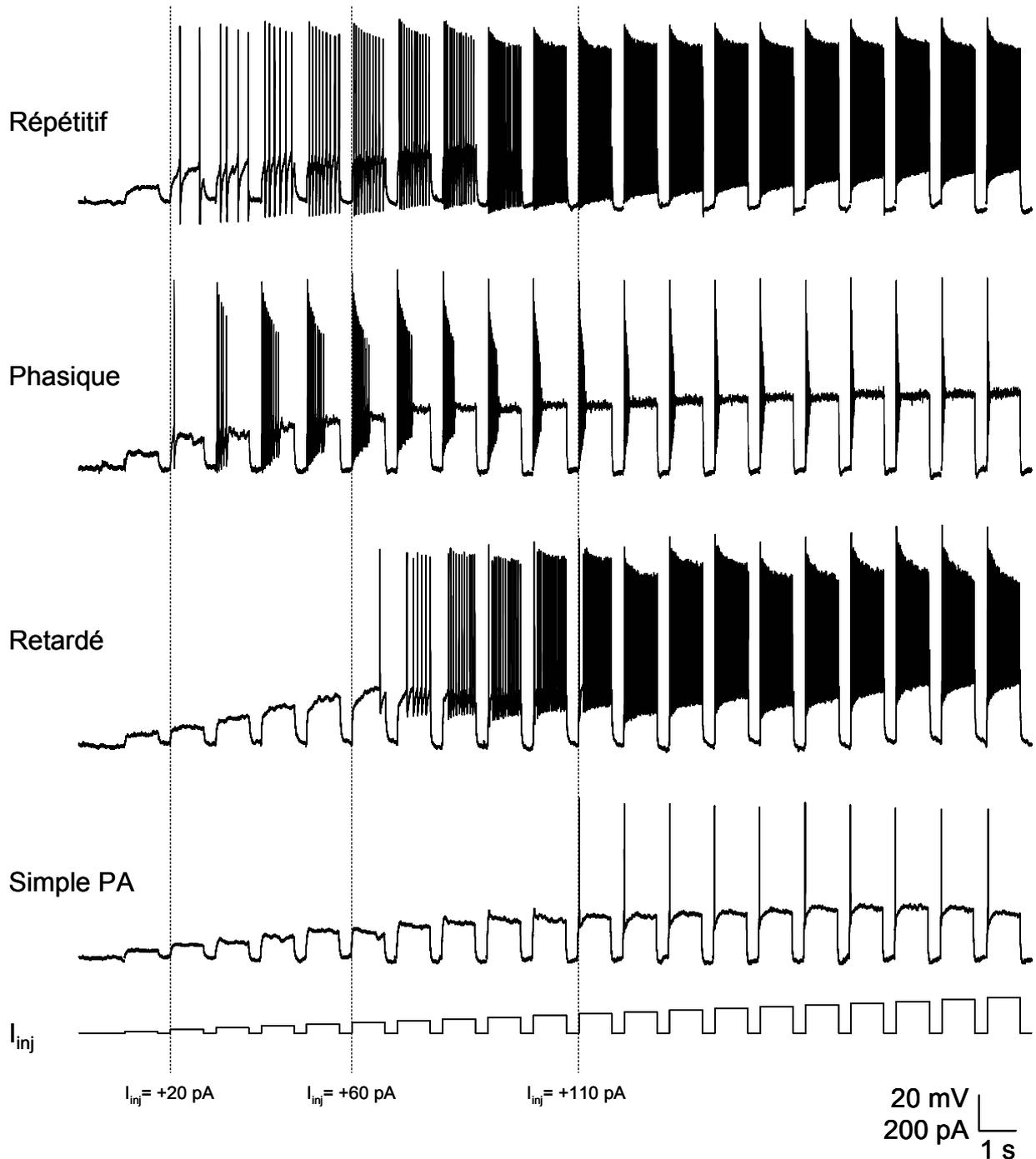


Figure 32 : Représentation des profils de décharge en PA en fonction du créneau de courant imposé.

De haut en bas sont illustrés les profils de décharge *répétitif*, *phasique*, *retardé* et *simple PA* de quatre neurones représentatifs enregistrés à partir d'un potentiel membranaire ajusté à -60 mV. Les réponses des neurones à des stimulations de 0 à +200 pA (incrément de 10 pA) sont illustrées successivement. Chaque dépolarisation dure 900 ms et 20 s séparent deux stimulations. Afin de faciliter l'illustration, les réponses des neurones ont été juxtaposées. Les profils *répétitifs* et *phasiques* correspondent aux cellules les plus excitables ($I_{inj} = +20$ pA) à la différence du profil de type *simple PA* qui nécessite des stimulations plus importantes afin d'observer l'apparition d'un PA ($I_{inj} = +110$ pA).

I. Caractérisation des propriétés membranaires des neurones de la lamina II

La caractérisation des propriétés membranaires des neurones de la lamina II a été effectuée dans la configuration cellule entière du « patch-clamp » en mode courant imposé afin d'observer les variations du potentiel membranaire dues à des injections de courant au travers de la membrane plasmique. Dans ces expériences, la solution intrapipette 1 ($E_{Cl} = -60$ mV) a été utilisée (tableau 8, Matériels et Méthodes). A partir d'un potentiel membranaire ajusté à -60 mV, des créneaux de courant d'une durée de 900 ms, de -80 à +200 pA (incrément de 10 pA) ont été effectués afin de déterminer les propriétés membranaires actives et passives sur 82 neurones issus de rats âgés de 15 à 30 jours postnataux.

1. Profil de décharge en potentiel d'action

Une des manières de caractériser les neurones de la lamina II, du point de vue fonctionnel, est d'observer le profil de décharge en PA des neurones enregistrés lors de stimulations dépolarisantes supraliminaire.

Les neurones de la lamina II montrent une diversité fonctionnelle qui se caractérise par l'observation de quatre grandes familles stéréotypées de profils de décharge en PA (figures 31 et 32). Le premier type de profil de décharge en PA appelé type *répétitif* représente 34 % (n=28) des neurones enregistrés. Il se caractérise par une décharge continue de PA tout le long de la durée des stimulations supraliminaire. Il est à noter que le nombre de PA généré augmente en fonction de l'intensité de la stimulation électrique. Le deuxième profil de décharge en PA appelé profil *phasique* se caractérise par l'apparition d'une bouffée de PA suivie d'une phase silencieuse qui se prolonge jusqu'à la fin de la stimulation dépolarisante. Ce type de profil représente 31 % (n=25) des neurones enregistrés dans notre structure. Il est à noter qu'en fonction de la stimulation électrique, le nombre de PA tend à augmenter (12 ± 3 PA équivalent à une fréquence de $13,3 \pm 3,3$ Hz au pic pour une stimulation de 900 ms) puis à diminuer progressivement pour observer seulement 4 à 5 PA (soit une fréquence d'environ 5 Hz) lors de stimulations supérieures à +160 pA (figure 33 B). Le profil de décharge *retardé* concerne 22 % (n=18) des neurones enregistrés dans la lamina II. Il présente une phase silencieuse avant l'apparition d'une ou plusieurs bouffées de PA jusqu'à la fin de la stimulation dépolarisante. Durant la phase silencieuse, la membrane se dépolarise lentement

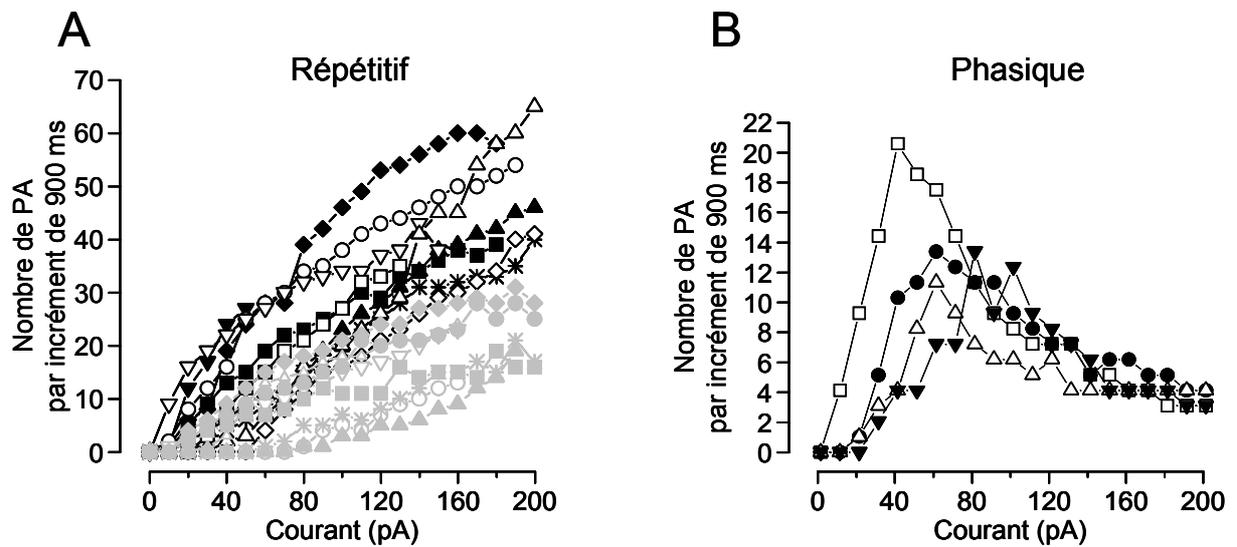


Figure 33 : Diversité fonctionnelle des neurones présentant un profil de décharge *répétitif* et *phasique*.

A : Les neurones ayant un profil de décharge *répétitif* présentent des fréquences de décharge variables d'un neurone à l'autre. Le nombre de PA généré en fonction de l'intensité du courant augmente de manière quasi linéaire dans la gamme de stimulations appliquées au neurone. La stimulation minimale supraliminaire se situe dans une gamme allant de +10 à +70 pA.

B : Evolution du nombre de PA en fonction de l'intensité de la stimulation appliquée aux neurones de type *phasique*. Pour chacun des neurones enregistrés, le nombre de PA tend à augmenter avec l'intensité de la stimulation pour atteindre un pic pour des créneaux de courant de +40 à +80 pA. Au-delà de ce pic, le nombre de PA généré est environ de 4 à 5 PA pour des créneaux de courant supérieurs à +160 pA.

Chaque symbole correspond à un neurone différent.

jusqu'à atteindre le seuil de déclenchement du PA. La durée de cette phase dépend de l'intensité de la stimulation électrique : elle tend à disparaître progressivement avec l'augmentation de cette stimulation. Enfin, le quatrième type de profil de décharge est appelé *simple PA*. Des stimulations supraliminaires ne permettent d'obtenir qu'un voire deux PA malgré le maintien de la dépolarisation. Nous avons observé ce profil de décharge en PA dans 13 % (n=11) des neurones enregistrés.

La qualité des enregistrements et la classification de ces neurones en quatre familles distinctes ont été vérifiées en réalisant successivement pendant plus d'une heure d'enregistrement le protocole de stimulation. En effet, au cours du temps, la configuration cellule entière peut provoquer, par la dialyse du milieu intracellulaire, le phénomène de « run-down ». Celui-ci peut être à la base de modifications des propriétés membranaires par dilution du calcium intracellulaire par exemple. Ainsi, pendant plus d'une heure, les neurones testés n'ont pas présenté de modifications du profil de décharge en PA, ni des propriétés membranaire passives et actives, en réponse à des stimulations hyperpolarisantes et dépolarisantes.

Cependant, cette classification, acceptée depuis plusieurs années, ne rend pas totalement compte de la diversité fonctionnelle des neurones de la lamina II (figure 33). Les neurones de type *répétitif* ont une fréquence de décharge en PA variable d'un neurone à l'autre (16 à 73 PA soit une fréquence de 17,7 à 81,1 Hz enregistrée pour un créneau de +200 pA et d'une durée de 900 ms). Quand on prend en compte le nombre de PA observés par créneau de courant (figure 33 A), la répartition des neurones n'est pas homogène. Il est à noter que la fréquence de décharge en PA augmente de manière linéaire avec l'intensité du créneau de courant injecté, sans présenter de phase plateau pour des créneaux de courant inférieurs à +200 pA. Les neurones répondant par un profil *phasique* se subdivisent en deux sous-groupes. Ici, ce sont les premiers sauts de courant qui permettent de mettre en évidence les différences dans ce groupe. En effet, certains neurones (16 %, n=4/25) présentent une décharge tonique avec les propriétés d'adaptation de fréquence de décharge en PA. Mais la grande majorité des neurones (84 %, n=21/25) montrent un profil *phasique* pour tous les courants supraliminaires. Enfin, les neurones de type *retardé* peuvent aussi être divisés en trois sous-groupes. Ils présentent tous la phase silencieuse avant l'apparition des premiers PA pour des stimulations suffisantes. Cependant, on peut observer une bouffée de PA tonique (22 %, n=4/18), une décharge phasique (28 %, n=5/18) ou une décharge tonique irrégulière par bouffées de PA séparées par de courtes phases silencieuses (50 %, n=9/18).

Tableau 13 : Propriétés membranaires passives et actives des neurones de la lamina II

Propriétés membranaires passives					Propriétés membranaires actives					
	n	τ_m (ms)	R_m (M Ω)	C_m (pF)	V_m repos (mV)	Seuil (mV)	I_{seuil} (pA)	Overshoot (mV)	Amplitude (mV)	Durée (ms)
Répétitif (Rp)	29	45,4 ± 6,0 *S	609 ± 62	109,3 ± 23,7	-59,4 ± 1,7	-36,0 ± 1,5	38,0 ± 6,4 *Rt, **S	38,1 ± 2,3 *Rt, ***S	74,1 ± 2,9 **Rt, **S	2,5 ± 0,2 **Rt, ***P
Retardé (Rt)	17	42,1 ± 3,1 **S	926 ± 101 *S	46,9 ± 7,1	-60,9 ± 2,5	-30,4 ± 2,0	62,7 ± 7,5 *Rp, **P	27,2 ± 2,6 *Rp, *S	57,3 ± 3,2 **Rp	3,5 ± 0,2 **Rp
Phasique (P)	24	36,1 ± 4,7	761 ± 92	55,6 ± 7,6	-59,3 ± 1,7	-36,8 ± 1,3	30,6 ± 4,2 **Rt	32,9 ± 3,0 **S	69,7 ± 3,1 *S	3,7 ± 0,2 ***Rp
Simple PA (S)	11	20,1 ± 4,6 *Rp, **Rt	462 ± 95 *Rt	50,8 ± 9,9	-60,5 ± 3,3	-37,4 ± 2,6	110,8 ± 17,3 **Rp	16,1 ± 2,7 ***Rp, *Rt, **P	51,7 ± 3,4 **Rp, *P	3,4 ± 0,3

Les valeurs sont exprimées comme étant la moyenne ± l'erreur-type. Les différences statistiques significatives sont décrites comme étant $p < 0,05$ (*), $p < 0,01$ (**), $p < 0,001$ (***) en utilisant le test non-paramétrique de Steel-Dwass. n, nombre d'observations ; τ_m , constante de temps membranaire ; C_m , capacité membranaire ; R_m , résistance membranaire ; V_m repos, potentiel membranaire de repos ; I_{seuil} , courant minimum nécessaire pour observer le premier PA ; Overshoot, amplitude maximale du potentiel membranaire au-dessus de 0 mV durant le PA ; Amplitude, amplitude du PA mesurée entre le seuil et la pointe du PA ; Durée, durée du PA mesurée au niveau du seuil de déclenchement du PA. Pour V_m repos, les mesures sont réalisées pour $I = 0$ pA, les autres mesures sont effectuées pour un créneau de courant liminaire à un potentiel membranaire ajusté à -60 mV.

2. Propriétés membranaires des neurones de la lamina II

A partir de cette classification fonctionnelle des neurones de la lamina II basée sur le profil de décharge en PA résultant de stimulations électriques soutenues, il nous a été possible de décrire les propriétés membranaires actives et passives des neurones enregistrés dans chaque famille.

2.1. Les caractéristiques du potentiel d'action

Les propriétés actives des neurones correspondent aux paramètres décrivant les variations du potentiel de membrane résultant de la modification de la conductance des canaux ioniques transitoires ou non qui, elle, dépend à la fois du potentiel membranaire et du temps. Les paramètres considérés, pour chacun des neurones enregistrés, ont été obtenus en prenant en compte le premier PA généré obtenu pour une injection de courant liminaire. Ce que l'on peut déduire des résultats obtenus, résumés dans le tableau 13, est que les neurones de type *répétitif* et de type *phasique* sont des cellules beaucoup plus excitables (voir figure 32). En effet, le créneau de courant dépolarisant minimum nécessaire pour générer les premiers PA est beaucoup plus faible ($R_p : 38,0 \pm 6,4 \text{ pA}$; $P : 30,6 \pm 4,2$) que pour les autres types ($R_t : 62,7 \pm 7,5 \text{ pA}$; $S : 110,8 \pm 17,3 \text{ pA}$). De plus, les neurones de type *répétitif* présentent un PA dont l'amplitude est plus importante ($74,1 \pm 2,9 \text{ mV}$) et une durée du PA plus courte ($2,5 \pm 0,2 \text{ ms}$) que dans le cas des autres profils. Enfin, malgré l'absence de différence significative entre les différents profils pour le seuil de déclenchement des PA, il s'avère que le type *retardé* présente une valeur seuil plus dépolarisée ($-30,4 \pm 2,0 \text{ mV}$) que les autres types (valeurs moyennes comprises entre $-37,4$ et $-36,0 \text{ mV}$). Ceci est le résultat de la lente dépolarisation de la phase silencieuse qui précède les premiers PA.

2.2. Cinétique de l'AHP des neurones de la lamina II

La phase de dépolarisation membranaire qui suit la phase d'hyperpolarisation est appelée « AHP » (« after hyperpolarization phase »). Cette phase peut être considérée comme une « relaxation » du potentiel de membrane, dont l'amplitude et la cinétique favoriseront à

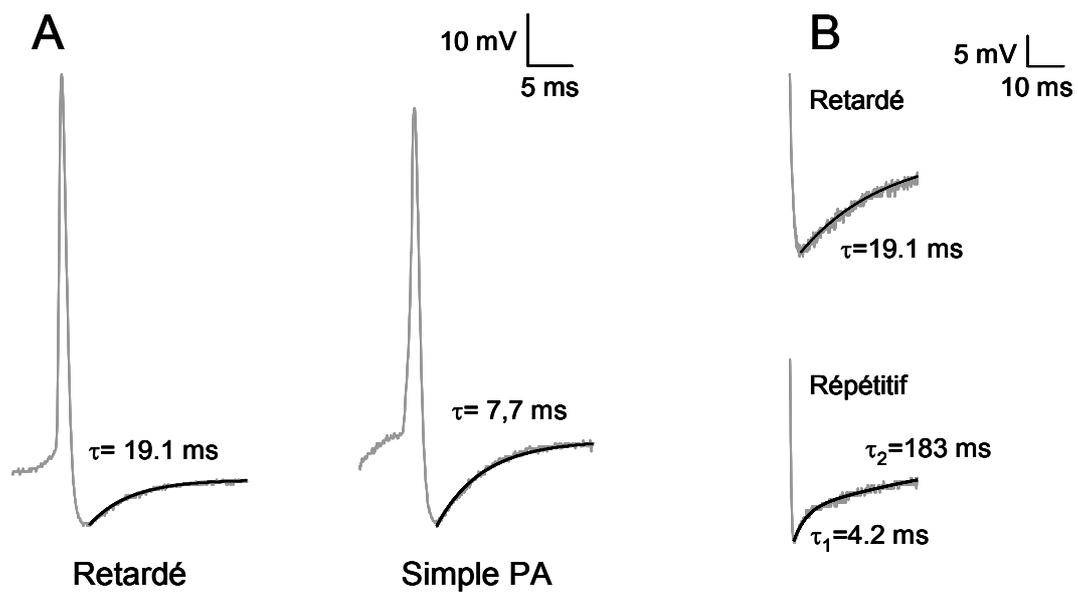


Figure 34 : Cinétique de l'AHP des neurones de la substance gélatineuse.

Le premier PA généré pour une stimulation électrique suffisante est représenté pour un neurone de type *retardé* et de type *simple PA* (A). La cinétique de l'AHP de ces neurones peut être ajustée par une fonction mono-exponentielle, dont le décaours est plus rapide pour les neurones de profil *simple PA* que pour les autres profils de décharge en PA. Cependant, certains des neurones enregistrés présentent, pour le potentiel de membrane durant l'AHP, une évolution de type bi-exponentielle (B).

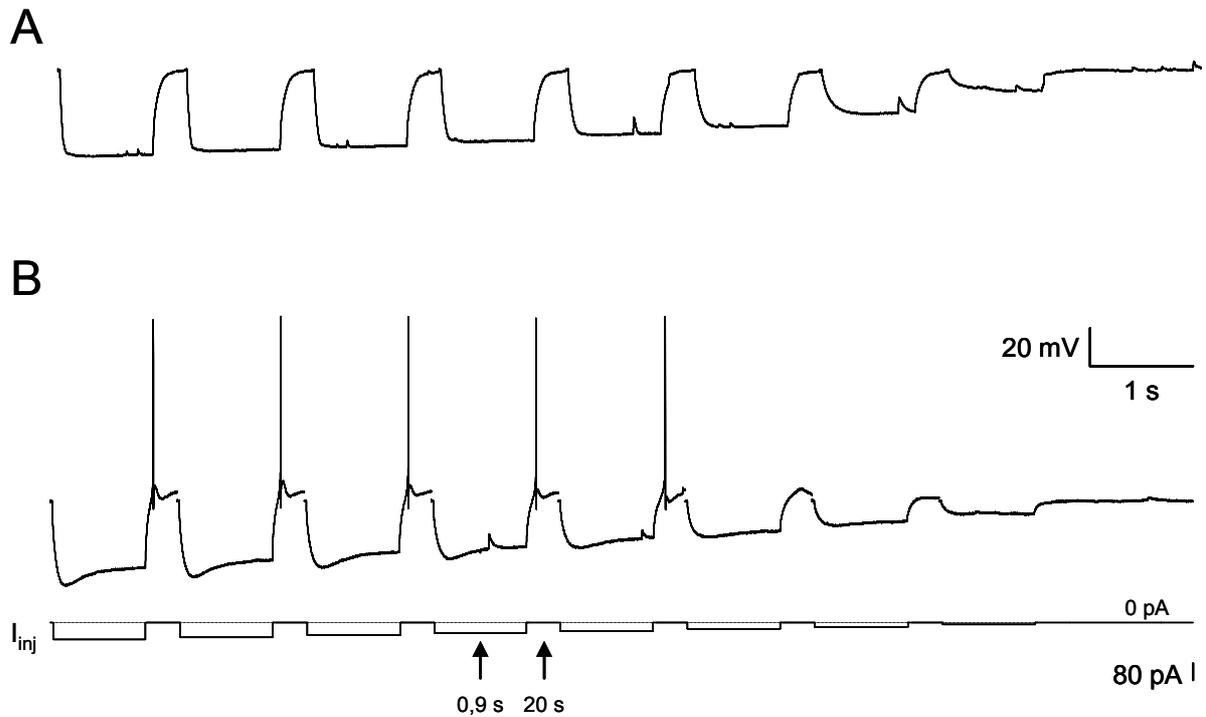


Figure 35 : En réponse à une hyperpolarisation membranaire, les neurones de la lamina II ont des décours du potentiel de membrane différents.

Face à des injections de courants négatifs, le potentiel de membrane s'hyperpolarise. Deux comportements peuvent être observés : un décours temporel en plateau du potentiel de membranaire face à l'hyperpolarisation (A) ou une évolution transitoire exagérée nommée « sag » (B). Ce phénomène est à la fois dépendant du temps et du potentiel de membrane. Lorsque l'amplitude du courant hyperpolarisant diminue, le « sag » tend à disparaître. De plus, la cinétique de repolarisation pendant le créneau de courant tend à s'accélérer avec l'amplitude du créneau hyperpolarisant. La présence du « sag » favorise l'apparition de PA à la fin du créneau de courant hyperpolarisant. Les créneaux de faible amplitude ne permettent pas d'initier le ou les PA.

Les traces correspondent à l'enregistrement de deux neurones représentatifs où sont figurées les réponses membranaires face à des injections de courants allant de -80 à 0 pA (incrément de 10 pA, durée 900 ms) à partir d'un potentiel membranaire ajusté à -60 mV. Chaque saut de courants hyperpolarisant dure 900 ms et 20 s séparent deux stimulations.

nouveau un état excitable du neurone à la suite d'amples et rapides transitions du potentiel membranaire comme celles que l'on observe pendant un PA.

L'analyse des cinétiques de cette AHP a été effectuée sur 64 neurones. Dans la grande majorité des cas, cette phase est de type mono-phasique. Seuls 4 neurones de type *répétitif* présentaient une AHP poly-phasique caractérisée par de rapides oscillations du potentiel membranaire. Ainsi, pour chacun des types de profil de décharge en PA, l'AHP peut être décrite suivant une fonction monoexponentielle (*répétitif* : 65 %, n=13/20 ; *phasique* : 88 %, n=15/17 ; *retardé* : 81 %, n=13/16 et *simple PA* : 100 %, n=7/7) ou par une fonction bi-exponentielle (figure 34 B). Lorsqu'on considère les neurones qui présentent une AHP monoexponentielle (figure 34 A), la cinétique de l'AHP des neurones *simple PA* est significativement plus rapide que celle des types *répétitifs* et *phasiques* (*répétitive* : $27,5 \pm 5,2$ ms ; *phasique* : $25,6 \pm 5,7$ ms ; *retardé* : $17,9 \pm 4,8$ ms ; *simple PA* : $7,2 \pm 1,2$ ms ; $p < 0,05$ avec Rp et P ; test de Steel-Dwass).

2.3. Propriétés des neurones lors de stimulations hyperpolarisantes

Certains neurones de la lamina II présentent des propriétés particulières lorsque des créneaux de courants hyperpolarisants sont appliqués à la membrane. La figure 35 montre deux comportements représentatifs de l'évolution des variations du potentiel de membrane au cours du temps pour des créneaux de courant entre -80 et 0 pA (durée de 900 ms).

D'une part (figure 35 A), chacun des profils de décharge en PA peut répondre face à un créneau de courant négatif par une variation hyperpolarisante progressive suivie par l'établissement d'une phase stable du potentiel membranaire jusqu'à la fin de la stimulation (*répétitif* : 54 %, n=14/26 ; *phasique* : 77 %, n=17/22 ; *retardé* : 56 %, n=9/16 ; *simple PA* : 71 %, n=5/7). Cette évolution du potentiel membranaire dépend uniquement des propriétés membranaires passives (résistance et capacité membranaires décrites ci-dessous).

D'autre part, des neurones (*répétitif* : 46 %, n=12/26 ; *phasique* : 23 %, n=5/22 ; *retardé* : 44 %, n=7/16 ; *simple PA* : 29 %, n=2/7), en réponse à une stimulation hyperpolarisante, montrent une « exagération » transitoire du potentiel de membrane avant sa stabilisation (figure 35 B). Ce phénomène dépend du potentiel de membrane. En effet, plus l'amplitude du créneau hyperpolarisant diminue et plus l'amplitude de cette hyperpolarisation transitoire est faible jusque, dans la grande majorité des cas, à être absente pour des créneaux hyperpolarisants d'amplitude inférieure à 20 pA. Il est à noter que la quasi-totalité des

neurones qui présentent ce phénomène (25/26 neurones enregistrés), montrent aussi l'émission d'un ou plusieurs PA sous la forme d'une bouffée à la suite de la repolarisation de la membrane à la fin de la stimulation hyperpolarisante (figure 31 A et figure 35 B).

Cette propriété déjà décrite pour les neurones de la substance gélatineuse est appelée « sag » en raison du décours du potentiel membranaire en réponse à la stimulation hyperpolarisante. Il correspond à l'activation d'un courant transitoire cationique non-sélectif, nommé courant I_h , dépendant du potentiel membranaire (Yoshimura et Jessell, 1989). Celui-ci possède la caractéristique de s'activer lors d'une hyperpolarisation membranaire et il est sensible au Cs^+ (un bloqueur non spécifique du courant I_h). Ainsi, lors de l'activation de ce courant, le flux net de cation est entrant, provoquant une dépolarisation de la membrane et limitant ainsi l'hyperpolarisation. Un des intérêts de ce type de courant est de favoriser l'état excitable des neurones qui expriment une telle conductance ionique, lorsque le potentiel de membrane est dans la gamme d'activation de ce courant.

2.4. Propriétés membranaires passives

L'analyse des propriétés membranaires passives a été obtenue par l'injection d'un courant négatif hyperpolarisant minimum afin de ne pas mettre en jeu des mécanismes actifs dépendant du potentiel membranaire (voir Matériels et Méthodes paragraphe 1.6 a) et la figure 25 pour la méthodologie). L'ensemble des résultats concernant les paramètres étudiés est résumé dans le tableau 13. Les neurones de la lamina II enregistrés dans cette étude ne présentent pas de différence significative pour le potentiel membranaire de repos ($I_{inj}= 0$ pA) et ceci quelque soit le type de profil de décharge en PA considéré. Par contre, les neurones de type *répétitif* et *retardé* montrent une constante de temps membranaire (τ_m) significativement plus élevée que les neurones de type *simple PA* ($R_p : 45,4 \pm 6,0$ ms [$p<0,05$] ; $R_t : 42,1 \pm 3,1$ ms [$p<0,01$] ; $S : 20,1 \pm 4,6$ ms ; test de Steel-Dwass). Les neurones de profil de décharge *simple PA* ont une résistance membranaire (R_m) plus faible (462 ± 95 M Ω ; $p<0,05$ avec R_t ; test de Stell-Dwass) que les autres types de profil de décharge en PA (valeurs moyennes comprises entre 609 et 926 M Ω). Enfin, les neurones de type *répétitif* enregistrés dans ce travail présentent une capacité membranaire (C_m) plus élevée ($109,3 \pm 23,7$ pF) que les neurones des autres profils de décharge (valeurs moyennes comprises entre 46,9 et 55,6 pF) sans noter de différence significative.

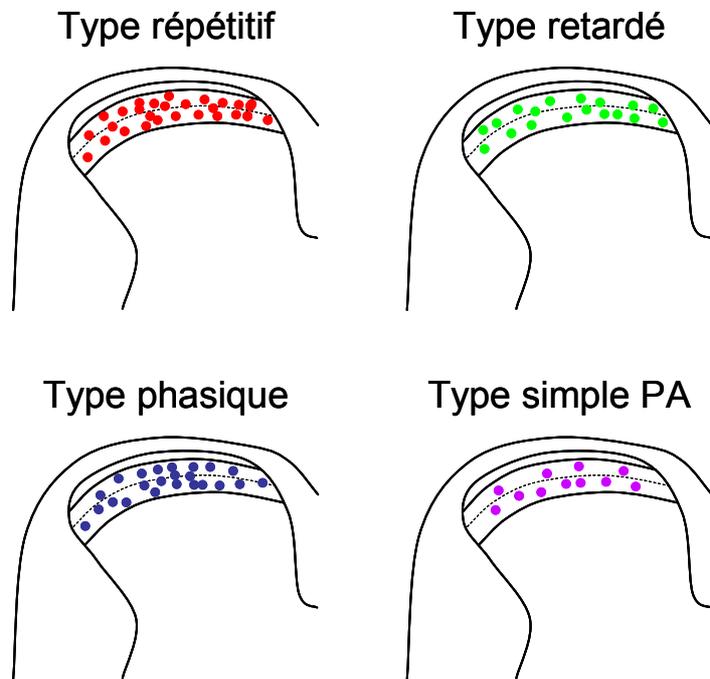


Figure 36 : Localisation spatiale des neurones de la lamina II enregistrés dans cette étude.

La position de chacun des neurones enregistrés est représentée schématiquement. Quelque soit son type de profil de décharge en PA, la répartition des neurones est homogène dans la lamina II.

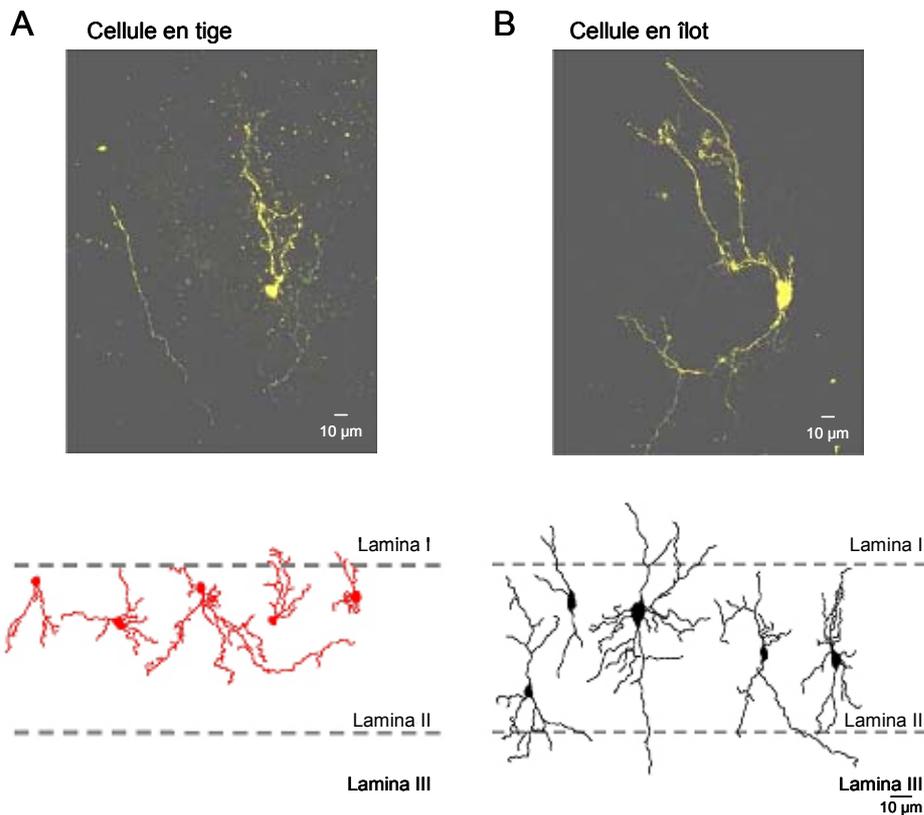


Figure 37 : Morphologie des neurones de la substance gélatineuse.

Pendant l'enregistrement électrophysiologique, les neurones ont été dialysés par de la biocytine, marqueur vital, dont la présence est révélée a posteriori en fluorescence. Deux grands types de morphologie sont observés dans la lamina II : les cellules en tige (A) et les cellules en îlot (B). Les images ont été obtenue en microscopie confocale (plan de coupe de 2,5 µm). L'arborisation dendritique des cellules en tige est de manière générale plus étendue que les cellules en îlot.

En bas, les neurones marqués ont été redessinés à la main. Ici, sont représentés quelques exemples typiques de morphologies rencontrées dans la lamina II. Les neurones ont été repositionnés au sein de cette structure médullaire.

Tableau 14 : Répartition des profils de décharge en PA en fonction de la morphologie des neurones enregistrés.

	Cellules en îlot	Cellules en tige
Répétitif	6	10
Phasique	5	3
Retardé	7	8
Simple PA	4	7

3. Corrélation entre le profil de décharge en potentiel d'action, la localisation spatiale du neurone et sa morphologie

Comme le montre la figure 36, la répartition des neurones enregistrés est uniforme dans la lamina II (n=82). Il en est de même selon l'âge du rat. Ainsi, nos données ne montrent pas de localisation préférentielle d'un type de profil de décharge au sein de la lamina II.

Deux grandes familles avec des caractéristiques morphologiques différentes ont pu être observées après révélation immunocytochimique de la biocytine injectée dans le cytosol lors de l'enregistrement (figure 37). Les résultats obtenus dans nos conditions suivent la classification déjà établie par Todd et Spike (1993). On observe ainsi des neurones de type cellules en îlot et cellules en tige. Les résultats sont résumés dans le tableau 14 et un test d'indépendance dans un tableau de contingence n'a pas montré de différence significative entre le type de morphologie et le type de profil de décharge en PA.

De plus, dans quelques rares cas, il a pu être mis en évidence un marquage de deux neurones, alors qu'un seul neurone a été dialysé par la biocytine. Un tel résultat montre la possibilité de l'existence d'un couplage entre deux neurones de la lamina II par l'intermédiaire de jonctions communicantes de type « gap ». En général, la distance séparant le soma de ces deux neurones est inférieure à 100 μm et ils sont tous deux situés dans la lamina II (n=4).

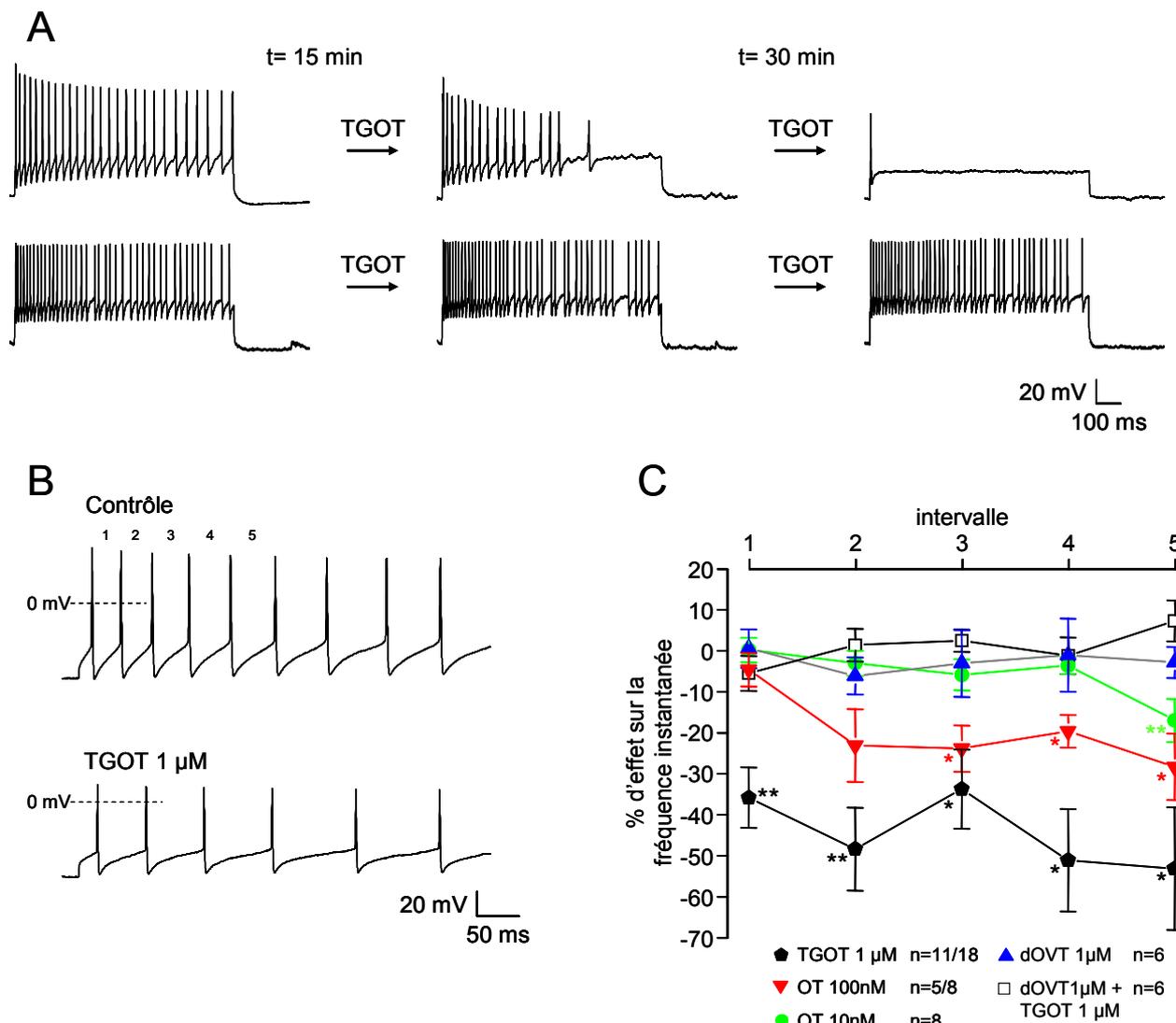


Figure 38 : Effets de l'ocytocine sur le profil de décharge en PA des neurones de la lamina II.

A : La perfusion continue par le bain de TGOT (1 μ M) provoque, pour une sous-population des neurones enregistrés, une diminution progressive de l'excitabilité caractérisée par une conversion du profil de décharge en PA vers un profil simple PA. Ainsi, un neurone *répétitif* est successivement converti en profil *phasique* puis *simple PA* (haut). Un autre neurone est insensible à l'application de TGOT (bas).

B : 15 min après le début de l'application de TGOT, l'intervalle de temps entre les PA est augmenté diminuant ainsi la fréquence instantanée des PA observés. Cet effet est accompagné d'un ralentissement de l'AHP. De plus, l'amplitude des PA est fortement diminuée (réduction de l'« overshoot »).

C : L'effet de différents agonistes et antagonistes du récepteur OT sur la fréquence instantanée des PA est représenté pour chacun des 5 premiers intervalles de PA observés, après 15 min d'application. Un effet dose-dépendant entre la concentration d'OT et le pourcentage de réduction de la fréquence est observé. Plus la concentration en agoniste OT est importante, plus la diminution de fréquence est précoce. Ce ralentissement est à mettre en parallèle avec la conversion rapide (5-10 min) en profil *simple PA* de neurones de type *répétitif* observée après une application d'OT (1 μ M) ; (voir texte).

L'ensemble des traces et des résultats a été obtenu pour des créneaux de courant de +140 pA pendant 900 ms à partir d'un potentiel de membrane ajusté à -60 mV. Les différences statistiques sont données avant et après application des substances pharmacologiques ; $p < 0,05$ (*) ; $p < 0,01$ (**) ; $p < 0,001$ (***) ; test t de Student de données appariées.

II. Modulation de l'excitabilité des neurones de la lamina II par l'ocytocine

Afin d'observer la modulation de l'excitabilité des neurones de la lamina II, des agonistes et un antagoniste du récepteur OT ont été appliqués sur les cellules à l'aide d'une perfusion générale par bain pendant l'enregistrement. L'observation des profils de décharge en PA, des propriétés membranaires passives et actives a été réalisée par l'injection dans la cellule de créneaux de courants de -80 à +200 pA (durée 900 ms). Ces enregistrements ont été réalisés à partir de tranches de moelle épinière de rats âgés de 15 à 30 jours postnataux.

1. Effets de l'ocytocine sur les profils de décharge en potentiel d'action des neurones de la lamina II

Les effets modulateurs des drogues testées sur la fréquence instantanée des PA ont été évalués en prenant en compte le pourcentage d'effet sur la fréquence moyenne des 6 premiers PA obtenus lors d'une stimulation dépolarisante de +140 pA. Au total, 18 neurones ont été enregistrés en condition contrôle puis en présence d'un agoniste synthétique spécifique du récepteur OT : TGOT (1 μ M). Les expériences ont été menées en présence ou en absence des transmissions synaptiques rapides (2 mM d'acide kynurénique, 1 μ M de strychnine, 1 μ M de bicuculline perfusés dans le milieu extracellulaire) afin de s'assurer que les effets observés sont le résultat d'une action postsynaptique de la drogue testée et non d'une modulation via une modification des entrées synaptiques. En présence ou en absence de transmission synaptique rapide, aucune différence significative n'a pu être mise en évidence pour les différents paramètres étudiés lorsque TGOT est appliqué ou non, sauf pour C_m (voir ci-après paragraphe 2.).

Une sous-population des neurones (39 %, $n=7/18$) ne présente aucune modification de la forme du profil de décharge en PA pendant une perfusion qui a pu dans certains cas dépasser une heure d'enregistrement (figure 38 A). Cependant, 61 % des neurones enregistrés ($n=11/18$) présentent une réduction importante de la fréquence instantanée de décharge en PA ($-41,8 \pm 10,3$ % ; $p<0,01$; test t de Student de données appariées) en présence de 1 μ M de TGOT. Pour 45 % des neurones sensibles à TGOT ($n=5/11$), l'application de cet agoniste a entraîné une modification du profil de décharge caractérisée par une conversion vers un profil moins excitable (figure 38 A). Ainsi, des neurones de type *répétitif* ont successivement été convertis en type *phasique* puis *simple PA*. De même, des neurones de type *phasique* et

retardé ont été converti en type *simple PA*. L'observation de la conversion totale nécessite un délai d'environ 30 minutes dans le cas des neurones de profil *répétitif*. De plus, il est à noter que les neurones de type *retardé* (n=3) en condition contrôle montrent une inhibition progressive de la phase silencieuse qui précède la bouffée de PA, durant l'application de TGOT. Cette diminution de la fréquence instantanée de décharge s'accompagne aussi d'une modification du PA (réduction de l'« overshoot » notamment) et de la cinétique de l'AHP (figure 38 B).

Au cours de nos enregistrements, nous avons tenté d'observer la réversibilité des effets de TGOT. Parmi toutes les cellules testées, une seule a montré un léger retour et ceci une heure après l'arrêt de la perfusion de la drogue. En effet, dans nos conditions expérimentales, l'utilisation de la technique de « patch-clamp » en configuration cellule entière des neurones de la lamina II permet rarement d'enregistrer l'activité électrique de ces neurones plus de 1h30 après le début de l'expérience.

Les effets inhibiteurs de TGOT sont absents lors d'une application concomitante avec un antagoniste du récepteur OT (figure 38 C) : dOVT 1 μ M ($1,0 \pm 3,9\%$; n=6). De plus, une perfusion des neurones enregistrés avec cet antagoniste seul ne présente aucun effet sur la fréquence instantanée des PA ($-2,2 \pm 5,7\%$; n=6).

Afin de s'assurer que l'agoniste naturel du récepteur à l'OT soit capable de moduler de la même manière les neurones de la lamina II, l'OT a été testée à différentes concentrations (1 μ M, 100 nM, 10 nM). A la concentration de 1 μ M, l'application d'OT a été effectuée sur 5 neurones et deux d'entre eux (profil *répétitif*) ont été rapidement (5 à 10 minutes) convertis en profil *simple PA* ; les 3 autres neurones n'ont montré aucune modification de leurs propriétés membranaires. La réduction de la fréquence instantanée des PA est de $-18,6 \pm 5,8\%$ dans 62 % des neurones enregistrés (n=5/8 ; p<0,01 ; test t de Student de données appariées) lorsque l'OT est appliquée à la concentration de 100 nM, sans observer de conversion de profil. Enfin, l'OT a été testée à la concentration de 10 nM et aucune modification de la fréquence instantanée ($-5,4 \pm 3,2\%$; n=8) n'est observable pendant toute la durée de l'enregistrement.

La figure 38 C représente le pourcentage d'effet des diverses drogues testées sur la fréquence instantanée en fonction de l'intervalle entre les PA considérés. La réduction de fréquence instantanée est significative dès le premier intervalle et se maintient sur tous les intervalles examinés lorsque TGOT (1 μ M) est perfusé dans le bain. La différence statistique par rapport à la condition contrôle s'observe à partir du troisième intervalle quand l'OT est

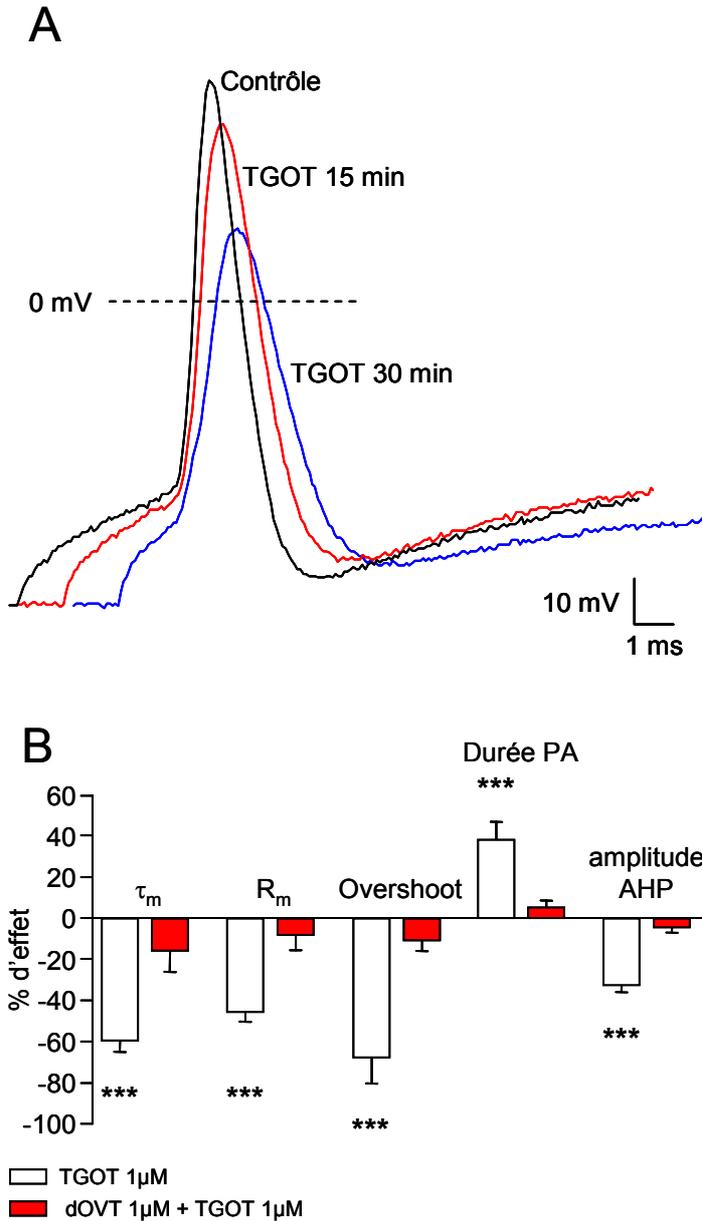


Figure 39 : Effet de l'ocytocine sur les propriétés membranaires des neurones de la lamina II.

A : Décours du premier PA généré par un créneau de courant de +140 pA (durée de 900 ms) pour un potentiel ajusté à -60 mV. La perfusion de TGOT (1 μ M) provoque une modification profonde et progressive du PA. L'« overshoot » et l'amplitude de l'AHP sont diminués. Les cinétiques de la phase de dépolarisation et de repolarisation du PA ainsi que de l'AHP sont ralenties. Enfin, on peut remarquer que la durée de la latence qui précède le seuil de déclenchement du PA tend à diminuer progressivement lors de la perfusion de TGOT. Les PA sont alignés temporellement au niveau du seuil de déclenchement des PA.

B : Pourcentage d'effet de la perfusion de TGOT sur les principales propriétés membranaires passives et actives. Les pourcentages d'effets sont présentés à partir des résultats obtenus en comparant l'effet de TGOT par rapport à une absence d'application et en comparant les effets de l'application de TGOT+dOVT par rapport à l'application de dOVT seul. Les effets sont réduits voire bloqués lorsque TGOT est co-appliqué avec dOVT (antagoniste compétitif du récepteur OT). *** : $p < 0,001$ (test t de Student de données appariées) ; comparaisons faites en absence et présence de TGOT.

Tableau 15. Les principales propriétés membranaires modulées par l'activation du récepteur ocytocine.

	Propriétés membranaires passives				Propriétés membranaires actives									
	τ_m		R_m		Seuil du PA		I_{seuil}		Overshoot		Amplitude AHP		Durée	
	TGOT	dOVT +TGOT	TGOT	dOVT +TGOT	TGOT	dOVT +TGOT	TGOT	dOVT+ TGOT	TGOT	dOVT+ TGOT	TGOT	dOVT +TGOT	TGOT	dOVT +TGOT
Effet (%)	-59 ± 5 ***	-7 ± 6	-46 ± 5 ***	-6 ± 6	26 ± 2 ***	3 ± 3	110 ± 21 **	3 ± 10	-68 ± 13 ***	-8 ± 6	33 ± 3 ***	-5 ± 2	38 ± 9 ***	-10 ± 5
n	11	6	10	6	9	6	12	6	17	6	13	6	13	6

Les valeurs sont exprimés comme étant les moyennes ± l'erreur-type en pourcentage. Les données sont comparées entre la condition contrôle et 15 min après le début de l'application des substances pharmacologiques. Les différences statistiques sont données comme : $p < 0.01$ (**); $p < 0.001$ (***) ; test t de Student de données appariées. n, nombre d'observations ; τ_m , constante de temps membranaire ; R_m , résistance membranaire ; Overshoot, variation maximale du potentiel membranaire au-dessus de 0 mV durant le PA ; Amplitude AHP, amplitude mesurée entre le seuil du PA et le potentiel minimum de la phase d'hyperpolarisation ; Durée, durée du PA mesurée au niveau du seuil de déclenchement du PA.

appliquée à la concentration de 100 nM, alors qu'à 10 nM, celle-ci se révèle à partir du cinquième intervalle.

L'activation du récepteur OT modifie profondément l'excitabilité des neurones de la lamina II et cet effet est spécifiquement bloqué lors de co-application de TGOT avec dOVT. De plus, cette modulation est dépendante de la concentration d'OT utilisée. En effet, à partir d'une concentration inférieure à 100 nM d'OT, la conversion des profils de décharge n'est plus observable et la réduction de la fréquence instantanée diminue avec la concentration d'OT.

2. Effets de l'ocytocine sur les propriétés membranaires passives et actives

Les effets de TGOT (1 μ M) ont été étudiés sur les propriétés membranaires passives et actives. L'ensemble des résultats est résumé dans le tableau 15 et la figure 39 B. Les effets de TGOT ont été observés sur les différents types de profil de décharge en PA. Du fait de l'existence de différences significatives des propriétés membranaires entre les différents profils de décharge en PA, les résultats présentés correspondent à la moyenne des pourcentages d'effets observés sur chaque neurone. Ces résultats prennent en compte l'ensemble des neurones pour lesquels TGOT a été testé (n=18).

Durant l'application de TGOT (1 μ M), le premier PA enregistré, lors d'un créneau de courant dépolarisant de +140 pA, possède un décours profondément modifié (figure 39 A). En effet, l'« overshoot » est fortement diminué 15 minutes après le début de l'application de TGOT (-68 ± 13 % ; $p < 0,001$; test t de Student de données appariées), parallèlement, sa durée est allongée (39 ± 9 % ; $p < 0,001$; test t de Student de données appariées). Enfin, le courant dépolarisant minimum (I_{seuil}) injecté permettant l'apparition des premiers PA est plus important en présence de TGOT que dans les conditions contrôles (110 ± 21 % ; $p < 0,01$; test t de Student de données appariées). Enfin, l'amplitude de l'AHP est diminuée de 33 ± 3 % ($p < 0,001$; test t de Student de données appariées). Les propriétés membranaires actives modulées par TGOT ne sont pas affectées lors d'une application concomitante de TGOT (1 μ M) et de dOVT (1 μ M). Les effets observés sur les propriétés membranaires actives montrent que les conductances ioniques dépendantes du potentiel membranaire sont affectées de manière à diminuer l'excitabilité des neurones de la lamina II.

En présence de TGOT (1 μ M), τ_m et R_m sont fortement diminuées (-59 ± 5 % et -46 ± 5 %, respectivement ; $p < 0,001$; test t de Student de données appariées) et ces effets sont bloqués lorsque dOVT (1 μ M) est co-appliqué (figure 39 B). Par contre aucune variation du potentiel membranaire de repos n'a pu être mise en évidence. De même, lorsque la transmission synaptique rapide est bloquée, C_m n'est pas modulée lors de l'application de TGOT (1 μ M).

L'activation du récepteur OT modifie profondément l'excitabilité des neurones de la lamina II, et ceci, probablement, par la modulation de plusieurs conductances ioniques dépendantes ou non du potentiel membranaire. Ainsi, dans ces conditions, le neurone génère plus difficilement des PA et la stimulation nécessaire afin de les générer doit être plus importante. La modulation des propriétés membranaires actives est telle que le neurone est dans une situation le conduisant à ne générer que peu de PA. Cette idée est confortée par le fait que l'augmentation de la valeur du seuil de déclenchement du PA, la diminution de I_{seuil} , la diminution de l'« overshoot » et le ralentissement de la phase ascendante du PA (figure 39 A), lors d'une activation du récepteur OT, semblent être le résultat d'une inhibition des canaux Na^+ dépendants du potentiel membranaire. De plus, la durée de la phase de repolarisation du PA est augmentée et l'amplitude de l'AHP est diminuée. Ces effets seraient le résultat d'une modulation négative des canaux K^+ dépendants du potentiel membranaire. Des études tendent à s'accorder sur le fait qu'une réduction de l'excitabilité des neurones est en partie due à une modulation des canaux ioniques membranaires perméables au K^+ dépendant du potentiel membranaire. C'est pour vérifier cette hypothèse que nous avons caractérisé l'effet de TGOT sur les conductances K^+ dépendante du potentiel observable dans notre préparation.

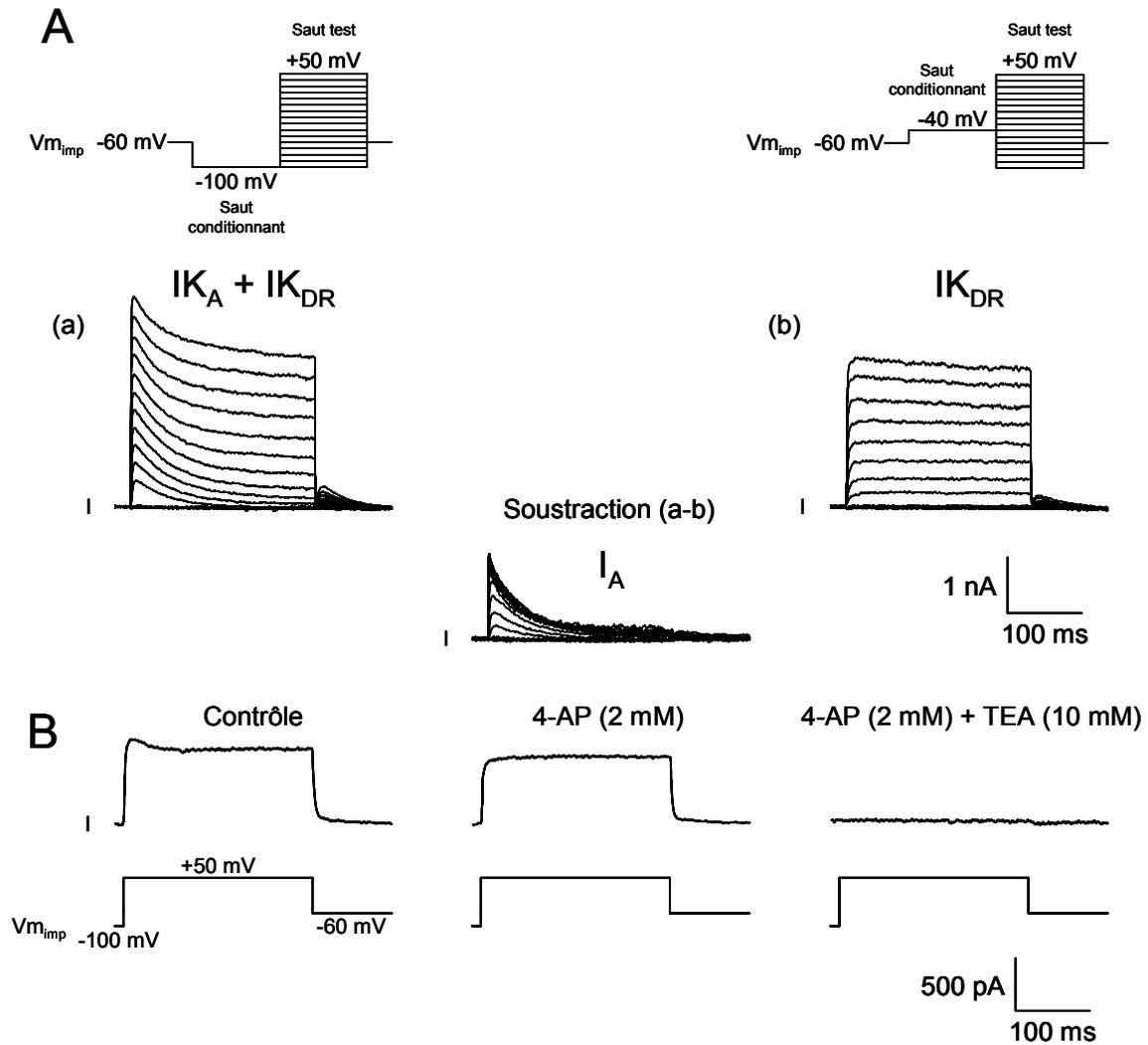


Figure 40 : Les neurones de la lamina II possèdent deux familles de conductances potassium dépendant du potentiel.

A : En se basant sur les propriétés électrophysiologiques des canaux ioniques potassium, il est possible de séparer deux grandes familles de courant. Lorsque le potentiel membranaire est conditionné par une hyperpolarisation à -100 mV pendant 250 ms avant le saut de potentiel test (250 ms), on peut observer le courant potassium total (a) qui se caractérise par la présence d'une phase transitoire (pic) précédant une phase maintenue (plateau). L'amplitude de ce courant total augmente avec l'amplitude du créneau test. Pour un potentiel membranaire conditionnant de -40 mV, un courant maintenu se développe pendant toute la durée du créneau test (b). Il est à noter que l'amplitude de ce courant augmente avec l'intensité de la stimulation, il correspond à IK_{DR} . Afin d'isoler le courant transitoire, on réalise la soustraction trace par trace du courant total IK_{DR} (a-b) pour chaque valeur de potentiel test. Ce courant transitoire, nommé aussi I_A , s'active très rapidement puis s'inactive avant la fin de la stimulation test. L'amplitude de ce courant dépend du saut de potentiel imposé à la membrane pendant le test.

B : Les courants I_A et IK_{DR} peuvent aussi être isolés pharmacologiquement en perfusant de manière continue des bloqueurs comme la 4-AP (inhibiteur de conductance K^+ transitoire) et le TEA (inhibiteur de conductance K^+ maintenue), où la co-application de ces deux bloqueurs entraîne une inhibition totale du courant potassium total enregistré pour un saut de potentiel membranaire à $+50$ mV à partir d'un potentiel de maintien de -60 mV.

L'ensemble des traces a été obtenu à partir d'enregistrements réalisés en présence de TTX ($0,5 \mu\text{M}$) à un potentiel de maintien membranaire de -60 mV. En A, les deux protocoles de stimulation utilisés consécutivement lors de l'enregistrement sont figurés en haut. Ainsi, le potentiel membranaire est conditionné à -100 ou -40 mV durant 250 ms avant le créneau de courant test appliqué entre -100 et $+50$ mV (incrément de 10 mV, durée 250 ms). $V_{m_{imp}}$: potentiel membranaire imposé (mV) ; I : courant transmembranaire enregistré (pA).

III. Incidences fonctionnelles de l'ocytocine sur les conductances ioniques potassium des neurones de la lamina II

La caractérisation des conductances ioniques K^+ dépendantes du potentiel membranaire a été menée sur 25 neurones. Afin d'isoler ces conductances, au milieu extracellulaire de base a été ajoutée de la tétrodotoxine (TTX ; 0,5 μ M), bloquant spécifique des canaux Na^+ dépendant du potentiel membranaire. La composition du milieu intrapipette utilisé est celle de la solution 1 avec $E_{Cl^-} = -60$ mV.

Dans la lamina II, deux types de conductances ioniques K^+ ont pu être observées. L'un de ces courants présente des propriétés d'inactivation (I_A) alors que l'autre (IK_{DR}) est un courant de type maintenu (figure 40). Afin de les discriminer, nous avons utilisé un protocole classique de double stimulation (Matériels et Méthodes, paragraphe 1.6. b) permettant de fixer le potentiel membranaire lors de la première stimulation, à une valeur activant ou inactivant totalement le courant transitoire (I_A). Les neurones ont été enregistrés en mode potentiel imposé afin d'enregistrer les variations de courant transmembranaire à partir d'un potentiel imposé de -60 mV.

Dans ces conditions, lorsque le créneau de potentiel conditionnant est appliqué à -100 mV, on observe des courants sortants dont l'amplitude dépend du saut test de potentiel imposé à la membrane. Le décours de la réponse du neurone à la stimulation électrique se compose de deux phases : une phase précoce transitoire où l'amplitude du courant diminue progressivement pour laisser place à une phase soutenue jusqu'à la fin de la stimulation (figure 40 A a). Les courants sortants enregistrés correspondent au courant K^+ total. Lorsque le potentiel conditionnant est au potentiel de -40 mV, le courant enregistré est sortant et ne présente qu'une phase soutenue durant la stimulation. L'amplitude du courant enregistré montre une dépendance vis-à-vis du potentiel membranaire appliqué à la membrane et ressemble au courant de type retardé rectifiant IK_{DR} (figure 40 A b, figure 41 A). Afin d'isoler la composante transitoire, les traces enregistrées du courant maintenu ont été soustraites aux traces du courant total. L'amplitude de la composante transitoire ainsi obtenue augmente avec l'amplitude du créneau de potentiel test (figure 40 A a-b, figure 42 A). Ce courant présente une activation rapide suivie par un mécanisme d'inactivation rapide qui entraîne une diminution progressive de l'amplitude du courant avant la fin du choc électrique, caractéristique du courant de type I_A , déjà décrit dans cette préparation. Ce type de courant a été enregistré dans 23 des 25 neurones observés.

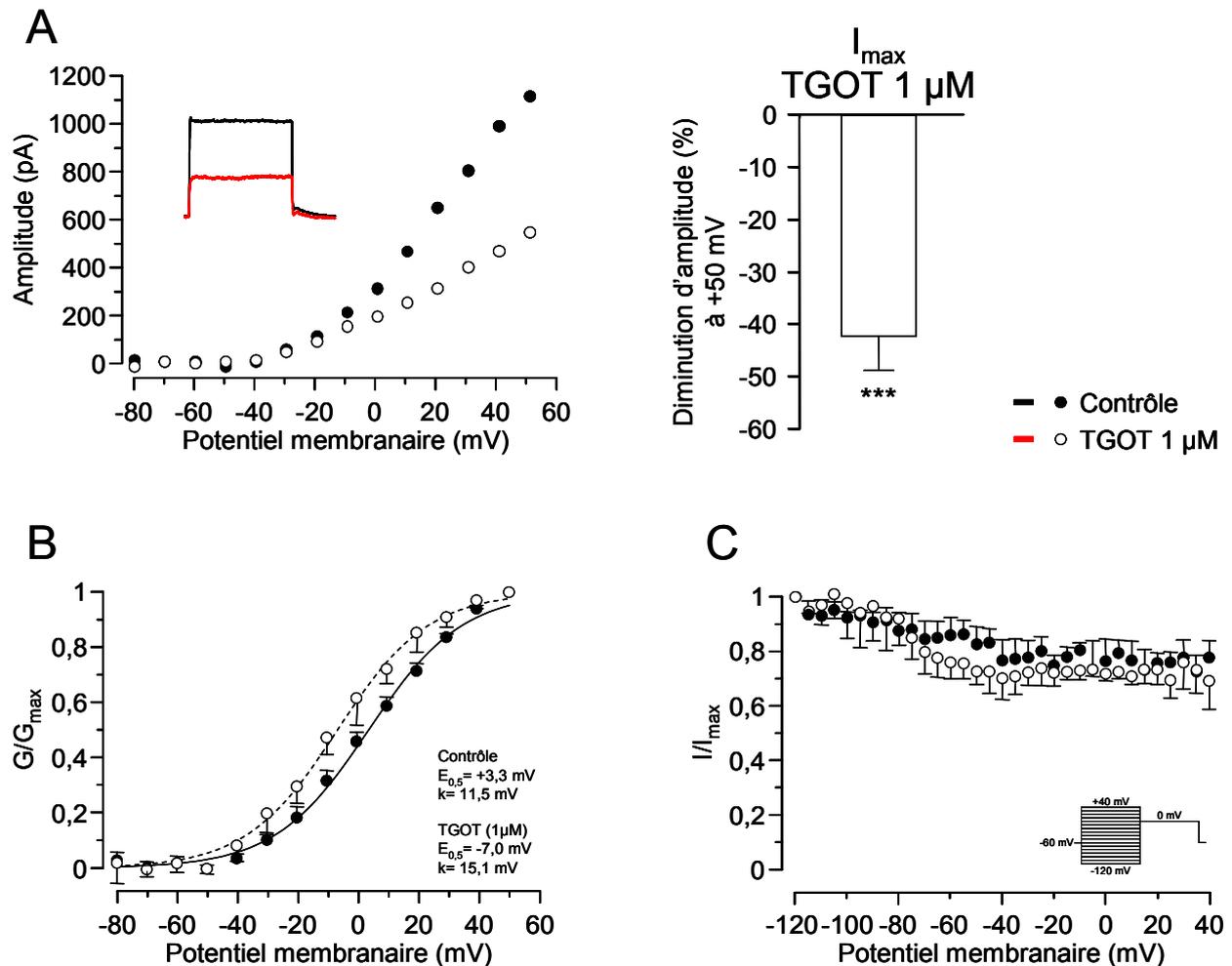


Figure 41 : Effets inhibiteurs de l'ocytocine sur le courant potassium I_{KDR} .

A : Courbe I/V représentative d'un neurone de la lamina II (gauche). L'amplitude de I_{KDR} dépend du potentiel imposé à la membrane ; elle augmente progressivement et présente une rectification sortante. L'application de TGOT (1 μ M) provoque une diminution de la pente de la courbe I/V correspondant à une diminution de la conductance globale. Ceci se traduit par une diminution de l'amplitude (droite) mesurée pour un créneau de potentiel de +50 mV de $-42 \pm 6,7$ % ($p < 0,001$; test t de Student de données appariées ; comparaisons faites en absence et en présence de TGOT). Les traces de courant, représentées en insert, correspondent à des enregistrements réalisés pour un potentiel membranaire de +50 mV en absence et en présence de TGOT.

B et C : Les courbes moyennes d'activation (gauche) et d'inactivation (droite) du courant I_{KDR} . En présence de TGOT, aucune modification notable de ces courbes n'a pu être observée. Il est à noter que I_{KDR} possède une faible inactivation vis-à-vis du potentiel membranaire imposé à la membrane. En C, l'insert correspond au protocole de double stimulation utilisé.

Les effets de l'application de TGOT ont été observés 15 minutes après le début de la perfusion.

$E_{0,5}$ et k sont obtenus par ajustement de l'équation simplifiée de Boltzmann sur les valeurs moyennes de la courbe d'activation.

Par ailleurs, une autre manière de caractériser les canaux ioniques K^+ est d'utiliser une approche pharmacologique. Ainsi, des inhibiteurs des canaux ioniques K^+ dépendant du potentiel ont été appliqués par perfusion : la 4-AP (2 mM) bloqueur des canaux K^+ transitoires et le TEA (10 mM) bloqueur des canaux K^+ maintenus. La figure 40 B montre sur un courant total obtenu pour une valeur de potentiel membranaire de +50 mV, que la 4-AP inhibe la composante transitoire de ce courant pour ne laisser se développer que la composante maintenue, elle-même inhibée totalement lors de la perfusion de TEA (n=4). Cependant, ces inhibiteurs ne sont pas totalement spécifiques du type de canaux ioniques bloqués. En effet, la 4-AP inhibe partiellement les canaux de type IK_{DR} ; de même le TEA peut interagir avec les canaux K^+ transitoires. Cet effet dépend à la fois du type des sous-unités composant les canaux et de la concentration utilisée de ces inhibiteurs. Afin d'étudier les conductances K^+ des neurones de la lamina II, nous avons donc choisi d'utiliser les propriétés électrophysiologiques différentielles de ces canaux afin de les séparer.

1. Modulation des conductances ioniques potassium par l'ocytocine

1.1. La conductance ionique maintenue

Les effets de TGOT (1 μ M) sur IK_{DR} ont été testés sur 16 neurones. 69 % (n=11/16) des neurones enregistrés présentent une sensibilité à l'application par bain de cet agoniste du récepteur OT. La courbe I/V montre en condition contrôle que le courant IK_{DR} est dépendant du potentiel membranaire et que durant l'application de TGOT, la pente de la partie linéaire de cette courbe est diminuée (figure 41 A). L'amplitude du courant obtenu pour une stimulation à +50 mV est fortement inhibée de $-42,1 \pm 6,7$ % (p<0,001 ; n=11 ; test t de Student de données appariées). Cette modification de la courbe I/V pourrait être le résultat de la modulation de la densité de canaux fonctionnels ou d'une modulation de la probabilité d'ouverture des canaux ioniques à l'origine du courant IK_{DR} .

Afin d'examiner cette possibilité, G_{K^+} a été évaluée pour chaque valeur de potentiel membranaire testée lors de la réalisation de la courbe I/V en utilisant la relation suivante :

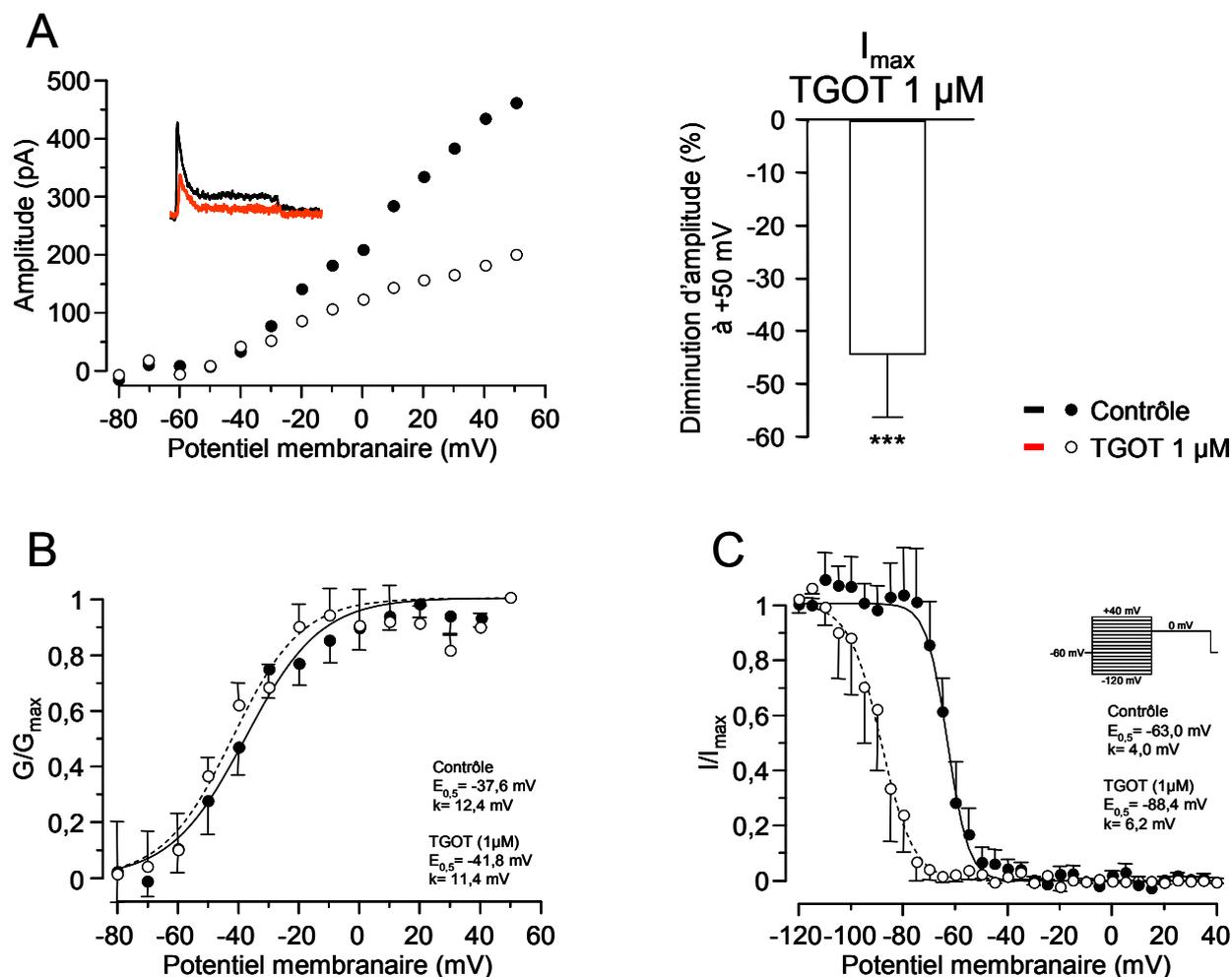


Figure 42 : Effets inhibiteurs de l'ocytocine sur le courant potassium I_{K_A} .

A : Courbe I/V représentative d'une neurone de la lamina II (gauche). L'amplitude de I_{K_A} dépend du potentiel imposé à la membrane ; elle augmente progressivement avec l'intensité de la stimulation dépolarisante. L'application de TGOT (1 μ M) provoque une diminution de la pente de la courbe I/V. Ceci se traduit par une diminution de l'amplitude (droite) mesurée pour un créneau de potentiel de +50 mV de $-44,2 \pm 11,9$ % ($p < 0,001$; test t de Student de données appariées ; comparaisons faites en absence et en présence de TGOT). Les traces de courant, représentées en insert, correspondent à des enregistrements réalisés pour un potentiel membranaire de +50 mV en absence et en présence de TGOT.

B et C : Les courbes moyennes d'activation (gauche) et d'inactivation (droite) du courant I_{K_A} respectivement. En présence de TGOT, aucune modification notable de la courbe d'activation n'a pu être observée. Par contre, certains neurones (4/7) montrent un déplacement important de la courbe d'inactivation de I_A vers des potentiels membranaires plus négatifs ($p < 0,001$; test t de Student de données appariées). En C, l'insert correspond au protocole de double stimulation utilisé.

Les effets de l'application de TGOT ont été observés 15 minutes après le début de la perfusion. $E_{0,5}$ et k sont obtenus par ajustement de l'équation simplifiée de Boltzmann sur les valeurs moyennes des courbes d'activation et d'inactivation.

$I_{K^+} = G_{K^+}(E_m - E_{K^+})^1$. L'ensemble des résultats a été normalisé par rapport à $G_{K^+_{max}}$ obtenu pour une valeur de potentiel membranaire de +50 mV. La figure 41 B montre l'évolution de G_{K^+} moyen en fonction du potentiel membranaire imposé qui correspond à l'état d'activation des canaux en fonction du potentiel imposé à la membrane encore appelé courbe d'activation. Sur le graphique, la courbe représente le meilleur ajustement du décours de G_{K^+} par l'utilisation de l'équation simplifiée de Boltzmann (voir Matériels et Méthodes, paragraphe 1.6. b). Les résultats obtenus montrent que la courbe d'activation moyenne de $I_{K_{DR}}$ est dépendante du potentiel appliqué à la membrane et que le seuil d'activation de ce courant est de -60 mV environ. De plus, en présence de TGOT, les caractéristiques d'activation des canaux ioniques ne présentent pas de différences significatives ($E_{0,5} = +4,44 \pm 1,4$ mV et $-1,94 \pm 2,22$ mV ; $k = 14,82 \pm 0,72$ mV et $15,17 \pm 0,61$ mV en condition contrôle et en présence de TGOT respectivement).

Le courant $I_{K_{DR}}$ ne s'inactive pas ou très peu au cours du temps. L'inactivation dépend de la composition des sous-unités constituant le canal. Cependant, l'application de TGOT pourrait modifier cet aspect du comportement des canaux ioniques responsables du courant $I_{K_{DR}}$. Afin d'examiner cela, la courbe d'inactivation à l'état stable a été établie en absence et en présence de TGOT (1 μ M) sur 7 neurones enregistrés en utilisant le protocole de double stimulation électrique décrit dans la section Matériels et Méthodes (paragraphe 1.6. b). Le graphique (figure 41 C) représente les valeurs moyennes de courant obtenues, normalisées par rapport à la valeur maximale en fonction de la valeur du potentiel imposé à la membrane durant le pré-pulse conditionnant. En absence comme en présence de TGOT, le courant $I_{K_{DR}}$ s'inactive peu en fonction du potentiel, aucune différence notable n'a pu être observée lors de la perfusion de TGOT.

1.2. La conductance ionique transitoire

En parallèle de l'étude des effets de TGOT sur le courant $I_{K_{DR}}$, la modulation par cet agoniste a été testée sur la conductance ionique I_A . Sur 14 neurones présentant cette conductance, 10 d'entre eux (soit 71 % des neurones enregistrés) ont montré une sensibilité se caractérisant aussi par une diminution de la pente de la courbe I/V (figure 42 A). Ainsi,

¹ I_{K^+} : courant transmembranaire mesuré (pA) ; G_{K^+} : conductance des canaux potassium (pS) ; E_m : potentiel membranaire imposé (mV) ; E_{K^+} : potentiel d'équilibre électrochimique du potassium de -106 mV dans nos conditions expérimentales.

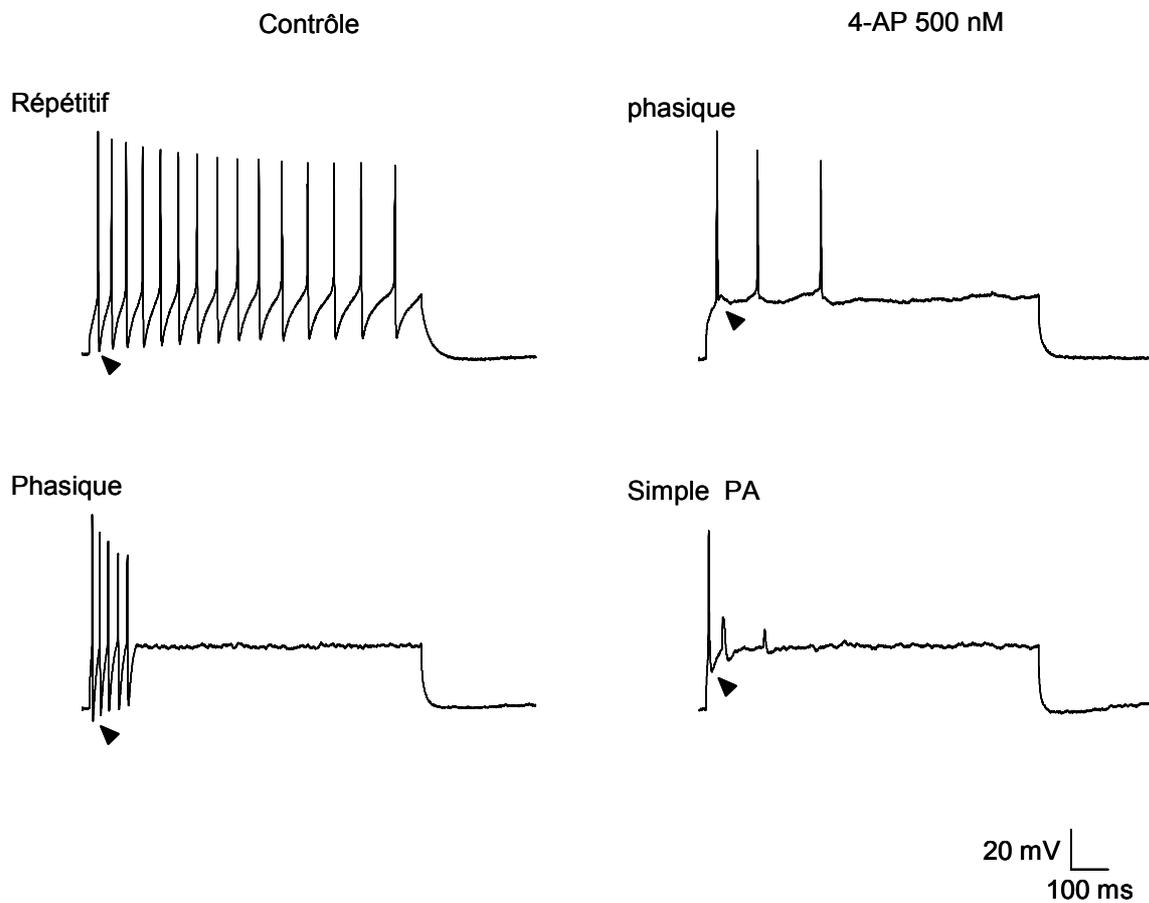


Figure 43 : L'inhibition de conductances ioniques par la 4-aminopyridine mime les effets de TGOT sur le profil de décharge en PA des neurones répétitifs et phasiques.

L'application de 4-AP (500 nM) sur des interneurones induit une diminution de leur excitabilité, qui se caractérise par une forte diminution du nombre de PA générés pour un créneau de courant de +140 pA. Cette réduction de l'excitabilité neuronale s'accompagne d'une conversion du profil de décharge en PA (de *répétitif* en *phasique* et de *phasique* en *simple PA*). Enfin, la 4-AP induit aussi une forte diminution de l'amplitude de l'AHP (flèche noire).

Les profils de décharge en PA ont été obtenus à partir de deux neurones représentatifs en réponse à un créneau de courant de +140 pA (durée 900 ms) à partir d'un potentiel membranaire de -60 mV.

l'amplitude de I_A est statistiquement diminuée de $44,2 \pm 11,9 \%$ ($n=10$; $p<0,001$, test t de Student de données appariées) lorsqu'on considère l'amplitude du courant engendré pour un choc électrique de +50 mV appliqué à la membrane. Il est à noter que tous les neurones qui présentent une inhibition de I_A par TGOT présentent parallèlement une inhibition de $I_{K_{DR}}$.

Les caractéristiques d'activation et d'inactivation de I_A ont été observées en absence et en présence de TGOT (1 μ M). L'activation de I_A dépend du potentiel imposé à la membrane du neurone et elle peut être idéalisée en utilisant l'équation simplifiée de Boltzmann. Aucune différence statistique n'a pu être observée entre la condition contrôle et la perfusion de TGOT (figure 42 B): $E_{0,5} = -29,99 \pm 4,31$ mV et $-40,90 \pm 3,02$ mV ; $k = 12,27 \pm 2,04$ mV et $13,74 \pm 4,31$ mV ; respectivement ; et le seuil d'activation (environ -70 mV) est inchangé dans ces deux conditions expérimentales (figure 42 B).

Les propriétés d'inactivation du courant I_A , observées à l'état stable, sont quant à elles fortement modulées pour une fraction des neurones enregistrés ($n=4/7$, soit 57 %) lors de la perfusion de TGOT (figure 42 C). Le paramètre affecté par cet activateur du récepteur OT est $E_{0,5}$, lequel déplace la courbe d'inactivation vers des valeurs de potentiel membranaire plus négatif : $E_{0,5} = -64,56 \pm 3,13$ mV et $E_{0,5} = -89,71 \pm 5,57$ mV en absence et en présence de TGOT respectivement ($p<0,001$, test t de Student de données appariées). A l'inverse, aucune modification notable du paramètre k dans ces deux conditions n'a pu être relevée : $k = 5,62 \pm 1,99$ mV (contrôle) et $k = 3,90 \pm 0,42$ mV (TGOT).

1.3. Effet de la 4-AP sur l'excitabilité des neurones de la lamina II

En mode courant imposé, des neurones de type *répétitif* ($n=2$) et *phasique* ($n=2$) ont été enregistrés en présence continue de 4-AP (500 nM) afin d'observer d'éventuels effets sur le profil de décharge en PA lorsque les conductances K^+ sensibles à la 4-AP sont bloquées (figure 43). On remarque que la 4-AP est capable de mimer en partie les effets d'une perfusion de TGOT. Ainsi, les neurones au mode de décharge *répétitif* voient leur profil converti en profil *phasique*, avec une diminution importante de la fréquence et du nombre de PA générés pour un saut de courant de +140 pA. De même, les neurones de profil *phasique* sont convertis en type *simple PA*. La phase de repolarisation du premier PA généré n'est pas affectée par la présence de 4-AP. Cependant, quel que soit le profil de décharge en PA, observé en condition contrôle, l'amplitude de l'AHP est fortement diminuée en présence de ce bloqueur ($-65,6 \pm 16,5 \%$; $n=4$; $p<0,05$; test t de Student de données appariées) voire quasi

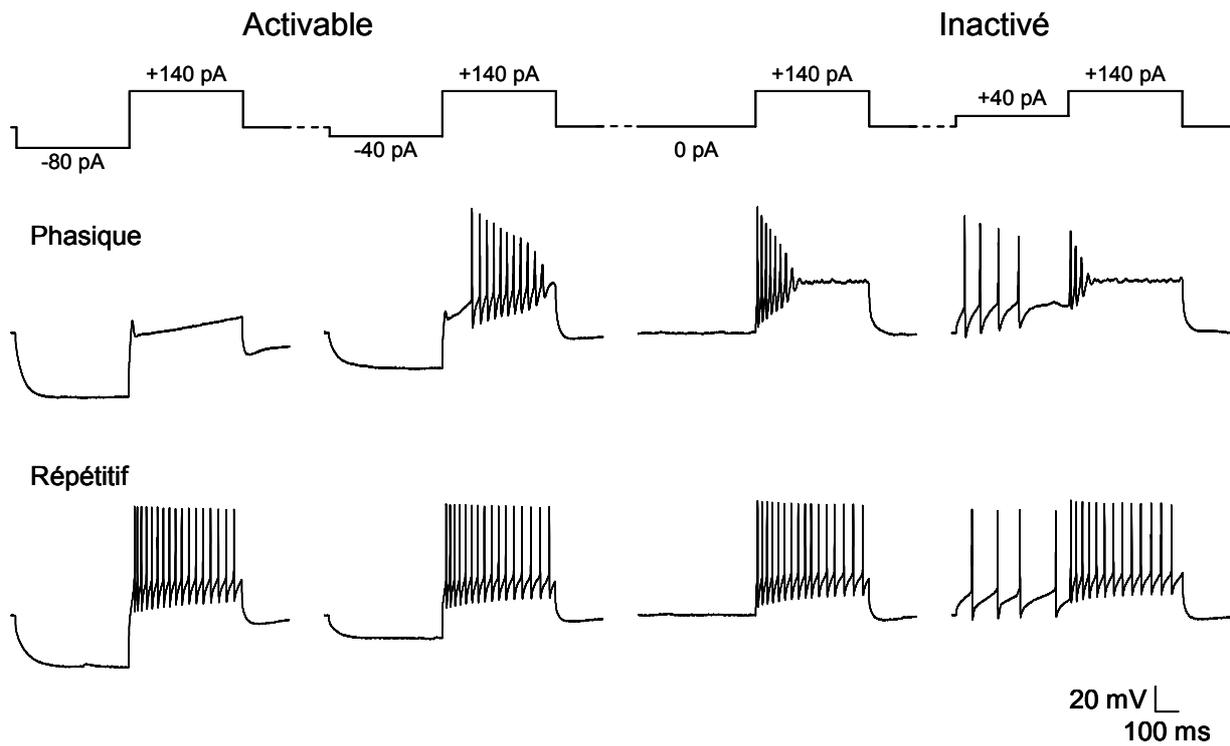


Figure 44 : Le potentiel membranaire de maintien conditionne l'état d'excitabilité des neurones de la lamina II.

Différents créneaux de courant préconditionnant (-80 pA à +40 pA ; incrément de 20 pA), précédant le créneau test (+140 pA), ont été appliqués à la membrane des neurones de la lamina II à partir d'un potentiel de -60 mV. Deux neurones représentatifs (phasique : haut ; répétitif : bas) sont illustrés. L'hyperpolarisation préalable de la membrane tend à augmenter le temps de latence d'apparition du premier PA (neurone phasique). Par ailleurs, des créneaux de courant conditionnant dépolarisant diminuent la fréquence de décharge en PA. Ceci est en plus accompagné par une diminution de l'amplitude de l'AHP (neurone phasique). Le neurone répétitif illustré, ne semble pas être affecté par les sauts de courant conditionnant.

Tableau 16 : Effet du conditionnement du potentiel membranaire sur l'excitabilité des neurones de la lamina II en condition contrôle.

	Retard (hyperpolarisation)	Augmentation de la fréquence des PA (par hyperpolarisation)	Diminution de l'amplitude de l'AHP (par dépolarisation)	Conversion du profil (par dépolarisation)
Répétitif	0 % (n=7)	100 % (n=7)	0 % (n=7)	14 % (n=1/7)
Phasique	80 % (n=4/5)	100 % (n=5)	80 % (n=4/5)	80 % (n=4/5)
Retardé	100 % (n=2/2)	100 % (n=2)	100 % (n=2)	50 % (n=1/2)
Total	36 % (n=5/14)	100 % (n=14)	43 % (n=6/14)	43 % (n=6/14)

Tableau 17 : Effet du conditionnement du potentiel membranaire sur l'excitabilité des neurones sensible à l'application de TGOT (1 μ M) par une diminution de fréquence de décharge en PA en absence de conditionnement membranaire.

	Diminution de la latence d'apparition du 1 ^{er} PA (hyperpolarisation)	Diminution de l'amplitude de l'AHP (dépolarisation)
Répétitif	0 % (n=4)	100 % (n=4)
Phasique	75 % (n=3/4)	100 % (n=4/4)
Retardé	100 % (n=2)	100 % (n=2)
Total	50 % (n=5/10)	100 % (n=10)

Ces données représentent les effets observés en comparaison avec la condition contrôle pour chacun des sauts conditionnant.

inexistante pour deux de ces neurones. Ainsi, l'inhibition des conductances ioniques sensibles à la 4-AP provoque une forte diminution de l'excitabilité des neurones de la lamina II comparable à celle observée par l'activation du récepteur OT. Ceci passe par une inhibition du « réarmement » du neurone pour la décharge suivante par la modulation négative de l'AHP.

2. Incidences fonctionnelles du potentiel membranaire sur l'excitabilité des neurones et les conséquences de l'application d'ocytocine

L'état d'activation et d'inactivation des canaux ioniques dépendants du potentiel membranaire joue un rôle prépondérant dans le conditionnement de l'excitabilité des neurones. Ainsi, en modifiant l'état de ces canaux par un conditionnement du potentiel membranaire avant d'effectuer un créneau de courant dépolarisant permettant la genèse de PA, nous pourrions observer les effets du potentiel membranaire sur l'excitabilité des neurones de la lamina II. La figure 44 présente deux exemples typiques de réponses observées lors du conditionnement du potentiel de membrane ; les résultats sont résumés dans le tableau 16. Lorsque la membrane est au préalable hyperpolarisée, le courant I_A est activable (peu inactivé). Ainsi, il est possible d'observer la présence d'un délai avant la bouffée de PA, comme illustré dans notre exemple (profil *phasique* ; figure 44, haut). Ce résultat est retrouvé pour 80 % des neurones de type *phasique* et amplifié pour 100 % des neurones de type *retardé*. Par contre, aucun neurone de type *répétitif* ne présente ce délai lorsque le potentiel membranaire est au préalable hyperpolarisé (figure 44, bas). On remarque, d'ailleurs, que plus le potentiel membranaire est dépolarisé et plus le nombre de PA est diminué (lors du saut de courant à +140 pA) ; à l'inverse, plus le potentiel membranaire est hyperpolarisé, plus l'excitabilité augmente lors du saut de courant test. Un tel résultat est observé dans l'ensemble des neurones enregistrés quelque soit le profil de décharge en PA. De plus, on remarque que plus le potentiel membranaire est dépolarisé lors du saut conditionnant, plus l'amplitude de l'AHP diminue. Ainsi, 80 % des neurones *phasiques* et 100 % des neurones *retardés* présentent un tel résultat. L'amplitude de l'AHP des neurones de type *répétitif* n'est pas modifiée par la valeur du saut de courant conditionnant. Enfin, on remarque que les neurones sensibles au conditionnement du potentiel de membrane (profils *phasique* et *retardé*) sont convertis en profil de décharge moins excitable : *simple PA* pour les neurones de type *phasique* et *phasique* pour les neurones de type *retardé* (à bouffée de PA tonique) ; lorsque le potentiel membranaire est dépolarisé au préalable.

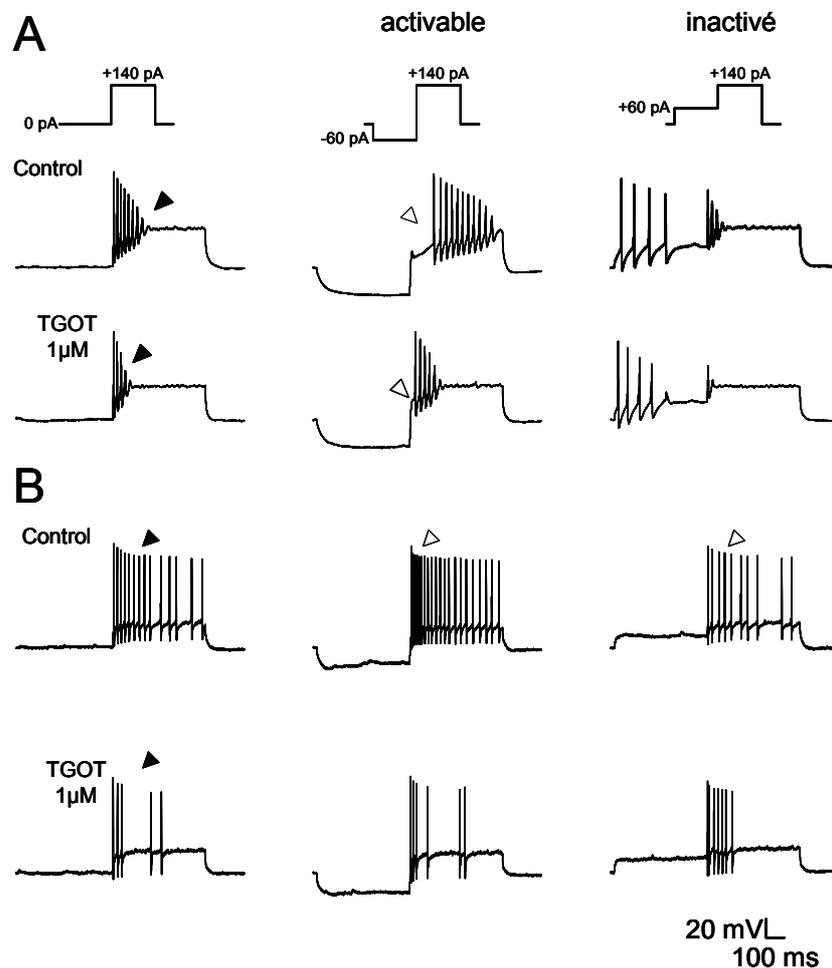


Figure 45 : Conséquence de l'application d'ocytocine sur l'excitabilité des neurones de la lamina II pour des potentiels membranaires conditionnants différents.

Deux neurones, de profils de décharge en PA différents, sensibles à TGOT (1 μM) ont été enregistrés. Le neurone phasique (A), lorsque le potentiel membranaire est hyperpolarisé, montre un délai avant la bouffée de PA durant le créneau de courant de +140 pA. Ce délai est réduit en présence d'OT (flèches blanches). De plus, l'excitabilité de ce neurone est fortement diminuée, quelque soit le créneau de courant conditionnant observé, en présence de TGOT (flèches noires). De la même manière, le neurone de profil répétitif (B) montre une diminution du nombre de PA générés (flèche noire). Il est à noter que plus le créneau de courant est dépolarisant, plus la fréquence des PA générés est diminuée (flèches blanches).

Les neurones qui répondent par une diminution d'excitabilité lors d'une application de TGOT (1 μ M) ont été testés par ce protocole de conditionnement du potentiel membranaire. Les résultats sont résumés dans le tableau 17. Deux paramètres sont étudiés : le temps de latence du premier PA et la variation de l'amplitude de l'AHP et ceci pour chacun des sauts de courant conditionnant en absence et en présence de TGOT (1 μ M). Les résultats nous montrent que le temps de latence d'apparition du premier PA des neurones de type *répétitif* n'est pas modulé lors de l'application de TGOT (figure 45 B). Par contre, 75 % des neurones de type *phasique* et 100 % des neurones de type *retardé* montrent une diminution importante voire une disparition totale du délai lors des sauts conditionnants hyperpolarisants (figure 45 A). L'ensemble des neurones sensibles à l'application de TGOT montre une diminution de l'amplitude de l'AHP lors des sauts conditionnants dépolarisants en comparaison avec la condition contrôle. Enfin, comme précédemment, si l'on compare la fréquence de décharge en PA des neurones avant et après application de TGOT, quelle que soit la valeur du saut de courant conditionnant, on remarque que cette fréquence est diminuée durant l'application de TGOT (figure 45 A [flèches noires] et B [flèches blanches et noires]).

Partie II :

Conséquences fonctionnelles de l'activation
du récepteur de l'ocytocine sur l'activité du
réseau d'interneurones de la lamina II.

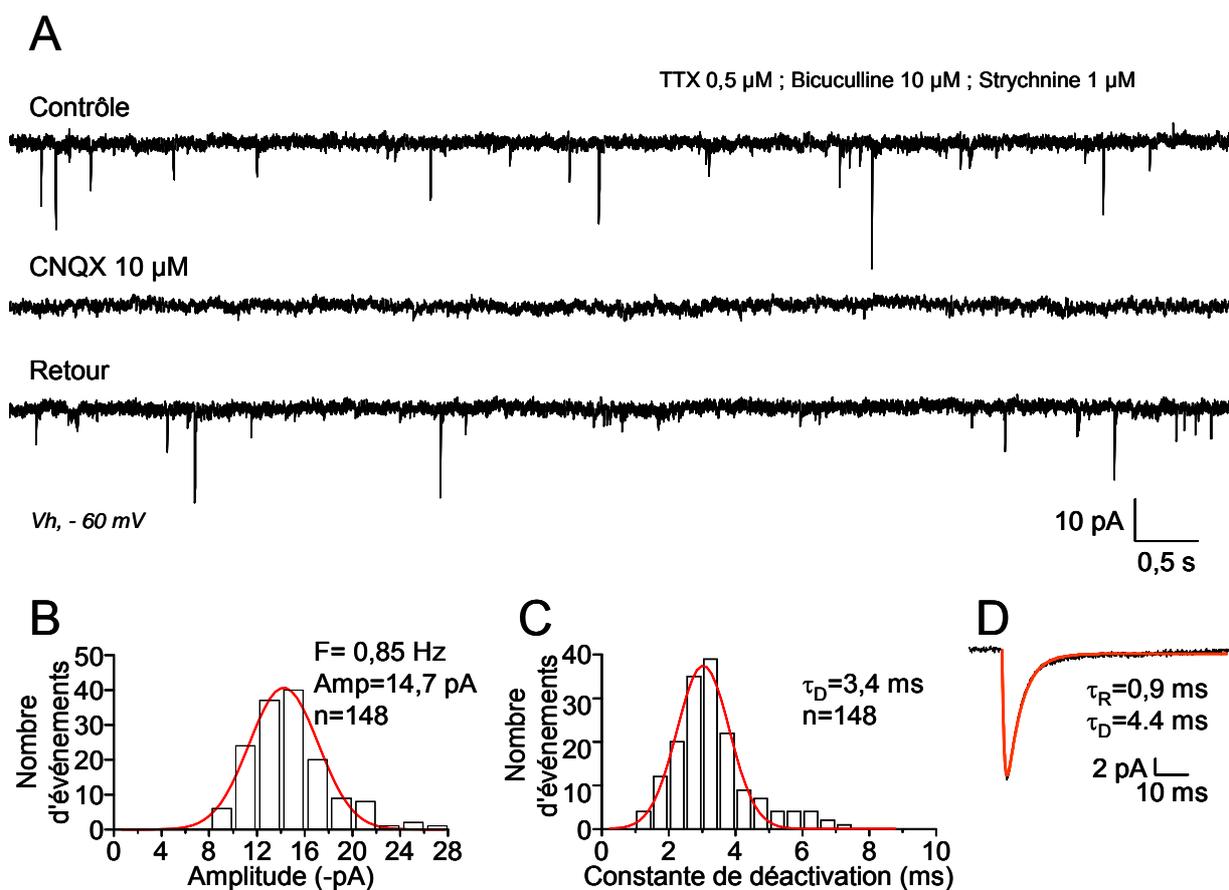


Figure 46 : Caractérisation de la transmission synaptique excitatrice médiée par le récepteur AMPA du glutamate.

A : En présence de bicuculline (10 μ M), de strychnine (1 μ M) et de TTX (0,5 μ M), des événements synaptiques miniatures entrants sont réversiblement inhibés par la perfusion de CNQX, un antagoniste du récepteur ionotropique AMPA du glutamate. Les enregistrements ont été effectués à un potentiel membranaire de maintien de -60 mV.

B et C : Histogramme de répartition des amplitudes (2 pA par colonne) et de la constante de temps de déactivation (τ_D 5-95%, 0,5 ms par colonne) des événements détectés sur une même cellule. La répartition des CPSE miniatures peut être ajusté par une fonction gaussienne. F : fréquence moyenne (Hz) ; Amp : amplitude médiane (pA) ; τ_D : médiane de la constante de déactivation ; n : nombre d'événements.

D : Trace moyennée des CPSE miniatures AMPA obtenus à partir du même neurone. τ_R : constante de temps d'activation.

Tableau 18 : Caractéristiques des CPSE AMPA des neurones de la lamina II

	Amplitude (pA)	τ_R (ms)	τ_D (ms)	Fréquence (Hz)	n
CPSEm	-14,10 \pm 0,87	1,27 \pm 0,07	3,91 \pm 0,17	0,81 \pm 0,17	14
CPSEs	-16,33 \pm 0,82	1,31 \pm 0,10	4,23 \pm 0,26	1,26 \pm 0,47	16

n : nombre de neurones enregistrés.

Les neurones de la lamina II sont organisés en un réseau complexe. Ils peuvent recevoir des informations issues des neurones sensoriels primaires, des interneurons de la lamina II, des couches plus profondes et des centres supramédullaires. Ainsi, il existe une grande diversité de connexions synaptiques dont la nature neurochimique est principalement liée à la libération de glutamate, de GABA et de glycine.

I. Les effets de l'ocytocine sur la transmission synaptique rapide glutamatergique médiée par le récepteur AMPA.

1. Les effets de l'ocytocine sur la transmission synaptique miniature médiée par le récepteur AMPA

Lors des enregistrements, la solution extracellulaire est additionnée de bicuculline (10 μM), de strychnine (1 μM) afin de bloquer la transmission inhibitrice rapide et de TTX (0,5 μM) nécessaire à l'obtention d'une libération vésiculaire indépendante du PA. La solution intrapipette utilisée est la solution 3 ($E_{\text{Cl}^-} = 0 \text{ mV}$; Matériels et Méthode, tableau 8). Ces enregistrements ont été obtenus à partir de tranches de rats âgés de 15 à 30 jours postnataux. Les événements synaptiques enregistrés sont des courants entrants rapides réversiblement bloqués par l'ajout de CNQX (10 μM) dans le bain (figure 46 A) dont le potentiel d'inversion se situe vers 0 mV (non illustré). Ainsi, la transmission synaptique rapide enregistrée, dans nos conditions expérimentales, est médiée par le récepteur glutamatergique AMPA. En effet, à un potentiel membranaire imposé à -60 mV et en présence Mg^{2+} extracellulaire, aucun événement synaptique glutamatergique médié par le récepteur NMDA n'a pu être observé. Les courants postsynaptiques excitateurs miniatures (CPSE miniatures), obtenus à partir de 14 neurones, ont un temps de montée au pic de $1,27 \pm 0,07 \text{ ms}$ et une constante de temps de désactivation rapide de τ_D de $3,91 \pm 0,17 \text{ ms}$. L'amplitude moyenne mesurée des courants est de $-14,10 \pm 0,87 \text{ pA}$ ($n=14$). L'ensemble de ces caractéristiques est illustré dans la figure 46 B à D et le tableau 18. La fréquence d'apparition de ces événements synaptiques miniatures est très variable d'une cellule à l'autre. Ainsi, les fréquences obtenues se répartissent de 0,15 à 2,25 Hz avec une moyenne de $0,81 \pm 0,17 \text{ Hz}$ ($n=14$). Cette variabilité entre les cellules pourrait être le résultat du nombre

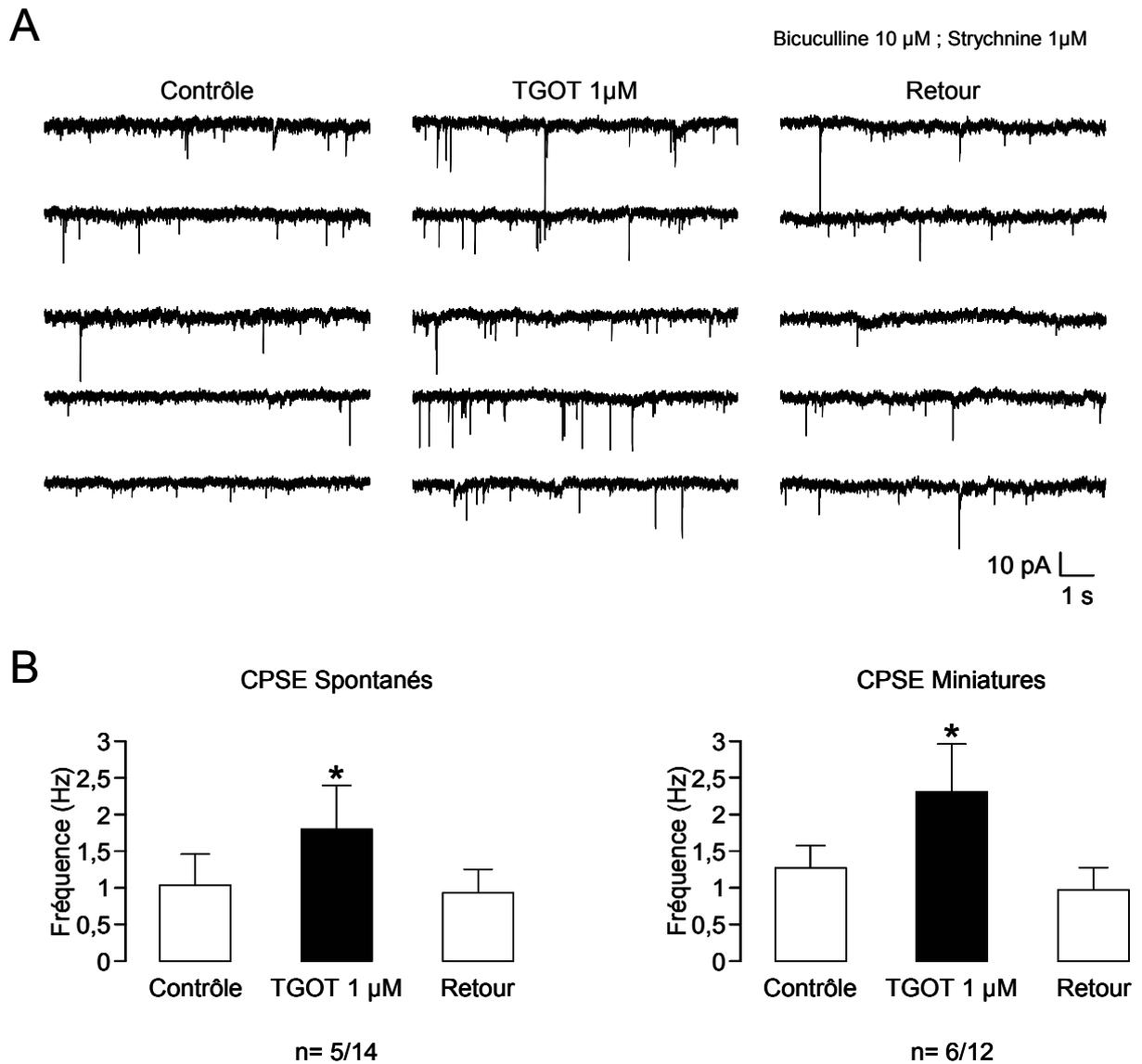


Figure 47 : L'activation du récepteur de l'ocytocine potentialise la libération de glutamate.

A : Traces représentative d'un neurone enregistré en condition contrôle, lors de l'application par bain de TGOT (1 μ M) et lors du lavage. Après un délai d'environ 90 s, l'agoniste du récepteur OT entraîne une augmentation réversible du nombre de CPSE spontanés qui dure environ 30 s. Cet enregistrement a été obtenu à un potentiel membranaire imposé de -60 mV en présence d'une perfusion continue de bicuculline (10 μ M) et de strychnine (1 μ M).

B : La fréquence instantanée d'apparition des CPSE augmente de manière significative que ce soit de l'enregistrement d'événements synaptiques spontanés ou miniatures ($p < 0,05$; test t de Student de données appariées ; comparaisons faites en absence et en présence de TGOT).

Tableau 19 : Modulation des caractéristiques des CPSEm AMPA obtenus en absence et en présence de TGOT (1 μ M).

	Amplitude (pA)	Temps pic (ms)	τ_D (ms)	Fréquence (Hz)	n
Contrôle	$-15,9 \pm 1,40$	$1,20 \pm 0,14$	$3,81 \pm 0,20$	$1,27 \pm 0,30$	6
TGOT	$-12,54 \pm 1,05$	$1,45 \pm 0,19$	$5,85 \pm 0,56$	$2,31 \pm 0,65$	6
	$p < 0,001$	$p < 0,05$	$p < 0,01$	$p < 0,05$	

Les données sont exprimées comme la moyenne \pm l'erreur-type. Les données ont été comparées entre les deux conditions expérimentales en utilisant le test t de Student de données appariées.

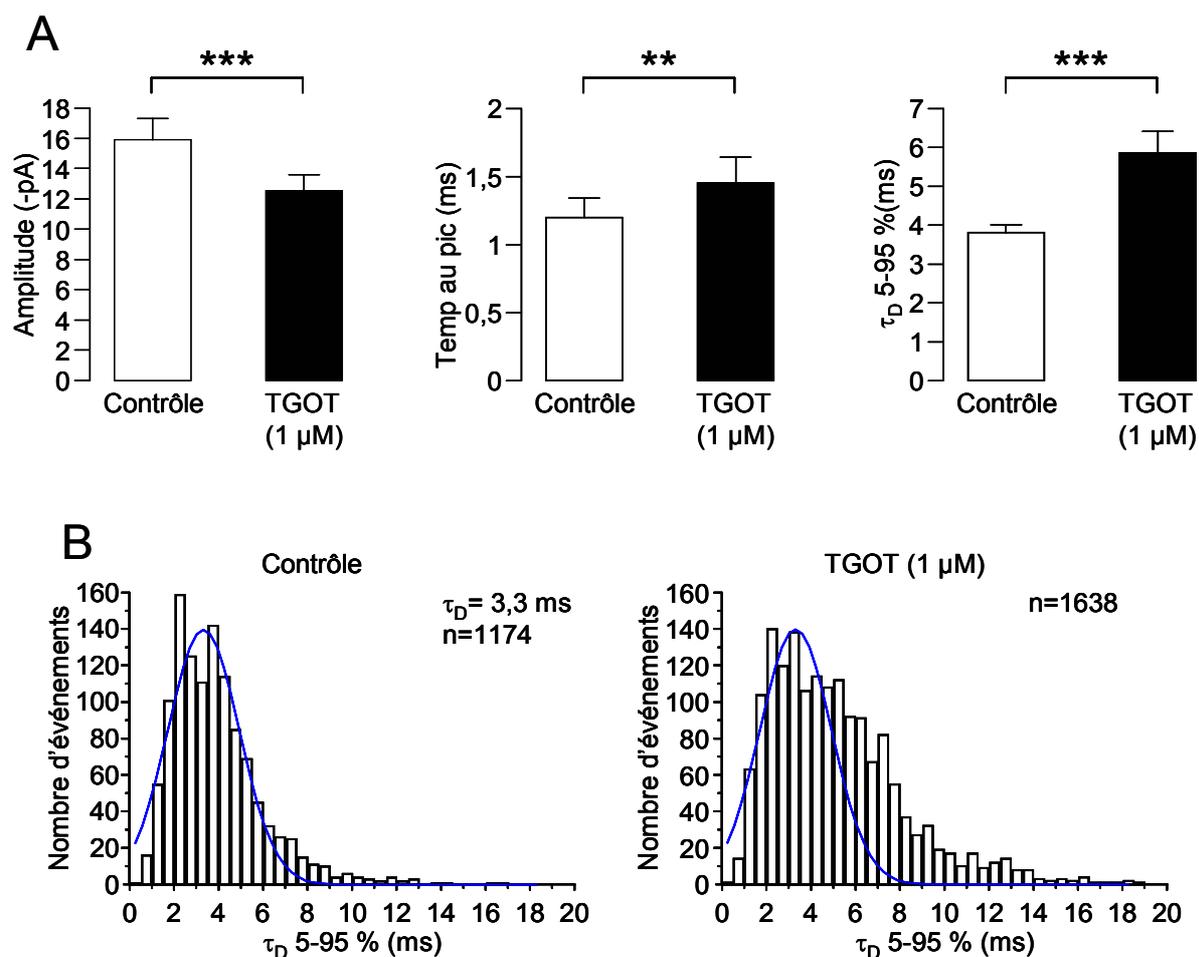


Figure 48 : L'analyse des caractéristiques des CPSE miniatures AMPA suggère que l'activation du récepteur à l'ocytocine révèle des synapses dendritiques distales.

A : L'application exogène de TGOT (1 μ M) diminue significativement l'amplitude moyenne des CPSEm AMPA ($p < 0,001$; test t de Student de données appariées), alors qu'au contraire le temps au pic et τ_D sont augmentés ($p < 0,05$; test t de Student de données appariées).

B : Histogrammes de distribution de τ_D (0,5 ms par colonne) des CPSE miniatures AMPA enregistrés à partir de 6 neurones de la lamina II. En condition contrôle, la répartition des événements peut être approximée par une fonction gaussienne dont le centre est de 3,3 ms. L'effet de TGOT (1 μ M) se caractérise par une augmentation du nombre de CPSE miniatures enregistrés pour une même période de temps. La répartition des événements synaptiques montre que des CPSE miniatures de τ_D plus lents apparaissent en présence de TOGT. Cependant, il est remarquable de voir qu'en présence de TGOT, les événements synaptiques obtenus en conditions contrôle sont toujours présents (courbe bleue). Une nouvelle population de CPSE m AMPA apparaît, sans déplacer la courbe de répartition des événements vers la gauche.

Les CPSE miniatures individuels ont été enregistrés à partir d'un potentiel de membrane de -60 mV en présence de bicuculline (10 μ M), de strychnine (1 μ M) et de TTX (0,5 μ M).

de contacts synaptiques excitateurs que reçoit le neurone enregistré. En effet, plus le neurone sera éloigné de la surface de la tranche et plus la taille de son arbre dendritique sera importante, favorisant la conservation des contacts synaptiques sur les dendrites distales. Ainsi, cette variabilité pourrait être le résultat de l'orientation dans l'espace du neurone enregistré dans la tranche.

Dans les mêmes conditions, les effets de l'application de TGOT (1 μ M) ont été observés. Ainsi, la perfusion par bain de TGOT (durée d'application 5 minutes) entraîne une augmentation transitoire de la fréquence moyenne d'apparition des événements synaptiques de manière réversible (figure 47 B, droite). Cette fréquence moyenne est augmentée significativement de $96,8 \pm 31,1$ % (contrôle : $1,27 \pm 0,30$ Hz ; TGOT : $2,31 \pm 0,65$ Hz ; $p < 0,05$; test t de Student de données appariées) dans 50 % des neurones enregistrés ($n=6/12$). Il est à noter que cet effet est réversible avant la fin de l'application de TGOT. Cette augmentation transitoire apparaît 80 à 100 s environ après le début de l'application de TGOT et dure entre 10 et 50 s (moyenne : $28,8 \pm 6,2$ s ; $n=6$).

Lors de l'enregistrement des CPSE miniatures AMPA, en présence de TGOT, on a pu observer, sur les neurones sensibles à TGOT ($n=6/12$), une modification significative des paramètres suivants : l'amplitude, le temps d'obtention du pic et τ_D (figure 48 A et tableau 19). Ainsi, l'amplitude moyenne des événements synaptiques enregistrés diminue de $20,9 \pm 2,0$ % ($p < 0,001$). De plus, les cinétiques des CPSE miniatures sont ralenties : le temps au pic augmente de $20,9 \pm 4,6$ % ($p < 0,01$) et τ_D augmente de $52,7 \pm 7,9$ % ($p < 0,001$). Ces résultats ont été obtenus pour des durées d'enregistrement de 5 min en absence et en présence de TGOT ($n=1174$ et $n=1638$ CPSE miniatures respectivement). L'analyse statistique utilise un test de Kolmogorov-Smirnov comparant les données obtenues en absence et en présence de TGOT des 6 neurones sensibles.

Cette observation est renforcée lorsque l'on compare les valeurs de τ_D en absence et en présence de TGOT (1 μ M) pour l'ensemble des événements détectés à partir des 6 neurones enregistrés qui présentent une augmentation de fréquence des CPSE miniatures en présence de TGOT. Les τ_D de ces CPSE sont issues de séquences d'enregistrement de 5 min dans les deux conditions expérimentales. La figure 48 B présente les histogrammes de répartition de la constante de temps de désactivation des CPSE miniatures AMPA en condition contrôle et lors de l'application de TGOT (1 μ M). En condition contrôle, la répartition des constantes de temps de désactivation suit une loi binomiale avec un pic à 3,3 ms. Durant l'application de TGOT, on observe un élargissement sans décalage vers la droite de cette répartition. Ceci

correspond à l'apparition d'une population d'événements synaptiques dont la constante de désactivation est plus importante que celle observée pour les CPSE miniatures en condition contrôle.

Nos résultats montrent que l'activation du récepteur OT favorise la libération des vésicules présynaptiques contenant du glutamate et que cet effet est réversible. Nos résultats suggèrent que l'augmentation de fréquence de libération des vésicules de glutamate correspond en fait à l'apparition d'une nouvelle population de CPSE miniatures dans 50 % des neurones enregistrés. Cette population pourrait être issue de l'activation de synapses dendritiques distales dont la libération de glutamate est stimulée par l'activation du récepteur OT (effet présynaptique) ou celui-ci permettrait l'expression de récepteurs AMPA à la membrane (effet postsynaptique) révélant ainsi des synapses silencieuses distales.

2. Les effets de l'ocytocine sur la transmission synaptique spontanée médiée par le récepteur AMPA

Les effets de TGOT (1 μM) ont été testés sur la transmission synaptique spontanée médiée par le récepteur AMPA. Les CPSE spontanés ont été enregistrés à partir de 16 neurones de la lamina II de rats âgés de 15 à 30 jours postnataux, pour un potentiel de maintien de -60 mV. La transmission synaptique inhibitrice a été bloquée en perfusant de manière continue de la bicuculline (10 μM) et de la strychnine (1 μM). La solution intrapipette utilisée dans cette étude est la solution 3 ($E_{\text{Cl}^-} = -60$ mV) additionnée de QX314 (2,5 mM). Le QX314 est un bloquant des canaux Na^+ dépendants du potentiel membranaire, appartenant à la famille des anesthésiques locaux comme la lidocaïne. Cette substance permet de bloquer les PA générés par le neurone enregistré lorsque les PPSE sont suffisants pour atteindre le seuil de déclenchement des PA. Le QX314 est hydrophile et ne diffuse pas hors de la cellule limitant ainsi son action uniquement sur les canaux Na^+ du neurone enregistré.

En condition contrôle, la fréquence moyenne des CPSE spontanés enregistrés est de $1,26 \pm 0,47$ Hz ($n=16$), valeur comparable à la fréquence obtenue lors de l'enregistrement des CPSE miniatures. Les caractéristiques de ces courants synaptiques sont résumées dans le

tableau 18. L'amplitude est de $-16,33 \pm 0,82$ pA, le temps d'obtention du pic est de $1,31 \pm 0,10$ ms et τ_D est de $4,23 \pm 0,26$ ms.

Lors de la perfusion de TGOT (1 μ M, durée 5 min), on a pu observer une augmentation transitoire et significative de la fréquence moyenne des CPSE spontanés (figure 47 A et B, gauche) qui passe de $1,04 \pm 0,42$ Hz (contrôle) à $1,79 \pm 0,60$ Hz (TGOT) soit une augmentation de 103 ± 27 % ($p < 0,05$; test t de Student de données appariées; $n=5/14$). Cette augmentation, comme lors de l'enregistrement des CPSE miniatures, est observée pour une fraction de 36 % des neurones de la lamina II ($n=5/14$). Cependant, aucune différence significative n'a été observée dans le nombre de cellules sensibles à l'application de TGOT entre les conditions d'enregistrement des CPSE spontanés et miniatures (test d'indépendance dans un tableau de contingence). Ainsi, l'activation du récepteur OT entraîne un effet comparable sur la fréquence moyenne des CPSE dans ces deux conditions. L'effet sur la fréquence de libération des CPSE spontanés apparaît entre 80 et 90 s après le début de l'application de TGOT et sa durée est variable, comprise entre 10 et 50 s (moyenne de $30 \pm 6,9$ s ; $n=5$), soit des durées similaires à celles rencontrées lors de l'effet de TGOT sur les CPSE miniatures.

II. Effet de l'ocytocine sur la transmission synaptique rapide glycinergique

La transmission inhibitrice a été largement décrite dans le laboratoire par les travaux de Keller *et al.* (2001). Elle est constituée d'une transmission synaptique rapide médiée par le récepteur GABA_A et par le récepteur de la glycine. Les courants postsynaptiques inhibiteurs spontanés (CPSI spontanés) glycinergiques ont été enregistrés à un potentiel membranaire de -60 mV en utilisant une solution intracellulaire 3 ($E_{Cl^-} = 0$ mV) et en présence continue dans le milieu extracellulaire d'un antagoniste des récepteurs ionotropiques du glutamate : l'acide kynurénique (2 mM) afin de bloquer la composante excitatrice de la transmission synaptique rapide médiée par les récepteurs ionotropiques du glutamate rencontrés dans notre préparation : les récepteurs AMPA et NMDA. De plus, de la bicuculline (10 μ M) est perfusée pour bloquer la transmission synaptique rapide GABAergique médiée par le récepteur GABA_A. Ainsi, les CPSI spontanés glycinergiques ont été enregistrés isolés pharmacologiquement.

Une application de TGOT (1 μ M, durée d'application 90 secondes) par bain a été réalisée sur 5 neurones de la lamina II. Aucune modification qu'elle soit pré ou postsynaptique n'a pu être observée : fréquence instantanée (contrôle : $0,47 \pm 0,21$ Hz ; TGOT : $0,52 \pm 0,22$ Hz) ; amplitude (contrôle : $-94,16 \pm 32,10$ pA ; TGOT : $-81,34 \pm 25,24$ pA). Ainsi, il ne semble pas, dans ces conditions expérimentales, que l'activation des récepteurs de l'OT affecte la transmission synaptique inhibitrice glycinergique.

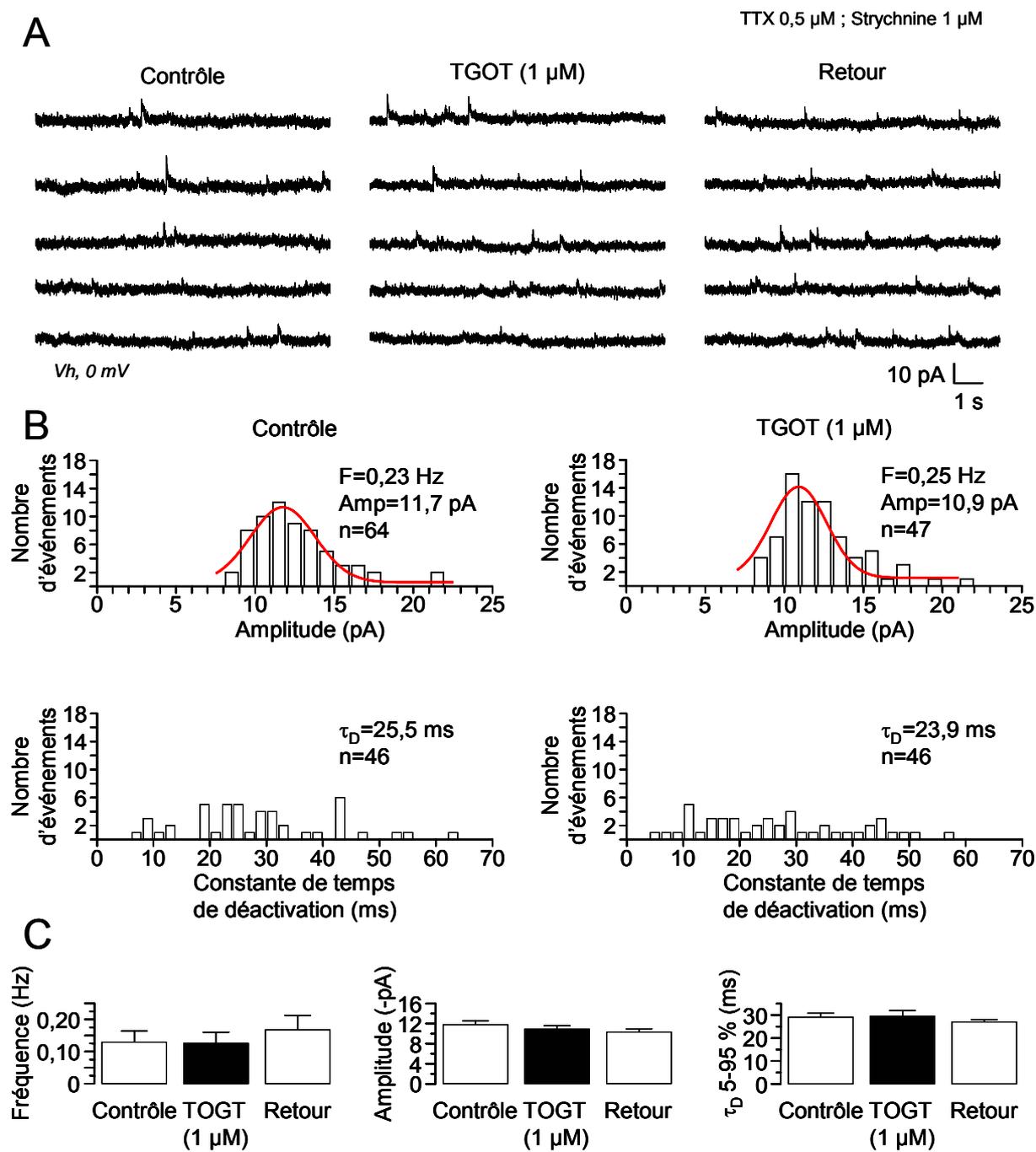


Figure 49 : L'ocytocine n'a aucun effet pré et postsynaptique sur la transmission GABA_A miniature.

A : Traces représentatives de l'enregistrement des CPSI miniatures GABA enregistrés en absence, en présence de TGOT (1 μ M) et après lavage. Aucune modification du nombre d'événements synaptiques détectés est observable.

B : Histogrammes de répartition de l'amplitude (haut) et de la constante de temps de déactivation (bas) des CPSI miniatures GABA_A enregistrés à partir d'un même neurone en absence et en présence de TOGT (1 μ M). La répartition des événements peut être ajustée par une fonction gaussienne en ce qui concerne l'amplitude des CPSI miniatures. Aucune modification de la répartition des événements synaptiques pour les deux paramètres étudiés n'est observable. F : fréquence (Hz) ; Amp : amplitude moyenne (pA) ; τ_D : constante de temps de déactivation (ms) ; n : nombre d'observations.

C : Histogrammes représentant les valeurs moyennes de la fréquence, de l'amplitude et de τ_D en absence, en présence de TGOT et après lavage. Aucune variation notable de ces différents paramètres n'a pu être mise à jour (n=6).

Les enregistrements électrophysiologiques ont été effectués en présence de TTX (0,5 μ M) et strychnine (1 μ M) à un potentiel imposé de 0 mV.

III. Effet de l'ocytocine sur la transmission synaptique rapide GABAergique miniature médiée par le récepteur GABA_A

Les CPSI miniatures GABAergiques ont été enregistrés de manière à ce que la transmission synaptique rapide glutamatergique soit laissée libre. Les enregistrements ont été obtenus en utilisant la solution intrapipette 2 (tableau 8, Matériels et Méthodes) où $E_{Cl^-} = -60$ mV. Le milieu extracellulaire contient de la strychnine (1 μ M) et de la TTX (0,5 μ M). Dans ces conditions, des courants synaptiques rapides entrants sensibles au CNQX sont observés à un potentiel de maintien de -60 mV (CPSE miniatures AMPA) sans enregistrer des CPSI miniatures GABAergiques (non illustré). A un potentiel de maintien de 0 mV, des courants sortants rapides sensibles uniquement à la bicuculline sont enregistrés (CPSI miniatures GABA_A). Les enregistrements ont été réalisés à un potentiel de maintien de 0 mV afin d'observer les effets de TGOT (1 μ M) sur la transmission synaptique GABAergique miniature médiée par le récepteur GABA_A. Les expériences ont été pratiquées sur des tranches de moelle épinière de rats âgés de 15-30 jours postnataux.

Des applications de TGOT (1 μ M) ont été effectuées à partir de 6 neurones de la lamina II. La durée de l'application a été de 90 s. La figure 49 montre que la perfusion de TGOT (1 μ M) n'entraîne aucune modification de la fréquence moyenne d'apparition des CPSIm (n=6) : $0,13 \pm 0,03$ Hz (contrôle) ; $0,12 \pm 0,04$ Hz (TGOT). De même, τ_D (contrôle : $29,06 \pm 3,83$ ms ; TGOT : $29,5 \pm 2,48$ ms ; n=6) et l'amplitude (contrôle : $11,68 \pm 0,78$ pA ; TGOT : $10,81 \pm 0,73$ pA ; n=6) ne sont pas affectées pendant le traitement de TGOT.

Dans ces conditions d'enregistrement, l'absence d'effet sur les différents paramètres observés permet d'affirmer que les récepteurs OT ne se trouvent pas au niveau des terminaisons présynaptiques des neurones GABAergiques et, d'autre part, qu'au niveau postsynaptique l'application aiguë (90 s) de TGOT ne provoque aucune modulation du récepteur GABA_A.

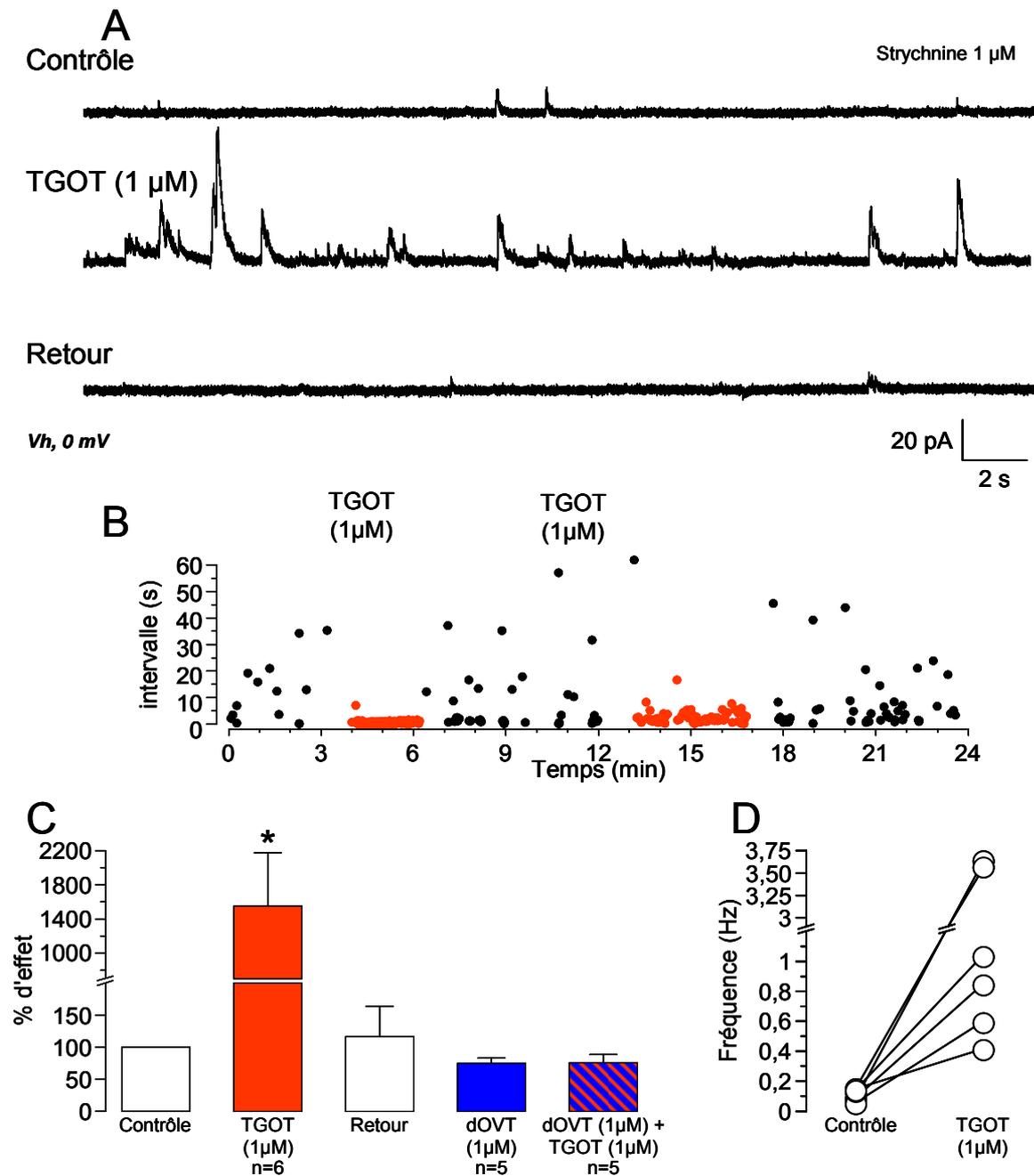


Figure 50 : L'ocytocine module positivement la transmission synaptique GABAergique spontanée médiée par le récepteur GABA_A.

A : TGOT (1 μM) augmente réversiblement la fréquence d'apparition des CPSI spontanés GABA_A enregistrés à partir d'un neurone représentatif.

B : Graphique représentant l'évolution de l'intervalle de temps entre les CPSI spontanés GABA_A enregistrés lors d'applications successives de TGOT (1 μM), comparée à la condition contrôle (100 %). On note une augmentation réversible de la fréquence instantanée des CPSI spontanés GABA suite à l'application de TGOT. Chaque point représente un événement synaptique et en rouge, les événements appartenant à l'effet de TGOT.

C : Histogramme représentant le pourcentage d'effet de l'application de TGOT (1 μM) sur la fréquence moyenne des CPSI spontanés GABA_A. En présence de TGOT, la fréquence est très fortement augmentée ($p < 0,05$; test t de Student de données appariées ; $n=6$). Cependant, cet effet est complètement bloqué lors d'une co-application de TGOT (1 μM) avec dOVT (1 μM).

D : (○) représente la répartition très hétérogène des fréquences moyennes des neurones testés lors de l'effet de TGOT.

Les enregistrements ont été effectués à un potentiel de membrane de 0 mV en présence de strychnine (1 μM).

IV. Effet de l'ocytocine sur la transmission synaptique rapide GABAergique spontanée médiée par le récepteur GABA_A

Ici, les CPSI spontanés GABAergiques sont enregistrés dans les mêmes conditions de solution intrapipette et de potentiel de maintien que précédemment. Le milieu extracellulaire est composé d'ACSF additionné de strychnine (1 μ M). La perfusion de TGOT (1 μ M, application de 90 s) entraîne une augmentation réversible de la fréquence d'apparition des CPSI spontanés GABA_A (figure 50 A et B), de plus, cet effet est partiellement reproductible lors d'une deuxième application, cependant le délai nécessaire pour retrouver un effet similaire après le début de l'application est augmenté (figure 50 B). Ceci est certainement dû à une modification de l'excitabilité du réseau de neurone de la lamina II par TGOT. En effet, après la première application, la fréquence moyenne des CPSI spontanés revient à son niveau de base. Cependant, l'activation du récepteur OT peut avoir modifié l'activité globale du réseau que l'on observe lors d'une nouvelle application. Ainsi, en condition contrôle la fréquence instantanée d'apparition des événements synaptiques se disperse de 0,06 à 0,16 Hz (moyenne de $0,12 \pm 0,02$ Hz ; n=6) pour s'étaler de 0,42 à 3,65 Hz (moyenne de $1,69 \pm 0,61$ Hz ; n=6) en présence de TGOT (figure 50 D), soit une augmentation moyenne significative de 1543 ± 568 % (p<0,05 ; test t de Student de données appariées ; figure 50 C). Ces observations sont obtenues pour tous les neurones enregistrés (n=6). L'effet apparaît entre 52 et 197 s après le début de l'application de TGOT (moyenne : 109 ± 22 s ; n=6) et la durée de l'effet est très variable entre 37 et 356 s (moyenne : 221 ± 45 s ; n=6).

Lorsque l'antagoniste dOVT (1 μ M) est perfusé dans le bain, la fréquence moyenne des CPSI spontanés GABA_A enregistrés est diminuée de $25,45 \pm 8,53$ % (n=5) par rapport à la condition contrôle. Cependant, on n'observe pas de différence significative avant et après application de dOVT (figure 50 C). Sur les mêmes neurones, lorsque TGOT est co-appliqué avec dOVT en concentration équimolaire (1 μ M), aucune variation de la fréquence d'apparition des CPSIs n'est observable (réduction de $23,96 \pm 15,22$ % par rapport à la condition contrôle ; n=5 ; figure 50 C).

Lorsqu'on étudie l'amplitude des événements synaptiques GABA_A spontanés en condition contrôle et après l'application de TGOT, il peut apparaître des événements synaptiques de plus grandes amplitudes, isolés ou bien résultant de la sommation temporelle de plusieurs CPSIs (figure 50 A). Cependant, les amplitudes moyennes des neurones enregistrés sont de $11,11 \pm 1,53$ pA en contrôle et de $12,90 \pm 1,72$ pA en présence de TGOT (n=6) et ne

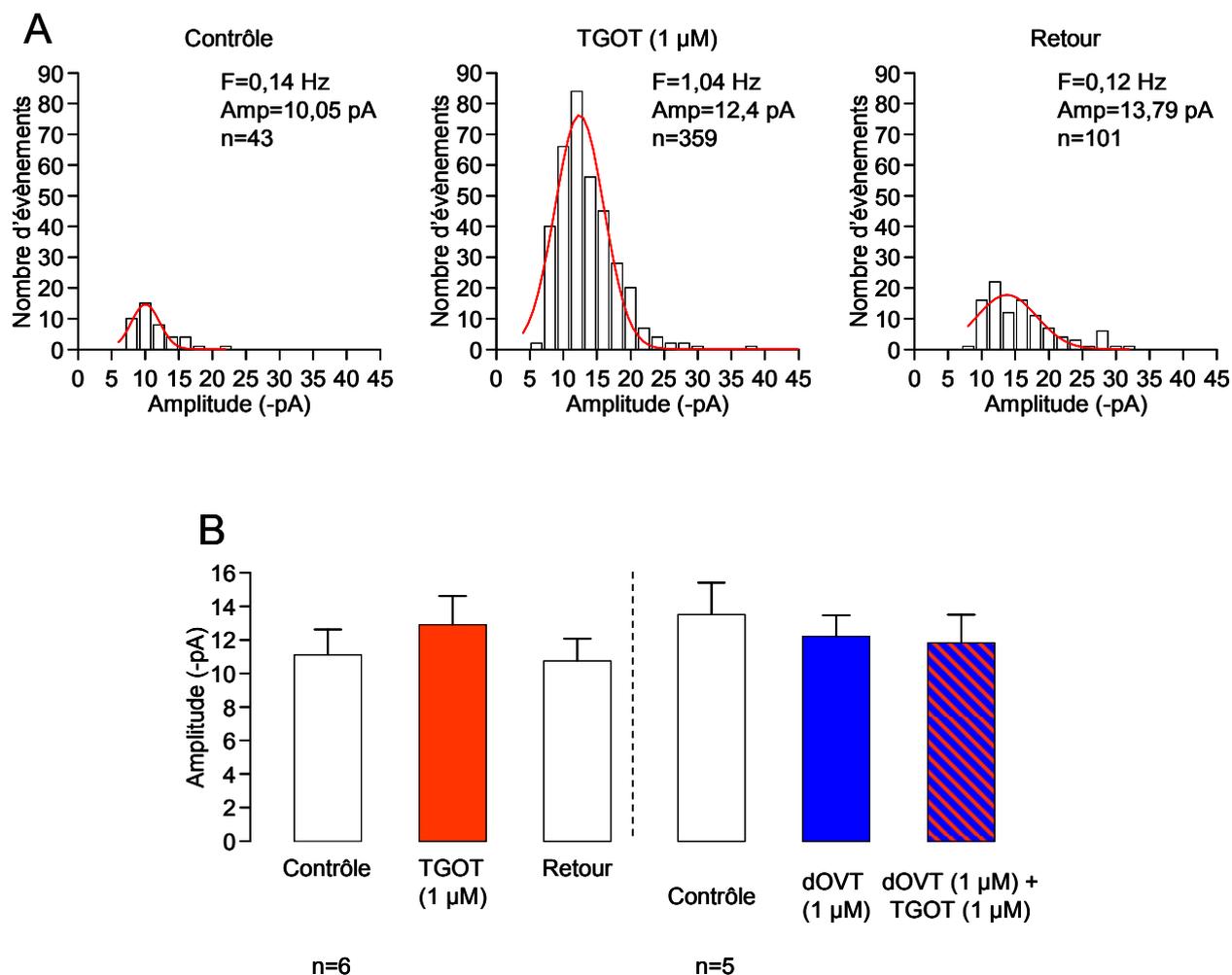


Figure 51 : L'ocytocine n'a aucun effet sur l'amplitude des CPSI spontanés GABA_A.

A : Histogramme de répartition des amplitudes (2 pA par colonne) des CPSI spontanés GABA en condition contrôle, lors de l'application de TGOT et après lavage pour une cellule représentative (durée d'enregistrement de 5 min pour chaque condition). Aucune variation de la répartition de l'amplitude des événements synaptiques détectés n'est observable (test non paramétrique de Kolmogorov-Smirnov). Celle-ci peut être ajusté par une fonction gaussienne. F : fréquence (Hz) ; Amp : amplitude moyenne (pA) ; n : nombre d'événements.

B : Les agonistes et antagonistes du récepteur OT utilisés n'entraînent pas de variation significative de l'amplitude moyenne des CPSI spontanés GABA enregistrés.

présentent aucune différence statistique dans ces deux conditions (figure 51 B gauche). Les événements synaptiques observés en condition contrôle et en présence de TGOT se distribuent selon des gaussiennes avec des médianes quasi identiques (contrôle : 10,1 pA ; TGOT : 12,4 pA ; retour : 13.8 pA ; figure 51 A). Enfin, l'amplitude des CPSI spontanés n'est pas modifiée par l'application de dOVT seul ($12,22 \pm 1,27$ pA ; n=5) ou co-appliqué avec TGOT ($-11,83 \pm 1,70$ pA ; n=5), voir figure 51 B droite.

Ainsi, l'activation du récepteur OT induit une augmentation de la fréquence de libération des vésicules GABAergiques. Cependant, nos résultats suggèrent que les terminaisons GABAergiques ne possèdent pas le récepteur OT. Cet effet est le résultat d'une modification de l'activité du réseau d'interneurones stimulant la libération de GABA, donc favorisant l'inhibition dans ce réseau.

Tableau 20 : Modulation des caractéristiques des CPSI GABA_A par TGOT (1 μM) lorsque la transmission synaptique glutamatergique est inhibée.

		Amplitude (pA)	τ_D (ms)	Fréquence (Hz)
CPSI GABA _A Spontanés	Contrôle n=9	-21,0 ± 1,4	32,7 ± 2,2	0,20 ± 0,05
	TGOT n=9	-25,5 ± 3,4	35,0 ± 2,0	0,53 ± 0,16 n=5/9 ; p<0,01
CPSI GABA _A miniatures	Contrôle n=6	-26,8 ± 2,1	29,5 ± 1,5	0,14 ± 0,03
	TGOT n=6	-25,5 ± 2,7	31,1 ± 1,6	0,13 ± 0,02

Les résultats sont exprimés comme la moyenne ± l'erreur-type. Les différences statistiques sont données par un test t de Student de données appariées par comparaison des résultats obtenus en condition contrôle et TGOT.

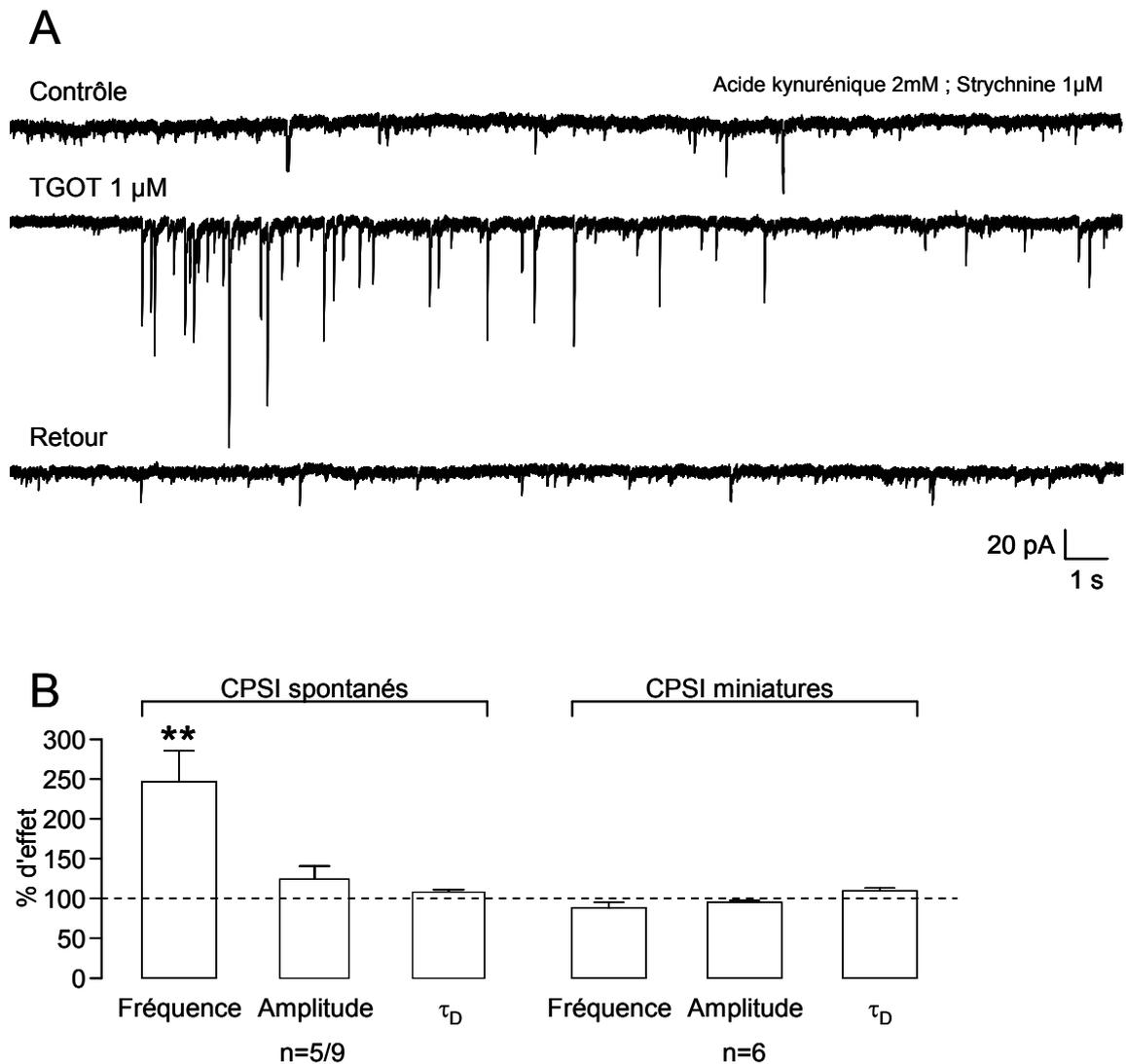


Figure 52 : La transmission synaptique glutamatergique, médiée par les récepteurs ionotropiques du glutamate, modulée par l'ocytocine est impliquée de façon majeure dans la stimulation de la libération de GABA.

A : Traces électrophysiologiques montrant l'apparition des CPSI spontanés GABA en absence, en présence de TGOT (1 µM) et après lavage lorsque les récepteurs ionotropiques glutamatergiques sont bloqués. La perfusion de TGOT provoque une augmentation réversible et brève (voir texte) du nombre de CPSI spontanés observés en comparaison avec les données obtenues lorsque les CPSE ne sont pas inhibés (figure R17).

B : Histogramme représentant les pourcentages d'effet de TGOT sur la fréquence, l'amplitude, et τ_D des CPSI comparés par rapport à la condition contrôle (ligne pointillée). Seule la fréquence des CPSI spontanés est modulée positivement lors de la perfusion de TGOT ($p < 0,01$; $n=5/9$ neurones enregistrés ; test t de Student de données appariées). En condition d'enregistrement des événements miniatures, aucune modification notable de ces paramètres n'est observable.

Les enregistrements ont été effectués en présence d'une application continue, dans le milieu extracellulaire, d'acide kynurénique (2mM) et de strychnine (1 µM) pour l'enregistrement des CPSIs GABA, avec en plus, de la TTX (0,5 µM) pour l'enregistrement des CPSI miniatures. Le potentiel de membrane a été imposé à -60 mV.

V. Contribution des récepteurs ionotropiques du glutamate à la libération du GABA dans des conditions de libération spontanée

Comme nous l'avons vu précédemment, l'activation du récepteur OT favorise l'inhibition GABAergique par une modulation de l'activité du réseau de neurones de la lamina II. De plus, nous avons pu observer que l'activation du récepteur OT favorisait la libération de glutamate d'une sous-population de neurones glutamatergiques de la lamina II. Ainsi, l'activation des neurones GABAergiques lors d'une application de TGOT, en absence de TTX, pourrait être due à une augmentation de la libération présynaptique de glutamate agissant sur les récepteurs glutamatergiques des neurones GABAergiques. Il semble donc judicieux d'observer les effets de l'application de TGOT en absence de transmission synaptique excitatrice rapide.

Les enregistrements ont été effectués à un potentiel membranaire imposé de -60 mV en utilisant la solution intracellulaire 3 où $E_{Cl^-} = 0$ mV. Les neurones sont perfusés de manière continue avec de la strychnine (1 μ M) et de l'acide kynurénique (2 mM) pour l'enregistrement des CPSI spontanés GABA_A isolés pharmacologiquement. De la TTX (0,5 μ M) est ajoutée dans la solution extracellulaire dans les cas où nous souhaitons enregistrer les CPSI GABA_A miniatures.

Comme précédemment (paragraphe III de la partie résultats), les CPSI GABA_A miniatures enregistrés à partir de 6 neurones de la lamina II ne sont pas modulés lors de l'application de TGOT (1 μ M, application de 90 s). Les résultats sont résumés dans le tableau 20 et la figure 52 B. Par contre, lorsque l'on observe la transmission synaptique GABAergique spontanée, la perfusion de TGOT (1 μ M, application de 90 s) provoque une augmentation transitoire de la fréquence d'apparition des événements synaptiques détectés sur une fraction (56%) des neurones enregistrés (n=5/9, figure 52 A). Ainsi, la fréquence instantanée des CPSI spontanés augmente de $146,7 \pm 38,4$ % ($p < 0,01$; n=5 ; test t de Student de données appariées). Il est à noter que la durée de l'effet (30 secondes au maximum) est moins importante que lors d'applications de TGOT sur des tranches où les récepteurs ionotropiques du glutamate ne sont pas bloqués. De plus, l'augmentation de fréquence observée peut être reproduite lors d'une deuxième application avec un effet similaire.

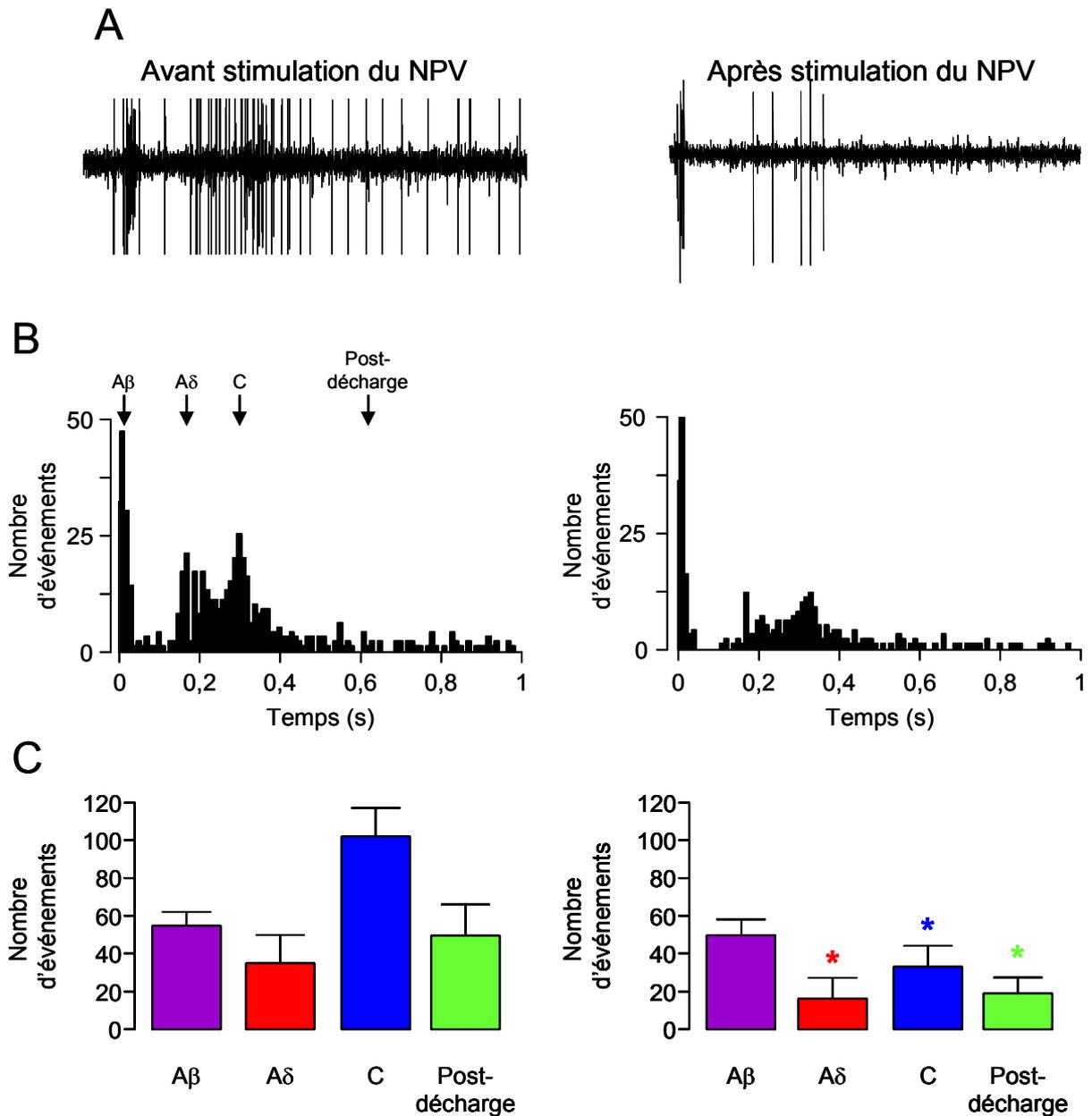


Figure 53 : La stimulation du noyau paraventriculaire inhibe sélectivement les entrées sensorielles nociceptives des neurones de la lamina II.

A : Enregistrement de la réponse d'un neurone de la lamina II suite à une stimulation nociceptive. Le neurone enregistré émet une série de bouffées de PA dont la durée est fortement réduite à la suite de la stimulation du NPV.

B : Les graphiques présentent le nombre de PA enregistrés en réponse à une stimulation nociceptive avant et après activation du NPV. En fonction du temps de propagation de chacune des fibres sensorielle (Aβ, Aδ et C), il est possible de discerner chacune des bouffées illustrées en A.

C : Les histogrammes présentent le nombre de PA générés par le neurone de la lamina II en réponse à une stimulation nociceptive en fonction du type d'entrée sensorielle et de la post-décharge. Suite à la stimulation du NPV, le neurone émet moins de PA en réponse à la stimulation des fibres sensorielles nociceptives. Il est à noter que la post-décharge est elle aussi inhibée.

* : $p < 0,05$; test t de Student de données appariées.

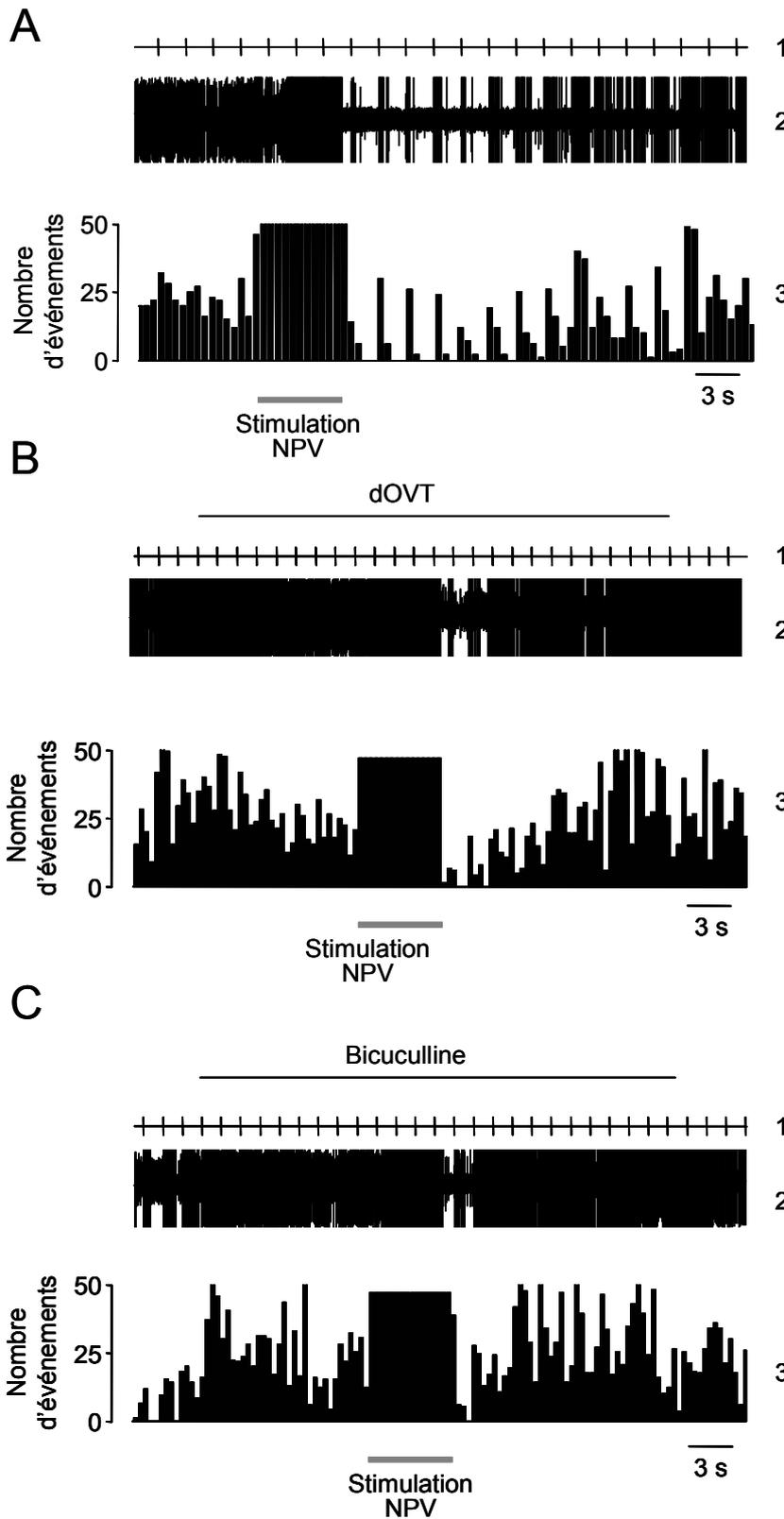


Figure 54 : La stimulation du noyau paraventriculaire inhibe la réponse électrophysiologique des neurones de la lamina II par un mécanisme dépendant du récepteur OT et du GABA.

Des enregistrements unitaires de neurones de la lamina II ont été effectués par la technique d'enregistrement *in vivo*. La stimulation électrique nociceptive du champ récepteur correspondant au neurone enregistré provoque l'émission de PA. Cette réponse est partiellement et transitoirement inhibée lors d'une stimulation du NPV (A). Par contre cet effet est antagonisé lorsque, à proximité du neurone enregistré, sont appliquées des substances comme le dOVT (B) ou la bicuculline (C) (enregistrements obtenus à partir du même neurone).

1 : Artéfact de stimulation électrique du champ récepteur au niveau de la patte postérieure.

2 : Variation du potentiel membranaire du neurone enregistré. Chaque barre verticale correspond à un PA.

3 : Histogramme représentant le nombre de PA observés au cours du temps (0,5 s par colonne).

VI. Conséquences fonctionnelles de l'activation du récepteur ocytocine sur l'activité des neurones de la lamina II *in vivo* lors de stimulations nociceptives.

Les résultats obtenus à la fois sur l'étude des effets de l'activation du récepteur OT sur l'excitabilité des neurones et sur les différentes transmissions synaptiques nous montrent que l'activation de ce récepteur modifie profondément l'activité électrique des neurones de la lamina II, mais aussi l'activité synaptique. Cependant, toutes ces expériences ont été menées *in vitro*. Nos conditions expérimentales ne nous permettent pas de montrer une action directe de la stimulation de la source médullaire d'OT, c'est-à-dire le noyau paraventriculaire (NPV). Dans le cadre d'une collaboration avec l'équipe du Dr Miguel Condés-Lara, nous avons pu, grâce à l'utilisation d'une approche électrophysiologique *in vivo*, observer les effets de l'activation du NPV sur l'activité des neurones de la lamina II lors de stimulations nociceptives. Les résultats obtenus permettent de conforter certains de nos résultats obtenus *in vitro* et permettent aussi de mieux appréhender la modulation de l'activité de ce réseau de neurones, ainsi que l'articulation des neurones entre eux.

Les neurones de la lamina II de rats mâles adultes (300 g) ont été enregistrés en utilisant la technique d'enregistrement extracellulaire. La méthode utilisée est décrite dans la section Matériels et Méthodes (section 2). La pipette d'enregistrement recueille les réponses du neurone consécutives à des stimulations électriques nociceptives du champ récepteur situé au niveau de la patte postérieure, du côté ipsilatéral au neurone enregistré. Cette stimulation permet d'activer les fibres sensorielles primaires A β , A δ et C. En réponse à l'activation de ces fibres, le neurone de la lamina II émet alors des PA qui sont recueillis par la pipette d'enregistrement extracellulaire. Le temps de latence entre le début de la stimulation du champ récepteur et l'enregistrement des bouffées de PA permet d'associer chacune de ces bouffées avec l'activation d'un type précis de fibres sensorielles primaires en se basant sur leurs vitesses de conduction (figure 53, gauche).

Les figures 53 et 54 A présentent les enregistrements électrophysiologiques typiques obtenus lors de stimulations électriques du NPV. Le nombre de PA émis par le neurone enregistré suite à la stimulation nociceptive est comptabilisé pour chaque type de fibres sensorielles activées. Les résultats sont exprimés en % d'effet moyen par rapport au contrôle (avant la stimulation du NPV). Ces moyennes sont obtenues en comptabilisant le nombre de

Tableau 21: Pourcentage d'effet de la modulation des réponses des fibres sensorielles enregistrées au niveau des neurones de la lamina II suite à une stimulation électrique du NPV.

	A β	A δ	C	Post-décharge	n
Stimulation NPV	3,2 \pm 9,1	-54,0 \pm 14,4	-72,1 \pm 9,3	-50,2 \pm 9,4	15
NPV + dOVT	7,8 \pm 10,9	-26,8 \pm 13,5	33,2 \pm 10,4	10,6 \pm 11,7	15
NPV + Bic	-16,9 \pm 9,3	-3,9 \pm 23,1	-16,4 \pm 22,2	14,2 \pm 13,5	14

Les données sont exprimées en pourcentage d'effet par rapport à la condition contrôle (avant stimulation du NPV et/ou application des substances pharmacologiques).

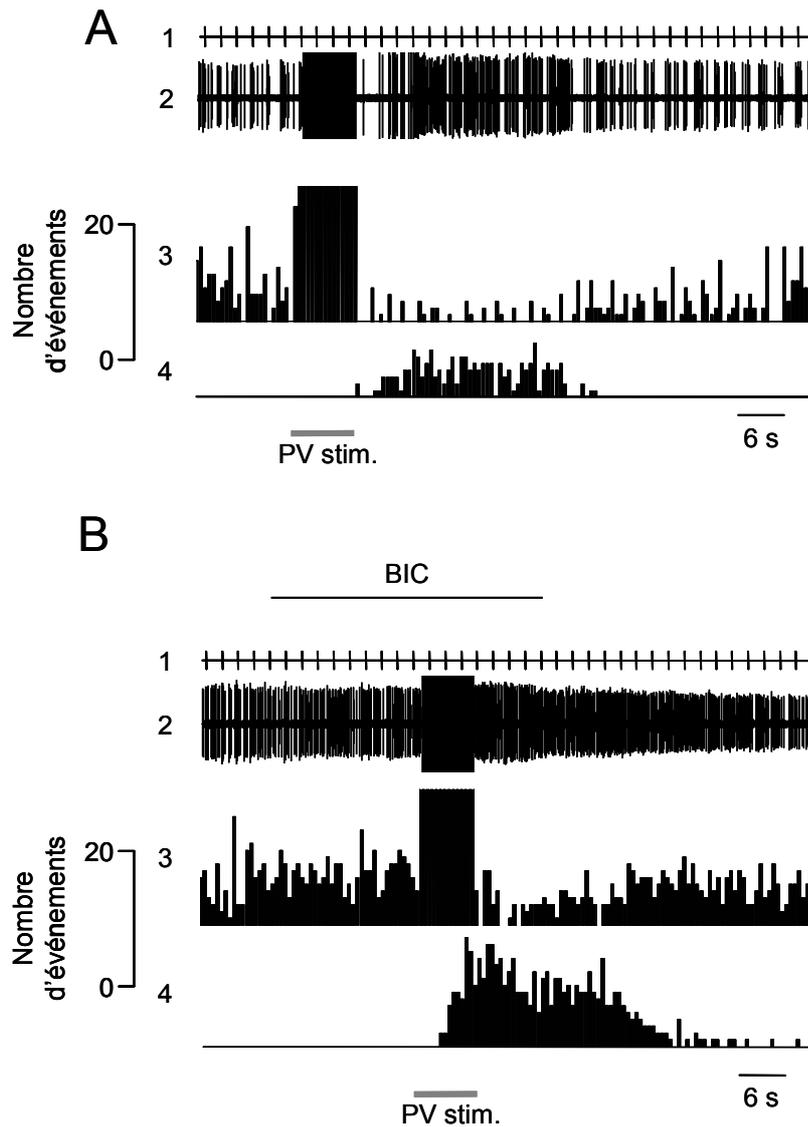


Figure 55 : La stimulation du noyau paraventriculaire inhibe les neurones nociceptifs et permet l'activation d'un autre neurone non nociceptif.

Lors de l'activation du NPV, il est possible de discriminer deux neurones dont les réponses à cette stimulation sont opposées en observant la taille des PA dans les bouffées lors de l'enregistrement. Le neurone qui répond aux stimulations nociceptives est inhibé transitoirement lors de l'activation du NPV. En parallèle, un neurone ne possédant pas d'entrées nociceptives est activé transitoirement suite à la stimulation du NPV (A). Par la suite, l'application de bicuculline sur les mêmes neurones ne modifie pas la réponse du neurone activé par la stimulation nociceptive (3), alors que le neurone activé par la stimulation du NPV (4) à une réponse exacerbée (en comparaison avec A 4). De plus, le temps de latence du neurone activé par le NPV est diminué. Ces effets sont dus à une levée d'inhibition GABAergique des entrées inhibitrice de ce neurone par la bicuculline.

1 : Artéfact de stimulation électrique du champ récepteur au niveau de la patte postérieure.

2 : Variation du potentiel membranaire du neurone enregistré. Chaque barre verticale correspond à un PA.

3 : Histogramme représentant le nombre de PA observés au cours du temps du neurone inhibé par l'activation du NPV (0,5 s par colonne).

4 : Histogramme représentant le nombre de PA observés au cours du temps du neurone stimulé par l'activation du NPV (0,5 s par colonne).

PA générés pour les 16 stimulations nociceptives précédent et suivant la stimulation électrique du NPV. L'ensemble des résultats obtenus est résumé dans le tableau 21.

Lorsque le NPV est activé par stimulation électrique, le nombre de PA observés est transitoirement diminué, montrant ainsi que l'activation du NPV induit une inhibition des neurones enregistrés (n=15, figure 53). Cette inhibition affecte uniquement les réponses des fibres sensorielles primaires A δ et C ($-54,0 \pm 14,4$ % ; $-72,1 \pm 9,3$ % respectivement ; $p < 0,05$; n=15). De même, cette inhibition affecte la post-décharge des neurones de la lamina II ($-50,2 \pm 9,4$ % ; $p < 0,05$; n=15). Ces effets sont partiellement inhibés lorsque, à proximité du neurone enregistré (n=15), un antagoniste du récepteur OT (dOVT) est appliqué de manière continue avant la stimulation électrique du NPV (figure 54 B ; tableau 21). Ainsi, l'activation du NPV inhibe l'activité des neurones de la lamina II suite à une stimulation nociceptive.

Lorsque la transmission synaptique GABAergique rapide est inhibée par l'application locale de bicuculline (n=14), l'effet inhibiteur obtenu lors de l'activation du NPV est bloquée (figure 54 C ; tableau 21). Ainsi, la stimulation électrique du NPV induit libération d'OT qui produit une inhibition GABAergique.

Lors de la stimulation de NPV, en plus du neurone enregistré en condition contrôle qui est transitoirement inhibé, il a été possible, dans certains cas (n=11), de distinguer au sein de l'enregistrement l'activation transitoire d'un second neurone, proche de la pipette d'enregistrement, jusque-là silencieux (figure 55 A). Il se différencie du neurone inhibé par une amplitude de PA plus petite. Le neurone activé ne semble pas posséder les mêmes entrées sensorielles que le neurone inhibé, du fait qu'il ne répond pas à la stimulation nociceptive précédant l'activation du NPV. C'est cette dernière qui permet l'activation transitoire de ce neurone. Par la suite, lors de la perfusion continue de bicuculline, après une nouvelle stimulation du NPV, on remarque que son excitabilité est augmentée. Ceci se caractérise par une diminution de la latence d'activation de ce neurone et par une augmentation du nombre de PA générés suite à la stimulation du NPV (figure 55 B). Ce neurone est donc stimulé spécifiquement par l'activation du NPV et ne possède pas le même champ récepteur que le neurone inhibé par la stimulation du NPV. De plus, les résultats montrent que ce neurone possède des entrées inhibitrices GABAergiques.

Partie III :

Conséquences fonctionnelles d'une inflammation périphérique sur les neurones de la lamina II

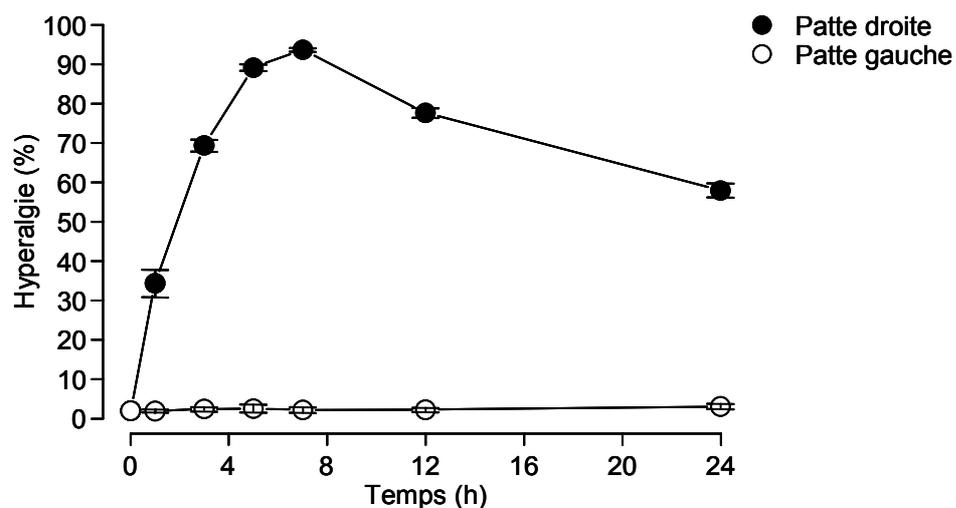


Figure 56 : L'inflammation périphérique induite par l'injection de λ -carragénine provoque une hyperalgie mécanique.

L'hyperalgie mécanique induite par l'injection de λ -carragénine 3 % se développe assez rapidement jusqu'à atteindre un maximum 7 heures après son injection dans la patte postérieure droite de l'animal. Aucune variation de la sensibilité mécanique de la patte gauche (non injectée) n'est observable tout au long des mesures expérimentales.

L'hyperalgie mécanique est mesurée par l'application d'une pression mécanique donnée en gramme sur la patte (test de la pince BIOSEB). Le point obtenu à $t=0$ h avant l'injection constitue le référentiel soit, 0 % d'hyperalgie. Lors du développement du phénotype inflammatoire, chaque mesure est comparée à $t=0$ h afin de donner le pourcentage d'hyperalgie au temps donné avec la formule suivante : $H(t)=100 \times \{ [P(0)-P(t)] / P(0) \}$; où $H(t)$ est le pourcentage d'hyperalgie mesurée au temps t ; $P(0)$ est le poids appliqué sur la patte au temps $t=0$ h et $P(t)$ est le poids appliqué au temps t .

Le réseau de neurones de la lamina II intègre les informations sensorielles périphériques nociceptives. Ces neurones jouent un rôle fondamental dans le traitement précoce de ces informations « douloureuses » car ils réalisent un premier filtre avant le transfert de l'information vers les neurones de projection puis vers les structures supramédullaires. Afin de mieux appréhender le rôle de l'OT dans la modulation de l'excitabilité des neurones de la lamina II, nous avons souhaité observer l'activité de ce réseau dans des conditions pathologiques. Dans ce travail, nous avons opté pour le développement d'un modèle animal de douleur inflammatoire périphérique par l'injection sous-cutanée d'une substance inflammatoire, la λ -carragénine, dans la patte postérieure. Ce modèle présente plusieurs avantages. En effet, le phénotype inflammatoire et le comportement douloureux sont atteints rapidement au bout de quelques heures. Le phénotype douloureux persiste 3 à 10 jours selon la modalité sensorielle testée.

I. Caractérisation du modèle animal de douleur inflammatoire périphérique par un test de sensibilité mécanique

Une inflammation périphérique a été réalisée sur un groupe de 19 animaux adultes (poids <250g) en injectant dans la patte postérieure droite une solution de λ -carragénine 3 % (100 μ l), la patte gauche servant de contrôle. Au cours du développement de l'inflammation, l'hyperalgie mécanique a été testée sur les deux pattes 1, 3, 5, 7, 12 et 24 heures après l'injection. La figure 56 présente l'évolution du phénotype inflammatoire au cours du temps. Deux facteurs ont été analysés : le côté mesuré et le temps, avec mesures répétées sur le même animal. L'analyse de variance (ANOVA) montre un effet significatif de chacun des deux facteurs, ainsi que de l'interaction entre eux ($p < 0,001$). L'hyperalgie mesurée se développe très rapidement pour atteindre une valeur maximale de $93,6 \pm 0,5$ % ($p < 0,001$; $n=19$; test de comparaison multiple de Tukey) 7 heures après l'injection de λ -carragénine et diminuer à une valeur de $57,1 \pm 1,8$ % 24 heures après l'injection intraplantaire de λ -carragénine ($p < 0,001$; $n=19$; test de comparaison multiple de Tukey). Parallèlement, la patte gauche non-injectée ne présente aucune modification de la sensibilité mécanique.

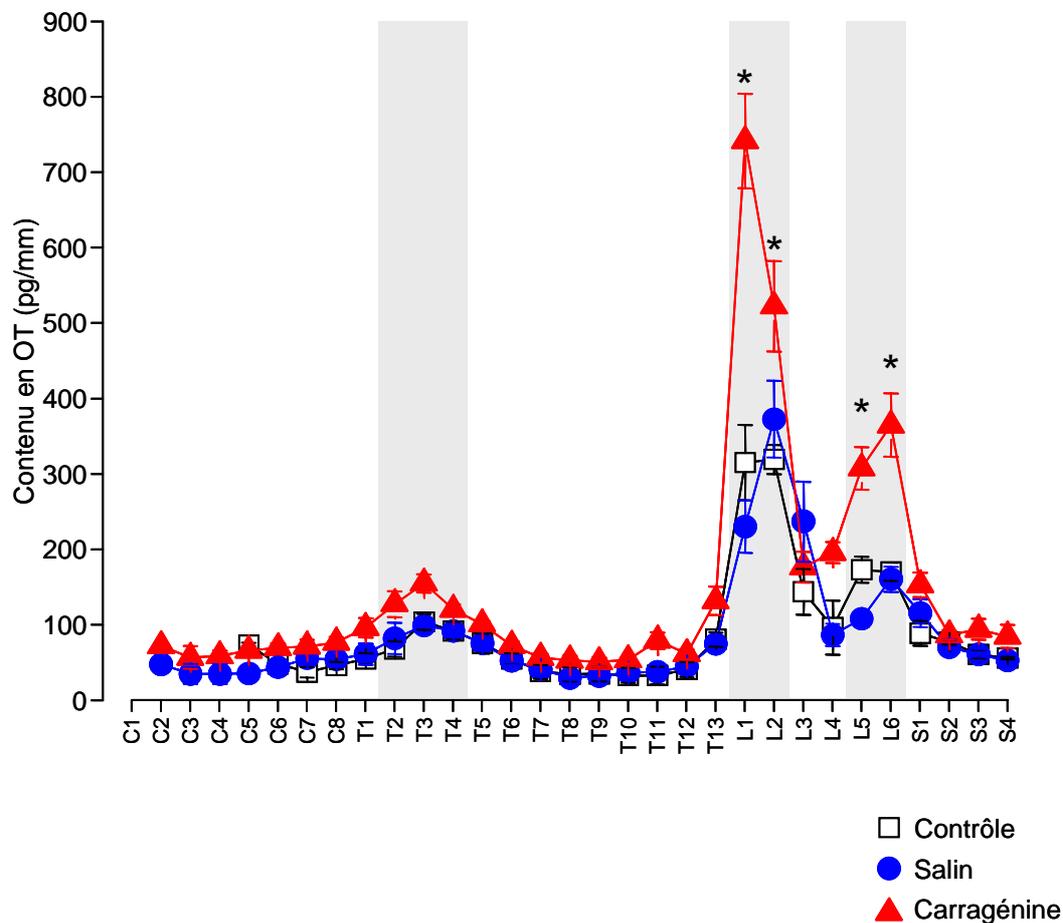


Figure 57 : L'induction d'une inflammation périphérique par la carragénine entraîne une augmentation des contenus médullaires en ocytocine.

Le graphique représente les contenus en OT mesurés par la technique de dosage radio-immunologique chez trois groupes d'animaux adultes : un groupe contrôle non injecté, un groupe Salin (NaCl 9 ‰) et un groupe λ -carragénine (3%). Pour ces deux derniers, des injections bilatérales ont été réalisées au niveau des voûtes plantaires des pattes postérieures. Le dosage des contenus en OT a été effectué tout le long de la moelle épinière 24 h après les injections intraplantaires. Le profil du dosage présente trois pics aux niveaux thoracique (vertèbre T3) et lombaire (vertèbres L1-L2 et L5-L6) en condition contrôle. Le groupe d'animaux Salin présente un profil tout à fait similaire à la condition contrôle. Par contre, lors d'une inflammation, le groupe λ -carragénine montre d'une manière globale une augmentation des contenus en OT tout le long de la moelle. Le contenu en OT est significativement augmenté par rapport aux contrôles des pics lombaires L1-L2 ($p < 0,05$) et L5-L6 ($p < 0,05$; ANOVA à 2 facteurs suivie d'un test de Tukey).

II. Les taux médullaires d'ocytocine sont augmentés lors d'une inflammation périphérique

Des dosages des contenus en OT médullaires ont été réalisés chez des rats mâles adultes (>350 g) par la technique de dosage radio-immunologique. Trois groupes d'animaux ont été considérés : un groupe contrôle (n=3), un groupe NaCl (n=4) et un groupe λ -carragénine 3 % (n=5). Ces deux derniers ont été obtenus en pratiquant une injection bilatérale, dans la voûte plantaire des pattes postérieures, de solution saline NaCl 9 ‰ ou de λ -carragénine 3 % (100 μ l).

24 h après l'induction de l'inflammation, dans une phase où 60 % environ de l'hyperalgie mécanique persiste, les animaux sont sacrifiés afin de prélever la moelle épinière. Deux facteurs ont été analysés : le traitement (injection intraplantaire, facteur inter-groupes) et la localisation vertébrale (facteur intra, avec mesures répétées sur le même animal). L'analyse de variance (ANOVA) montre un effet significatif de chacun des deux facteurs, ainsi que de l'interaction entre eux ($p < 0,001$). Les contenus mesurés tout le long de la moelle épinière (figure 57) montrent en condition contrôle, un niveau basal (de 40 pg/mm environ), ainsi que trois pics situés au niveau thoracique T3 ($103,9 \pm 10,6$ pg/mm), lombaire L1-L2 ($317,0 \pm 34,7$ pg/mm) et L5-L6 ($171,4 \pm 14,6$ pg/mm). Un profil tout à fait similaire est observable avec le groupe d'animaux salin. Par contre, le groupe d'animaux inflammatoires se démarque des deux autres groupes par une augmentation globale moyenne des contenus en OT d'un facteur 1,6 sans présenter de différence significative des niveaux cervicaux, thoraciques et sacrés. Cependant, les pics d'OT lombaires sont significativement augmentés de 135,4 % en L1 ($741,5 \pm 62,7$ pg/mm ; n= 5 ; $p < 0,05$; Test de comparaison multiple de Tukey) et 114,4 % en L6 ($364,5 \pm 41,8$ pg/mm ; n=5 ; $p < 0,05$; test de comparaison multiple de Tukey).

Ainsi, lors d'une inflammation induite dans les pattes postérieures, la présence d'OT est augmentée 24 heures après l'induction de l'inflammation périphérique par la λ -carragénine, où l'hyperalgie résiduelle est de $57,1 \pm 1,8$ %. L'augmentation des contenus en OT observée lors de l'inflammation pourrait résulter d'un accroissement de la libération des vésicules ocytocinergiques dans les étages médullaires.

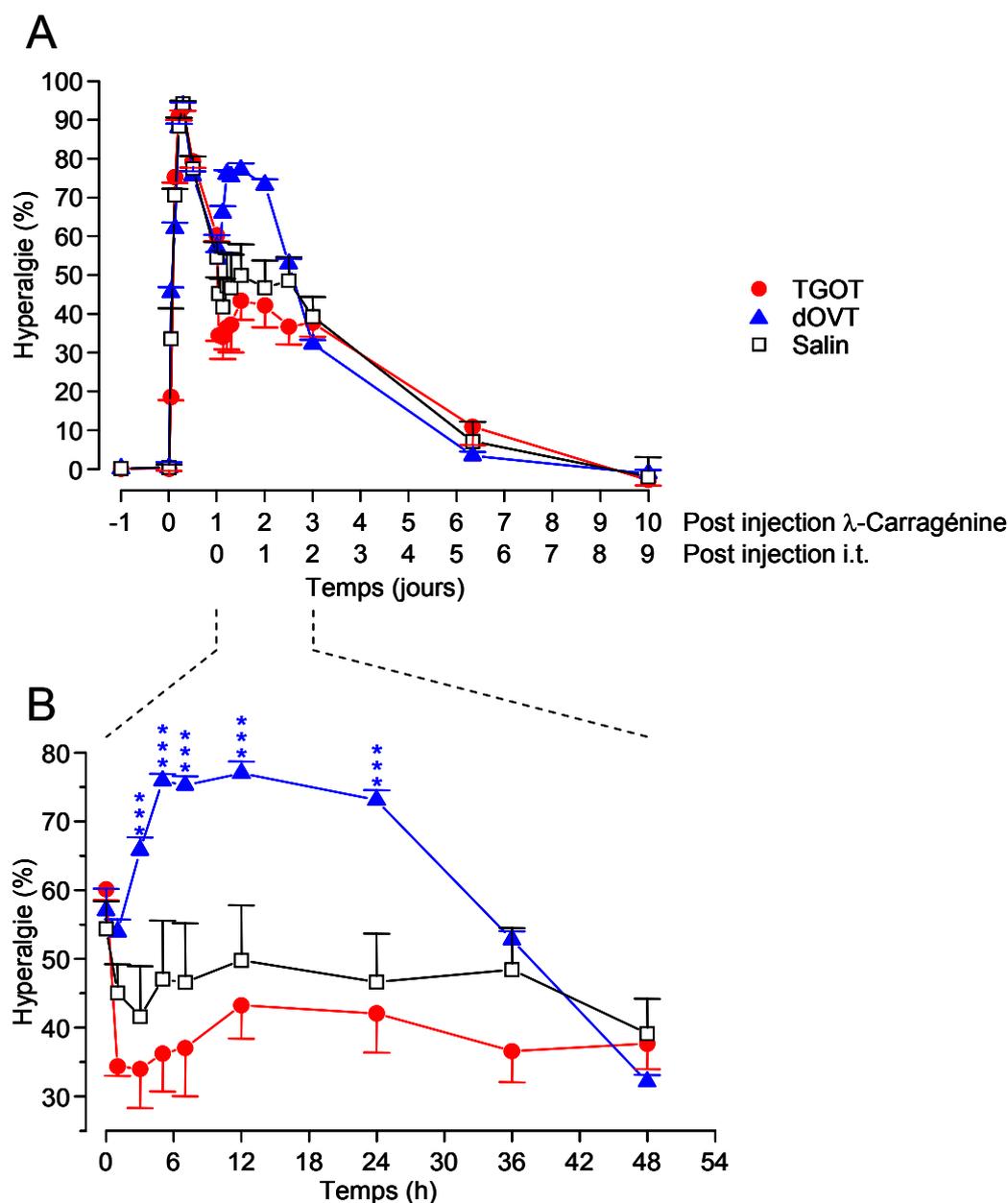


Figure 58 : Au cours de l'inflammation induite par la carragénine, l'inhibition des récepteurs OT entraîne une hyperalgie mécanique soutenue.

Trois groupes d'animaux ont reçu une injection de λ -Carragénine 3 % dans la patte droite. 24 heures après le développement du phénotype inflammatoire et de l'hyperalgie associée, chaque groupe reçoit une injection i.t. unique de solution NaCl 9 ‰ (10 μ l), de TGOT (10 ng/10 μ l) ou de dOVT (10 ng/10 μ l). Les graphiques représentent l'évolution de l'hyperalgie mécanique, mesurée sur la patte injectée, en fonction du temps (vue générale en A et en B, vue centrée entre 0 et 48 heures après l'injection i.t.). Les trois groupes d'animaux développent une hyperalgie similaire durant les 24 premières heures, qui se caractérise par un pic à 7 heures après l'injection de carragénine. Le traitement intrathécal (à 24 heures) des trois groupes d'animaux induit une hyperalgie différente en fonction de l'injection réalisée. Le traitement des animaux par un antagoniste du récepteur OT (dOVT) provoque une reprise importante de l'hyperalgésie (\approx 75 %), maximale 5 heures après le traitement et se maintenant 24 heures. Le traitement par TGOT n'entraîne pas de différence significative de l'hyperalgie par rapport au contrôle. 48 heures après l'i.t., le décours de l'hyperalgie mécanique des trois groupes d'animaux est similaire et elle disparaît totalement 10 jours après l'induction de l'inflammation périphérique. Parallèlement la patte gauche non-injectée ne présente aucune modification de sensibilité mécanique durant toute la durée de l'expérience.

Injection i.t. : Injection intrathécale. *** : $p < 0,001$; test de Tuckey comparé par rapport au groupe Salin.

III. Modulation de l'hyperalgie mécanique lors d'une inflammation périphérique

24 heures après le début de l'inflammation, les animaux sont répartis en trois groupes. Chacun d'eux reçoit une injection intrathécale (10 μ l) soit de solution saline NaCl 9 % (n=6), soit de dOVT (10 ng, n=7), soit de TGOT (10 ng, n=6) afin de tester une modulation éventuelle de l'hyperalgie résiduelle ($57,1 \pm 1,8$ %) observée 24 heures après l'injection intraplantaire de λ -carragénine. La sensibilité mécanique des deux pattes des animaux de chacun des groupes est mesurée au cours du temps comme le montre la figure 58 A. Trois facteurs ont été analysés : le traitement (injection i.t., facteur inter-groupes), le temps et la patte mesurée (facteurs intra, avec mesures répétées sur le même animal). L'analyse de variance (ANOVA) montre un effet significatif de chacun des trois facteurs, ainsi que de l'interaction entre eux ($p < 0,001$). Les tests paramétriques de comparaison multiple *a posteriori* (test de Tukey) indiquent que l'injection de dOVT provoque une reprise importante de l'hyperalgie (figure 58 B), qui atteint un maximum de $76,0 \pm 1,0$ % à 5 heures ($p < 0,001$, n=7) après l'injection intrathécale (i.t.) et se maintient pendant 24 heures. L'injection de TGOT (n=6) n'induit pas de différence significative avec le groupe contrôle (NaCl, n=6). 48 heures après l'i.t., les trois groupes d'animaux présentent une hyperalgie similaire (NaCl : $37,6 \pm 4,2$ % ; dOVT : $31,8 \pm 0,8$ % ; TGOT : $37,7 \pm 3,7$ %).

Ainsi, il apparaît que dans des conditions d'inflammation périphérique résultant d'une injection de λ -carragénine dans la patte postérieure, l'apport d'un antagoniste spécifique du récepteur OT induit une reprise importante de l'hyperalgie. Ainsi, l'activation du récepteur OT, par une libération tonique d'OT endogène, induirait un effet hypoalgique. Comme les résultats le montrent, l'effet du blocage de ce récepteur est assez rapide car trois heures après l'injection i.t. de dOVT, la reprise d'hyperalgie est significative. De plus, l'apport d'un agoniste spécifique du récepteur OT ne modifie pas la sensibilité mécanique en réponse à une stimulation nociceptive en comparaison avec le groupe d'animaux contrôle. Ceci suggère que l'OT endogène présente dans la moelle épinière est à un niveau maximum et que l'apport d'un agoniste du récepteur OT ne permet pas d'augmenter l'effet hypoalgique par activation du récepteur OT.

L'inflammation produit une augmentation des contenus en OT médullaire 24 h après l'injection de λ -carragénine. En parallèle, le blocage du récepteur OT par l'injection intrathécale d'un antagoniste du récepteur OT provoque une hyperalgie. Ces résultats

suggèrent que durant l'inflammation, l'OT est libérée afin de limiter l'hyperalgie mécanique associée à cette inflammation.

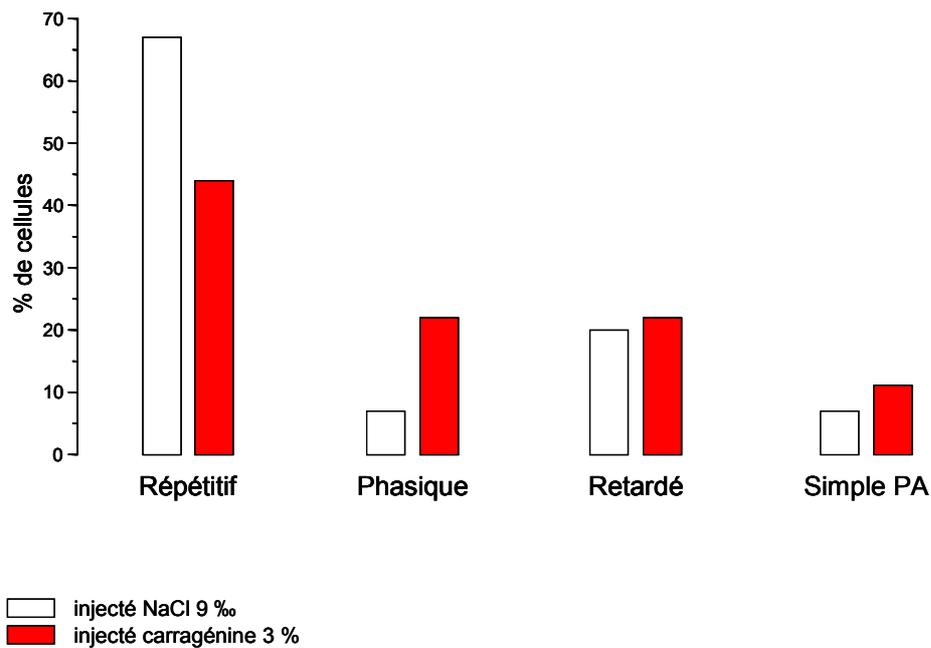


Figure 59 : L'inflammation périphérique modifie les proportions des profils de décharge en PA vers un état moins excitable.

Les proportions des différents profils de décharge en PA ont été mesurées 24 heures après injection dans les pattes postérieures d'une solution de NaCl 9 % ou de λ -carragénine 3 %. La proportion des neurones de type répétitif diminue au profit d'une augmentation des neurones de type phasique, lors de l'inflammation. Les autres profils de décharge en PA restent sensiblement les mêmes.

Les profils de décharge en PA ont été obtenus en mode courant imposé avec des créneaux de courant calibrés de -80 à +200 pA (incrément de 10 pA, durée de 900 ms). Le potentiel de membrane était ajusté à -60 mV.

IV. Modification de l'excitabilité des neurones de la lamina II lors d'une inflammation périphérique

1. Changement des profils de décharge en potentiel d'action

Des neurones de la lamina II ont été enregistrés en mode courant imposé à partir d'animaux âgés de 21 à 30 jours post-nataux. Deux groupes d'animaux ont été utilisés : des animaux inflammatoires (n=9) recevant des injections bilatérales dans la voute plantaire d'une solution de λ -carragénine 3 % et des animaux salins (n=15) recevant du solvant (NaCl 9 %). Les neurones ont été enregistrés en mode courant imposé à un potentiel membranaire ajusté à -60 mV en utilisant la solution intrapipette 1 (voir tableau 8, Matériels et Méthodes). Des créneaux de courant de -80 à +200 pA (incrément de 10 pA, durée de 900 ms) ont été injectés dans le neurone.

Dans ces conditions, les profils de décharge en PA des deux groupes présentent des proportions différentes (24 h après l'injection intraplantaire), cependant les données actuelles ne permettent pas mettre en évidence de différences significatives (test de contingences) entre ces deux groupes d'animaux (figure 59). On retrouve dans le groupe NaCl une grande majorité de neurones de profil de décharge en PA de type *répétitif* (n=10/15, 67 % des neurones enregistrés). Les autres profils de décharge se répartissent de la manière suivante : 7 % de neurones de type *phasique* et *simple PA* (n=1/15) et 19 % de neurone type *retardé* (n=3/15). Les neurones enregistrés à partir des animaux inflammatoires présentent quant à eux une proportion plus faible des profils de décharge en PA de type *répétitif* (n=4/9, 44% des neurones enregistrés) au profit d'une augmentation de la proportion du type *phasique* (n=2/9, 22% des neurones enregistrés). Les deux autres profils de décharge sont représentés en proportion similaire en condition inflammatoire : 22% de neurones de type *retardé* (n=2/9) et 11 % de neurone de type *simple PA* (n=1/9).

A l'état actuel des données à notre disposition, il semble, lors d'une inflammation périphérique, que les profils de décharge des neurones de la lamina II évoluent vers un profil moins excitable, c'est-à-dire par une diminution de nombre de neurones présentant un profil de décharge *répétitif*. Cette hypothèse serait en accord avec les résultats présentés dans la partie 1 de ce travail, où l'activation du récepteur OT induit une diminution de l'excitabilité. De plus, comme nous l'avons vu, le développement du phénotype inflammatoire s'accompagne d'une augmentation des taux médullaires d'OT.

Tableau 22 : Propriétés membranaires passives et actives des neurones de la lamina II lors d'une inflammation périphérique

		Propriétés membranaires passives					Propriétés membranaires actives				
	n	τ_m (ms)	R_m (M Ω)	C_m (pF)	V_m repos (mV)	Seuil (mV)	I_{seuil} (pA)	Overshoot (mV)	Amplitude (mV)	Durée (ms)	
Rp	Salin	10	79,9 \pm 10,9	315 \pm 49	290,6 \pm 46,3	-52,7 \pm 2,5	-28,19 \pm 7,8	46,0 \pm 8,5	30,8 \pm 3,9	66,9 \pm 3,5	2,3 \pm 0,2
	Carra	4	34,6 \pm 14,0	244 \pm 76	133,1 \pm 24,7	-61,1 \pm 5,4	-40,6 \pm 2,2	70,0 \pm 20,8	37,4 \pm 3,5	77,9 \pm 4,4	1,6 \pm 0,4
Rt	Salin	3	90,7 \pm 29,3	309 \pm 28	293,5 \pm 87,0	-57,2 \pm 2,4	-29,3 \pm	100 \pm 11,6	19,7 \pm 3,1	49,0 \pm 4,5	2,6 \pm 0,2
	Carra	2	36,9 \pm 1,4	261 \pm 42	144,2 \pm 18,1	-67,3 \pm 1,8	-35,9 \pm 6,9	110 \pm 50,0	10,2 \pm 8,9	46,1 \pm 2,0	3,4 \pm 1,3
P	Salin	1	12,6	675	131,8	-50,0	-28,9	40	45,8	74,7	2,5
	Carra	2	19,5 \pm 7,9	233 \pm 57	97,7 \pm 57,5	-72,8 \pm 8,5	-34,2 \pm 12,7	110 \pm 70	40,4 \pm 0,9	74,5 \pm 11,8	2,4 \pm 0,8
S	Salin	1	44,9	287	156,0	-64	-37,8	100	44,8	82,6	1,5
	Carra	1	16,7	212	78,6	-62	-43,3	320	10,5	53,8	1,6

Rp : profil répétitif ; Rt : profil retardé ; P : profil phasique ; S : profil salin. n, nombre d'observations ; τ_m , constante de temps membranaire ; C_m , capacité membranaire ; R_m , résistance membranaire ; V_m repos, potentiel membranaire de repos ; I_{seuil} , courant minimum nécessaire pour observer le premier PA ; Overshoot, amplitude maximale du potentiel membranaire au-dessus de 0 mV durant le PA ; Amplitude, amplitude du PA mesurée entre le seuil et la pointe du PA ; Durée, durée du PA mesurée au niveau du seuil de déclenchement du PA. Salin : groupe d'animaux Salin ; Carra : groupe d'animaux λ -carragénine. Pour V_m repos, les mesures sont réalisées pour $I=0$ pA, les autres mesures sont effectuées pour un créneau de courant liminaire à un potentiel membranaire ajusté à -60 mV.

2. Modification des propriétés membranaires

Dans ces conditions d'inflammation périphérique, les propriétés membranaires actives et passives des neurones ont été comparées à celles de neurones enregistrés à partir de rats du groupe NaCl, qui constitue notre contrôle (voir Matériels et Méthodes, paragraphe 1.6 a). L'ensemble des résultats est résumé dans le tableau 22. Malgré le faible effectif de neurones obtenus dans ces deux conditions expérimentales, il se dégage un certain nombre de différences. D'une manière générale, lorsque l'on considère l'ensemble des neurones enregistrés à partir d'animaux inflammatoires, on remarque que I_{seuil} est augmenté par rapport au groupe NaCl (NaCl : $46,0 \pm 8,5$ pA ; carragénine : $70,0 \pm 20,8$ pA ; pour les neurones répétitifs par exemple). Ceci indique que les neurones de la lamina II issus de rats inflammatoires sont moins excitables. Cette observation est confortée aussi par le fait que la résistance membranaire est diminuée chez ces animaux inflammatoires (-23 % de diminution pour les neurones répétitifs). Il est à noter aussi que les animaux NaCl présentent des neurones dont le seuil de déclenchement des PA et le potentiel membranaire de repos sont plus élevés (30,5 % et 13,7 % respectivement). D'une manière générale, les paramètres modifiés des neurones du groupe λ -carragénine sont en faveur d'une diminution de l'excitabilité. Comme précédemment, on pourrait voir dans ces résultats un effet de l'activation du récepteur OT médullaire induit par une augmentation des taux d'OT endogène lors de l'inflammation périphérique. Cependant, le nombre d'observation n'est pas encore suffisant afin de tirer des conclusions définitives.

Partie IV :

Perspectives des travaux en cours:
Effets chroniques de l'ocytocine sur le
tonus inhibiteur GABAergiques des
neurones de la lamina II

Tableau 23 : Composition des milieux extracellulaires de stockage.

Nom du milieu	ACSF	TGOT (100 nM)	TTX (0,5 μ M)	dOVT (1 μ M)	PK (10 μ M)	FIN (50 μ M)	Durée incubation minimale
CTRL	x						3h
TGOT	x	x					3h
TGOT+TTX	x	x	x				3h
TGOT+dOVT	x	x		X			3h
TGOT+PK+FIN	x	x			x	x	3h
Préincubation				1h	3h	3h	

La durée d'incubation représente le temps minimum avant l'enregistrement. Dans certains cas, les tranches sont préincubées avec des antagonistes dont la durée est indiquée ci-dessus, avant d'être incubées en présence de TGOT.

I. Contexte scientifique

Nous avons vu précédemment que l'activation du récepteur OT par des applications courtes de TGOT était relayée par des interneurons glutamatergiques qui amplifient l'inhibition GABAergique, tout en diminuant l'excitabilité des neurones. Dans ces conditions, aucune modulation des caractéristiques des CPSI miniatures GABA_A n'a pu être mise à jour. Cependant, comme nous l'avons vu, 24 h après l'induction d'une inflammation périphérique les contenus en OT médullaire sont augmentés par rapport à ceux d'animaux non pathologiques. De plus, dans cette condition d'inflammation périphérique, le blocage du récepteur OT par dOVT entraîne une reprise importante de l'hyperalgie mécanique pendant 48 h. Ainsi, chez l'animal inflammatoire, il semble que l'OT et son récepteur jouent un rôle important dans la modulation du système nociceptif à l'étage médullaire. Il est bien décrit dans la littérature que le tonus inhibiteur joue un rôle clé dans l'inhibition du réseau de neurones de la lamina II et plus particulièrement les terminaisons GABAergiques. A ce jour, aucune donnée ne montre une modulation de ce tonus par une activation à long terme du système OT. Nous avons donc tenté par cette étude préliminaire de mettre en évidence une modulation du tonus inhibiteur médié par le récepteur GABA_A par une présence à long terme (chronique) *in vitro* de TGOT.

II. Méthodologie

Dans cette étude préliminaire, nous avons utilisé des animaux âgés de 23 à 30 jours postnataux. Les tranches de moelle épinière ont été incubées dans des solutions et des durées décrites dans le tableau 23. Les tranches ont été incubées en présence de TGOT (100 nM) ou en présence de TGOT (100 nM) et TTX (0,5 µM). L'ajout de TTX dans la solution extracellulaire nous permet de voir si les paramètres étudiés sont sous la dépendance de l'activité globale du réseau de neurones lors de l'incubation de TGOT. TGOT (100 nM) a été incubé avec dOVT (1 µM) afin de préciser la spécificité des effets observés.

A la suite de l'incubation, la transmission synaptique miniature GABAergique a été enregistrée au moyen de la technique de « patch-clamp » en configuration cellule entière en utilisant la solution intrapipette, où $E_{Cl^-} = 0$ mV. Les enregistrements ont été effectués à un potentiel de maintien de -60 mV en mode potentiel imposé. Les CPSI miniatures GABA_A ont

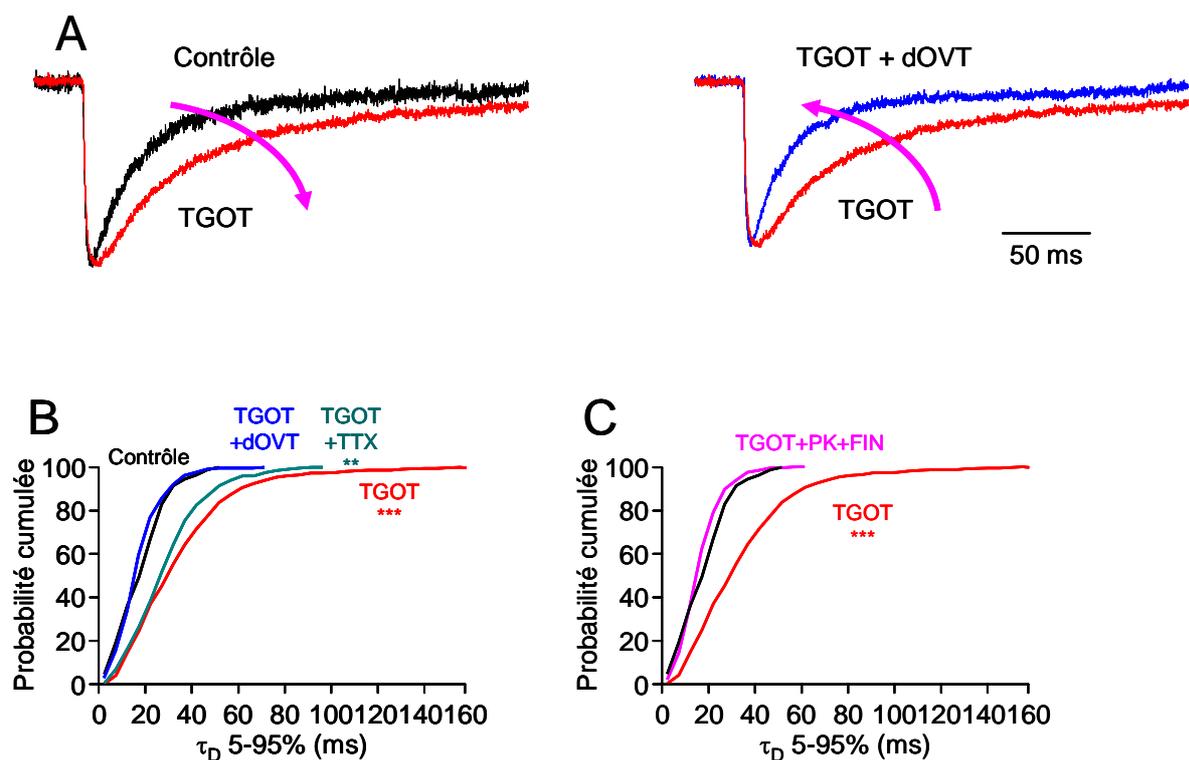


Figure 60 : L'activation chronique du récepteur à l'ocytocine stimule la neurostéroïdogénèse et augmente le tonus inhibiteur GABAergique des CPSIm.

A : Traces normalisées de CPSIm GABA_A issus de trois neurones enregistrés dans des conditions différentes. Une incubation chronique de TGOT induit un ralentissement important de la déactivation du courant GABA_A (haut-gauche : amplitude normalisée par rapport à la trace contrôle), la co-incubation de dOVT avec TGOT abolit l'effet chronique de TGOT.

B et C : Les graphiques représentent la probabilité cumulée des τ_D des CPSIm GABA_A de l'ensemble des neurones enregistrés, à partir de tranches qui ont subi des traitements chroniques différents. La constante de déactivation des CPSIm GABA_A est significativement augmentée lorsque l'incubation en présence de TGOT est concomitante ou non à une incubation de TTX ($p < 0,001$). Cet effet est complètement bloqué lorsque TGOT est co-incubé avec l'antagoniste du récepteur OT (dOVT). Lorsque la neurostéroïdogénèse est inactivée par des inhibiteurs spécifiques (PK et FIN) au préalable, l'incubation chronique de TGOT, PK et FIN n'entraîne aucune modification de τ_D des CPSIm GABA_A.

PK : PK11195 ; FIN : Finastéride.

Concentrations utilisées: TGOT (100 nM) ; dOVT (1 μ M) ; TTX (0,5 μ M) ; PK : 10 μ M ; FIN : 50 μ M.

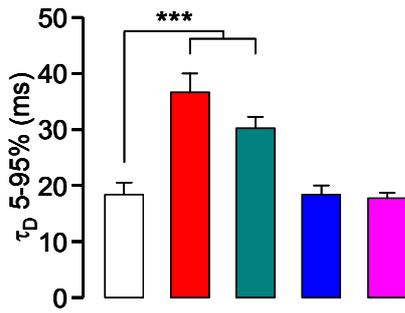
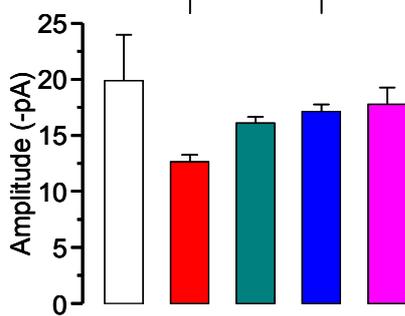
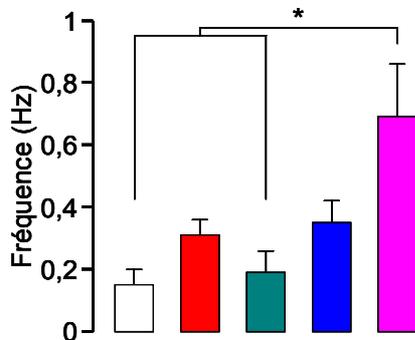
Durée d'incubation : minimum 3 heures d'incubation en présence de TGOT ; pré-incubation minimum de 1 heure lorsque dOVT est testé et 3 heures lorsque la neurostéroïdogénèse est inhibée.

Les données électrophysiologiques ont été obtenues à partir de neurones enregistrés à un potentiel membranaire imposé de -60 mV. Les CPSIm GABA détectés ont été isolés pharmacologiquement par la perfusion continue dans le milieu extracellulaire d'acide kynurénique (2mM), strychnine (1 μ M) et de TTX (0,5 μ M).

Nombre de cellules enregistrées dans chaque condition expérimentale : Contrôle : n= 5 ; TGOT : n= 8 ; TGOT+TTX : n= 6 ; TGOT+dOVT : n= 4 ; TGOT+PK+FIN : n= 8.

Nombre d'événements synaptiques observés dans chaque condition expérimentale : Contrôle : n= 165 ; TGOT : n= 561 ; TGOT+TTX : n= 201 ; TGOT+dOVT : n= 208 ; TGOT+PK+FIN : n= 668.

Test statistique : test de Kolmogorov-Smirnov comparant chaque milieu d'incubation à la condition contrôle. ** : $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

A**B****C**

- Contrôle ; n=5
- TGOT (100 nM) ; n=8
- TGOT (100 nM) + TTX (0,5 μ M) ; n=6
- TGOT (100 nM) + dOVT (1 μ M) ; n=4
- TGOT (100 nM) + PK (10 μ M) + FIN (50 μ M) ; n=8

Figure 61 : Une stimulation oxytocinergique chronique module l'inhibition GABAergique des neurones de la lamina II.

Les caractéristiques principales des CPSEm GABA_A ont été observées dans différentes conditions expérimentales. Des incubations chroniques des tranches de moelle épinière ont été réalisées en présence de TGOT, TGOT+TTX, TGOT+dOVT et TGOT+PK+FIN.

A : La constante de désactivation (τ_D) des CPSEm GABA_A est significativement augmentée lorsque les tranches sont incubées en présence de TGOT seul ou avec de la TTX ($p < 0,01$; test non paramétrique de Steel-Dwass).

B : L'incubation chronique de TGOT induit une inhibition significative de l'amplitude des CPSEm GABA_A ($p < 0,05$; test non paramétrique de Steel-Dwass).

C : Lors d'une co-incubation TGOT+PK+FIN, la fréquence instantanée d'apparition des CPSEm GABA_A est augmentée de manière significative ($p < 0,05$; test non paramétrique de Steel-Dwass).

été enregistrés isolés pharmacologiquement en ajoutant dans l'ACSF 2 mM d'acide kynurénique, 1 μ M de strychnine et 0,5 μ M de TTX.

III. Résultats

Comme le montrent les résultats résumés dans le tableau 24 et les figures 60-61 A, lorsque les tranches sont incubées en présence de TGOT, la constante de désactivation des CPSI miniatures GABA_A est significativement augmentée ($99,8 \pm 18,4$ % ; $p < 0,001$; test non paramétrique de Steel-Dwass ; $n=5$ en condition contrôle et $n=8$ en présence de TGOT). Il s'agit ici, d'un effet postsynaptique affectant l'affinité apparente du récepteur GABA_A synaptique. Un résultat identique peut être observé lorsque les tranches sont incubées en présence de TGOT 100 nM et TTX 0,5 μ M ($65,0 \pm 11,2$ % ; $p < 0,001$; test non paramétrique de Steel-Dwass ; $n=6$). Ainsi, cette modulation positive des récepteurs GABA_A n'est pas le fait de l'activité globale du réseau d'interneurones de la lamina II, ni d'une manière générale, de l'activité de l'ensemble des entrées synaptiques des neurones que l'on enregistre. Cet effet est complètement inhibé lorsque TGOT est co-incubé en présence de dOVT (1 μ M ; $n=4$). Ceci montre que l'effet obtenu lors de l'incubation des tranches en présence de TGOT est spécifique à l'activation du récepteur OT. Le changement de cinétique des CPSI miniatures GABAergiques est tout à fait similaire à celui produit par des modulateurs allostériques positifs comme les benzodiazépines et les neurostéroïdes. Comme nous avons montré récemment que la neurostéroïdogenèse était réactivé chez des animaux inflammatoires, nous avons cherché à savoir si l'effet d'une incubation de TGOT favorisait la synthèse et l'action sur le récepteur GABA_A des neurostéroïdes réduits en position 3 et 5 α . Pour cela, des tranches ont été préincubées durant trois heures en présence d'inhibiteurs spécifiques d'étapes clés de la neurostéroïdogenèse : le PK11195 (PK ; 10 μ M) et le finastéride (FIN ; 50 μ M) ; avant une incubation concomitante avec TGOT (100 nM, >3 h). Dans ces conditions ($n=8$), l'effet de TGOT est aboli, la constante de temps de désactivation des CPSIm GABA retrouve sa valeur contrôle. Ainsi, la potentialisation de τ_D , observée en présence chronique de TGOT, est le résultat de l'activation du récepteur OT, lequel semble stimuler la production médullaire de neurostéroïdes modulateurs des récepteurs GABA_A.

En plus de ce type de modulation, il apparaît que l'incubation des tranches avec TGOT entraîne une diminution de l'amplitude des courants GABA ($-36,5 \pm 3,3$ % ; $p < 0,05$; test non paramétrique de Steel-Dwass ; comparaison significative avec la condition d'incubation

Tableau 24: Caractéristiques des CPSEm GABAergiques dans différentes conditions d'incubations de tranches de rats >23 jours postnataux.

Condition d'incubation	Fréquence (Hz)	Amplitude (pA)	τ_D (ms)	n
CTRL (1)	$0,15 \pm 0,05$ *(5)	$-19,9 \pm 4,1$ *(2)	$18,3 \pm 2,3$ *** (2 et 3)	5
TGOT (2)	$0,31 \pm 0,05$	$-12,6 \pm 0,7$ *(1)	$36,6 \pm 3,4$ *** (1, 4 et 5)	8
TGOT+TTX (3)	$0,19 \pm 0,07$ *(5)	$-16,1 \pm 1,6$	$30,2 \pm 2,1$ *** (1, 4 et 5)	6
TGOT+dOVT (4)	$0,35 \pm 0,07$	$-17,1 \pm 0,7$	$18,3 \pm 1,7$ *** (2 et 3)	4
TGOT+PK+FIN (5)	$0,69 \pm 0,17$ *(1), *(3)	$-17,8 \pm 1,5$	$17,7 \pm 1,0$ *** (2 et 3)	8

Les données sont exprimées comme la moyenne \pm l'erreur type. Les différences statistiques sont données comme : * : $p < 0,05$; *** : $p < 0,001$; test t de Student de données non appariées pour la comparaison des fréquences ; test de Kolmogorov-Smirnov pour l'amplitude et τ_D .

TGOT+dOVT), alors que, dans les autres conditions expérimentales, aucune différence significative n'a pu être observée avec la condition contrôle. Enfin, la présence de PK et FIN augmente de manière significative ($p < 0,05$) la fréquence de libération des vésicules GABAergiques comme indiqué dans le tableau 24, alors que TGOT seul ne semble pas moduler la fréquence de libération des vésicules GABAergiques présynaptiques.

Ainsi, une présence chronique d'OT au sein du réseau d'interneurones de la lamina II augmente l'inhibition médullaire par un accroissement du tonus inhibiteur GABAergique via une modulation postsynaptique du récepteur lui-même. Ceci passe par une activation de la neurostéroïdogénèse qui potentialise l'affinité relative du récepteur GABA_A pour son agoniste, ralentissant la désactivation des récepteurs.

Discussion

Au cours de ce travail de thèse, je me suis intéressé au rôle du contrôle hypothalamo-médullaire ocytocinergique dans la modulation de l'excitabilité des neurones de la lamina II. L'étude fonctionnelle a porté autant sur les conséquences électrophysiologiques de l'activation du récepteur OT postsynaptique que sur la modulation des transmissions synaptiques rapides excitatrices et inhibitrices dans, des conditions non pathologiques, *in vitro* et *in vivo*. Afin de mieux appréhender le rôle de ce contrôle lors d'une douleur pathologique, j'ai utilisé un modèle animal développant une douleur inflammatoire à court terme.

Les neurones enregistrés, dans des tranches aiguës de moelle épinière lombaire (lamina II) présentent, dans 60 % des cas, une diminution de leur excitabilité *in vitro* à la suite d'une perfusion exogène d'OT. Ceci se caractérise par une modification de l'adaptation en fréquence de leur décharge en PA suite à une dépolarisation supraliminaire de la membrane. Par ailleurs, l'activation du récepteur OT présynaptique sur une population de neurones glutamatergiques augmente *in fine* la transmission synaptique GABAergique. Enfin, en accord avec les données *in vitro* utilisant une application exogène d'un agoniste ocytocinergique, la stimulation *in vivo* du NPV induit une diminution de la réponse des neurones de la lamina II lors d'une activation des afférences sensorielles primaires. Il semble que ce mécanisme d'inhibition fasse intervenir l'activation des neurones GABAergiques et un blocage spécifique des afférences sensorielles nociceptives A δ et C. Ces effets ont une pertinence physiopathologique, car les contenus médullaires en OT sont augmentés 24 h après une injection intraplantaire de λ -carragénine, qui induit une sensibilisation douloureuse inflammatoire. En parallèle, l'OT semble être impliquée dans l'hyperalgie mécanique, car le blocage du récepteur OT *in vivo* produit une hyperalgie importante chez les animaux inflammatoires. Nous avons remarqué que l'activation chronique des récepteurs OT favorisait le tonus GABAergique *in vitro*. Il semble, dans ce cas, que l'activation du récepteur OT stimule la neurostéroïdogenèse, comme observé dans des conditions d'inflammation périphérique (voir les annexes 1,2 et 3). Tous ces résultats tendent à montrer que l'action de l'OT par l'activation du contrôle descendant ocytocinergique dans des conditions pathologiques ont un effet antinociceptif sur le réseau d'interneurones de la lamina II. Cet effet antinociceptif semble impliquer plusieurs mécanismes cellulaires.

I. Les effets postsynaptiques de l'ocytocine sur les neurones de la lamina II : l'ocytocine inhibitrice de l'excitabilité neuronale

1. Les propriétés électrophysiologiques des neurones de la lamina II

Les profils de décharge en PA que j'ai observé en enregistrant les neurones de la lamina II dans des tranches de moelle épinière lombaire sont en accord avec les profils déjà décrit (tableau 5) *in vivo* chez la souris (Graham *et al.*, 2004), sur des cultures de neurones des couches superficielles de la corne dorsale de souris (Hu et Gereau, 2003) et sur des tranches transversales de moelle épinière de hamster (Grudt et Perl, 2002). Ruschewey et Sandkuhler (2002) n'ont pas enregistré de profil de décharge de type *répétitif* dans la lamina II de rat. En revanche, ils présentent un cinquième profil de décharge qui se caractérise par des bouffées de PA lors de dépolarisations supraliminaire. J'ai pu observer certains de ces neurones lors de mes enregistrements. Je les ai classés dans les neurones de type *répétitif* lorsqu'ils présentaient des bouffées de PA sur toute la durée de la stimulation et dans les neurones de type *phasique* lorsqu'une phase silencieuse apparaissait avant la fin de la stimulation. En effet, dans cette catégorie de neurones, la durée des phases silencieuses et le nombre des bouffées diminuent rapidement avec l'augmentation de l'amplitude de la dépolarisation. C'est pourquoi j'ai fait le choix de ne pas prendre en compte ce critère pour la classification des neurones de la lamina II, puisque ces bouffées ne sont pas observables pour tous les créneaux de courant. De même, la présence du « sag » n'a pas été un critère déterminant dans la classification des neurones, à la différence de Lopez-Garcia et King (1994) et de Jo *et al.* (1998a), puisqu'on enregistre le « sag » en proportion variable pour chaque profil de décharge en PA. Comme le montre le tableau 5, il est difficile de faire des comparaisons pertinentes entre les différentes études. Il existe des variations dans les proportions des profils de décharge qui peuvent résulter de la préparation expérimentale (cultures, tranches, *in vivo*, « patch-clamp ») et des milieux intracellulaires d'enregistrement. En effet, l'utilisation de la technique du « patch-clamp » en configuration « cellule entière » dialyse les métabolites modulateurs des conductances ioniques intervenant dans l'excitabilité neuronale (AMPC, Ca²⁺ intracellulaire, etc.). Par ailleurs, le changement d'environnement cellulaire pourrait jouer un rôle important dans les propriétés électrophysiologiques des neurones de la lamina II. Chez la souris, le profil de type *répétitif* est très majoritaire pour des neurones en culture (Hu et Gereau, 2003) alors que dans des conditions *in vivo* (Graham *et al.*, 2004), les profils

répétitifs, *phasiques* et *retardés* sont en proportions équivalentes. Ainsi, l'architecture dendritique du neurone et les entrées synaptiques pourraient en partie jouer un rôle important dans la forme du profil de décharge en PA. Les propriétés membranaires passives (potentiel membranaire de repos, R_m et C_m et τ_m) mesurées dans nos conditions expérimentales sont comparables à celles observées sur des tranches de moelle épinière de rat (Ruscheweyh et Sandkuhler, 2002), de hamster (Grudt et Perl, 2002) et sur des neurones des couches superficielles de moelle épinière de rat en culture (Jo et al., 1998a). De plus, nos données sont très proches de celles observées sur des enregistrements *in vivo* de neurones de la lamina II de rat (Furue et al., 1999; Light et Willcockson, 1999) et de souris (Graham *et al.*, 2004).

Selon Thomson *et al.* (1989), les neurones de type *répétitif* émettent des PA de manière soutenue suite à une stimulation périphérique nociceptive alors que les types *phasique* et *simple PA* répondent brièvement, voire ne répondent pas, à une stimulation nociceptive identique. Ainsi, les neurones de type *répétitif* pourraient coder à la fois l'intensité et la durée des informations sensorielles périphériques, à la différence des profils *phasique* et *simple PA* qui pourraient être activés brièvement uniquement suite à une stimulation liminaire des afférences sensorielles. Le profil de type *retardé* présente des propriétés de codage différentes, dues à la présence du délai dépendant du potentiel membranaire et/ou de l'intensité de la stimulation sensorielle périphérique. Ce délai aurait comme propriété de ralentir l'émission du premier PA ou de défavoriser l'initiation de la réponse du neurone lors d'une stimulation périphérique. Comme le montrent nos résultats, une stimulation plus importante est nécessaire pour exciter les neurones *retardés* en comparaison avec les neurones *répétitifs* et *phasiques*. Il en est de même pour les neurones de type *simple PA* qui sont peu excitable. Dans des conditions non pathologiques, ces différents profils de décharge semblent indiquer que les neurones de la lamina II sont en mesure de coder les informations sensorielles avec une large gamme de patrons de PA.

L'étude des profils de décharge des neurones de la moelle épinière a été effectuée en utilisant des créneaux de courant dépolarisant afin d'évoquer et de classer ces profils. Cette méthode ne rend pas compte de la signification physiologique de ces profils de décharge dans l'intégration et le codage des informations transmises par les afférences sensorielles. Seule une approche *in vivo* permet de répondre à cette question. Les neurones de la lamina II enregistrés *in vivo* répondent à des stimulations nociceptives et non nociceptives, thermiques (chaud, froid) et mécaniques (pincement, touché léger, frottement plus ou moins léger) ; (Furue et al., 1999; Light et Willcockson, 1999; Graham et al., 2004). Cependant, Graham *et al.* (2004) ont montré que les neurones *répétitifs* et *phasiques* répondent de la même manière à

une stimulation mécanique nociceptive. Ainsi, les neurones de la lamina II sont activés par des afférences sensorielles qui sont stimulées par des modalités sensorielles diverses.

La classification des neurones de la lamina II sur le critère de leur profil de décharge en PA n'est pas suffisante pour les distinguer. En effet, plusieurs critères peuvent être combinés : les propriétés électrophysiologiques, la morphologie, le type d'afférences nociceptives (fibres A δ ou C, entrées mono ou polysynaptiques), l'expression de conductances membranaires spécifiques, le type de neurotransmetteur libéré et l'expression de protéines intracellulaires spécifiques (Todd et Spike, 1993; Yoshimura et Nishi, 1993; Laing et al., 1994; Albuquerque et al., 1999; Grudt et Perl, 2002). Par ailleurs, Melnick *et al.* (2004b) montrent que 70 % des neurones de la lamina II sont de type *répétitif* dans leurs conditions expérimentales et environ 80 % des neurones de ce type sont convertis réversiblement en profil de décharge *simple PA* par une activation des récepteurs μ des opiacés (Santos *et al.*, 2004). Ces données montrent qu'il existe une sous-population de neurones de la lamina II pour laquelle l'adaptation en fréquence de décharge des PA peut être modulée de telle manière qu'un neurone peut présenter différents profils de décharge. Ceci résulterait de l'activité des voies de signalisation intracellulaires (Santos *et al.*, 2004). En effet, les conductances ioniques, dépendantes du potentiel ou non, sont régulées par des mécanismes de phosphorylation et de déphosphorylation, où l'activité des canaux ioniques est responsable de la forme du patron de décharge du neurone lors d'une stimulation prolongée.

2. Rôle de l'OT dans la modulation de l'excitabilité des neurones de la lamina II

En mode courant imposé, les résultats que j'ai obtenu montrent que l'excitabilité d'une proportion importante de neurones de la lamina II est diminuée par l'activation du récepteur OT. Rousselot *et al.* (1990) ont montré par microscopie électronique que les fibres immunoréactives pour l'OT réalisent des synapses axo-dendritiques avec les neurones de la lamina II. Les couches superficielles de la corne dorsale présentent, de plus, une forte densité de sites de liaison pour l'OT (Reiter et al., 1994; Tribollet et al., 1997; Jo et al., 1998b). Enfin, des neurones des couches superficielles de la moelle épinière en culture expriment des récepteurs de l'OT à la surface des prolongements dendritiques et du soma (Jo et al., 1998b). Cependant, dans cette dernière étude, la fraction de neurones exprimant le récepteur OT n'a pas été évaluée. Les effets de l'OT observés dans le cadre de notre étude semblent indiquer que des récepteurs OT fonctionnels sont présents à la surface membranaire d'une sous-

population de neurones. Robinson *et al.* (2002) ont, eux aussi, observé la présence de récepteurs OT fonctionnels sur des neurones de la lamina II de tranches aiguës de moelle épinière de souris. L'application exogène d'OT induit une inhibition réversible de la réponse des neurones de la lamina II lors d'une stimulation électrique de la racine dorsale. Cependant, on ne peut pas exclure que l'activation du récepteur OT induise la libération d'un médiateur local par les cellules gliales et/ou neuronales. On pourrait alors suspecter une action paracrine de ce médiateur sur une sous-population de neurones de la lamina II qui exprimeraient le récepteur de ce médiateur. La validation, ou non, de cette hypothèse nécessite tout d'abord de vérifier l'expression des récepteurs OT sur les cellules gliales, comme cela a pu être mis en évidence sur des cultures d'astrocytes hypothalamiques (Di Scala-Guenot *et al.*, 1994; Strosser *et al.*, 2001). Cependant, il est à noter que dans des co-cultures comprenant des neurones et des astrocytes hypothalamiques, la présence des neurones inhibe l'expression des récepteurs OT astrocytaires (Di Scala-Guenot et Strosser, 1995). Dans notre modèle d'étude, nous ne pouvons pas présager du niveau d'expression du récepteur OT par les cellules gliales. Mais il est possible que, là aussi, les neurones de la lamina II inhibent l'expression des récepteurs OT. Les cellules gliales n'interviendraient pas, ou alors indirectement, dans la modulation de l'excitabilité neuronale par l'OT.

Dans nos conditions expérimentales, nous n'avons pas pu observer les effets de l'application de TGOT sur le courant Na^+ dépendant du potentiel membranaire isolé. Les tentatives menées dans ce sens ont été systématiquement « polluées » par l'enregistrement de courants d'action. Ceci résultait d'un défaut de contrôle du potentiel membranaire, induisant des PA dans les prolongements dendritiques et probablement dans l'axone, lors des enregistrements en potentiel imposé. Cependant, si l'on regarde les effets de TGOT sur la cinétique du PA, on constate une diminution de « l'overshoot » et un allongement de la durée de la phase ascendante du PA. Un blocage partiel des canaux Na^+ dépendants du potentiel membranaire par une faible concentration de TTX (10 nM) induit également, dans les neurones de la lamina II, une diminution de « l'overshoot » et un ralentissement de la phase de dépolarisation du PA par une réduction du nombre de canaux Na^+ activables (Olschewski *et al.*, 2001). Ceci suggère, indirectement, que l'activation du récepteur OT pourrait affecter les canaux Na^+ dépendants du potentiel membranaire qui sont impliqués dans ces paramètres du PA. Ainsi, la stimulation du récepteur OT couplé à une protéine G (Alberi *et al.*, 1997; Robinson *et al.*, 2002) pourrait moduler l'activité de canaux ioniques par la mise en jeu de messagers secondaires, comme suggéré par Santos *et al.* (2004). Cette inhibition des canaux

Na^+ dépendants du potentiel membranaire pourrait affecter la densité des canaux fonctionnels, les propriétés d'activation et/ou d'inactivation. A ce jour, je n'ai aucun résultat me permettant de préciser les effets de l'activation du récepteur OT sur le courant Na^+ dépendant du potentiel. Afin de répondre à cette question, il serait possible de réaliser des enregistrements électrophysiologiques en utilisant la technique du soma isolé (permettant de palier les difficultés techniques précisées ci-dessus). Cependant, dans une telle configuration, nous ne savons pas si le récepteur OT et la (ou les) voie(s) de signalisation intracellulaire sont présents et fonctionnels au niveau du soma des neurones en tranche aiguë. Par ailleurs, il se peut que les propriétés membranaires actives et passives du neurone soient profondément modifiées par l'absence des dendrites et du cone axonal. En effet, il existe une distribution spatiale particulière des canaux Na^+ et K^+ , dépendants du potentiel membranaire, à la surface des neurones de la lamina II (Safronov, 1999).

L'activation du récepteur OT diminue l'excitabilité d'une fraction des neurones de la lamina II (61 %). Cet effet se caractérise par une adaptation accrue et par une diminution de la fréquence de décharge en PA. Les données actuelles montrent que la modulation des canaux K^+ (I_A et $I_{K_{DR}}$) dépendants du potentiel membranaire est impliquée dans la régulation de la fréquence de décharge en PA (Olschewski et al., 2001; Ruscheweyh et Sandkuhler, 2002; Hu et Gereau, 2003; Hu et al., 2003; Melnick et al., 2004a; Santos et al., 2004). En effet, 70 % des neurones montrent une inhibition des conductances $I_{K_{DR}}$ et I_A . Expérimentalement, il a été impossible de corréliser les effets de TGOT observés sur le profil de décharge en PA et la présence de conductances K^+ particulières modulées par l'activation du récepteur OT. Lors de nos expériences, nous avons observé que les effets résultant de l'activation du récepteur OT étaient difficilement réversibles. En conséquence, il était impossible d'observer les effets de l'OT, d'abord sur le profil de décharge en PA, puis sur les conductances K^+ isolées, sur un même neurone. Le pourcentage de neurones qui présentent une modulation du profil de décharge en PA est proche de celui des neurones dont les courants K^+ sont inhibés. On peut supposer que la modulation de ces courants est très probablement responsable des effets sur les profils de décharge en PA.

Nous avons pu observer, dans notre préparation, la présence de deux types de courant K^+ dont les caractéristiques électrophysiologiques et pharmacologiques sont proches de celles déjà décrites : le courant K^+ transitoire, ou I_A , et le courant K^+ maintenu, ou $I_{K_{DR}}$ (Wolff et al., 1998; Olschewski et al., 2001; Ruscheweyh et Sandkuhler, 2002; Hu et al., 2003; Melnick et al., 2004b). Le courant $I_{K_{DR}}$ présente une cinétique d'activation rapide (constante de temps

de demi-activation $<0,9$ ms, $V_m = +40$ mV), qui en combinaison avec une inactivation rapide des canaux Na^+ pour des potentiels membranaires positifs (constante de temps d'inactivation $<0,4$ ms, $V_m = +10$ mV), favorisera une repolarisation rapide de la membrane lors du PA (Melnick *et al.*, 2004b). Cette caractéristique est nécessaire pour permettre des trains de PA de fréquence élevée comme ceux observés dans les neurones de type *répétitif*.

L'activation du récepteur OT induit une inhibition de IK_{DR} qui se caractérise par une diminution du nombre de canaux activables sans affecter les propriétés d'activation ou de désactivation. Ceci est observé pour une sous-population de neurones (70 %). L'effet de l'OT est similaire à une application de TEA (un inhibiteur des conductances K^+ non inactivables). Par ailleurs, sur le déroulement du PA, l'activation du récepteur OT induit un ralentissement de la phase de repolarisation. Une application de TEA ou d'un anti-émétique (le dropéridol) sur des neurones de la lamina II produit un résultat identique par un blocage des canaux IK_{DR} (Olschewski *et al.*, 2001; Melnick *et al.*, 2004b). Les canaux K^+ sensibles au TEA, comme IK_{DR} , jouent un rôle dans la régulation de la fréquence de décharge des PA. En effet, l'application de TEA sur les neurones de la lamina II induit une diminution de la fréquence de décharge en PA lors d'une stimulation supraliminaire soutenue (Olschewski *et al.*, 2001; Melnick *et al.*, 2004b). Cet effet est accompagné d'une diminution de l'amplitude de l'AHP et d'une modification de son déroulement. Nos résultats montrent que l'activation du récepteur OT est capable de diminuer l'amplitude de l'AHP, ainsi que d'augmenter l'intervalle de temps entre les PA.

L'AHP est une phase cruciale dans la régulation de la fréquence de décharge des PA, par sa cinétique et son amplitude. Il semble que la modulation de la fréquence de décharge en PA implique les courants ioniques responsables de l'AHP (Madison et Nicoll, 1984) dans les neurones pyramidaux de l'aire CA1 de l'hippocampe et dans les neurones de la lamina II de la moelle épinière (Melnick *et al.*, 2004b). L'AHP résulterait de l'activation de courant K^+ activés par la Ca^{2+} intracellulaire (IK_{Ca}), dont BK et SK (Sah, 1996). L'entrée de Ca^{2+} dans le neurone, favorisée lors du PA, active ces canaux K^+ , augmentant à la fois l'amplitude de l'AHP et la durée de l'intervalle entre deux PA. BK est impliqué dans la phase de repolarisation du PA, alors que SK intervient dans l'AHP. Dans la lamina II, ces deux types de conductance n'ont pas été clairement identifiés. Cependant, l'AHP des neurones de type *répétitif* est sensible au Co^{2+} , à l'apamine et insensible à la charybdotoxine, ce qui confirme la présence d'une conductance de type SK (Melnick *et al.*, 2004b), alors que les neurones de type *phasique* ne semblent pas présenter d'AHP sensible au Ca^{2+} intracellulaire (Melnick *et al.*, 2004a). La modulation de la fréquence de décharge observée lors de l'activation du

récepteur OT implique ces deux populations de neurones. Il semble que l'effet de TGOT ne soit pas médié uniquement par des variations de Ca^{2+} intracellulaire impliquant un courant IK_{Ca} , mais ferait intervenir d'autres voies de signalisation modulant les courants de l'AHP. Il a été décrit que la modulation de l'AHP pouvait être dépendante ou non des IK_{Ca} dans la lamina II de la moelle épinière (Melnick *et al.*, 2004a), les motoneurones de l'hypoglosse (Sawczuk *et al.*, 1997; Powers *et al.*, 1999) et les neurones du néocortex (Fleidervish *et al.*, 1996). Il semble donc que l'adaptation en fréquence des neurones implique diverses conductances ioniques. Ainsi, il n'est pas exclu que IK_{DR} intervienne aussi dans l'AHP. En effet, son inhibition va ralentir la repolarisation de la membrane et peut participer à la diminution de l'amplitude de l'AHP. En effet, IK_{DR} est activé pour des valeurs de potentiel membranaire supérieures à -60 mV. Par ailleurs, la diminution de l'amplitude de l'AHP peut aussi se répercuter sur le comportement des canaux Na^+ vis-à-vis de la dépolarisation. L'hyperpolarisation membranaire étant moins importante en présence de TGOT, ceci peut diminuer le nombre de canaux Na^+ activables et favoriser l'adaptation de fréquence des PA décrite par Melnick *et al.* (2004a). Les courants K^+ activés par le Ca^{2+} semblent être insensibles à la 4-AP (Sah, 1996). Or l'application de ce bloquant est capable de mimer les effets de l'activation du récepteur OT : diminution de l'amplitude de l'AHP et adaptation en fréquence de décharge en PA (voir figure 43 ; 4-AP : 0,5 mM). Un effet similaire a pu être observé par Ruschweyh et Sandkuhler (2002) (4-AP : 5 mM). Par ailleurs, les sous-unités formant des canaux K^+ exprimées par les neurones de la lamina II n'ont pas toutes été mises à jour et il existe peu d'études fonctionnelles concernant ces conductances ioniques dépendantes du potentiel de membrane dans la lamina II.

Parallèlement à l'effet de l'activation du récepteur OT sur IK_{DR} , le courant I_A est lui aussi inhibé pour la même population de neurones. Cette inhibition affecte le nombre de canaux I_A activables, ainsi que, parfois, leurs propriétés d'inactivation pour 57 % des neurones sensibles à TGOT. Il ne semble pas que le courant I_A observé dans les neurones de la lamina II participe au décours du PA, car sa courbe d'inactivation montre qu'il est inactivé dans la gamme de potentiel parcourue par le PA (Ruschweyh et Sandkuhler, 2002; Hu *et al.*, 2003; Melnick *et al.*, 2004b). Cependant, il peut intervenir dans la régulation de la fréquence de décharge en PA lors de la phase d'hyperpolarisation membranaire et de l'AHP, où le potentiel membranaire atteint une gamme de potentiel levant en partie l'inactivation de ce courant (figure 42). L'état d'activation de I_A est décrit comme imposant le rythme de décharge en PA et son inhibition augmente la fréquence de décharge des PA des neurones de la lamina II (Hu et Gereau, 2003). Ce courant est aussi responsable du profil de décharge *retardé* en initiant un délai entre le

début de la stimulation et le premier PA dans la lamina II de la moelle épinière (Ruscheweyh et Sandkuhler, 2002; Hu et Gereau, 2003; Hu et al., 2003) et dans le noyau colliculus supérieur (Saito et Isa, 1999). Nous avons observé, dans une sous-population de neurones, qu'une hyperpolarisation membranaire préalable à une dépolarisation supraliminaire permet d'augmenter suffisamment la population de canaux I_A activables pour faire apparaître un retard (figure 44). De plus, l'inhibition de I_A induite par l'application de TGOT induit d'une manière générale une inhibition de la latence d'apparition du premier PA (figures 39 A et 45), tout comme une application de 4-AP (Ruscheweyh et Sandkuhler, 2002; Hu et Gereau, 2003). L'inhibition de I_A que nous avons observée dans nos conditions expérimentales n'induit pas d'augmentation de la fréquence de décharge en PA comme celle observée sur des neurones des couches superficielles de la corne dorsale de la moelle épinière de la souris lors d'une application de 4-AP (Hu et Gereau, 2003). Par contre nos résultats sont cohérents avec Ruscheweyh et Sandkuhler (2002) sur une préparation de tranche de moelle épinière similaire chez le rat, où ils observent une disparition de l'hyperpolarisation membranaire suivant le PA. De plus, Melnick *et al.* (2004b) semblent observer que le courant I_A participe peu à la fréquence de décharge en PA pour les neurones de la lamina II chez le rat. L'inhibition de I_A conduit certainement à une synchronisation des neurones sensibles à TGOT. En effet, cette inhibition supprime le délai avant le déclenchement du premier PA. Ainsi, lorsqu'une stimulation supraliminaire est appliquée aux neurones sensibles à l'OT, ceux-ci sont activés dans un laps de temps à peu près similaire. Ici, la latence d'obtention du seuil du PA va dépendre en grande partie des propriétés membranaires passives. Or l'activation du récepteur OT conduit aussi à une diminution de la constante de temps membranaire. Ainsi, les neurones sensibles à l'OT vont être dans un état d'activation similaire.

Une diminution de la densité des canaux Na^+ favorise l'adaptation en fréquence de la décharge qui se caractérise par une conversion en profil *simple PA* des neurones *répétitifs* de la lamina II (Melnick *et al.*, 2004a). Par ailleurs, un ralentissement de la cinétique d'inactivation des canaux Na^+ pourrait être responsable de l'adaptation en fréquence. En effet, dans les motoneurones médullaires et de l'hypoglosse, la présence de canaux Na^+ à inactivation lente de type persistant favorise l'adaptation en fréquence (Sawczuk et al., 1997; Powers et al., 1999; Miles et al., 2005; Zeng et al., 2005). Enfin, la présence de ces courants Na^+ à inactivation lente diminue l'amplitude des PA et ralentit la phase de dépolarisation du PA au cours du temps (Powers et al., 1999; Miles et al., 2005). Ainsi, l'activation du récepteur OT pourrait, via l'activation de seconds messagers, bloquer l'activation, diminuer

l'expression ou ralentir la cinétique d'inactivation des canaux Na^+ , voire permettre l'expression membranaire de canaux à inactivation lente. Nous avons pu observer qu'une dépolarisation membranaire précédant le saut de courant test favorisait l'adaptation en fréquence des PA qui peut être due à l'inactivation partielle des canaux Na^+ (figures 39 A et 45). Ceci favoriserait la diminution d'excitabilité des neurones de la lamina II par une modulation des propriétés d'adaptation en fréquence des PA dépendante des canaux Na^+ dépendants du potentiel.

Nos résultats montrent que plusieurs types de canaux ioniques sont impliqués dans la modulation des propriétés actives du PA et que leur modulation par l'activation du récepteur OT est susceptible de modifier profondément l'efficacité du transfert du message nerveux lors de son intégration. L'OT semble synchroniser les neurones qui y sont sensibles de telle manière à ce qu'ils répondent dans les plus brefs délais lorsqu'une stimulation liminaire est appliquée. Par ailleurs, il semble que l'OT favorise l'expression d'un profil de décharge en PA qui présente peu de PA, voire un seul, résultat d'une diminution de l'excitabilité.

3. Les voies de signalisation intracellulaires et les seconds messagers impliqués dans le contrôle de l'excitabilité des neurones de la lamina II

L'activation des voies de signalisation intracellulaires est impliquée dans la modulation de l'activité de différentes protéines intervenant dans la mise en place et le maintien de la sensibilisation centrale, l'allodynie et l'hyperalgie (Sun et al., 2003b; Harvey et al., 2004; Sun et al., 2004a; Sandkuhler et Ruscheweyh, 2005; Hu et al., 2006). Ces voies mettent en jeu principalement les protéines kinases PKA et PKC (Miletic et al., 2000; Zou et al., 2002; Sun et al., 2004b; Sweitzer et al., 2004; Lim et al., 2005). Concernant l'OT et son récepteur, il existe très peu de données sur les voies de signalisation mises en jeu, ainsi que sur les neurones exprimant ce récepteur dans d'autres structures du SNC. Hu *et al.* (2003) ont montré, dans les neurones de la lamina II de la moelle épinière, que I_A pouvait être inhibé par l'activation des « extracellular signal-regulated protein kinase » ERK1/2. L'activation de PKC et de PKA inhibe le courant I_A par une modulation des propriétés d'activation et d'inactivation ainsi que par une diminution du nombre de canaux K^+ fonctionnels. L'activation de ces kinases impliquerait une convergence des voies PKC et PKA (figure 62). Ainsi, la voie PKC inhibe de manière constitutive et tonique ce courant, alors que la voie PKA est inductible pour

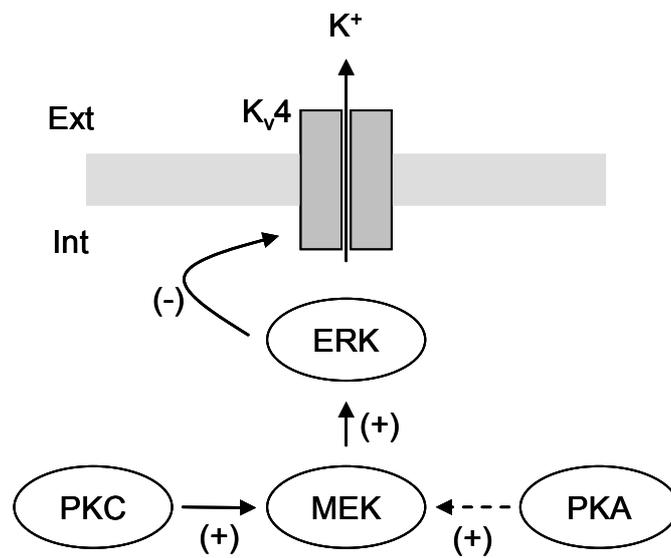


Figure 62 : Les mécanismes cellulaires de l'inhibition du courant I_A par PKA et PKC dans les neurones de la lamina II.

PKA et PKC inhibe le courant I_A par une activation de MEK par l'intermédiaire de médiateur non identifiés à ce jour. La voie PKC/MEK semble posséder un niveau d'activité de base alors que la voie PKA/MEK doit être activée

D'après Hu *et al.* (2003)

effectuer cette inhibition. On peut faire l'hypothèse que l'activation du récepteur OT induit l'inhibition des canaux responsables du courant I_A par une mise en jeu des ERK1/2. La voie des MEK pourrait être activée soit par un renforcement de la voie PKC, soit par une activation de la voie PKA, ou les deux. De même, nos résultats montrent que $I_{K_{DR}}$ est inhibé. Un effet inhibiteur sur $I_{K_{DR}}$ de l'activation de PKC a été observé sur différents types cellulaires (Pan et al., 2001; Sun et al., 2003a). Parallèlement, on peut aussi émettre l'hypothèse que les canaux Na^+ modulés par l'activation du récepteur OT pourraient être affectés par ces kinases, comme cela a été montré récemment sur des neurones non pyramidaux du cortex préfrontal, où ils sont inhibés par une convergence d'activité de PKA et de PKC suite à une stimulation des récepteurs μ des opiacés (Witkowski et Szulczyk, 2006).

Les données actuelles permettent d'envisager que les voies de la PKC dépendante du Ca^{2+} et de la PKA sont impliquées lors de l'activation du récepteur OT. Suite à une application d'OT, les astrocytes hypothalamiques en culture mobilisent les stocks de Ca^{2+} intracellulaires, suggérant l'activation de la voie phospholipase C-PKC (Di Scala-Guenot *et al.*, 1994). Dans les motoneurones du nerf vague, l'activation du récepteur OT ne semble pas mobiliser le Ca^{2+} intracellulaire, donc il ne fait pas intervenir la voie phospholipase C-PKC. Les données montrent que la réponse de ces motoneurones, suite à l'activation du récepteur OT, met en jeu, d'une part, une voie dépendante de l'AMPC sans activer la PKA et, d'autre part, une voie indépendante de l'AMPC dont les médiateurs n'ont pas été décrits (Alberi *et al.*, 1997). De plus, l'activation de ces voies met en jeu la stimulation d'une protéine G. Enfin, dans des cellules tumorales ainsi que dans des cellules ovariennes, l'activation du récepteur OT active la voie des ERK appartenant à la famille des MAP kinases (Strakova et al., 1998; Copland et al., 1999). Il a été montré que le récepteur OT est couplé à une protéine Gq ainsi qu'à une protéine Gi. Ceci a été observé par l'utilisation de bloqueurs spécifiques : la toxine pertussique qui bloque l'activation de la protéine Gi et des inhibiteurs spécifiques de l'activation de la phospholipase C et de la PKC, effecteurs de la protéine Gq. Enfin, l'activation de la protéine Gq permet l'activation de la voie des ERK. L'activation du récepteur OT exprimé à la surface des neurones de la lamina II semble mettre en jeu un couplage entre le récepteur OT et des protéines G chez la souris (Robinson *et al.*, 2002). Santos *et al.* (2004) ont montré que l'activation de protéines G couplées aux récepteurs μ des opiacés produit une conversion du profil de décharge en PA comparable à celle que l'on a observée lors d'une activation du récepteur OT. Il se peut donc, que la ou les mêmes voies de signalisation intracellulaire soient mises en jeu.

Ainsi, il est possible que l'activation du récepteur OT dans les neurones de la lamina II de la moelle épinière induise une inhibition des courants I_{Na} , I_A et I_{KDR} par une convergence des voies faisant intervenir PKA et PKC. De plus, l'inhibition de l'AHP observée dans nos conditions expérimentales ne semble pas impliquer des canaux responsables de I_{KCa} . En effet, si l'activation du récepteur OT impliquait une augmentation de Ca^{2+} intracellulaire, le courant de type SK décrit dans les neurones de type *répétitif* de la lamina II de la moelle épinière favoriserait l'augmentation de l'amplitude de l'AHP, et non sa diminution comme nous l'avons observé.

II. Les effets de l'ocytocine sur le réseau de neurones de la lamina II : l'ocytocine potentialise le tonus inhibiteur GABAergique

1. La localisation des récepteurs OT

Comme nous l'avons vu précédemment, une sous-population de neurones de la lamina II exprime un récepteur OT fonctionnel. L'application d'un agoniste spécifique réduit l'excitabilité des neurones. Cet effet est bloqué spécifiquement par l'application d'un antagoniste spécifique du récepteur OT, le dOVT. Nos résultats montrent également que la transmission synaptique glutamatergique médiée par le récepteur AMPA est facilitée lors de l'activation du récepteur OT. Cet effet est observé dans une sous-population (environ 50 %) de neurones de la lamina II en présence ou non de TTX dans le bain (figure 47). Cette observation contraste avec l'absence d'effet lors de l'enregistrement des CPSI miniatures GABAergiques et des CPSI spontanés glycinergiques. Ceci indique la présence de récepteurs OT présynaptiques sur une sous-population de neurones glutamatergiques (environ 50 %) et leur absence sur les entrées inhibitrices des neurones de la lamina II. Une telle potentialisation par l'OT de la transmission glutamatergique médiée par le récepteur AMPA avait déjà été observée sur des neurones en culture des couches superficielles des cornes dorsales de la moelle épinière (Jo et al., 1998b). Il semble que ces récepteurs OT soient présents à proximité ou sur les terminaisons axonales des neurones glutamatergiques, car leur effet est indépendant du PA présynaptique (insensible à la TTX).

Les données disponibles indiquent que les fibres ocytocinergiques établissent des contacts synaptiques principalement axo-dendritiques avec les neurones des laminae I et II. L'existence de synapses axo-axoniques n'a encore jamais été démontrée ni avec les terminaisons centrales des afférences sensorielles primaires, ni avec les neurones des couches superficielles (Rousselot *et al.*, 1990).

Nos résultats ne permettent pas de savoir si la libération d'OT par les fibres ocytocinergiques module la libération de glutamate par les afférences sensorielles primaires. Cependant, Yang *et al.* (2002) ont montré qu'une sous-population de neurones sensoriels en culture était sensible à une application exogène d'OT. Toutefois, la localisation membranaire des récepteurs OT dans les neurones sensoriels natifs n'est pas encore définie. Il n'est pas exclu que ces récepteurs OT soient situés à la terminaison centrale des afférences sensorielles primaires. Une situation similaire est décrite pour les nocicepteurs et les fibres

immunopositives pour les opiacés endogènes. A ce jour aucune synapse axo-axonique n'a pu être mise en évidence (Ma *et al.*, 1997). Cependant, il est admis que l'activation des récepteurs aux opiacés situés sur les terminaisons centrales des nocicepteurs inhibe la libération de substance P, malgré l'absence de synapses. L'action des opiacés se ferait à distance du lieu de libération. Une telle situation pourrait être envisageable pour l'OT sur son récepteur. Afin de confirmer la présence de récepteurs OT fonctionnels sur les terminaisons centrales des afférences sensorielles nociceptives, il serait intéressant d'effectuer des stimulations électriques des racines dorsales par un protocole classique de double stimulations. On enregistrerait, alors, la réponse évoquée (sous la forme de CPSE glutamatergiques) des neurones de la lamina II afin de déterminer des changements possibles du ratio des amplitudes de chacune des stimulations en absence et en présence d'OT.

Nos résultats sont en faveur d'une potentialisation de la transmission synaptique glutamatergique d'une sous-population de terminaisons excitatrices. Robinson *et al.* (2002) ont montré que l'application exogène d'OT diminuait l'amplitude des PPSE et CPSE AMPA évoqués des neurones de la lamina II lors d'une stimulation électrique de la racine dorsale chez la souris. Ils suggèrent que cet effet résulte d'un mécanisme postsynaptique, par lequel les protéines G activées par le récepteur OT inhiberaient les récepteurs AMPA des neurones de la lamina II. Cependant, ils n'ont ni confirmé ni infirmer un effet présynaptique par l'utilisation d'un protocole de double stimulations électriques des afférences sensorielles ou des terminaisons glutamatergiques de neurones de la lamina II et par l'enregistrement des CPSE miniatures AMPA. Il est possible que l'effet observé par Robinson *et al.* (2002) proviennent d'une modification de la résistance d'entrée des neurones de la lamina II enregistrés suite à l'activation du récepteur OT. En effet, nous avons pu observer, dans nos conditions expérimentales, que l'activation du récepteur OT diminuait la résistance membranaire des neurones de la lamina II.

Lors de l'enregistrement des CPSE miniatures AMPA, nous avons observé, pendant une application de TGOT dans le bain, des CPSE miniatures AMPA dont l'amplitude est diminuée et les cinétiques d'activation et de désactivation sont ralenties (figure 48). Par ailleurs, en plus de cette population de CPSE miniatures AMPA « lents », observée en présence de TGOT, co-existe une population de CPSE miniatures AMPA dont les caractéristiques sont similaires à celles observées en condition contrôle. Enfin, la probabilité de libération des synapses de cette dernière population de CPSE miniatures AMPA ne semble pas être modulée par le récepteur

OT. Un tel résultat suggère que l'activation du récepteur OT révèle des synapses qui seraient « silencieuses », ou indétectables avec notre approche méthodologique en absence d'OT. Par ailleurs ces synapses « silencieuses » seraient localisées à distance du soma du fait que les CPSE miniatures semblent être filtrés. Ce filtrage induit une atténuation du signal se propageant le long des dendrites. Ce phénomène d'atténuation, bien connu, est sous la dépendance des propriétés membranaires définies par R_m et C_m et la distance parcourue par le signal. Ainsi, l'OT favoriserait l'émergence d'une population de synapses dendritiques distales. En condition contrôle la probabilité de libération de ces synapses distales serait faible et cette probabilité serait augmentée en présence d'OT, alors que les synapses glutamatergiques somatiques et dendritiques proximales ne seraient pas modulées par l'OT.

Des synapses silencieuses glutamatergiques ont été mises en évidence dans plusieurs structures du SNC (Isaac et al., 1995; Liao et al., 1995; Durand et Konnerth, 1996; Wu et al., 1996; Isaac et al., 1997; Malenka et Nicoll, 1997) et suspectées dans la moelle épinière pour la première fois par Wall (1977). Les synapses sont dites silencieuses lorsqu'elles sont anatomiquement bien individualisées, mais fonctionnellement incapables de transmettre une information. D'un point de vue développemental, il a été montré que ces synapses silencieuses étaient très peu représentées après 10 jours post-nataux, comme observé dans l'aire CA1 de l'hippocampe et pour les synapses thalamocorticales (Durand et Konnerth, 1996; Isaac et al., 1997). Ces mécanismes impliquent une maturation des synapses glutamatergiques, résultat d'une plasticité synaptique qui met en œuvre un remodelage de la synapse médié par le récepteur NMDA. Ainsi, dans ce processus, l'activité de la synapse, par l'intervention des mécanismes de potentialisation à long terme et l'expression de récepteurs spécifiques, permet la conversion des synapses silencieuses en synapses fonctionnelles. Récemment, il a été mis en évidence qu'une population de neurones des couches superficielles de la corne dorsale de la moelle épinière possédait des synapses glutamatergiques inefficaces chez des rats âgés de 2 à 17 jours post-nataux (Li et Zhuo, 1998). La stimulation d'afférences sensorielles nociceptives à bas seuil d'activation est inefficace pour observer une transmission synaptique glutamatergique médiée par le récepteur AMPA. Cependant, l'application de sérotonine (médiateur d'un des contrôles descendants médullaires) révèle la présence de ces synapses. Cet effet résulte de l'activation des récepteurs sérotoninergiques exprimés à la surface de neurones médullaires. Ceci stimule des protéines G qui vont favoriser l'expression membranaire de récepteurs AMPA au niveau des synapses silencieuses, qui alors deviennent fonctionnelles. Il s'agit d'un effet postsynaptique. Ces synapses silencieuses co-existent sur un même neurone avec des synapses fonctionnelles et ne sont quasiment plus observables après

le 17^{ème} jour post-natal. Un tel mécanisme nécessite plusieurs minutes (environ 10 min) afin de recycler les récepteurs AMPA fonctionnels exprimés à la membrane (Li et Zhuo, 1998).

Dans nos conditions expérimentales, la détection de cette population de CPSE AMPA « lents » est rapide et très transitoire (durée de détection : $28,8 \pm 6,2$ ms) et nos résultats suggèrent une action présynaptique de l'OT sur les terminaisons glutamatergiques en augmentant la probabilité de libération, tout comme observé par Jo *et al.* (1998b), sur des neurones des couches superficielles en culture. La mise en jeu de mécanismes présynaptiques permet, avec des cinétiques rapides de convertir une synapse silencieuse en une synapse fonctionnelle par diverses hypothèses. Une modulation des mécanismes de fusion des vésicules peuvent conduire à une modulation des flux de neurotransmetteurs (Renger *et al.*, 2001; Choi *et al.*, 2003). Lors de nos enregistrements, l'activation du récepteur OT augmente la fréquence des CPSE spontanés et miniatures « lents » suggérant que cet effet est dépendant d'une augmentation du Ca^{2+} dans les terminaisons glutamatergiques distales. Ici, la probabilité d'ouverture des canaux Ca^{2+} intervenant dans les mécanismes de sécrétion serait faible. Ces canaux Ca^{2+} sont situés à proximité des protéines impliquées dans la sécrétion vésiculaire. L'activation des canaux Ca^{2+} permet une entrée de cet ion qui modifie l'architecture de ces protéines liées aux vésicules, favorisant ainsi la fusion de celles-ci avec la membrane plasmique présynaptique. Comme nous l'avons vu précédemment, l'activation du récepteur OT peut activer diverses voies de signalisation intracellulaire. Il semble, qu'en fonction du type cellulaire et de la localisation tissulaire, que le récepteur OT met en jeu des mécanismes différents. Ainsi, le Ca^{2+} intracellulaire, l'AMPC, la PKC, la PKA, les ERK1/2 peuvent être mobilisés suite à l'activation du récepteur OT couplé aux protéines G (Di Scala-Guenot *et al.*, 1994; Alberi *et al.*, 1997; Strakova *et al.*, 1998; Copland *et al.*, 1999; Gimpl et Fahrenholz, 2001; Robinson *et al.*, 2002). Ainsi, dans nos conditions, il est envisageable que l'activation du récepteur OT facilite la fusion des vésicules glutamatergiques par la mise en jeu d'une ou plusieurs de ces voies de signalisation intracellulaire. Il a été montré que la stimulation de la PKC dépendante du Ca^{2+} intracellulaire par les esters de phorbol favorise la fusion des vésicules glutamatergiques dans l'hippocampe (Malenka *et al.*, 1986; Finch et Jackson, 1990; Parfitt et Madison, 1993; Hori *et al.*, 1999). De même, la transmission glutamatergique peut être potentialisée par un mécanisme présynaptique dépendant de la PKA (Chen et Roper, 2003; Bie et Pan, 2005; Negrete-Diaz *et al.*, 2006). Enfin, la co-activation de PKA et de PKC facilite de manière synergique la libération du glutamate (Millan *et al.*, 2003). L'activation de ces voies de signalisation permet d'envisager que les canaux Ca^{2+} dépendants du potentiel situés dans les terminaisons sont potentialisés (Swartz *et al.*, 1993; Hell *et al.*, 1995; Stea *et*

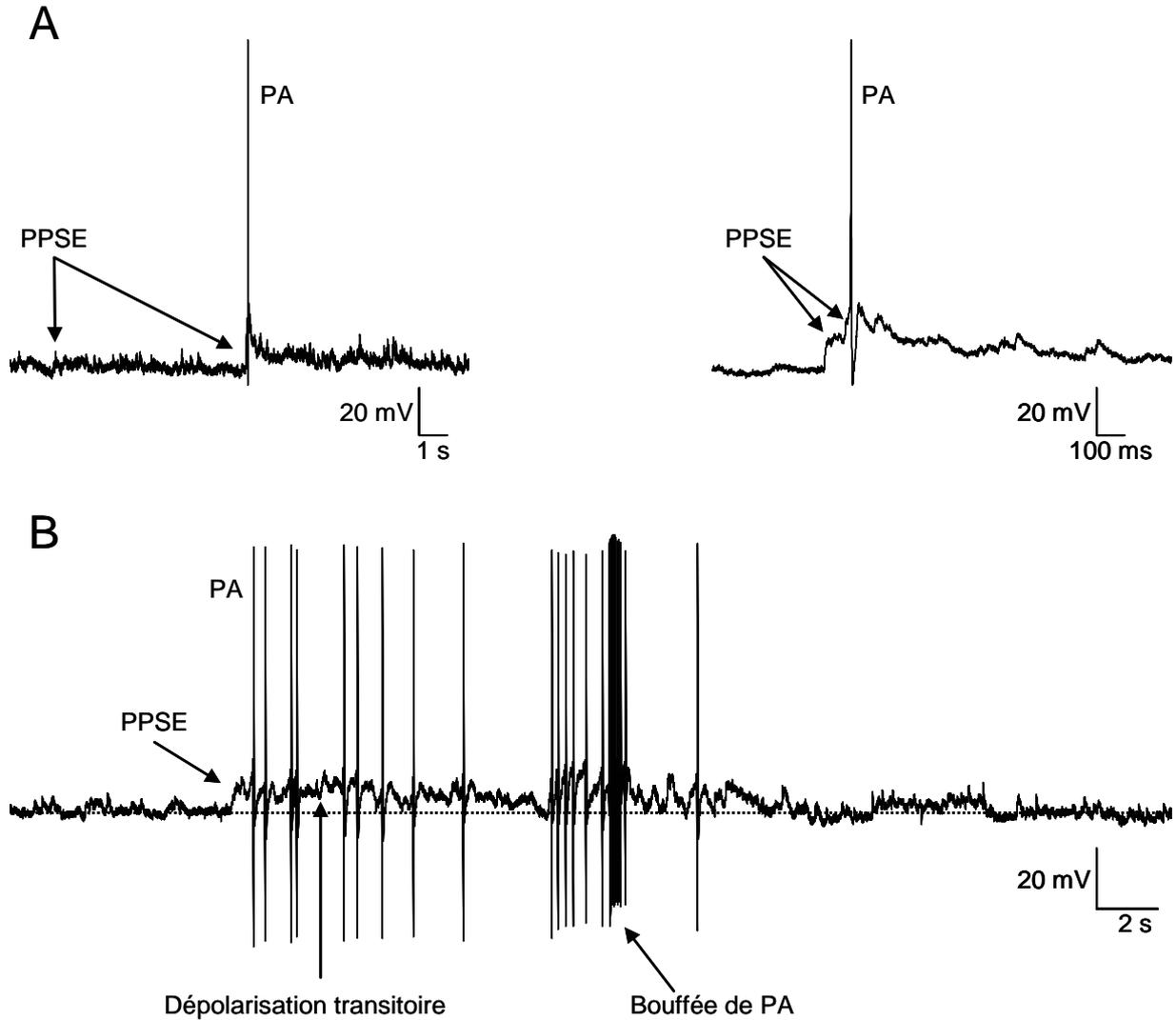


Figure 63 : L'ocytocine déclenche des potentiels d'action dans quelques neurones de la lamina II par une potentialisation de la transmission synaptique glutamatergique.

Deux neurones de la lamina II, profil de décharge de type phasique (A) et répétitif (B), ont été enregistrés lors de l'application de TGOT (1 μ M) dans le bain à partir de potentiel membranaire ajusté à -60 mV.

A : L'augmentation de la fréquence d'apparition des PPSE permet d'atteindre le seuil de déclenchement des PA observable sur un agrandissement à droite. On peut remarquer que le potentiel membranaire est transitoirement dépolarisé avant et après le PA résultant de la sommation des PPSE. Un PPSE, seul, ne permet pas d'atteindre le seuil de déclenchement des PA.

B : Ici aussi, l'augmentation de la fréquence des PPSE permet d'atteindre le seuil par une sommation temporelle. Dans ce cas, la dépolarisation transitoire observée est plus soutenue et permet de générer plusieurs PA successifs, voire une bouffée de PA courte. Lorsque le potentiel membranaire se rapproche de -60 mV (ligne pointillée) les PA disparaissent car la sommation des PPSE n'est pas suffisante pour atteindre le seuil de déclenchement des PA.

al., 1995) et que les protéines impliquées dans les mécanismes d'exocytose sont mises en jeu (Greengard *et al.*, 1993).

Comme le montrent les résultats, la libération vésiculaire de ces synapses glutamatergiques distales est potentialisée par l'activation du récepteur OT. Cependant, les CPSE sont atténués lors de leur propagation le long des dendrites. Ainsi, l'amplitude des CPSE « lents » est plus petite, mais la durée de la dépolarisation membranaire est augmentée au niveau du soma. Bien que ces CPSE « lents » ne semblent pas être suffisants pour atteindre le seuil de déclenchement des PA, l'augmentation de leur probabilité d'apparition va transitoirement favoriser une augmentation de l'excitabilité des neurones par une dépolarisation membranaire plus longue que des CPSE « rapides » issus de synapses somatiques et dendritiques proximales. De plus, par le phénomène de sommation temporelle, les CPSE « rapides » et « lents » peuvent se superposer. Il est possible, alors, que le potentiel membranaire atteigne le seuil de déclenchement des PA. Des observations dans ce sens ont pu être mises en évidence sur quelques neurones enregistrés en courant imposé (figure 63). Ainsi, la potentialisation des synapses glutamatergiques distales, par l'OT, favorise transitoirement l'excitabilité des neurones qui y sont connectées.

Les synapses ocytocinergiques sont de type axo-dendritique (Rousselot *et al.*, 1990). Jusqu'à ce jour aucune synapse ocytocinergique axo-axonique n'a pu être mise en évidence. Or nous observons des récepteurs sur les terminaisons de certains neurones glutamatergiques. *In vivo*, l'OT libérée par les fibres descendantes pourrait moduler les terminaisons glutamatergiques qui possèdent un récepteur OT fonctionnel par une action à distance résultant d'une diffusion de l'OT dans l'espace extracellulaire par une transmission extrasynaptique ou de type volumique sur les terminaisons glutamatergiques (Landgraf et Neumann, 2004).

Afin de confirmer la présence de ces synapses « silencieuses » et de les étudier plus en détail, il serait intéressant d'apposer une pipette de « patch-clamp » sur les dendrites ainsi que sur le soma des neurones de la lamina II. En stimulant électriquement la terminaison présynaptique des synapses glutamatergiques distales et en appliquant de l'OT sur ces neurones, il serait alors possible d'enregistrer les réponses évoquées. Cependant, les neurones de la lamina II ont des dendrites trop fines pour pouvoir appliquer une pipette de « patch-clamp ». Par ailleurs, le pourcentage de neurones de la lamina II connectés fonctionnellement entre-eux directement semble faible (Lu et Perl, 2005). Nous sommes donc confrontés à des difficultés techniques qui ne permettent pas d'étudier directement ces synapses « silencieuses » plus en détail.

Nos résultats montrent que le récepteur OT ne semble pas être exprimé sur les terminaisons des neurones GABAergiques et glycinergiques qui établissent des synapses avec les neurones de la lamina II. Par ailleurs, les caractéristiques des CPSI GABAergiques miniatures ne sont pas modifiées lors de l'application aiguë de TGOT (figure 49). Ceci confirme que l'activation du récepteur OT, s'il est exprimé à la surface du neurone postsynaptique, ne permet pas de moduler les récepteurs GABA_A des neurones de la lamina II. Il est à noter que, dans le noyau supraoptique, Brussaard *et al.* (1996) ont montré que l'OT diminue l'amplitude des CPSI GABAergiques miniatures et spontanés. Cet effet inhibiteur postsynaptique semble impliquer une voie de signalisation intracellulaire mobilisant le Ca²⁺ et la voie de la PKC (Brussaard *et al.*, 1996; Brussaard *et al.*, 2000). Il semble donc que les récepteurs GABA_A des neurones de la lamina II de la moelle épinière ne sont pas régulés de la même manière que ceux des neurones du noyau supraoptique. Une explication de cette différence entre le noyau supraoptique et la lamina II de la moelle épinière serait que les neurones inhibiteurs de la lamina II n'expriment pas le récepteur OT à leur surface membranaire.

Dans ce travail, nous avons observé qu'environ 60 % des neurones de la lamina II possèdent des récepteurs OT postsynaptiques fonctionnels modulant les propriétés membranaires. Les neurones inhibiteurs de la lamina II ne semblent pas exprimer le récepteur OT. De plus, seuls certains neurones glutamatergiques (environ 50 %) expriment sur leurs terminaisons des récepteurs OT fonctionnels. Enfin, la majorité des neurones de la lamina II semblent être des neurones glutamatergiques (environ les deux tiers selon Todd et Spike, 1993). Au vu de ces données, nous émettons l'hypothèse que seuls les neurones glutamatergiques possèdent des récepteurs OT. Cependant, il semble que dans ce cas, l'expression de ce récepteur fonctionnel sur les terminaisons glutamatergiques implique alors une régulation différente suivant les neurones. Ou alors, il se peut que le couplage entre le récepteur OT et la ou les voies de signalisations intracellulaires est non fonctionnel dans les terminaisons. Ainsi, des neurones glutamatergiques possèderaient des récepteurs OT fonctionnels sur toute leur surface membranaire alors que d'autres auraient des récepteurs OT fonctionnels uniquement sur le compartiment somatodendritique. L'hypothèse d'une compartimentation des récepteurs OT fonctionnels a été suggérée pour des neurones GABAergiques de l'hippocampe et du noyau central de l'amygdale (Zaninetti et Raggenbass,

2000; Huber et al., 2005), où il semble que le récepteur OT augmente l'excitabilité de ces neurones sans modifier la probabilité de libération des terminaisons GABAergiques.

2. L'organisation fonctionnelle du réseau de neurones de la lamina II et les conséquences de l'activation du récepteur OT dans ce réseau

Nos résultats *in vitro* montrent que la transmission GABAergique rapide est potentialisée dans tous les neurones de la lamina II, lorsque TOGT est appliquée (figure 50). Ceci n'est jamais observé quand les PA sont bloqués par la TTX (figure 49). Ceci suggère que les neurones GABAergiques sont sous le contrôle de neurones glutamatergiques qui possèdent des récepteurs OT présynaptiques fonctionnels. Dans les neurones du NSO, l'OT peut augmenter la fréquence des bouffées de PA des neurones dont l'activité de décharge est spontanée et peut déclencher une activité de décharge en bouffée dans des neurones à activité non spontanée (Jourdain *et al.*, 1998). Cet effet est dû à une potentialisation de la transmission synaptique glutamatergique par l'activation du récepteur OT de neurones glutamatergiques connectés à ces neurones du NSO. Par contraste, dans l'hippocampe et l'amygdale (Zaninetti et Raggenbass, 2000; Huber et al., 2005), la transmission GABAergique peut être potentialisée par une action présynaptique. Ici, l'OT exerce une action excitatrice sur le compartiment somato-dendritique favorisant l'émission de PA. Pour Huber *et al.* (2005), l'OT induit une dépolarisation de la membrane qui permet d'atteindre plus facilement le seuil de déclenchement des PA. Dans nos conditions expérimentales, nous n'avons observé l'émission de PA que lors d'une sommation temporelle des PPSE suffisante pour atteindre le seuil de déclenchement des PA en absence de la transmission synaptique inhibitrice (figure 63). De plus, *in vivo*, nous avons observé que la stimulation électrique du NPV provoquait une inhibition de la réponse des neurones de la lamina II à une stimulation nociceptive (figure 54). Des résultats similaires ont déjà été mis en évidence (Condes-Lara *et al.*, 2006). Nos données montrent que cet effet était spécifique du récepteur OT et en partie aboli lorsque de la bicuculline était appliquée localement à proximité du neurone enregistré. Ainsi, les neurones GABAergiques, sous la dépendance du contrôle ocytocinergique, réalisent une inhibition de l'activité des neurones de la lamina II. L'activation du récepteur OT des neurones glutamatergiques permet d'augmenter le tonus inhibiteur GABAergique médié par le récepteur GABA_A de telle manière qu'il diminue la réponse nociceptive des neurones de la lamina II lors d'une stimulation des fibres A δ et C, spécifiquement (figure 64).

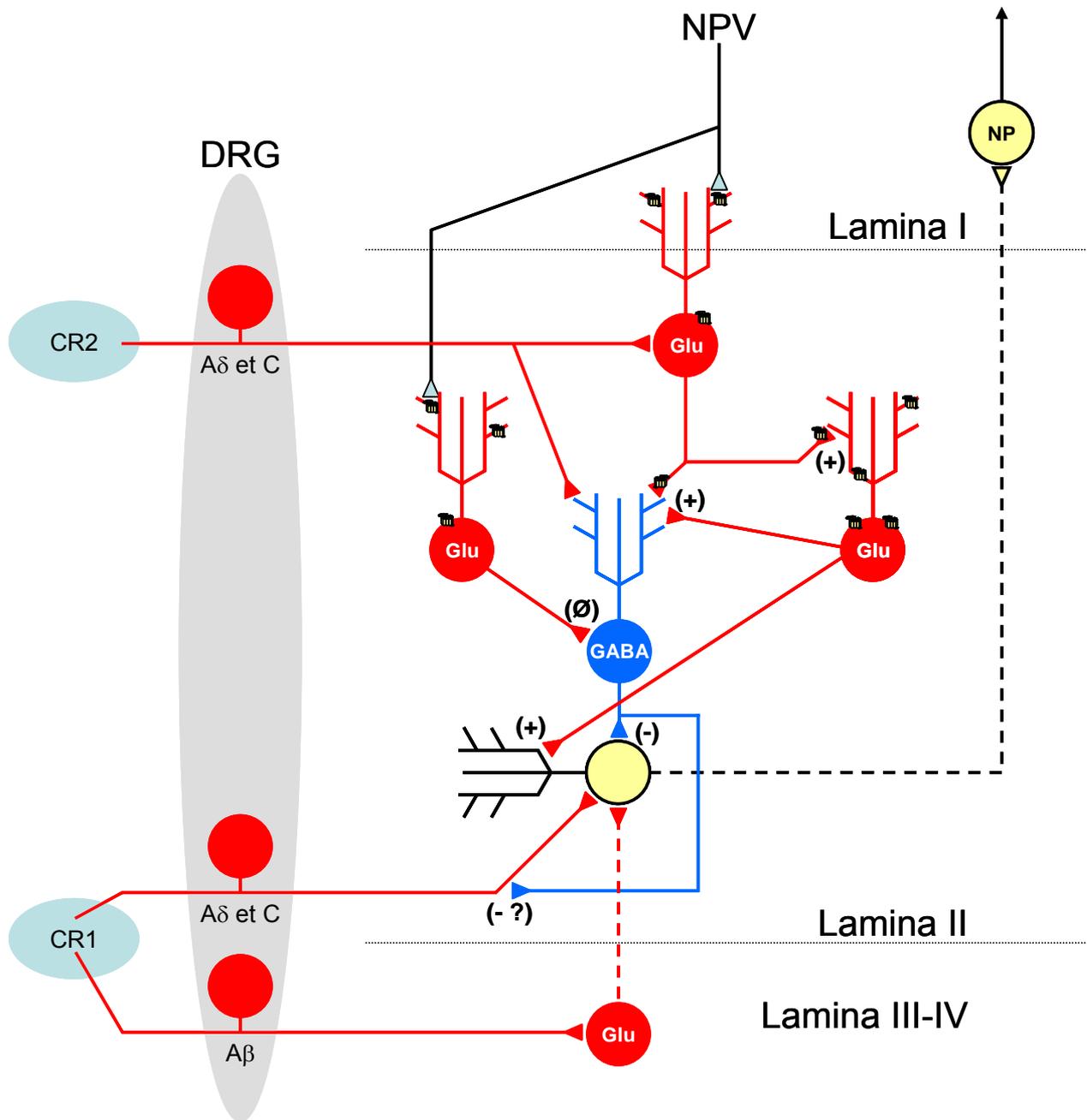


Figure 64 : Schéma simplifié modélisant l'organisation des interneurons de la lamina II et le rôle du contrôle OT.

Un neurone de la lamina II (jaune) reçoit des entrées excitatrices (rouge) mono ou polysynaptiques de neurones sensoriels nociceptifs (type A δ et C) et polysynaptiques issues de neurones sensoriels non nociceptifs (A β). Ces afférences sensorielles sont activées suite à la stimulation de leur champ récepteur (CR1). De plus, le neurone de la lamina II reçoit des entrées excitatrices glutamatergiques par d'autres neurones de la lamina II, ainsi que des entrées inhibitrices GABAergique et glycinergique. Ce neurone relaie les informations vers le neurone de projection (NP) situé dans la lamina I. Les neurones glutamatergiques sont contactés sur leurs dendrites par les fibres descendantes ocytocinergiques. Ces contacts permettent d'inhiber l'excitabilité des neurones glutamatergiques. Le neurone GABAergique et le neurone (jaune) sont stimulés directement ou indirectement par des neurones glutamatergiques possédant des récepteurs OT à leurs terminaisons. L'action de l'OT sur ces récepteurs augmente le tonus inhibiteur des neurones GABAergiques. Ces neurones GABAergiques inhibent directement les neurones de la lamina II et/ou indirectement par une inhibition présynaptique des afférences sensorielles nociceptives. Il en résulte que la transmission des informations nociceptives suite à la stimulation du champ récepteur CR1 est inhibée. Par contre, la stimulation du champ récepteur du neurone GABAergique (CR2) renforce l'inhibition de manière synergique avec l'activation du contrôle descendant ocytocinergique.

Glu : glutamate ; (+) : excitation du neurone postsynaptique ; (-) : inhibition du neurone postsynaptique ; (- ?) : inhibition présynaptique possible ; (\emptyset) : pas d'effet sur le neurone postsynaptique ;  : récepteur OT.

In vivo, Condés-Lara *et al.* (2003) ont montré que l'application concomitante d'OT et de glutamate inhibait la réponse de certains neurones par rapport à l'application de glutamate seul. Par ailleurs, dans cette même étude, il a pu être mis en évidence que, dans certains cas, l'application d'OT avait des effets opposés lors de l'enregistrement simultané de cellules voisines. L'OT est capable d'activer un neurone jusqu'à lors silencieux et cette activation est suivie par l'inhibition de l'activité d'un autre neurone. Nos résultats confirment ces effets opposés de l'activation du récepteur OT (figure 55). Nos données permettent de préciser que le neurone médullaire activé par la stimulation électrique du NPV (libérant de l'OT) ne possède pas d'entrées sensorielles nociceptives issues du même champ récepteur que le neurone inhibé par la stimulation du NPV. Nos données montrent en plus que l'activité de ce neurone, dépendante du NPV n'est pas inhibée lors d'une application médullaire de bicuculline. Ceci suggère que ce neurone activé spécifiquement par le NPV peut être un neurone glutamatergique sensible à l'OT ou un neurone GABAergique dont l'activité est potentialisée par les neurones glutamatergiques sensibles à l'OT (potentialisation de la libération de glutamate) ; (figure 64). Ainsi, l'activation du contrôle descendant ocytocinergique augmente l'inhibition des neurones de la lamina II qui se traduit par une diminution de la réponse des neurones de la lamina II à une stimulation nociceptive. Cette inhibition peut s'exercer directement sur les neurones de la lamina II comme nous avons pu l'observer *in vitro*. Mais elle peut également s'exercer sur les afférences sensorielles nociceptives où le neurone GABAergique pourrait inhiber le transfert des informations par un mécanisme d'inhibition présynaptique des terminaisons centrales des nocicepteurs (figure 64).

Il a été montré que des neurones GABAergiques pouvaient établir des synapses axo-axoniques avec les nocicepteurs de type C (Todd et Lochhead, 1990; Bernardi *et al.*, 1995; Todd, 1996). Par ailleurs, il est accepté, d'une manière générale, que le GABA inhibe la libération de glutamate et de neuropeptides par les terminaisons centrales des nocicepteurs (Malcangio et Bowery, 1996; Rudomin et Schmidt, 1999; Willis, 1999). Ces dernières expriment le récepteur GABA_B (Price *et al.*, 1984; Bernardi *et al.*, 1995; Yang *et al.*, 2001) dont l'activation inactive les canaux Ca²⁺ dépendants du potentiel et inhibe donc la fusion des vésicules synaptiques (Dolphin et Scott, 1987; Dolphin *et al.*, 1991; Campbell *et al.*, 1993). Cependant, il apparaît que l'activation du récepteur GABA_B joue un rôle mineur, par rapport aux récepteur GABA_A, dans l'inhibition des terminaisons centrales des afférences primaires de type Ia qui réalisent des synapses avec les motoneurones des muscles gastrocnémiens (Stuart et Redman, 1992). Nos résultats montrent que l'inhibition observée lors de la stimulation électrique du NPV est en grande partie médiée par le récepteur GABA_A, car cette

inhibition est en partie abolie par la bicuculline (figure 54). En effet, les neurones sensoriels expriment ce récepteur, où le gradient de concentration pour le Cl⁻ est tel que l'ouverture du récepteur GABA_A entraîne une dépolarisation (Sivilotti et Nistri, 1991). Cette inhibition des afférences sensorielles, médiée par le récepteur GABA_A, résulte d'un mécanisme de court-circuit de la membrane dû à une dépolarisation locale de celle-ci. Ainsi, la propagation de proche en proche d'un PA issu de la périphérie vers la terminaison centrale n'est plus possible car les conductances ioniques dépendantes du potentiel sont inactivées. Donc, la potentialisation de la transmission GABAergiques lors de la stimulation du NPV pourrait agir aussi sur les terminaisons centrales des nocicepteurs par une activation des récepteurs GABA_A principalement et GABA_B. Il en résulterait, ainsi, une diminution de la réponse des neurones de la lamina II lors d'une stimulation des afférences sensorielles nociceptives.

Une population de neurones glutamatergiques de la lamina II de la corne dorsale de la moelle épinière est stimulée par les neurones ocytocinergiques du NPV (figure 64). L'activation de ces neurones glutamatergiques est transmise (directement ou indirectement) à tous les neurones GABAergiques de la lamina II et produit une inhibition du transfert des informations véhiculées par les afférences sensorielles de type A δ et C. Comme suggéré par Condes-Lara *et al.* (2003), nos résultats ont permis de mettre en évidence que des neurones de la lamina II de la moelle épinière sont excités spécifiquement par la libération d'OT issue de neurones du NPV et que cette activation conduit à une inhibition de certains neurones de la lamina II. Nos données permettent d'envisager qu'il existe une articulation privilégiée entre les neurones glutamatergiques sensibles à l'OT (potentialisation de la libération) et des neurones GABAergiques qui ont pour rôle de bloquer le transfert des informations nociceptives vers les neurones de projections. De plus, le neurone activé par la stimulation du NPV (neurone GABAergique ou neurone glutamatergique sensible à l'OT) ne présente pas le même champ récepteur que le neurone inhibé par la stimulation du NPV. Ainsi, un neurone GABAergique sous la dépendance d'un champ récepteur donné pourrait inhiber des neurones de la lamina II qui eux sont sous la dépendance d'un autre champ récepteur. Cette inhibition pourrait être renforcée de manière synergique par l'activation du NPV afin de favoriser l'analgésie dans des conditions particulières, telles que le stress (Robinson *et al.*, 2002), les douleurs neuropathiques (Miranda-Cardenas *et al.*, 2006) ou dans le cadre de ce travail, lors de douleurs inflammatoires périphériques, où le contrôle descendant ocytocinergique semble être impliqué.

Il apparaît que les effets modulateurs de l'OT impliquent l'existence d'une boucle hypothalamo-médullaire. L'activation des afférences sensorielles nociceptives stimule les neurones de projection favorisant ainsi la libération d'OT au niveau médullaire.

En effet, une voie spino-hypothalamique peut être activée par une stimulation nociceptive et peut être impliquée dans la mise en place de mécanismes endocrines et autonomes (Burstein et al., 1987; Dado et al., 1994c, 1994b, 1994a). Les neurones de projections des couches superficielles de la corne dorsale, aussi bien que les neurones du noyau médullaire latéral et de la lamina X, projettent leurs axones sur les parties latérale et médiane de l'hypothalamus. Par ailleurs, des projections ocytocinergiques médullaires à partir de du NPV de l'hypothalamus ont été décrites (Sawchenko et Swanson, 1982; Cechetto et Saper, 1988; Toth et al., 1999). Ainsi, l'activation des afférences sensorielles nociceptives pourrait stimuler le contrôle descendant ocytocinergique qui agirait alors sur le réseau de neurone de la lamina II.

Comme nous l'avons vu l'OT diminue l'excitabilité des neurones de la lamina II par un effet postsynaptique, où les neurones génèrent plus difficilement des PA lorsqu'ils sont stimulés. De plus, nous avons formulé l'hypothèse selon laquelle les neurones glutamatergiques possèdent des récepteurs OT capables de moduler cette excitabilité alors que les neurones inhibiteurs en sont dépourvus. *In vivo*, lorsque les neurones glutamatergiques sont affectés par la présence d'OT, ils répondront plus difficilement à une sollicitation des afférences sensorielles nociceptives et généreront que peu de PA. En parallèle, l'activation du contrôle descendant ocytocinergique conduira à une augmentation du tonus inhibiteur GABAergique.

Il semble, alors, que le contrôle descendant ocytocinergique modifie la balance excitation-inhibition en faveur de l'inhibition. En effet, il est suggéré qu'il existe une balance entre l'excitation et l'inhibition telle que dans des conditions non pathologiques, l'inhibition prédomine. Cependant, expérimentalement, il s'avère qu'un renforcement de l'excitation ou une désinhibition produirait des symptômes similaires à ceux observés dans des conditions pathologiques. Ainsi, des expériences de blocage des transmissions synaptiques rapides médiées par les récepteurs GABA_A et glycine ont été effectuées par l'injection intrathécale des inhibiteurs spécifiques *in vivo* (Yaksh, 1989; Sivilotti et Woolf, 1994). Dans ces conditions, les animaux présentent des symptômes d'hyperlagie et d'allodynie. Parallèlement, les neurones médullaires présentent une hyperexcitabilité et une sensibilisation centrale des afférences sensorielles primaires est observée, lors d'une stimulation tactile de la patte (Sivilotti et Woolf, 1994).

Par ailleurs, nous avons observé, dans des conditions d'inflammation périphérique, que les contenus en OT étaient augmentés 24 h après l'initiation de l'inflammation. On peut suggérer, alors, que l'augmentation du tonus ocytocinergique au niveau médullaire va favoriser l'inhibition en augmentant le tonus GABAergique par une potentialisation de la libération du GABA induite par l'activation des neurones glutamatergiques sensibles à l'OT.

III. Les conséquences physiopathologiques de l'activation du contrôle descendant ocytocinergique

Dans des conditions non pathologiques, nous avons pu observer que l'activation aiguë du récepteur OT *in vitro* et *in vivo* favorisait une diminution de l'excitabilité d'une population de neurones de la lamina II à la fois par un mécanisme postsynaptique, où les neurones génèrent plus difficilement des PA, et par une augmentation du tonus inhibiteur GABAergique qui se caractérise par une potentialisation de la libération du GABA par l'ensemble des neurones GABAergiques. Ces effets de l'activation du récepteur OT rendent compte que le contrôle descendant ocytocinergique pourrait avoir une action antinociceptive, analgésique dans des conditions pathologiques.

En utilisant un modèle de sensibilisation douloureuse inflammatoire à court terme, nos résultats montrent que les contenus en OT dans la moelle épinière sont significativement augmentés, 24 h après le déclenchement de l'inflammation. La technique de dosage radioimmunologique permet juste de montrer une augmentation du contenu médullaire de la substance dosée, mais pas de confirmer si l'effet observé conduit à une augmentation de la sécrétion d'OT dans des conditions inflammatoires. Cependant, nos résultats sont similaires à ceux observés par Miakowski *et al.* (1988), où un stress induit par la nage forcée chez le rat produit une augmentation des contenus médullaires en OT. De plus, il est suggéré que l'activation du NPV et la libération d'OT dans la moelle épinière sont impliqués dans l'analgésie induite par le stress (Truesdell et Bodnar, 1987; Robinson *et al.*, 2002). Dans des conditions de douleurs pathologiques particulières (« neck and back pain ») induites par compression de la moelle épinière chez le chien, les concentrations d'OT sont largement augmentées dans le liquide céphalo-rachidien du groupe d'animaux présentant des douleurs (Brown et Perkowski, 1998). De plus, les quantités d'OT mesurées sont supérieures pour les chiens ayant une douleur dite « chronique » (supérieure à 7 jours). Cette étude permet d'envisager que dans des conditions de douleurs pathologiques, l'OT est libérée à partir des fibres descendantes ocytocinergiques. Dans nos conditions expérimentales, le blocage du récepteur OT par l'injection intrathécale de dOVT produit une reprise de l'hyperalgie mécanique chez les rats inflammatoires. Le résultat montre que l'inflammation induite par l'injection de carragénine produit une libération d'OT dans le milieu extracellulaire, qui exerce une action antinociceptive tonique dans des conditions pathologiques. Un effet similaire a pu être observé par Yu *et al.* (2003). De plus, ces mêmes auteurs ont pu mettre en évidence sur

des animaux normaux qu'il existait une libération et une action tonique d'OT, car l'injection intrathécale d'un antagoniste de l'OT induit une augmentation des seuils de l'hyperalgie thermique et mécanique. L'action de l'OT peut s'exercer par un effet local (autocrine et/ou paracrine) et par diffusion dans le liquide céphalo-rachidien sur la moelle épinière. Nos résultats sont également en accord avec ceux obtenus par Yu *et al.* (2003), où ils observent qu'une injection intrathécale d'OT induit une diminution de l'hyperalgie mécanique et thermique chez des animaux ayant reçu une injection intraplantaire de carragénine. Cependant, l'effet antinociceptif observé implique la libération et l'action d'opiacés agissant sur les récepteurs μ et κ médullaires. Nous ne pouvons pas exclure qu'une partie des effets de l'activation du récepteur OT que nous observons *in vitro* et *in vivo* passe par une participation des opiacés endogènes, comme cela est suggéré par Miranda-Cardenas *et al.* (2006). Les observations du groupe de recherche de Miguel Condés-Lara montrent qu'une injection intrathécale d'OT ou une stimulation électrique du NPV induit un effet antinociceptif qui diminue les réponses à une stimulation mécanique et thermique chez des rats qui présentent une douleur chronique induite par une ligature lâche du nerf sciatique. Cet effet passe pour une grande partie par une action directe de l'OT mais aussi d'une manière non significative par une action des opiacés. Par ailleurs, il a été mis en évidence, que le contrôle descendant des opiacés endogènes était recruté lors de l'activation d'un contrôle ocytocinergique sur la substance grise périaqueducule et du noyau du Raphé Magnus (Ge *et al.*, 2002; Wang *et al.*, 2003). Il serait intéressant dans le cadre de nos expériences électrophysiologiques *in vitro* et *in vivo* de connaître la part potentielle des opiacés dans les effets observés lors de l'activation aiguë du récepteur OT. En effet, il existe une relation importante entre l'OT et les opiacés aux étages supramédullaires. Il se peut que dans des conditions d'une activation à court ou à long terme des récepteurs OT médullaires, il y ait une activation des récepteurs opiacés médullaires.

Des travaux récents réalisés dans le laboratoire montrent que chez le rat adulte, dans des conditions de douleurs inflammatoires, il y a une reprise de la neurostéroïdogénèse qui permet d'augmenter le tonus GABAergique médié par le récepteur GABA_A, afin d'accroître l'inhibition dans le réseau de neurone de la lamina II (voir les annexes 1, 2 et 3). Cependant, jusqu'à ce jour, aucune donnée ne permet de renseigner sur le ou les médiateurs qui interviennent dans l'activation de ce mécanisme cellulaire. Les résultats de mon travail de thèse montrent qu'une incubation chronique des tranches de moelle épinière avec TGOT

produit une reprise de la neurostéroïdogenèse d'une manière comparable à une incubation chronique des tranches avec des stéroïdes réduits en position 5 et 3 α . Ce résultat a été obtenu en utilisant la sensibilité des récepteurs GABA_A aux neurostéroïdes comme détecteur de la production des neurostéroïdes réduits en position 5 et 3 α . Ces stéroïdes sont connus pour être des agents potentialisateurs important du récepteur GABA_A (Lambert *et al.*, 2003). Ainsi, nos résultats semblent être en faveur d'une activation de la neurostéroïdogenèse par le contrôle descendant ocytocinergique. Ceci aurait pour conséquence d'augmenter le tonus inhibiteur GABAergique lors d'une activation au long terme de ce contrôle. Très récemment, Do-Rego *et al.* (2006) ont montré que la vasotocine et la mésotocine étaient capables d'activer la neurostéroïdogenèse dans le SNC de la grenouille. Il est intéressant de constater, que la mésotocine, analogue de l'OT chez les amphibiens, est capable elle aussi de stimuler la neurostéroïdogenèse. Aujourd'hui, nous ne pouvons pas confirmer à quel niveau l'OT agit sur la chaîne de biosynthèse des neurostéroïdes. Est-ce que l'OT stimule directement le PBR, qui intervient dans l'incorporation mitochondriale du cholestérol (précurseur des stéroïdes) ? Est-ce que l'OT stimule des enzymes plus en aval de la biosynthèse des neurostéroïdes ? Est-ce que cet effet passe par une action directe de l'activation du récepteur OT afin de moduler la biosynthèse des neurostéroïdes, où alors y-a-t-il un intermédiaire ? Est-ce que l'activation du contrôle descendant ocytocinergique est impliquée, pour tout ou partie, dans la stimulation de la neurostéroïdogenèse, dans des conditions pathologiques chez le rat adulte ? Ces questions restent aujourd'hui ouvertes et nécessitent d'être approfondies. De plus, au regard de ces résultats tout à fait originaux, il semble aujourd'hui important de préciser le rôle de l'action des contrôles descendants facilitateurs et inhibiteurs dans la modulation de contrôle locaux comme la neurostéroïdogenèse.

Les résultats expérimentaux obtenus au cours de ce travail de thèse ont permis d'identifier quelques mécanismes qui permettent de mieux comprendre l'action antinociceptive du contrôle descendant ocytocinergique. L'activation du contrôle ocytocinergique et la libération de l'OT implique des actions à la fois pré et postsynaptique qui conduisent en condition d'activation aiguë du récepteur OT à 1) une inhibition de la réponse des neurones de la lamina II à des stimulations nociceptives, 2) à une augmentation du tonus inhibiteur GABAergique, 3) à une diminution de l'excitabilité des neurones qui se traduit par une difficulté à émettre des PA. D'autre part, dans des conditions d'activation plus chronique ou

durable du récepteur OT *in vitro*, l'OT semble capable d'augmenter le tonus inhibiteur GABAergique en produisant des modulateurs allostériques positifs locaux qui accentuent la fonction du récepteur GABA_A. Cet effet peut être mis en parallèle avec les données obtenues précédemment dans le laboratoire. Il reste quand même à préciser, par une approche *in vivo* et *in vitro*, le rôle de l'interaction OT-neurostéroïdogenèse médullaire. Enfin, nous avons observé les effets de l'activation du contrôle ocytocinergique dans des conditions pathologiques particulières. Il semble judicieux de préciser par une approche électrophysiologique *in vivo* chez des animaux présentant une douleur inflammatoire périphérique les conséquences de l'activation du contrôle descendant ocytocinergique par une injection intrathécale ou non d'un antagoniste du récepteur OT. Par ailleurs, il serait intéressant d'observer aussi, le rôle analgésique possible du contrôle descendant ocytocinergique dans des conditions de douleurs chroniques.

Bibliographie

- Akk G, Shu HJ, Wang C, Steinbach JH, Zorumski CF, Covey DF, Mennerick S (2005) Neurosteroid access to the GABAA receptor. *J Neurosci* 25:11605-11613.
- Alberi S, Dreifuss JJ, Raggenbass M (1997) The oxytocin-induced inward current in vagal neurons of the rat is mediated by G protein activation but not by an increase in the intracellular calcium concentration. *Eur J Neurosci* 9:2605-2612.
- Albuquerque C, Lee CJ, Jackson AC, MacDermott AB (1999) Subpopulations of GABAergic and non-GABAergic rat dorsal horn neurons express Ca²⁺-permeable AMPA receptors. *Eur J Neurosci* 11:2758-2766.
- Alstermark B, Isa T, Tantisira B (1991) Pyramidal excitation in long propriospinal neurones in the cervical segments of the cat. *Exp Brain Res* 84:569-582.
- Andrew D, Craig AD (2001a) Spinothalamic lamina I neurons selectively sensitive to histamine: a central neural pathway for itch. *Nat Neurosci* 4:72-77.
- Andrew D, Craig AD (2001b) Spinothalamic lamina I neurones selectively responsive to cutaneous warming in cats. *J Physiol* 537:489-495.
- Andrew D, Craig AD (2002) Responses of spinothalamic lamina I neurons to maintained noxious mechanical stimulation in the cat. *J Neurophysiol* 87:1889-1901.
- Antal M, Polgar E, Chalmers J, Minson JB, Llewellyn-Smith I, Heizmann CW, Somogyi P (1991) Different populations of parvalbumin- and calbindin-D28k-immunoreactive neurons contain GABA and accumulate 3H-D-aspartate in the dorsal horn of the rat spinal cord. *J Comp Neurol* 314:114-124.
- Arletti R, Benelli A, Bertolini A (1993) Influence of oxytocin on nociception and morphine antinociception. *Neuropeptides* 24:125-129.
- Armstrong WE, Warach S, Hatton GI, McNeill TH (1980) Subnuclei in the rat hypothalamic paraventricular nucleus: a cytoarchitectural, horseradish peroxidase and immunocytochemical analysis. *Neuroscience* 5:1931-1958.
- Arpin-Bott MP, Waltisperger E, Freund-Mercier MJ, Stoeckel ME (1997) Two oxytocin-binding site subtypes in rat kidney: pharmacological characterization, ontogeny and localization by in vitro and in vivo autoradiography. *J Endocrinol* 153:49-59.
- Averill S, McMahon SB, Clary DO, Reichardt LF, Priestley JV (1995) Immunocytochemical localization of trkA receptors in chemically identified subgroups of adult rat sensory neurons. *Eur J Neurosci* 7:1484-1494.
- Baba H, Yoshimura M, Nishi S, Shimoji K (1994) Synaptic responses of substantia gelatinosa neurones to dorsal column stimulation in rat spinal cord in vitro. *J Physiol* 478 (Pt 1):87-99.
- Barber LA, Vasko MR (1996) Activation of protein kinase C augments peptide release from rat sensory neurons. *J Neurochem* 67:72-80.
- Barber RP, Vaughn JE, Saito K, McLaughlin BJ, Roberts E (1978) GABAergic terminals are presynaptic to primary afferent terminals in the substantia gelatinosa of the rat spinal cord. *Brain Res* 141:35-55.
- Barberis C, Tribollet E (1996) Vasopressin and oxytocin receptors in the central nervous system. *Crit Rev Neurobiol* 10:119-154.
- Basbaum AI (1999) Spinal mechanisms of acute and persistent pain. *Reg Anesth Pain Med* 24:59-67.
- Battaglia G, Rustioni A (1988) Coexistence of glutamate and substance P in dorsal root ganglion neurons of the rat and monkey. *J Comp Neurol* 277:302-312.
- Beinfeld MC, Meyer DK, Brownstein MJ (1980) Cholecystokinin octapeptide in the rat hypothalamo-neurohypophysial system. *Nature* 288:376-378.
- Bekkers JM, Delaney AJ (2001) Modulation of excitability by alpha-dendrotoxin-sensitive potassium channels in neocortical pyramidal neurons. *J Neurosci* 21:6553-6560.

- Belelli D, Pistis M, Peters JA, Lambert JJ (1999) General anaesthetic action at transmitter-gated inhibitory amino acid receptors. *Trends Pharmacol Sci* 20:496-502.
- Benelli A, Bertolini A, Poggioli R, Menozzi B, Basaglia R, Arletti R (1995) Polymodal dose-response curve for oxytocin in the social recognition test. *Neuropeptides* 28:251-255.
- Bennett DL, Michael GJ, Ramachandran N, Munson JB, Averill S, Yan Q, McMahon SB, Priestley JV (1998) A distinct subgroup of small DRG cells express GDNF receptor components and GDNF is protective for these neurons after nerve injury. *J Neurosci* 18:3059-3072.
- Bernard JF, Dallel R, Raboisson P, Villanueva L, Le Bars D (1995) Organization of the efferent projections from the spinal cervical enlargement to the parabrachial area and periaqueductal gray: a PHA-L study in the rat. *J Comp Neurol* 353:480-505.
- Bernardi PS, Valtschanoff JG, Weinberg RJ, Schmidt HH, Rustioni A (1995) Synaptic interactions between primary afferent terminals and GABA and nitric oxide-synthesizing neurons in superficial laminae of the rat spinal cord. *J Neurosci* 15:1363-1371.
- Bester H, Beggs S, Woolf CJ (2000) Changes in tactile stimuli-induced behavior and c-Fos expression in the superficial dorsal horn and in parabrachial nuclei after sciatic nerve crush. *J Comp Neurol* 428:45-61.
- Bie B, Pan ZZ (2005) Increased glutamate synaptic transmission in the nucleus raphe magnus neurons from morphine-tolerant rats. *Mol Pain* 1:7.
- Bohlhalter S, Weinmann O, Mohler H, Fritschy JM (1996) Laminar compartmentalization of GABA_A-receptor subtypes in the spinal cord: an immunohistochemical study. *J Neurosci* 16:283-297.
- Bowie D, Mayer ML (1995) Inward rectification of both AMPA and kainate subtype glutamate receptors generated by polyamine-mediated ion channel block. *Neuron* 15:453-462.
- Brady LS, Herkenham M, Rothman RB, Partilla JS, Konig M, Zimmer AM, Zimmer A (1999) Region-specific up-regulation of opioid receptor binding in enkephalin knockout mice. *Brain Res Mol Brain Res* 68:193-197.
- Braz JM, Nassar MA, Wood JN, Basbaum AI (2005) Parallel "pain" pathways arise from subpopulations of primary afferent nociceptor. *Neuron* 47:787-793.
- Breton C, Neculcea J, Zingg HH (1996) Renal oxytocin receptor messenger ribonucleic acid: characterization and regulation during pregnancy and in response to ovarian steroid treatment. *Endocrinology* 137:2711-2717.
- Brooke RE, Atkinson L, Batten TF, Deuchars SA, Deuchars J (2004) Association of potassium channel Kv3.4 subunits with pre- and post-synaptic structures in brainstem and spinal cord. *Neuroscience* 126:1001-1010.
- Brooks CM (1988) The history of thought concerning the hypothalamus and its functions. *Brain Res Bull* 20:657-667.
- Brown DC, Perkowski S (1998) Oxytocin content of the cerebrospinal fluid of dogs and its relationship to pain induced by spinal cord compression. *Vet Surg* 27:607-611.
- Brownstein MJ, Russell JT, Gainer H (1980) Synthesis, transport, and release of posterior pituitary hormones. *Science* 207:373-378.
- Brussaard AB, Kits KS, de Vlieger TA (1996) Postsynaptic mechanism of depression of GABAergic synapses by oxytocin in the supraoptic nucleus of immature rat. *J Physiol* 497 (Pt 2):495-507.
- Brussaard AB, Wossink J, Lodder JC, Kits KS (2000) Progesterone-metabolite prevents protein kinase C-dependent modulation of gamma-aminobutyric acid type A receptors in oxytocin neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:3625-3630.

- Burlet A, Tonon MC, Dreyfuss F, Tankosic P (1984) [The co-localization of neurohypophysis peptides and the corticotropin-releasing factor in the rat brain. Contribution of morphometric analyses]. *Ann Endocrinol (Paris)* 45:189-199.
- Burstein R, Cliffer KD, Giesler GJ, Jr. (1987) Direct somatosensory projections from the spinal cord to the hypothalamus and telencephalon. *J Neurosci* 7:4159-4164.
- Cadden SW, Villanueva L, Chitour D, Le Bars D (1983) Depression of activities of dorsal horn convergent neurones by propriospinal mechanisms triggered by noxious inputs; comparison with diffuse noxious inhibitory controls (DNIC). *Brain Res* 275:1-11.
- Calas A, Landry M, Roche D, Trembleau A (1994) [A model of phenotypic plasticity: the hypothalamo-posthypophyseal neurons]. *C R Seances Soc Biol Fil* 188:187-206.
- Campbell V, Berrow N, Dolphin AC (1993) GABAB receptor modulation of Ca²⁺ currents in rat sensory neurones by the G protein G(0): antisense oligonucleotide studies. *J Physiol* 470:1-11.
- Campistron G, Buijs RM, Geffard M (1986) Glycine neurons in the brain and spinal cord. Antibody production and immunocytochemical localization. *Brain Res* 376:400-405.
- Carlton SM, Hayes ES (1990) Light microscopic and ultrastructural analysis of GABA-immunoreactive profiles in the monkey spinal cord. *J Comp Neurol* 300:162-182.
- Caterina MJ, Rosen TA, Tominaga M, Brake AJ, Julius D (1999) A capsaicin-receptor homologue with a high threshold for noxious heat. *Nature* 398:436-441.
- Caterina MJ, Schumacher MA, Tominaga M, Rosen TA, Levine JD, Julius D (1997) The capsaicin receptor: a heat-activated ion channel in the pain pathway. *Nature* 389:816-824.
- Caterina MJ, Leffler A, Malmberg AB, Martin WJ, Trafton J, Petersen-Zeitze KR, Koltzenburg M, Basbaum AI, Julius D (2000) Impaired nociception and pain sensation in mice lacking the capsaicin receptor. *Science* 288:306-313.
- Ceccatelli S, Villar MJ, Goldstein M, Hokfelt T (1989) Expression of c-Fos immunoreactivity in transmitter-characterized neurons after stress. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86:9569-9573.
- Cechetto DF, Saper CB (1988) Neurochemical organization of the hypothalamic projection to the spinal cord in the rat. *J Comp Neurol* 272:579-604.
- Cesare P, McNaughton P (1997) Peripheral pain mechanisms. *Curr Opin Neurobiol* 7:493-499.
- Chan WY, Chen DL, Manning M (1993) Oxytocin receptor subtypes in the pregnant rat myometrium and decidua: pharmacological differentiations. *Endocrinology* 132:1381-1386.
- Charpak S, Armstrong WE, Muhlethaler M, Dreifuss JJ (1984) Stimulatory action of oxytocin on neurones of the dorsal motor nucleus of the vagus nerve. *Brain Res* 300:83-89.
- Chen HX, Roper SN (2003) PKA and PKC enhance excitatory synaptic transmission in human dentate gyrus. *J Neurophysiol* 89:2482-2488.
- Chery N, Yu XH, de Koninck Y (2000) Visualization of lamina I of the dorsal horn in live adult rat spinal cord slices. *J Neurosci Methods* 96:133-142.
- Chini B, Mouillac B, Balestre MN, Trumpp-Kallmeyer S, Hoflack J, Hibert M, Andriolo M, Pupier S, Jard S, Barberis C (1996) Two aromatic residues regulate the response of the human oxytocin receptor to the partial agonist arginine vasopressin. *FEBS Lett* 397:201-206.
- Choi S, Klingauf J, Tsien RW (2003) Fusion pore modulation as a presynaptic mechanism contributing to expression of long-term potentiation. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 358:695-705.
- Christensen BN, Perl ER (1970) Spinal neurons specifically excited by noxious or thermal stimuli: marginal zone of the dorsal horn. *J Neurophysiol* 33:293-307.

- Chung K, Coggeshall RE (1983) Propriospinal fibers in the rat. *J Comp Neurol* 217:47-53.
- Clark D, Hugues J, Gasser HS (1935) Afferent function in the group of nerve fibers of slowest conduction velocity. *Am J Physiol* 114:69-76.
- Coetzee WA, Amarillo Y, Chiu J, Chow A, Lau D, McCormack T, Moreno H, Nadal MS, Ozaita A, Pountney D, Saganich M, Vega-Saenz de Miera E, Rudy B (1999) Molecular diversity of K⁺ channels. *Ann N Y Acad Sci* 868:233-285.
- Coggeshall RE, Carlton SM (1997) Receptor localization in the mammalian dorsal horn and primary afferent neurons. *Brain Res Brain Res Rev* 24:28-66.
- Condes-Lara M, Veinante P, Rabai M, Freund-Mercier MJ (1994) Correlation between oxytocin neuronal sensitivity and oxytocin-binding sites in the amygdala of the rat: electrophysiological and histoautoradiographic study. *Brain Res* 637:277-286.
- Condes-Lara M, Gonzalez NM, Martinez-Lorenzana G, Delgado OL, Freund-Mercier MJ (2003) Actions of oxytocin and interactions with glutamate on spontaneous and evoked dorsal spinal cord neuronal activities. *Brain Res* 976:75-81.
- Condes-Lara M, Rojas-Piloni G, Martinez-Lorenzana G, Rodriguez-Jimenez J, Lopez Hidalgo M, Freund-Mercier MJ (2006) Paraventricular hypothalamic influences on spinal nociceptive processing. *Brain Res*.
- Connor JA, Stevens CF (1971) Prediction of repetitive firing behaviour from voltage clamp data on an isolated neurone soma. *J Physiol* 213:31-53.
- Copland JA, Jeng YJ, Strakova Z, Ives KL, Hellmich MR, Soloff MS (1999) Demonstration of functional oxytocin receptors in human breast Hs578T cells and their up-regulation through a protein kinase C-dependent pathway. *Endocrinology* 140:2258-2267.
- Craig AD (1995) Distribution of brainstem projections from spinal lamina I neurons in the cat and the monkey. *J Comp Neurol* 361:225-248.
- Craig AD, Dostrovsky JO (2001) Differential projections of thermoreceptive and nociceptive lamina I trigeminothalamic and spinothalamic neurons in the cat. *J Neurophysiol* 86:856-870.
- Craig AD, Andrew D (2002) Responses of spinothalamic lamina I neurons to repeated brief contact heat stimulation in the cat. *J Neurophysiol* 87:1902-1914.
- Craig AD, Krout K, Andrew D (2001) Quantitative response characteristics of thermoreceptive and nociceptive lamina I spinothalamic neurons in the cat. *J Neurophysiol* 86:1459-1480.
- Cui JG, Linderoth B, Meyerson BA (1996) Effects of spinal cord stimulation on touch-evoked allodynia involve GABAergic mechanisms. An experimental study in the mononeuropathic rat. *Pain* 66:287-295.
- Cullinan WE, Herman JP, Battaglia DF, Akil H, Watson SJ (1995) Pattern and time course of immediate early gene expression in rat brain following acute stress. *Neuroscience* 64:477-505.
- Cunningham ET, Jr., Sawchenko PE (1991) Reflex control of magnocellular vasopressin and oxytocin secretion. *Trends Neurosci* 14:406-411.
- Dado RJ, Katter JT, Giesler GJ, Jr. (1994a) Spinothalamic and spinohypothalamic tract neurons in the cervical enlargement of rats. III. Locations of antidromically identified axons in the cervical cord white matter. *J Neurophysiol* 71:1003-1021.
- Dado RJ, Katter JT, Giesler GJ, Jr. (1994b) Spinothalamic and spinohypothalamic tract neurons in the cervical enlargement of rats. II. Responses to innocuous and noxious mechanical and thermal stimuli. *J Neurophysiol* 71:981-1002.
- Dado RJ, Katter JT, Giesler GJ, Jr. (1994c) Spinothalamic and spinohypothalamic tract neurons in the cervical enlargement of rats. I. Locations of antidromically identified axons in the thalamus and hypothalamus. *J Neurophysiol* 71:959-980.

- Dahlhaus A, Ruscheweyh R, Sandkuhler J (2005) Synaptic input of rat spinal lamina I projection and unidentified neurones in vitro. *J Physiol* 566:355-368.
- Dale HH (1906) On some physiological actions of ergot. *J Physiol* 34:163-206.
- Davis JB, Gray J, Gunthorpe MJ, Hatcher JP, Davey PT, Overend P, Harries MH, Latcham J, Clapham C, Atkinson K, Hughes SA, Rance K, Grau E, Harper AJ, Pugh PL, Rogers DC, Bingham S, Randall A, Sheardown SA (2000) Vanilloid receptor-1 is essential for inflammatory thermal hyperalgesia. *Nature* 405:183-187.
- Dayanithi G, Widmer H, Richard P (1996) Vasopressin-induced intracellular Ca²⁺ increase in isolated rat supraoptic cells. *J Physiol* 490 (Pt 3):713-727.
- De la Calle JL, Paino CL (2002) A procedure for direct lumbar puncture in rats. *Brain Res Bull* 59:245-250.
- de Wied D, Diamant M, Fodor M (1993) Central nervous system effects of the neurohypophyseal hormones and related peptides. *Front Neuroendocrinol* 14:251-302.
- Di Scala-Guenot D, Strosser MT (1995) Neurone-astrocyte interaction. Inhibitory influence of neurones on astrocytic oxytocin receptor expression. *Adv Exp Med Biol* 395:349-350.
- Di Scala-Guenot D, Mougnot D, Strosser MT (1994) Increase of intracellular calcium induced by oxytocin in hypothalamic cultured astrocytes. *Glia* 11:269-276.
- Do-Rego JL, Acharjee S, Seong JY, Galas L, Alexandre D, Bizet P, Burlet A, Kwon HB, Luu-The V, Pelletier G, Vaudry H (2006) Vasotocin and mesotocin stimulate the biosynthesis of neurosteroids in the frog brain. *J Neurosci* 26:6749-6760.
- Dolphin AC, Scott RH (1987) Calcium channel currents and their inhibition by (-)-baclofen in rat sensory neurones: modulation by guanine nucleotides. *J Physiol* 386:1-17.
- Dolphin AC, Huston E, Pearson H, Menon-Johanssen A, Sweeney MI, Adams ME, Scott RH (1991) G protein modulation of calcium entry and transmitter release. *Ann N Y Acad Sci* 635:139-152.
- Du Vigneaud V, Ressler C, Trippett S (1953) The sequence of amino acids in oxytocin, with a proposal for the structure of oxytocin. *J Biol Chem* 205:949-957.
- Dubois-Dauphin M, Raggenbass M, Widmer H, Tribollet E, Dreifuss JJ (1992) Morphological and electrophysiological evidence for postsynaptic localization of functional oxytocin receptors in the rat dorsal motor nucleus of the vagus nerve. *Brain Res* 575:124-131.
- Duggan AW (2000) Neuropeptide spread in the brain and spinal cord. *Prog Brain Res* 125:369-380.
- Durand GM, Konnerth A (1996) Long-term potentiation as a mechanism of functional synapse induction in the developing hippocampus. *J Physiol Paris* 90:313-315.
- Elands J, Barberis C, Jard S, Tribollet E, Dreifuss JJ, Bankowski K, Manning M, Sawyer WH (1988) 125I-labelled d(CH₂)₅[Tyr(Me)₂,Thr₄,Tyr-NH₂(9)]OVT: a selective oxytocin receptor ligand. *Eur J Pharmacol* 147:197-207.
- Engelmann M, Ebner K, Wotjak CT, Landgraf R (1998) Endogenous oxytocin is involved in short-term olfactory memory in female rats. *Behav Brain Res* 90:89-94.
- Evans AR, Vasko MR, Nicol GD (1999) The cAMP transduction cascade mediates the PGE₂-induced inhibition of potassium currents in rat sensory neurones. *J Physiol* 516 (Pt 1):163-178.
- Fahrbach SE, Morrell JI, Pfaff DW (1985) Possible role for endogenous oxytocin in estrogen-facilitated maternal behavior in rats. *Neuroendocrinology* 40:526-532.
- Ferguson JN, Young LJ, Hearn EF, Matzuk MM, Insel TR, Winslow JT (2000) Social amnesia in mice lacking the oxytocin gene. *Nat Genet* 25:284-288.
- Finch DM, Jackson MB (1990) Presynaptic enhancement of synaptic transmission in hippocampal cell cultures by phorbol esters. *Brain Res* 518:269-273.

- Fleidervish IA, Friedman A, Gutnick MJ (1996) Slow inactivation of Na⁺ current and slow cumulative spike adaptation in mouse and guinea-pig neocortical neurones in slices. *J Physiol* 493 (Pt 1):83-97.
- Frayer SM, Barber LA, Vasko MR (1999) Activation of protein kinase C enhances peptide release from rat spinal cord slices. *Neurosci Lett* 265:17-20.
- Freund-Mercier MJ, Stoeckel ME, Dietl MM, Palacios JM, Richard P (1988) Quantitative autoradiographic mapping of neurohypophysial hormone binding sites in the rat forebrain and pituitary gland--I. Characterization of different types of binding sites and their distribution in the Long-Evans strain. *Neuroscience* 26:261-272.
- Fuchs AR, Fuchs F (1984) Endocrinology of human parturition: a review. *Br J Obstet Gynaecol* 91:948-967.
- Fuchs AR, Fields MJ, Freidman S, Shemesh M, Ivell R (1995) Oxytocin and the timing of parturition. Influence of oxytocin receptor gene expression, oxytocin secretion, and oxytocin-induced prostaglandin F2 alpha and E2 release. *Adv Exp Med Biol* 395:405-420.
- Furue H, Narikawa K, Kumamoto E, Yoshimura M (1999) Responsiveness of rat substantia gelatinosa neurones to mechanical but not thermal stimuli revealed by in vivo patch-clamp recording. *J Physiol* 521 Pt 2:529-535.
- Furuyama T, Kiyama H, Sato K, Park HT, Maeno H, Takagi H, Tohyama M (1993) Region-specific expression of subunits of ionotropic glutamate receptors (AMPA-type, KA-type and NMDA receptors) in the rat spinal cord with special reference to nociception. *Brain Res Mol Brain Res* 18:141-151.
- Garry MG, Hargreaves KM (1992) Enhanced release of immunoreactive CGRP and substance P from spinal dorsal horn slices occurs during carrageenan inflammation. *Brain Res* 582:139-142.
- Gauriau C, Bernard JF (2002) Pain pathways and parabrachial circuits in the rat. *Exp Physiol* 87:251-258.
- Gautvik KM, de Lecea L, Gautvik VT, Danielson PE, Tranque P, Dopazo A, Bloom FE, Sutcliffe JG (1996) Overview of the most prevalent hypothalamus-specific mRNAs, as identified by directional tag PCR subtraction. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93:8733-8738.
- Ge Y, Lundeberg T, Yu LC (2002) Blockade effect of mu and kappa opioid antagonists on the anti-nociception induced by intra-periaqueductal grey injection of oxytocin in rats. *Brain Res* 927:204-207.
- Gimpl G, Fahrenholz F (2001) The oxytocin receptor system: structure, function, and regulation. *Physiol Rev* 81:629-683.
- Gobel S (1975) Golgi studies in the substantia gelatinosa neurons in the spinal trigeminal nucleus. *J Comp Neurol* 162:397-415.
- Gobel S (1978) Golgi studies of the neurons in layer II of the dorsal horn of the medulla (trigeminal nucleus caudalis). *J Comp Neurol* 180:395-413.
- Graham BA, Brichta AM, Callister RJ (2004) In vivo responses of mouse superficial dorsal horn neurones to both current injection and peripheral cutaneous stimulation. *J Physiol* 561:749-763.
- Greengard P, Valtorta F, Czernik AJ, Benfenati F (1993) Synaptic vesicle phosphoproteins and regulation of synaptic function. *Science* 259:780-785.
- Gross GA, Imamura T, Luedke C, Vogt SK, Olson LM, Nelson DM, Sadovsky Y, Muglia LJ (1998) Opposing actions of prostaglandins and oxytocin determine the onset of murine labor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:11875-11879.

- Grudt TJ, Perl ER (2002) Correlations between neuronal morphology and electrophysiological features in the rodent superficial dorsal horn. *J Physiol* 540:189-207.
- Guirimand F, Le Bars D (1996) [Physiology of nociception]. *Ann Fr Anesth Reanim* 15:1048-1079.
- 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.
- Hallbeck M, Blomqvist A (1999) Spinal cord-projecting vasopressinergic neurons in the rat paraventricular hypothalamus. *J Comp Neurol* 411:201-211.
- Hallbeck M, Larhammar D, Blomqvist A (2001) Neuropeptide expression in rat paraventricular hypothalamic neurons that project to the spinal cord. *J Comp Neurol* 433:222-238.
- Hamill OP, Marty A, Neher E, Sakmann B, Sigworth FJ (1981) Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches. *Pflugers Arch* 391:85-100.
- Hanesch U, Pfrommer U, Grubb BD, Heppelmann B, Schaible HG (1993) The proportion of CGRP-immunoreactive and SP-mRNA containing dorsal root ganglion cells is increased by a unilateral inflammation of the ankle joint of the rat. *Regul Pept* 46:202-203.
- Harvey RJ, Depner UB, Wassle H, Ahmadi S, Heindl C, Reinold H, Smart TG, Harvey K, Schutz B, Abo-Salem OM, Zimmer A, Poisbeau P, Welzl H, Wolfer DP, Betz H, Zeilhofer HU, Muller U (2004) GlyR alpha3: an essential target for spinal PGE2-mediated inflammatory pain sensitization. *Science* 304:884-887.
- Hatakeyama S, Kawai Y, Ueyama T, Senba E (1996) Nitric oxide synthase-containing magnocellular neurons of the rat hypothalamus synthesize oxytocin and vasopressin and express Fos following stress stimuli. *J Chem Neuroanat* 11:243-256.
- Hayes RL, Bennett GJ, Newlon PG, Mayer DJ (1978) Behavioral and physiological studies of non-narcotic analgesia in the rat elicited by certain environmental stimuli. *Brain Res* 155:69-90.
- Heinke B, Ruscheweyh R, Forsthuber L, Wunderbaldinger G, Sandkuhler J (2004) Physiological, neurochemical and morphological properties of a subgroup of GABAergic spinal lamina II neurones identified by expression of green fluorescent protein in mice. *J Physiol* 560:249-266.
- Hell JW, Yokoyama CT, Breeze LJ, Chavkin C, Catterall WA (1995) Phosphorylation of presynaptic and postsynaptic calcium channels by cAMP-dependent protein kinase in hippocampal neurons. *Embo J* 14:3036-3044.
- Hillman P, Wall PD (1969) Inhibitory and excitatory factors influencing the receptive fields of lamina 5 spinal cord cells. *Exp Brain Res* 9:284-306.
- Hingtgen CM, Waite KJ, Vasko MR (1995) Prostaglandins facilitate peptide release from rat sensory neurons by activating the adenosine 3',5'-cyclic monophosphate transduction cascade. *J Neurosci* 15:5411-5419.
- Hodgkin AL, Huxley AF (1952) A quantitative description of membrane current and its application to conduction and excitation in nerve. *J Physiol* 117:500-544.
- Hoffman DA, Magee JC, Colbert CM, Johnston D (1997) K⁺ channel regulation of signal propagation in dendrites of hippocampal pyramidal neurons. *Nature* 387:869-875.
- Hori T, Takai Y, Takahashi T (1999) Presynaptic mechanism for phorbol ester-induced synaptic potentiation. *J Neurosci* 19:7262-7267.
- Hu HJ, Gereau RWt (2003) ERK integrates PKA and PKC signaling in superficial dorsal horn neurons. II. Modulation of neuronal excitability. *J Neurophysiol* 90:1680-1688.

- Hu HJ, Glauner KS, Gereau RWt (2003) ERK integrates PKA and PKC signaling in superficial dorsal horn neurons. I. Modulation of A-type K⁺ currents. *J Neurophysiol* 90:1671-1679.
- Hu HJ, Carrasquillo Y, Karim F, Jung WE, Nerbonne JM, Schwarz TL, Gereau RWt (2006) The kv4.2 potassium channel subunit is required for pain plasticity. *Neuron* 50:89-100.
- Huang H, Wu X, Nicol GD, Meller S, Vasko MR (2003) ATP augments peptide release from rat sensory neurons in culture through activation of P2Y receptors. *J Pharmacol Exp Ther* 306:1137-1144.
- Huang HY, Liao CW, Chen PH, Tsaur ML (2006) Transient expression of A-type K channel alpha subunits Kv4.2 and Kv4.3 in rat spinal neurons during development. *Eur J Neurosci* 23:1142-1150.
- Huang HY, Cheng JK, Shih YH, Chen PH, Wang CL, Tsaur ML (2005) Expression of A-type K channel alpha subunits Kv 4.2 and Kv 4.3 in rat spinal lamina II excitatory interneurons and colocalization with pain-modulating molecules. *Eur J Neurosci* 22:1149-1157.
- Huang LY (1989) Calcium channels in isolated rat dorsal horn neurones, including labelled spinothalamic and trigeminothalamic cells. *J Physiol* 411:161-177.
- Huber D, Veinante P, Stoop R (2005) Vasopressin and oxytocin excite distinct neuronal populations in the central amygdala. *Science* 308:245-248.
- Hwang SJ, Pagliardini S, Rustioni A, Valtschanoff JG (2001) Presynaptic kainate receptors in primary afferents to the superficial laminae of the rat spinal cord. *J Comp Neurol* 436:275-289.
- Hwang SJ, Burette A, Rustioni A, Valtschanoff JG (2004) Vanilloid receptor VR1-positive primary afferents are glutamatergic and contact spinal neurons that co-express neurokinin receptor NK1 and glutamate receptors. *J Neurocytol* 33:321-329.
- Inoue T, Kimura T, Azuma C, Inazawa J, Takemura M, Kikuchi T, Kubota Y, Ogita K, Saji F (1994) Structural organization of the human oxytocin receptor gene. *J Biol Chem* 269:32451-32456.
- Insel TR, Harbaugh CR (1989) Lesions of the hypothalamic paraventricular nucleus disrupt the initiation of maternal behavior. *Physiol Behav* 45:1033-1041.
- Insel TR, Young L, Wang Z (1997) Central oxytocin and reproductive behaviours. *Rev Reprod* 2:28-37.
- Insel TR, Young L, Witt DM, Crews D (1993) Gonadal steroids have paradoxical effects on brain oxytocin receptors. *J Neuroendocrinol* 5:619-628.
- Isaac JT, Nicoll RA, Malenka RC (1995) Evidence for silent synapses: implications for the expression of LTP. *Neuron* 15:427-434.
- Isaac JT, Crair MC, Nicoll RA, Malenka RC (1997) Silent synapses during development of thalamocortical inputs. *Neuron* 18:269-280.
- Ishikawa T, Marsala M, Sakabe T, Yaksh TL (2000) Characterization of spinal amino acid release and touch-evoked allodynia produced by spinal glycine or GABA(A) receptor antagonist. *Neuroscience* 95:781-786.
- Jakowec MW, Yen L, Kalb RG (1995) In situ hybridization analysis of AMPA receptor subunit gene expression in the developing rat spinal cord. *Neuroscience* 67:909-920.
- Jessell TM, Yoshioka K, Jahr CE (1986) Amino acid receptor-mediated transmission at primary afferent synapses in rat spinal cord. *J Exp Biol* 124:239-258.
- Ji RR, Kohno T, Moore KA, Woolf CJ (2003) Central sensitization and LTP: do pain and memory share similar mechanisms? *Trends Neurosci* 26:696-705.

- Jiang X, Zhang YH, Clark JD, Tempel BL, Nicol GD (2003) Prostaglandin E2 inhibits the potassium current in sensory neurons from hyperalgesic Kv1.1 knockout mice. *Neuroscience* 119:65-72.
- Jo YH, Stoeckel ME, Schlichter R (1998a) Electrophysiological properties of cultured neonatal rat dorsal horn neurons containing GABA and met-enkephalin-like immunoreactivity. *J Neurophysiol* 79:1583-1586.
- Jo YH, Stoeckel ME, Freund-Mercier MJ, Schlichter R (1998b) Oxytocin modulates glutamatergic synaptic transmission between cultured neonatal spinal cord dorsal horn neurons. *J Neurosci* 18:2377-2386.
- Jourdain P, Israel JM, Dupouy B, Oliet SH, Allard M, Vitiello S, Theodosis DT, Poulain DA (1998) Evidence for a hypothalamic oxytocin-sensitive pattern-generating network governing oxytocin neurons in vitro. *J Neurosci* 18:6641-6649.
- Julius D, Basbaum AI (2001) Molecular mechanisms of nociception. *Nature* 413:203-210.
- Kai-Kai MA (1989) Cytochemistry of the trigeminal and dorsal root ganglia and spinal cord of the rat. *Comp Biochem Physiol A* 93:183-193.
- Kato G, Furue H, Katafuchi T, Yasaka T, Iwamoto Y, Yoshimura M (2004) Electrophysiological mapping of the nociceptive inputs to the substantia gelatinosa in rat horizontal spinal cord slices. *J Physiol* 560:303-315.
- Keller AF, Coull JA, Chery N, Poisbeau P, De Koninck Y (2001) Region-specific developmental specialization of GABA-glycine cosynapses in laminae I-II of the rat spinal dorsal horn. *J Neurosci* 21:7871-7880.
- Kew JN, Kemp JA (2005) Ionotropic and metabotropic glutamate receptor structure and pharmacology. *Psychopharmacology (Berl)* 179:4-29.
- Khasabov SG, Rogers SD, Ghilardi JR, Peters CM, Mantyh PW, Simone DA (2002) Spinal neurons that possess the substance P receptor are required for the development of central sensitization. *J Neurosci* 22:9086-9098.
- Kimura T, Tanizawa O, Mori K, Brownstein MJ, Okayama H (1992) Structure and expression of a human oxytocin receptor. *Nature* 356:526-529.
- Kimura T, Makino Y, Saji F, Takemura M, Inoue T, Kikuchi T, Kubota Y, Azuma C, Nobunaga T, Tokugawa Y, et al. (1994) Molecular characterization of a cloned human oxytocin receptor. *Eur J Endocrinol* 131:385-390.
- Kirsch P, Esslinger C, Chen Q, Mier D, Lis S, Siddhanti S, Gruppe H, Mattay VS, Gallhofer B, Meyer-Lindenberg A (2005) Oxytocin modulates neural circuitry for social cognition and fear in humans. *J Neurosci* 25:11489-11493.
- Kiss JP, Vizi ES (2001) Nitric oxide: a novel link between synaptic and nonsynaptic transmission. *Trends Neurosci* 24:211-215.
- Kosfeld M, Heinrichs M, Zak PJ, Fischbacher U, Fehr E (2005) Oxytocin increases trust in humans. *Nature* 435:673-676.
- Kumazawa T, Perl ER (1978) Excitation of marginal and substantia gelatinosa neurons in the primate spinal cord: indications of their place in dorsal horn functional organization. *J Comp Neurol* 177:417-434.
- Kupers RC, Vos BP, Gybels JM (1988) Stimulation of the nucleus paraventricularis thalami suppresses scratching and biting behaviour of arthritic rats and exerts a powerful effect on tests for acute pain. *Pain* 32:115-125.
- Kuriyama K, Nakashima T, Kawarabayashi T, Kiyohara T (1993) Oxytocin inhibits nonphasically firing supraoptic and paraventricular neurons in the virgin female rat. *Brain Res Bull* 31:681-687.
- Laing I, Todd AJ, Heizmann CW, Schmidt HH (1994) Subpopulations of GABAergic neurons in laminae I-III of rat spinal dorsal horn defined by coexistence with classical transmitters, peptides, nitric oxide synthase or parvalbumin. *Neuroscience* 61:123-132.

- Lambert JJ, Belelli D, Peden DR, Vardy AW, Peters JA (2003) Neurosteroid modulation of GABAA receptors. *Prog Neurobiol* 71:67-80.
- Lambert RC, Dayanithi G, Moos FC, Richard P (1994) A rise in the intracellular Ca²⁺ concentration of isolated rat supraoptic cells in response to oxytocin. *J Physiol* 478 (Pt 2):275-287.
- Landgraf R, Neumann ID (2004) Vasopressin and oxytocin release within the brain: a dynamic concept of multiple and variable modes of neuropeptide communication. *Front Neuroendocrinol* 25:150-176.
- Lang RE, Heil J, Ganten D, Hermann K, Rascher W, Unger T (1983a) Effects of lesions in the paraventricular nucleus of the hypothalamus on vasopressin and oxytocin contents in brainstem and spinal cord of rat. *Brain Res* 260:326-329.
- Lang RE, Heil JW, Ganten D, Hermann K, Unger T, Rascher W (1983b) Oxytocin unlike vasopressin is a stress hormone in the rat. *Neuroendocrinology* 37:314-316.
- Langosch D, Thomas L, Betz H (1988) Conserved quaternary structure of ligand-gated ion channels: the postsynaptic glycine receptor is a pentamer. *Proc Natl Acad Sci U S A* 85:7394-7398.
- Leng G, Brown CH, Russell JA (1999) Physiological pathways regulating the activity of magnocellular neurosecretory cells. *Prog Neurobiol* 57:625-655.
- Levine JD, Fields HL, Basbaum AI (1993) Peptides and the primary afferent nociceptor. *J Neurosci* 13:2273-2286.
- Li P, Zhuo M (1998) Silent glutamatergic synapses and nociception in mammalian spinal cord. *Nature* 393:695-698.
- Liao D, Hessler NA, Malinow R (1995) Activation of postsynaptically silent synapses during pairing-induced LTP in CA1 region of hippocampal slice. *Nature* 375:400-404.
- Light AR, Perl ER (1979) Reexamination of the dorsal root projection to the spinal dorsal horn including observations on the differential termination of coarse and fine fibers. *J Comp Neurol* 186:117-131.
- Light AR, Willcockson HH (1999) Spinal laminae I-II neurons in rat recorded in vivo in whole cell, tight seal configuration: properties and opioid responses. *J Neurophysiol* 82:3316-3326.
- Lim G, Wang S, Lim JA, Mao J (2005) Activity of adenylyl cyclase and protein kinase A contributes to morphine-induced spinal apoptosis. *Neurosci Lett* 389:104-108.
- Lind G, Meyerson BA, Winter J, Linderoth B (2004) Intrathecal baclofen as adjuvant therapy to enhance the effect of spinal cord stimulation in neuropathic pain: a pilot study. *Eur J Pain* 8:377-383.
- Linderoth B, Stiller CO, Gunasekera L, O'Connor WT, Ungerstedt U, Brodin E (1994) Gamma-aminobutyric acid is released in the dorsal horn by electrical spinal cord stimulation: an in vivo microdialysis study in the rat. *Neurosurgery* 34:484-488; discussion 488-489.
- Lindsay RM, Harmar AJ (1989) Nerve growth factor regulates expression of neuropeptide genes in adult sensory neurons. *Nature* 337:362-364.
- Lindsay RM, Lockett C, Sternberg J, Winter J (1989) Neuropeptide expression in cultures of adult sensory neurons: modulation of substance P and calcitonin gene-related peptide levels by nerve growth factor. *Neuroscience* 33:53-65.
- Lipton JM, Glyn JR (1980) Central administration of peptides alters thermoregulation in the rabbit. *Peptides* 1:15-18.
- Lopez-Garcia JA, King AE (1994) Membrane properties of physiologically classified rat dorsal horn neurons in vitro: correlation with cutaneous sensory afferent input. *Eur J Neurosci* 6:998-1007.

- Lu CR, Willcockson HH, Phend KD, Lucifora S, Darstein M, Valtschanoff JG, Rustioni A (2005) Ionotropic glutamate receptors are expressed in GABAergic terminals in the rat superficial dorsal horn. *J Comp Neurol* 486:169-178.
- Lu Y, Perl ER (2003) A specific inhibitory pathway between substantia gelatinosa neurons receiving direct C-fiber input. *J Neurosci* 23:8752-8758.
- Lu Y, Perl ER (2005) Modular organization of excitatory circuits between neurons of the spinal superficial dorsal horn (laminae I and II). *J Neurosci* 25:3900-3907.
- Luddens H, Korpi ER (1995) Biological function of GABAA/benzodiazepine receptor heterogeneity. *J Psychiatr Res* 29:77-94.
- Luddens H, Killisch I, Seeburg PH (1991) More than one alpha variant may exist in a GABAA/benzodiazepine receptor complex. *J Recept Res* 11:535-551.
- Luddens H, Korpi ER, Seeburg PH (1995) GABAA/benzodiazepine receptor heterogeneity: neurophysiological implications. *Neuropharmacology* 34:245-254.
- Luis-Delgado OE, Barrot M, Rodeau JL, Schott G, Benbouzid M, Poisbeau P, Freund-Mercier MJ, Lasbennes F (2006) Calibrated forceps: a sensitive and reliable tool for pain and analgesia studies. *J Pain* 7:32-39.
- Ma W, Ribeiro-da-Silva A, De Koninck Y, Radhakrishnan V, Cuello AC, Henry JL (1997) Substance P and enkephalin immunoreactivities in axonal boutons presynaptic to physiologically identified dorsal horn neurons. An ultrastructural multiple-labelling study in the cat. *Neuroscience* 77:793-811.
- Macdonald RL, Olsen RW (1994) GABAA receptor channels. *Annu Rev Neurosci* 17:569-602.
- Madison DV, Nicoll RA (1984) Control of the repetitive discharge of rat CA 1 pyramidal neurones in vitro. *J Physiol* 354:319-331.
- Magoul R, Onteniente B, Geffard M, Calas A (1987) Anatomical distribution and ultrastructural organization of the GABAergic system in the rat spinal cord. An immunocytochemical study using anti-GABA antibodies. *Neuroscience* 20:1001-1009.
- Maier T, Dai WJ, Csikos T, Jirikowski GF, Unger T, Culman J (1998) Oxytocin pathways mediate the cardiovascular and behavioral responses to substance P in the rat brain. *Hypertension* 31:480-486.
- Malcangio M, Bowery NG (1996) GABA and its receptors in the spinal cord. *Trends Pharmacol Sci* 17:457-462.
- Malenka RC, Nicoll RA (1997) Silent synapses speak up. *Neuron* 19:473-476.
- Malenka RC, Madison DV, Nicoll RA (1986) Potentiation of synaptic transmission in the hippocampus by phorbol esters. *Nature* 321:175-177.
- Mantyh PW, Rogers SD, Honore P, Allen BJ, Ghilardi JR, Li J, Daughters RS, Lappi DA, Wiley RG, Simone DA (1997) Inhibition of hyperalgesia by ablation of lamina I spinal neurons expressing the substance P receptor. *Science* 278:275-279.
- Mapp PI, Terenghi G, Walsh DA, Chen ST, Cruwys SC, Garrett N, Kidd BL, Polak JM, Blake DR (1993) Monoarthritis in the rat knee induces bilateral and time-dependent changes in substance P and calcitonin gene-related peptide immunoreactivity in the spinal cord. *Neuroscience* 57:1091-1096.
- Mason GA, Caldwell JD, Stanley DA, Hatley OL, Prange AJ, Jr., Pedersen CA (1986) Interactive effects of intracisternal oxytocin and other centrally active substances on colonic temperatures of mice. *Regul Pept* 14:253-260.
- Maxwell DJ, Christie WM, Short AD, Brown AG (1991) Direct observations of synapses between GABA-immunoreactive boutons and identified spinocervical tract neurons in the cat's spinal cord. *J Comp Neurol* 307:375-392.

- Mayer ML, Westbrook GL (1983) A voltage-clamp analysis of inward (anomalous) rectification in mouse spinal sensory ganglion neurones. *J Physiol* 340:19-45.
- McKernan RM, Whiting PJ (1996) Which GABAA-receptor subtypes really occur in the brain? *Trends Neurosci* 19:139-143.
- McLaughlin BJ, Barber R, Saito K, Roberts E, Wu JY (1975) Immunocytochemical localization of glutamate decarboxylase in rat spinal cord. *J Comp Neurol* 164:305-321.
- McNeilly AS, Sharpe RM, Fraser HM (1983) Increased sensitivity to the negative feedback effects of testosterone induced by hyperprolactinemia in the adult male rat. *Endocrinology* 112:22-28.
- Melnick IV, Santos SF, Safronov BV (2004a) Mechanism of spike frequency adaptation in substantia gelatinosa neurones of rat. *J Physiol* 559:383-395.
- Melnick IV, Santos SF, Szokol K, Szucs P, Safronov BV (2004b) Ionic basis of tonic firing in spinal substantia gelatinosa neurons of rat. *J Neurophysiol* 91:646-655.
- Melzack R, Wall PD (1965) Pain mechanisms: a new theory. *Science* 150:971-979.
- Melzack R, Rose G, Mc GD (1962) Skin sensitivity to thermal stimuli. *Exp Neurol* 6:300-314.
- Mestre C, Pelissier T, Fialip J, Wilcox G, Eschalier A (1994) A method to perform direct transcutaneous intrathecal injection in rats. *J Pharmacol Toxicol Methods* 32:197-200.
- Meyer RA, Campbell JN (1981) Myelinated nociceptive afferents account for the hyperalgesia that follows a burn to the hand. *Science* 213:1527-1529.
- Mezey E, Kiss JZ (1991) Coexpression of vasopressin and oxytocin in hypothalamic supraoptic neurons of lactating rats. *Endocrinology* 129:1814-1820.
- Miaskowski C, Ong GL, Lukic D, Haldar J (1988) Immobilization stress affects oxytocin and vasopressin levels in hypothalamic and extrahypothalamic sites. *Brain Res* 458:137-141.
- Miles GB, Dai Y, Brownstone RM (2005) Mechanisms underlying the early phase of spike frequency adaptation in mouse spinal motoneurons. *J Physiol* 566:519-532.
- Miletic V, Bowen KK, Miletic G (2000) Loose ligation of the rat sciatic nerve is accompanied by changes in the subcellular content of protein kinase C beta II and gamma in the spinal dorsal horn. *Neurosci Lett* 288:199-202.
- Millan C, Torres M, Sanchez-Prieto J (2003) Co-activation of PKA and PKC in cerebrocortical nerve terminals synergistically facilitates glutamate release. *J Neurochem* 87:1101-1111.
- Millan MJ (1999) The induction of pain: an integrative review. *Prog Neurobiol* 57:1-164.
- Millan MJ (2002) Descending control of pain. *Prog Neurobiol* 66:355-474.
- Millan MJ, Schmauss C, Millan MH, Herz A (1984) Vasopressin and oxytocin in the rat spinal cord: analysis of their role in the control of nociception. *Brain Res* 309:384-388.
- Miranda-Cardenas Y, Rojas-Piloni G, Martinez-Lorenzana G, Rodriguez-Jimenez J, Lopez-Hidalgo M, Freund-Mercier MJ, Condes-Lara M (2006) Oxytocin and electrical stimulation of the paraventricular hypothalamic nucleus produce antinociceptive effects that are reversed by an oxytocin antagonist. *Pain*.
- Mogil JS, Sternberg WF, Balian H, Liebeskind JC, Sadowski B (1996) Opioid and nonopioid swim stress-induced analgesia: a parametric analysis in mice. *Physiol Behav* 59:123-132.
- Morris M, Callahan MF, Li P, Lucion AB (1995) Central oxytocin mediates stress-induced tachycardia. *J Neuroendocrinol* 7:455-459.
- Muhlethaler M, Charpak S, Dreifuss JJ (1984) Contrasting effects of neurohypophysial peptides on pyramidal and non-pyramidal neurones in the rat hippocampus. *Brain Res* 308:97-107.

- Murai Y, Nakashima T, Miyata S, Kiyohara T (1998) Different effect of oxytocin on membrane potential of supraoptic oxytocin neurons in virgin female and male rats in vitro. *Neurosci Res* 30:35-41.
- Murase K, Randic M (1983) Electrophysiological properties of rat spinal dorsal horn neurones in vitro: calcium-dependent action potentials. *J Physiol* 334:141-153.
- Nagy GG, Watanabe M, Fukaya M, Todd AJ (2004) Synaptic distribution of the NR1, NR2A and NR2B subunits of the N-methyl-d-aspartate receptor in the rat lumbar spinal cord revealed with an antigen-unmasking technique. *Eur J Neurosci* 20:3301-3312.
- Nagy I, Woolf CJ, Dray A, Urban L (1994) Cobalt accumulation in neurons expressing ionotropic excitatory amino acid receptors in young rat spinal cord: morphology and distribution. *J Comp Neurol* 344:321-335.
- Nagy JI, Hunt SP (1982) Fluoride-resistant acid phosphatase-containing neurones in dorsal root ganglia are separate from those containing substance P or somatostatin. *Neuroscience* 7:89-97.
- Naylor AM, Ruwe WD, Veale WL (1986) Antipyretic action of centrally administered arginine vasopressin but not oxytocin in the cat. *Brain Res* 385:156-160.
- Negrete-Diaz JV, Sihra TS, Delgado-Garcia JM, Rodriguez-Moreno A (2006) Kainate receptor-mediated inhibition of glutamate release involves protein kinase A in the mouse hippocampus. *J Neurophysiol*.
- Nichols ML, Allen BJ, Rogers SD, Ghilardi JR, Honore P, Luger NM, Finke MP, Li J, Lappi DA, Simone DA, Mantyh PW (1999) Transmission of chronic nociception by spinal neurons expressing the substance P receptor. *Science* 286:1558-1561.
- Nicol GD, Vasko MR, Evans AR (1997) Prostaglandins suppress an outward potassium current in embryonic rat sensory neurons. *J Neurophysiol* 77:167-176.
- Nilaver G, Zimmerman EA, Wilkins J, Michaels J, Hoffman D, Silverman AJ (1980) Magnocellular hypothalamic projections to the lower brain stem and spinal cord of the rat. Immunocytochemical evidence for predominance of the oxytocin-neurophysin system compared to the vasopressin-neurophysin system. *Neuroendocrinology* 30:150-158.
- Nisenbaum ES, Xu ZC, Wilson CJ (1994) Contribution of a slowly inactivating potassium current to the transition to firing of neostriatal spiny projection neurons. *J Neurophysiol* 71:1174-1189.
- Nishimori K, Young LJ, Guo Q, Wang Z, Insel TR, Matzuk MM (1996) Oxytocin is required for nursing but is not essential for parturition or reproductive behavior. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93:11699-11704.
- Nishioka T, Anselmo-Franci JA, Li P, Callahan MF, Morris M (1998) Stress increases oxytocin release within the hypothalamic paraventricular nucleus. *Brain Res* 781:56-60.
- Numazaki M, Tominaga M (2004) Nociception and TRP Channels. *Curr Drug Targets CNS Neurol Disord* 3:479-485.
- Nylen A, Skagerberg G, Alm P, Larsson B, Holmqvist B, Andersson KE (2001) Nitric oxide synthase in the hypothalamic paraventricular nucleus of the female rat; organization of spinal projections and coexistence with oxytocin or vasopressin. *Brain Res* 908:10-24.
- Olschewski A, Hempelmann G, Vogel W, Safronov BV (2001) Suppression of potassium conductance by droperidol has influence on excitability of spinal sensory neurons. *Anesthesiology* 94:280-289.
- Ott I, Scott JC (1910) The action of infundibulin upon the mammary secretion. *Proc Soc Exp Biol Med* 8:48-49.

- Pan SJ, Zhu M, Raizada MK, Sumners C, Gelband CH (2001) ANG II-mediated inhibition of neuronal delayed rectifier K⁺ current: role of protein kinase C- α . *Am J Physiol Cell Physiol* 281:C17-23.
- Pan YZ, Pan HL (2004) Primary afferent stimulation differentially potentiates excitatory and inhibitory inputs to spinal lamina II outer and inner neurons. *J Neurophysiol* 91:2413-2421.
- Parfitt KD, Madison DV (1993) Phorbol esters enhance synaptic transmission by a presynaptic, calcium-dependent mechanism in rat hippocampus. *J Physiol* 471:245-268.
- Patapoutian A, Peier AM, Story GM, Viswanath V (2003) ThermoTRP channels and beyond: mechanisms of temperature sensation. *Nat Rev Neurosci* 4:529-539.
- Paxinos G, Watson C (1998) *The rat brain in stereotaxic coordinates*, 4th ed. San Diego: Academic Press.
- Pfeiffer F, Betz H (1981) Solubilization of the glycine receptor from rat spinal cord. *Brain Res* 226:273-279.
- Pfeiffer F, Graham D, Betz H (1982) Purification by affinity chromatography of the glycine receptor of rat spinal cord. *J Biol Chem* 257:9389-9393.
- Pitcher GM, Yashpal K, Coderre TJ, Henry JL (1995) Mechanisms underlying antinociception provoked by heterosegmental noxious stimulation in the rat tail-flick test. *Neuroscience* 65:273-281.
- Pongs O (1999) Voltage-gated potassium channels: from hyperexcitability to excitement. *FEBS Lett* 452:31-35.
- Porro CA, Carli G (1988) Immobilization and restraint effects on pain reactions in animals. *Pain* 32:289-307.
- Powers RK, Sawczuk A, Musick JR, Binder MD (1999) Multiple mechanisms of spike-frequency adaptation in motoneurons. *J Physiol Paris* 93:101-114.
- Price DD, Hayashi H, Dubner R, Ruda MA (1979) Functional relationships between neurons of marginal and substantia gelatinosa layers of primate dorsal horn. *J Neurophysiol* 42:1590-1608.
- Price GW, Wilkin GP, Turnbull MJ, Bowery NG (1984) Are baclofen-sensitive GABAB receptors present on primary afferent terminals of the spinal cord? *Nature* 307:71-74.
- Raggenbass M, Dreifuss JJ (1992) Mechanism of action of oxytocin in rat vagal neurones: induction of a sustained sodium-dependent current. *J Physiol* 457:131-142.
- Raggenbass M, Dubois-Dauphin M, Charpak S, Dreifuss JJ (1987) Neurons in the dorsal motor nucleus of the vagus nerve are excited by oxytocin in the rat but not in the guinea pig. *Proc Natl Acad Sci U S A* 84:3926-3930.
- Raggenbass M, Tribollet E, Dubois-Dauphin M, Dreifuss JJ (1989) Correlation between oxytocin neuronal sensitivity and oxytocin receptor binding: an electrophysiological and autoradiographical study comparing rat and guinea pig hippocampus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86:750-754.
- Rao VV, Loffler C, Batten J, Hansmann I (1992) The human gene for oxytocin-neurophysin I (OXT) is physically mapped to chromosome 20p13 by in situ hybridization. *Cytogenet Cell Genet* 61:271-273.
- Reeve AJ, Dickenson AH, Kerr NC (1998) Spinal effects of bicuculline: modulation of an allodynia-like state by an A1-receptor agonist, morphine, and an NMDA-receptor antagonist. *J Neurophysiol* 79:1494-1507.
- Reiter MK, Kremarik P, Freund-Mercier MJ, Stoeckel ME, Desaulles E, Feltz P (1994) Localization of oxytocin binding sites in the thoracic and upper lumbar spinal cord of the adult and postnatal rat: a histoautoradiographic study. *Eur J Neurosci* 6:98-104.

- Renaud LP, Bourque CW (1991) Neurophysiology and neuropharmacology of hypothalamic magnocellular neurons secreting vasopressin and oxytocin. *Prog Neurobiol* 36:131-169.
- Renger JJ, Egles C, Liu G (2001) A developmental switch in neurotransmitter flux enhances synaptic efficacy by affecting AMPA receptor activation. *Neuron* 29:469-484.
- Rexed B (1952) The cytoarchitectonic organization of the spinal cord in the cat. *J Comp Neurol* 96:414-495.
- Ribeiro-da-Silva A, Pioro EP, Cuello AC (1991) Substance P- and enkephalin-like immunoreactivities are colocalized in certain neurons of the substantia gelatinosa of the rat spinal cord: an ultrastructural double-labeling study. *J Neurosci* 11:1068-1080.
- Ridet JL, Rajaofetra N, Teilhac JR, Geffard M, Privat A (1993) Evidence for nonsynaptic serotonergic and noradrenergic innervation of the rat dorsal horn and possible involvement of neuron-glia interactions. *Neuroscience* 52:143-157.
- Robertson B (1997) The real life of voltage-gated K⁺ channels: more than model behaviour. *Trends Pharmacol Sci* 18:474-483.
- Robinson DA, Wei F, Wang GD, Li P, Kim SJ, Vogt SK, Muglia LJ, Zhuo M (2002) Oxytocin mediates stress-induced analgesia in adult mice. *J Physiol* 540:593-606.
- Rogers RC, Hermann GE (1985) Dorsal medullary oxytocin, vasopressin, oxytocin antagonist, and TRH effects on gastric acid secretion and heart rate. *Peptides* 6:1143-1148.
- Rokaeus A, Young WS, 3rd, Mezey E (1988) Galanin coexists with vasopressin in the normal rat hypothalamus and galanin's synthesis is increased in the Brattleboro (diabetes insipidus) rat. *Neurosci Lett* 90:45-50.
- Rosenmund C, Stern-Bach Y, Stevens CF (1998) The tetrameric structure of a glutamate receptor channel. *Science* 280:1596-1599.
- Rousselot P, Papadopoulos G, Merighi A, Poulain DA, Theodosis DT (1990) Oxytocinergic innervation of the rat spinal cord. An electron microscopic study. *Brain Res* 529:178-184.
- Rozen F, Russo C, Banville D, Zingg HH (1995) Structure, characterization, and expression of the rat oxytocin receptor gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92:200-204.
- Rudomin P (1999) Presynaptic selection of afferent inflow in the spinal cord. *J Physiol Paris* 93:329-347.
- Rudomin P, Schmidt RF (1999) Presynaptic inhibition in the vertebrate spinal cord revisited. *Exp Brain Res* 129:1-37.
- Rudy B (1988) Diversity and ubiquity of K channels. *Neuroscience* 25:729-749.
- Ruscheweyh R, Sandkuhler J (2002) Lamina-specific membrane and discharge properties of rat spinal dorsal horn neurones in vitro. *J Physiol* 541:231-244.
- Ruscheweyh R, Ikeda H, Heinke B, Sandkuhler J (2004) Distinctive membrane and discharge properties of rat spinal lamina I projection neurones in vitro. *J Physiol* 555:527-543.
- Rustioni A, Cuenod M (1982) Selective retrograde transport of D-aspartate in spinal interneurons and cortical neurons of rats. *Brain Res* 236:143-155.
- Ryu PD, Randic M (1990) Low- and high-voltage-activated calcium currents in rat spinal dorsal horn neurons. *J Neurophysiol* 63:273-285.
- Sabatier N, Richard P, Dayanithi G (1997) L-, N- and T- but neither P- nor Q-type Ca²⁺ channels control vasopressin-induced Ca²⁺ influx in magnocellular vasopressin neurones isolated from the rat supraoptic nucleus. *J Physiol* 503 (Pt 2):253-268.
- Safronov BV (1999) Spatial distribution of Na⁺ and K⁺ channels in spinal dorsal horn neurones: role of the soma, axon and dendrites in spike generation. *Prog Neurobiol* 59:217-241.

- Safronov BV, Wolff M, Vogel W (1997) Functional distribution of three types of Na⁺ channel on soma and processes of dorsal horn neurones of rat spinal cord. *J Physiol* 503 (Pt 2):371-385.
- Sah P (1996) Ca²⁺-activated K⁺ currents in neurones: types, physiological roles and modulation. *Trends Neurosci* 19:150-154.
- Saito Y, Isa T (1999) Electrophysiological and morphological properties of neurons in the rat superior colliculus. I. Neurons in the intermediate layer. *J Neurophysiol* 82:754-767.
- Sakamoto H, Atsumi S (1995) Interaction between substance P-immunoreactive central terminals and gamma-aminobutyric acid-immunoreactive elements in synaptic glomeruli in the lamina II of the chicken spinal cord. *Neurosci Res* 23:335-343.
- Sakmann B, Hamill OP, Bormann J (1983) Patch-clamp measurements of elementary chloride currents activated by the putative inhibitory transmitter GABA and glycine in mammalian spinal neurons. *J Neural Transm Suppl* 18:83-95.
- Salt TE, Morris R, Hill RG (1983) Distribution of substance P-responsive and nociceptive neurones in relation to substance P-immunoreactivity within the caudal trigeminal nucleus of the rat. *Brain Res* 273:217-228.
- Sandkuhler J (1996) The organization and function of endogenous antinociceptive systems. *Prog Neurobiol* 50:49-81.
- Sandkuhler J (2000) Learning and memory in pain pathways. *Pain* 88:113-118.
- Sandkuhler J, Ruscheweyh R (2005) Opioids and central sensitisation: II. Induction an reversal of hyperalgesia. *Eur J Pain* 9:159-152.
- Sandkuhler J, Stelzer B, Fu QG (1993) Characteristics of propriospinal modulation of nociceptive lumbar spinal dorsal horn neurons in the cat. *Neuroscience* 54:957-967.
- Sands SA, Morilak DA (1999) Expression of alpha1D adrenergic receptor messenger RNA in oxytocin- and corticotropin-releasing hormone-synthesizing neurons in the rat paraventricular nucleus. *Neuroscience* 91:639-649.
- Santos SF, Melnick IV, Safronov BV (2004) Selective postsynaptic inhibition of tonic-firing neurons in substantia gelatinosa by mu-opioid agonist. *Anesthesiology* 101:1177-1183.
- Saper CB, Loewy AD, Swanson LW, Cowan WM (1976) Direct hypothalamo-autonomic connections. *Brain Res* 117:305-312.
- Sawchenko PE, Swanson LW (1982) Immunohistochemical identification of neurons in the paraventricular nucleus of the hypothalamus that project to the medulla or to the spinal cord in the rat. *J Comp Neurol* 205:260-272.
- Sawczuk A, Powers RK, Binder MD (1997) Contribution of outward currents to spike-frequency adaptation in hypoglossal motoneurons of the rat. *J Neurophysiol* 78:2246-2253.
- Schomburg ED, Steffens H, Warneke G (1986) Functional organization of the spinal reflex pathways from forelimb afferents to hindlimb motoneurons in the cat. II. Conditions of the interneuronal connections. *Brain Res* 375:280-290.
- Seagrove LC, Suzuki R, Dickenson AH (2004) Electrophysiological characterisations of rat lamina I dorsal horn neurones and the involvement of excitatory amino acid receptors. *Pain* 108:76-87.
- Sherrington CS (1906) *The integrative action of the nervous system*. Scribner, New York.
- Shiraishi T, Onoe M, Kojima T, Sameshima Y, Kageyama T (1995) Effects of hypothalamic paraventricular nucleus: electrical stimulation produce marked analgesia in rats. *Neurobiology (Bp)* 3:393-403.
- Simmons CF, Jr., Clancy TE, Quan R, Knoll JH (1995) The oxytocin receptor gene (OXTR) localizes to human chromosome 3p25 by fluorescence in situ hybridization and PCR analysis of somatic cell hybrids. *Genomics* 26:623-625.

- Sivilotti L, Nistri A (1991) GABA receptor mechanisms in the central nervous system. *Prog Neurobiol* 36:35-92.
- Sivilotti L, Woolf CJ (1994) The contribution of GABA_A and glycine receptors to central sensitization: disinhibition and touch-evoked allodynia in the spinal cord. *J Neurophysiol* 72:169-179.
- Skinner RD, Adams RJ, Rempel RS (1980) Responses of long descending propriospinal neurons to natural and electrical types of stimuli in cat. *Brain Res* 196:387-403.
- Sofroniew MV, Weindl A, Schrell U, Wetzstein R (1981) Immunohistochemistry of vasopressin, oxytocin and neurophysin in the hypothalamus and extrahypothalamic regions of the human and primate brain. *Acta Histochem Suppl* 24:79-95.
- Soloff MS, Sweet P (1982) Oxytocin inhibition of (Ca²⁺ + Mg²⁺)-ATPase activity in rat myometrial plasma membranes. *J Biol Chem* 257:10687-10693.
- Song WJ (2002) Genes responsible for native depolarization-activated K⁺ currents in neurons. *Neurosci Res* 42:7-14.
- Spike RC, Kerr R, Maxwell DJ, Todd AJ (1998) GluR1 and GluR2/3 subunits of the AMPA-type glutamate receptor are associated with particular types of neurone in lamina I-II of the spinal dorsal horn of the rat. *Eur J Neurosci* 10:324-333.
- Spike RC, Puskar Z, Andrew D, Todd AJ (2003) A quantitative and morphological study of projection neurons in lamina I of the rat lumbar spinal cord. *Eur J Neurosci* 18:2433-2448.
- Stansfeld CE, Marsh SJ, Halliwell JV, Brown DA (1986) 4-Aminopyridine and dendrotoxin induce repetitive firing in rat visceral sensory neurones by blocking a slowly inactivating outward current. *Neurosci Lett* 64:299-304.
- Stea A, Soong TW, Snutch TP (1995) Determinants of PKC-dependent modulation of a family of neuronal calcium channels. *Neuron* 15:929-940.
- Stoeckel ME, Freund-Mercier MJ (1989) Autoradiographic demonstration of oxytocin-binding sites in the macula densa. *Am J Physiol* 257:F310-314.
- Strakova Z, Copland JA, Lolait SJ, Soloff MS (1998) ERK2 mediates oxytocin-stimulated PGE₂ synthesis. *Am J Physiol* 274:E634-641.
- Strosser MT, Evrard ME, Breton C, Guenot-Di Scala D (2001) Phorbol ester differentially regulates oxytocin receptor binding activity in hypothalamic cultured neurons and astrocytes. *Peptides* 22:677-683.
- Stuart GJ, Redman SJ (1992) The role of GABA_A and GABA_B receptors in presynaptic inhibition of Ia EPSPs in cat spinal motoneurons. *J Physiol* 447:675-692.
- Stuart GJ, Dodt HU, Sakmann B (1993) Patch-clamp recordings from the soma and dendrites of neurons in brain slices using infrared video microscopy. *Pflugers Arch* 423:511-518.
- Sun C, Du J, Raizada MK, Summers C (2003a) Modulation of delayed rectifier potassium current by angiotensin II in CATH.a cells. *Biochem Biophys Res Commun* 310:710-714.
- Sun RQ, Lawand NB, Willis WD (2003b) The role of calcitonin gene-related peptide (CGRP) in the generation and maintenance of mechanical allodynia and hyperalgesia in rats after intradermal injection of capsaicin. *Pain* 104:201-208.
- Sun RQ, Lawand NB, Lin Q, Willis WD (2004a) Role of calcitonin gene-related peptide in the sensitization of dorsal horn neurons to mechanical stimulation after intradermal injection of capsaicin. *J Neurophysiol* 92:320-326.
- Sun RQ, Tu YJ, Lawand NB, Yan JY, Lin Q, Willis WD (2004b) Calcitonin gene-related peptide receptor activation produces PKA- and PKC-dependent mechanical hyperalgesia and central sensitization. *J Neurophysiol* 92:2859-2866.

- Swanson LW (1977) Immunohistochemical evidence for a neurophysin-containing autonomic pathway arising in the paraventricular nucleus of the hypothalamus. *Brain Res* 128:346-353.
- Swanson LW, McKellar S (1979) The distribution of oxytocin- and neurophysin-stained fibers in the spinal cord of the rat and monkey. *J Comp Neurol* 188:87-106.
- Swanson LW, Kuypers HG (1980) The paraventricular nucleus of the hypothalamus: cytoarchitectonic subdivisions and organization of projections to the pituitary, dorsal vagal complex, and spinal cord as demonstrated by retrograde fluorescence double-labeling methods. *J Comp Neurol* 194:555-570.
- Swanson LW, Sawchenko PE (1980) Paraventricular nucleus: a site for the integration of neuroendocrine and autonomic mechanisms. *Neuroendocrinology* 31:410-417.
- Swartz KJ, Merritt A, Bean BP, Lovinger DM (1993) Protein kinase C modulates glutamate receptor inhibition of Ca²⁺ channels and synaptic transmission. *Nature* 361:165-168.
- Sweitzer SM, Wong SM, Peters MC, Mochly-Rosen D, Yeomans DC, Kendig JJ (2004) Protein kinase C epsilon and gamma: involvement in formalin-induced nociception in neonatal rats. *J Pharmacol Exp Ther* 309:616-625.
- Takahashi T (1990) Inward rectification in neonatal rat spinal motoneurons. *J Physiol* 423:47-62.
- Takayanagi Y, Yoshida M, Bielsky IF, Ross HE, Kawamata M, Onaka T, Yanagisawa T, Kimura T, Matzuk MM, Young LJ, Nishimori K (2005) Pervasive social deficits, but normal parturition, in oxytocin receptor-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102:16096-16101.
- Thomson AM, West DC, Headley PM (1989) Membrane Characteristics and Synaptic Responsiveness of Superficial Dorsal Horn Neurons in a Slice Preparation of Adult Rat Spinal Cord. *Eur J Neurosci* 1:479-488.
- Todd AJ (1996) GABA and glycine in synaptic glomeruli of the rat spinal dorsal horn. *Eur J Neurosci* 8:2492-2498.
- Todd AJ, Lewis SG (1986) The morphology of Golgi-stained neurons in lamina II of the rat spinal cord. *J Anat* 149:113-119.
- Todd AJ, McKenzie J (1989) GABA-immunoreactive neurons in the dorsal horn of the rat spinal cord. *Neuroscience* 31:799-806.
- Todd AJ, Lochhead V (1990) GABA-like immunoreactivity in type I glomeruli of rat substantia gelatinosa. *Brain Res* 514:171-174.
- Todd AJ, Sullivan AC (1990) Light microscope study of the coexistence of GABA-like and glycine-like immunoreactivities in the spinal cord of the rat. *J Comp Neurol* 296:496-505.
- Todd AJ, Spike RC (1992) Co-localization of Met-enkephalin and somatostatin in the spinal cord of the rat. *Neurosci Lett* 145:71-74.
- Todd AJ, Spike RC (1993) The localization of classical transmitters and neuropeptides within neurons in laminae I-III of the mammalian spinal dorsal horn. *Prog Neurobiol* 41:609-645.
- Todd AJ, Spike RC, Russell G, Johnston HM (1992) Immunohistochemical evidence that Met-enkephalin and GABA coexist in some neurones in rat dorsal horn. *Brain Res* 584:149-156.
- Tominaga M, Caterina MJ, Malmberg AB, Rosen TA, Gilbert H, Skinner K, Raumann BE, Basbaum AI, Julius D (1998) The cloned capsaicin receptor integrates multiple pain-producing stimuli. *Neuron* 21:531-543.
- Toth ZE, Gallatz K, Fodor M, Palkovits M (1999) Decussations of the descending paraventricular pathways to the brainstem and spinal cord autonomic centers. *J Comp Neurol* 414:255-266.

- Tribollet E, Barberis C, Arsenijevic Y (1997) Distribution of vasopressin and oxytocin receptors in the rat spinal cord: sex-related differences and effect of castration in pudendal motor nuclei. *Neuroscience* 78:499-509.
- Truesdell LS, Bodnar RJ (1987) Reduction in cold-water swim analgesia following hypothalamic paraventricular nucleus lesions. *Physiol Behav* 39:727-731.
- Twyman RE, Rogers CJ, Macdonald RL (1989) Differential regulation of gamma-aminobutyric acid receptor channels by diazepam and phenobarbital. *Ann Neurol* 25:213-220.
- Uhl-Bronner S, Waltisperger E, Martinez-Lorenzana G, Condes Lara M, Freund-Mercier MJ (2005) Sexually dimorphic expression of oxytocin binding sites in forebrain and spinal cord of the rat. *Neuroscience* 135:147-154.
- Vallejo M, Carter DA, Lightman SL (1984) Haemodynamic effects of arginine-vasopressin microinjections into the nucleus tractus solitarius: a comparative study of vasopressin, a selective vasopressin receptor agonist and antagonist, and oxytocin. *Neurosci Lett* 52:247-252.
- van den Pol AN (1982) The magnocellular and parvocellular paraventricular nucleus of rat: intrinsic organization. *J Comp Neurol* 206:317-345.
- van den Pol AN, Gores T (1988) Glycine and glycine receptor immunoreactivity in brain and spinal cord. *J Neurosci* 8:472-492.
- van Leengoed E, Kerker E, Swanson HH (1987) Inhibition of post-partum maternal behaviour in the rat by injecting an oxytocin antagonist into the cerebral ventricles. *J Endocrinol* 112:275-282.
- Verbalis JG (1999) The brain oxytocin receptor(s)? *Front Neuroendocrinol* 20:146-156.
- Voets T, Droogmans G, Wissenbach U, Janssens A, Flockerzi V, Nilius B (2004) The principle of temperature-dependent gating in cold- and heat-sensitive TRP channels. *Nature* 430:748-754.
- Waldvogel HJ, Faull RL, Jansen KL, Dragunow M, Richards JG, Mohler H, Streit P (1990) GABA, GABA receptors and benzodiazepine receptors in the human spinal cord: an autoradiographic and immunohistochemical study at the light and electron microscopic levels. *Neuroscience* 39:361-385.
- Wall P (1977) The presence of ineffective synapses and the circumstances which unmask them. *Trans R Soc Lond B* 278:361-372.
- Wang D, Li YQ, Li JL, Kaneko T, Nomura S, Mizuno N (2000) gamma-aminobutyric acid- and glycine-immunoreactive neurons postsynaptic to substance P-immunoreactive axon terminals in the superficial layers of the rat medullary dorsal horn. *Neurosci Lett* 288:187-190.
- Wang H, Woolf CJ (2005) Pain TRPs. *Neuron* 46:9-12.
- Wang H, Ehnert C, Brenner GJ, Woolf CJ (2006) Bradykinin and peripheral sensitization. *Biol Chem* 387:11-14.
- Wang JW, Lundeberg T, Yu LC (2003) Antinociceptive role of oxytocin in the nucleus raphe magnus of rats, an involvement of mu-opioid receptor. *Regul Pept* 115:153-159.
- Watson SJ, Akil H, Fischli W, Goldstein A, Zimmerman E, Nilaver G, van wimersma Griedanus TB (1982) Dynorphin and vasopressin: common localization in magnocellular neurons. *Science* 216:85-87.
- Welch JM, Simon SA, Reinhart PH (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. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:13889-13894.
- Westenbroek RE, Hoskins L, Catterall WA (1998) Localization of Ca²⁺ channel subtypes on rat spinal motor neurons, interneurons, and nerve terminals. *J Neurosci* 18:6319-6330.

- Whitnall MH (1993) Regulation of the hypothalamic corticotropin-releasing hormone neurosecretory system. *Prog Neurobiol* 40:573-629.
- Willis WD (2002) Long-term potentiation in spinothalamic neurons. *Brain Res Brain Res Rev* 40:202-214.
- Willis WD, Westlund KN (1997) Neuroanatomy of the pain system and of the pathways that modulate pain. *J Clin Neurophysiol* 14:2-31.
- Willis WD, Jr. (1999) Dorsal root potentials and dorsal root reflexes: a double-edged sword. *Exp Brain Res* 124:395-421.
- Winslow JT, Hearn EF, Ferguson J, Young LJ, Matzuk MM, Insel TR (2000) Infant vocalization, adult aggression, and fear behavior of an oxytocin null mutant mouse. *Horm Behav* 37:145-155.
- Witkowski G, Szulczyk P (2006) Opioid mu receptor activation inhibits sodium currents in prefrontal cortical neurons via a protein kinase A- and C-dependent mechanism. *Brain Res*.
- Wolff M, Vogel W, Safronov BV (1998) Uneven distribution of K⁺ channels in soma, axon and dendrites of rat spinal neurones: functional role of the soma in generation of action potentials. *J Physiol* 509 (Pt 3):767-776.
- Woodbury CJ, Ritter AM, Koerber HR (2000) On the problem of lamination in the superficial dorsal horn of mammals: a reappraisal of the substantia gelatinosa in postnatal life. *J Comp Neurol* 417:88-102.
- Wu G, Malinow R, Cline HT (1996) Maturation of a central glutamatergic synapse. *Science* 274:972-976.
- Xu ZC, Wiesenfeld-Hallin Z (1994) Intrathecal oxytocin facilitates the spinal nociceptive flexor reflex in the rat. *Neuroreport* 5:750-752.
- Yaksh TL (1989) Behavioral and autonomic correlates of the tactile evoked allodynia produced by spinal glycine inhibition: effects of modulatory receptor systems and excitatory amino acid antagonists. *Pain* 37:111-123.
- Yamashita H, Okuya S, Inenaga K, Kasai M, Uesugi S, Kannan H, Kaneko T (1987) Oxytocin predominantly excites putative oxytocin neurons in the rat supraoptic nucleus in vitro. *Brain Res* 416:364-368.
- Yang J (1994) Intrathecal administration of oxytocin induces analgesia in low back pain involving the endogenous opiate peptide system. *Spine* 19:867-871.
- Yang K, Wang D, Li YQ (2001) Distribution and depression of the GABA(B) receptor in the spinal dorsal horn of adult rat. *Brain Res Bull* 55:479-485.
- Yang Q, Wu ZZ, Li X, Li ZW, Wei JB, Hu QS (2002) Modulation by oxytocin of ATP-activated currents in rat dorsal root ganglion neurons. *Neuropharmacology* 43:910-916.
- Yellen G (2002) The voltage-gated potassium channels and their relatives. *Nature* 419:35-42.
- Yirmiya R, Ben-Eliyahu S, Shavit Y, Marek P, Liebeskind JC (1990) Stimulation of the hypothalamic paraventricular nucleus produces analgesia not mediated by vasopressin or endogenous opioids. *Brain Res* 537:169-174.
- Yoshimura M, Jessell TM (1989) Membrane properties of rat substantia gelatinosa neurons in vitro. *J Neurophysiol* 62:109-118.
- Yoshimura M, Jessell T (1990) Amino acid-mediated EPSPs at primary afferent synapses with substantia gelatinosa neurones in the rat spinal cord. *J Physiol* 430:315-335.
- Yoshimura M, Nishi S (1993) Blind patch-clamp recordings from substantia gelatinosa neurons in adult rat spinal cord slices: pharmacological properties of synaptic currents. *Neuroscience* 53:519-526.

- Yoshimura R, Kiyama H, Kimura T, Araki T, Maeno H, Tanizawa O, Tohyama M (1993) Localization of oxytocin receptor messenger ribonucleic acid in the rat brain. *Endocrinology* 133:1239-1246.
- Young WS, 3rd, Shepard E, Amico J, Hennighausen L, Wagner KU, LaMarca ME, McKinney C, Ginns EI (1996) Deficiency in mouse oxytocin prevents milk ejection, but not fertility or parturition. *J Neuroendocrinol* 8:847-853.
- Yu SQ, Lundeberg T, Yu LC (2003) Involvement of oxytocin in spinal antinociception in rats with inflammation. *Brain Res* 983:13-22.
- Zaninetti M, Raggenbass M (2000) Oxytocin receptor agonists enhance inhibitory synaptic transmission in the rat hippocampus by activating interneurons in stratum pyramidale. *Eur J Neurosci* 12:3975-3984.
- Zeng J, Powers RK, Newkirk G, Yonkers M, Binder MD (2005) Contribution of persistent sodium currents to spike-frequency adaptation in rat hypoglossal motoneurons. *J Neurophysiol* 93:1035-1041.
- Zimmermann M (2001) Pathobiology of neuropathic pain. *Eur J Pharmacol* 429:23-37.
- Zingg HH, Rozen F, Breton C, Larcher A, Neculcea J, Chu K, Russo C, Arslan A (1995) Gonadal steroid regulation of oxytocin and oxytocin receptor gene expression. *Adv Exp Med Biol* 395:395-404.
- Zoli M, Agnati LF (1996) Wiring and volume transmission in the central nervous system: the concept of closed and open synapses. *Prog Neurobiol* 49:363-380.
- Zou X, Lin Q, Willis WD (2002) Role of protein kinase A in phosphorylation of NMDA receptor 1 subunits in dorsal horn and spinothalamic tract neurons after intradermal injection of capsaicin in rats. *Neuroscience* 115:775-786.

Annexes

Annexe 1

Fast nongenomic effects of steroids on synaptic transmission and role of endogenous neurosteroids in spinal pain pathways.

Schlichter R, Keller AF, De Roo M, Breton JD, Inquimbert P, Poisbeau P.

Journal of Molecular Neuroscience

Année : 2006

Volume : 28 (1)

Pages : 33-51

[Signalement bibliographique ajouté par : ULP – SCD – Service des thèses électroniques]

Fast Nongenomic Effects of Steroids on Synaptic Transmission and Role of Endogenous Neurosteroids in Spinal Pain Pathways

Rémy Schlichter, Anne Florence Keller, Mathias De Roo, **Jean-Didier Breton**, Perrine Inquimbert, et Pierrick Poisbeau

Journal of Molecular Neuroscience, 2006, Vol. 28, Pages 33-51

Pages 33 à 51 :

La publication présentée ici dans la thèse est soumise à des droits détenus par un éditeur commercial.

Il est possible de consulter la thèse sous sa forme papier ou d'en faire une demande via le service de prêt entre bibliothèques (PEB), auprès du Service Commun de Documentation de l'ULP: peb.sciences@scd-ulp.u-strasbg.fr

Annexe 2

Inflammatory pain upregulates spinal inhibition via endogenous neurosteroid production.

Poisbeau P, Patte-Mensah C, Keller AF, Barrot M, Breton JD, Luis-Delgado OE, Freund-Mercier MJ, Mensah-Nyagan AG, Schlichter R.

Journal of Neuroscience

Année : 2005

Volume : 25 (50)

Pages : 11768-11776

[Signalement bibliographique ajouté par : ULP – SCD – Service des thèses électroniques]

Inflammatory Pain Upregulates Spinal Inhibition via Endogenous Neurosteroid Production

Pierrick Poisbeau, Christine Patte-Mensah, Anne Florence Keller, Michel Barrot, **Jean-Didier Breton**, Oliva Erendira Luis-Delgado, Marie José Freund-Mercier, Ayikoe Guy Mensah-Nyagan, et Rémy Schlichter

The Journal of Neuroscience, 2005, Vol. 25, Pages 11768-11776

Pages 11768 à 11776 :

La publication présentée ici dans la thèse est soumise à des droits détenus par un éditeur commercial.

Pour les utilisateurs ULP, il est possible de consulter cette publication sur le site de l'éditeur : <http://www.jneurosci.org/cgi/content/full/25/50/11768>

Il est également possible de consulter la thèse sous sa forme papier ou d'en faire une demande via le service de prêt entre bibliothèques (PEB), auprès du Service Commun de Documentation de l'ULP: peb.sciences@scd-ulp.u-strasbg.fr

Annexe 3

Production of 5alpha-reduced neurosteroids is developmentally regulated and shapes GABA(A) miniature IPSCs in lamina II of the spinal cord.

Keller AF, Breton JD, Schlichter R, Poisbeau P.

Journal of Neuroscience

Année : 2004

Volume : 24 (4)

Pages : 907-915

[Signalement bibliographique ajouté par : ULP – SCD – Service des thèses électroniques]

Production of 5 α -Reduced Neurosteroids Is Developmentally Regulated and Shapes GABA_A Miniature IPSCs in Lamina II of the Spinal Cord

A. Florence Keller, **Jean-Didier Breton**, Rémy Schlichter, et Pierrick Poisbeau

The Journal of Neuroscience, 2004, Vol. 24, Pages 907-915

Pages 907 à 915 :

La publication présentée ici dans la thèse est soumise à des droits détenus par un éditeur commercial.

Pour les utilisateurs ULP, il est possible de consulter cette publication sur le site de l'éditeur :
<http://www.jneurosci.org/cgi/content/full/24/4/907>

Il est également possible de consulter la thèse sous sa forme papier ou d'en faire une demande via le service de prêt entre bibliothèques (PEB), auprès du Service Commun de Documentation de l'ULP: peb.sciences@scd-ulp.u-strasbg.fr