



THESE

Pour obtenir le grade de

Docteur de l'Université Louis Pasteur (Strasbourg I)

Discipline : Sciences du vivant

Spécialité : Neurosciences

Présentée par

Perrine INQUIMBERT

**Modulation différentielle de la transmission synaptique
inhibitrice par la synthèse localisée de neurostéroïdes
dans la corne dorsale de la moelle épinière de rat.**

Soutenue publiquement le 5 octobre 2007

Membres du Jury :

M. Jean-Marc FRITSCHY,
Professeur, Université de Zurich

Rapporteur externe

M. Frédéric NAGY,
Directeur de recherches CNRS, Université Bordeaux 2

Rapporteur externe

M. Bernard POULAIN,
Directeur de recherches CNRS, Université Louis Pasteur

Rapporteur interne

M. Rémy SCHLICHTER,
Professeur, Université Louis Pasteur

Directeur de thèse

Cette thèse a été effectuée à l'Institut des Neurosciences Cellulaires et Intégrées, dans le département Nociception et Douleur, dans l'équipe « Neurophysiologie de la transmission synaptique dans la moelle épinière ». Ce travail a été réalisé grâce au soutien financier du Ministère de l'Education Nationale, de la Recherche et de la Technologie et l'Institut UPSA de la douleur.

Remerciements

Mon premier merci, je tiens à l'adresser à Rémy Schlichter. Je vous remercie du fond du cœur pour tout ; vous avez été pour moi, à tous les niveaux, le directeur de thèse idéal.

Je tiens à remercier sincèrement Monsieur le Professeur Jean-Marc Fritschy, Monsieur le Docteur Frédéric Nagy et Monsieur le Docteur Bernard Poulain de m'avoir fait l'honneur de juger mon travail de thèse.

Je remercie l'ensemble des membres du département Nociception et Douleur de l'INCI pour tout ce qu'ils m'ont appris et apporté. Je tiens à remercier plus particulièrement les membres de l'équipe 2 pour leur soutien et leur aide au quotidien.

Merci à Jean-Luc et à Sylvain, pour leurs précieux conseils et leurs critiques constructives.

Merci à Francine Herzog et Catherine Moreau pour leur soutien technique et logistique et pour leurs attentions de tous les jours.

Merci à Raymonde pour sa gentillesse et son grand talent de « maquerelle ».

Merci à Gilles Desmadryl de m'avoir un jour mis entre les doigts une pipette de patch et de m'avoir initiée à la configuration « cellule-entière ». Je remercie aussi tout le laboratoire de Montpellier qui m'a fait découvrir le monde de la recherche.

Un immense merci à mes amis qui même loin géographiquement m'ont toujours soutenue et ont toujours été présents.

Merci à Malik qui a décidé de tout partagé avec moi, pour le meilleur et pour le pire, même sa rédaction de thèse. Son soutien et son amour au quotidien (7j/7, 24h/24) ont été mes plus grand alliés au cours de ces quatre années. Avec tout mon amour je le remercie d'être présent à mes côtés.

Merci à Julie et à Camille d'avoir été mes meilleures supportrices.

Merci à mes parents. Leur soutien inconditionnel de toujours est inestimable. Sans eux, tout ceci n'aurait pas été possible. Ce travail leur est dédié.

Résumé

La corne dorsale de la moelle épinière est une structure d'importance fondamentale pour la réception, la modulation, l'intégration et la transmission des informations somatosensorielles en provenance de la périphérie. Les neurones des laminae III et IV de la moelle épinière reçoivent principalement des informations non nociceptives par les fibres afférentes A β tandis que les neurones de la lamina II reçoivent essentiellement des informations nociceptives transmises par les fibres afférentes de type A δ et C. L'intégration de ces informations implique des neurones excitateurs et des neurones inhibiteurs.

La transmission synaptique inhibitrice, qui joue un rôle essentiel dans l'intégration et la modulation des informations somatosensorielles, met en jeu l'acide γ -aminobutyrique (GABA) et la glycine par l'intermédiaire de récepteurs-canaux GABA_A et de la glycine. La transmission synaptique inhibitrice mettant en jeu les récepteurs GABA_A est fortement impliquée dans la modulation spinale de ces messages sensoriels. Les stéroïdes réduits en position 3 α et 5 α sont des modulateurs allostériques positifs du récepteur GABA_A qui peuvent être synthétisés dans la moelle épinière.

A l'heure actuelle, alors que la transmission inhibitrice a été bien étudiée dans la lamina II, très peu de choses sont connues sur les propriétés de l'inhibition synaptique dans les laminae III et IV de la moelle épinière. Par ailleurs, il n'existe aucune donnée sur l'éventuelle modulation de la transmission GABAergique dans les laminae III et IV par des stéroïdes 3 α 5 α -réduits endogènes. Par conséquent, le but de mon travail de thèse a été de caractériser les propriétés de la transmission synaptique inhibitrice (GABA/glycine) dans les laminae III et IV de la corne dorsale de la moelle épinière lombaire et de les comparer à celles de la transmission inhibitrice dans la lamina II. Nous avons aussi cherché à déterminer l'existence d'une modulation de la transmission GABAergique dans les laminae III et IV par les stéroïdes 3 α 5 α -réduits endogènes et de mettre en évidence d'éventuelles différences de neuro-stéroïdogénèse entre les couches III-IV et II.

Nos résultats montrent que la transmission glycinergique est prépondérante dans les laminae III-IV, alors que la transmission GABAergique domine dans la lamina II. D'autre part, une fraction de synapses inhibitrices dans la lamina II co-libèrent du GABA et de la glycine et la co-détection de ces deux neurotransmetteurs est possible dans des conditions où il y a une synthèse endogène de stéroïdes 3 α 5 α -réduits. En revanche, cette co-transmission n'a jamais été détectée dans les laminae III-IV.

Notre étude nous a aussi permis de montrer que les neurostéroïdes endogènes jouaient un rôle fondamental en facilitant de manière tonique la transmission GABAergique durant les premiers jours postnatals. Puis au cours du développement postnatal, on observe une réduction progressive de la synthèse de stéroïdes 3 α 5 α -réduits dans la corne dorsale, d'abord dans les laminae III-IV puis dans la lamina II. Ceci mène à une accélération des cinétiques des CPSIm GABA_A et à une disparition des CPSIm mixtes dans la lamina II. D'autre part, alors que la neurostéroïdogénèse reste stimulable pharmacologiquement dans la lamina II après avoir disparu, il est impossible de l'activer dans les laminae III-IV. Par contre, suite à une inflammation périphérique, une synthèse locale de stéroïdes 3 α 5 α -réduits est à nouveau observée. Ce phénomène est lié à la restauration de la fonctionnalité de la TSPO dans les laminae III-IV.

Ces résultats démontrent que les laminae III-IV, jusqu'alors considérées comme n'intervenant pas dans les phénomènes nociceptifs, subissent des changements plastiques importants lors d'une situation de douleur inflammatoire. Il est donc fortement envisageable que ces laminae participent à la mise en place des états d'allodynie associés à un grand nombre de douleurs.

Sommaire

Résumé	3
Sommaire	4
Abréviations	6
Tables des illustrations	8
Avant-propos	10

INTRODUCTION 12

I. La corne dorsale de la moelle épinière au sein du système somatosensoriel 14

1. Les entrées sensorielles dans la corne dorsale	15
2. Structure de la corne dorsale	16
a. Les laminae de Rexed	16
b. Les interactions entre laminae	18
3. Les voies de sortie de la corne dorsale	20
4. Les contrôles descendants	23

II. La transmission synaptique inhibitrice dans la corne dorsale 25

1. Les terminaisons synaptiques inhibitrices	25
a. Synthèse du GABA et de la glycine	25
b. Transporteur vésiculaire	26
c. Transporteurs membranaires	27
d. Trois types de terminaisons inhibitrices	28
2. Le récepteur GABA _A	30
a. Structure du récepteur	30
b. Expression des sous-unités	30
c. Adressage et cyclage du récepteur à la membrane	32
d. Pharmacologie	35
3. Le récepteur de la glycine	37
a. Structure du récepteur	37
b. Expression des sous-unités	38
c. Adressage et cyclage du récepteur à la membrane	38
d. Pharmacologie	40
4. La co-transmission GABA/glycine	41
5. Gradient de l'ion Cl ⁻	42

III. Les neurostéroïdes 45

1. Concept de neurostéroïdes	45
2. La biosynthèse	47
a. Du cholestérol à la prégnénolone	47
b. La biosynthèse	52
c. La voie de synthèse des stéroïdes 3 α 5 α -réduits	53
3. Mode d'action des stéroïdes : des modulateurs de la transmission synaptique	57
a. Action génomique	58
b. Récepteurs membranaire spécifiques	58
c. Modulation de la transmission synaptique	58
4. Neurostéroïdes et moelle épinière	65

Objectif de la thèse 67

MATERIEL ET METHODE 69

I. Animaux et traitement 70

1. Animaux utilisés	70
2. Induction de l'inflammation	70

3.	Injection sous-cutanée	71
II.	Préparation des tranches transversales de moelle épinière	73
1.	Dissection et réalisation des tranches	73
2.	Incubation des tranches	73
III.	Enregistrements électrophysiologiques	75
1.	Technique utilisée et type d'enregistrement	75
2.	Montage expérimental	76
a.	Chambre d'enregistrement et milieux extracellulaires	76
b.	Pipettes et milieux intrapipette	77
3.	Déroutement des enregistrements	78
4.	Acquisition des données	78
5.	Révélation de la biocytine	80
6.	Analyse des données	81
a.	Détection des CPSIm	81
b.	Ajustement des CPSIm	81
c.	Représentation des données	83
d.	Analyse statistique	83
IV.	Marquages immunocytochimiques	84
1.	Préparation des tranches de moelle épinière fixées	84
2.	Immunohistochimie	86
	RESULTATS	87
	Article 1	88
	Contribution différentielle de la transmission GABAergique et glycinergique dans la lamina II et les laminae III-IV de la corne dorsale de la moelle épinière de rat	
	Article 2	100
	Dans la corne dorsale de la moelle épinière de rat, le transport mitochondrial du cholestérol détermine les différences régionales de cinétiques de désactivation des CPSIm GABAergiques.	
	DISCUSSIONS ET PERSPECTIVES	133
I.	La transmission synaptique inhibitrice dans la corne dorsale	136
1.	Propriétés de la transmission synaptique inhibitrice	136
a.	Les entrées synaptiques inhibitrices	136
b.	La co-transmission	137
2.	Cinétiques des courants postsynaptiques inhibiteurs miniatures (CPSIm)	139
II.	Synthèse locale de stéroïdes 3α5α-réduits	142
1.	Synthèse différentielle de stéroïdes 3 α 5 α -réduits dans la corne dorsale	142
a.	Les CPSIm GABA _A : détecteurs fins de la présence de stéroïdes 3 α 5 α -réduits	142
b.	Absence de diffusion extracellulaire des stéroïdes	143
c.	Enzymes présentes et fonctionnelles	145
2.	TSPO : absence ou dysfonctionnement du complexe ?	147
3.	Stéroïdes circulants	150
a.	Variation de concentration de stéroïdes circulants	151
b.	Perméabilité de la barrière hémato-encéphalique	152
III.	Relations fonctionnelles entre les laminae III-IV et la lamina II : rôle potentiel dans le traitement de l'information somatosensorielle.	155
1.	Transmission inhibitrice	155
2.	Transmission excitatrice	157
3.	Réseau spinal et intégration des informations sensorielles	159
	REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	167

Abréviations

3 α -HSOR : 3 α -hydroxystéroïde oxydoréductase
3 β -HSD : 3 β -hydroxystéroïde déshydrogénase
5 α Red : 5 α -réductase
5-HT : 5-hydroxytryptamine
Ach : acétylcholine
ACSF : artificial cerebrospinal fluid
ADN : acide désoxyribonucléique
AMPc : adenosine 5'-monophosphate
ANOVA : Analysis of Variance
ANT : adenine nucleotide translocator
AP : allopregnanolone
AP2 : adaptin protein 2
ARN : acide ribonucléique
ATP : adenosine 5'-triphosphate
CBR : central benzodiazepine receptor
CD : corne dorsale
CPS : courant postsynaptique
CPSI : courant postsynaptique inhibiteur
CPSIm : courant postsynaptique inhibiteur miniature
Cy3 : cyanine 3
DHDOC : dihydrodésoxycorticostérone
DHEA : déhydroépiandrostérone
DHEA-S : DHEA sulfatée
DHProg : dihydroprogestérone
DOC : désoxycorticostérone
EGFP : enhanced green fluorescent protein
EPC : EndPlate Current
FITC : Fluorescéine Iso Thio Cyanate
GABA : γ aminobutyric acid
GABA-RAP : GABA_A receptor-associated protein;
GAD : glutamic acid decarboxylase
GAT : GABA transporter
Glu : glutamate
Gly : glycine
GlyT : glycine transporter
HAP1 : Huntingtin-associated protéin
HPLC : high performance liquid chromatography
MME : membrane mitochondriale externe
MMI : membrane mitochondriale interne
mPR : membran Progesterone Receptor
NK1 : neurokinine 1
NMDA : N-méthyl-D-aspartate
NP : neurone de projection
NPY : neuropeptide Y
p450scc : p450 side chain cleavage

PA : potential d'action
PAF : paraformaldéhyde
PAP7 : PBR-associated protein
PB : phosphate buffer
PBR : peripheral benzodiazepine receptor
PBS : phosphate buffered saline
PKA : protéine kinase A
PKC : protéine kinase C
Plic : protein that links integrin-associated protein with the cytoskeleton
Preg-S : prégnénolone sulfatée
Prog : progestérone
RACK1 : receptor for activated C-kinase
RT-PCR : reverse transcriptase- Polymerase Chain Reaction
sACSF : sucrose-ACSF
SNC : système nerveux central
StAR : steroid acute regulatory protein
THDOC : tétrahydro-désoxycorticostérone
THP : tétrahydro-progestérone
TSPO : translocator protein of 18 kDa
VDAC : voltage dependant anion channel
VIAAT : vesicular inhibitory amino-acid transporter
VPL : noyau ventral postérieur latéral
WDR : wide dynamic range

Table des illustrations et tableaux

INTRODUCTION

- Figure 1 : Système somatosensoriel
- Figure 2 : Laminae de Rexed
- Figure 3 : Projection des afférences primaires A β , A δ et C vers la corne dorsale de la moelle épinière
- Figure 4 : Représentation des arborisations dendritiques des neurones des différentes couches de la corne dorsale
- Figure 5 : Représentation schématique des principales voies ascendantes
- Figure 6 : Transporteur vésiculaire des acides aminés inhibiteurs (VIAAT)
- Figure 7 : Transporteurs membranaires du GABA (GAT) et de la glycine (GlyT)
- Figure 8 : Les trois types de terminaison synaptique inhibitrice
- Figure 9 : Le récepteur GABA de type A
- Figure 10 : Cyclage du récepteur GABA_A à la synapse
- Figure 11 : Ancrage des récepteurs GABA_A et de la glycine à la membrane postsynaptique
- Figure 12 : Le récepteur de la glycine
- Figure 13 : Maturation des récepteurs de la glycine
- Figure 14 : Co-transporteurs chlorure-cation
- Figure 15 : Rôle des transporteurs de l'ion chlorure dans la régulation du gradient Cl⁻
- Figure 16 : Modèle du transporteur du cholestérol dans la mitochondrie par la TSPO
- Figure 17 : Représentation schématique de l'activation du complexe mitochondrial
- Tableau 1 : Ligands inhibiteurs et stimulateurs du TSPO
- Figure 18 : Activité enzymatique de la p450_{scc}
- Figure 19 : Voies de biosynthèse des neurostéroïdes dans le système nerveux
- Figure 20 : Voie de synthèse des stéroïdes 3 α 5 α -réduits
- Tableau 2 : Inhibiteurs des enzymes de la voie de synthèse des stéroïdes 3 α 5 α -réduits
- Figure 21 : Mode d'action des stéroïdes
- Tableau 3 : Effets des stéroïdes neuroactifs sur les récepteurs des neurotransmetteurs
- Figure 22 : Sites de liaison des stéroïdes 3 α 5 α -réduits sur le récepteur GABA_A
- Figure 23 : Modulation de la synapse GABAergique par les stéroïdes 3 α 5 α -réduits

MATERIELS ET METHODES

Figure 24 : Prélèvement de la moelle épinière de rat par extrusion hydraulique et réalisation de tranches transversales de 600 μ m d'épaisseur

Tableau 4 : Composition en mM du sucrose-ACSF et de l'ACSF

Tableau 5 : Substances pharmacologiques utilisées en incubation

Figure 25 : Chambre de perfusion

Figure 26 : Tranche de moelle épinière lombaire visualisée en lumière transmise

Figure 27 : Réalisation de la configuration « cellule entière »

Tableau 6 : Composition des tampons utilisés pour les marquages immunologiques

Tableau 7 : Anticorps primaires utilisés

Tableau 8 : Anticorps secondaires utilisés

DISCUSSIONS ET PERSPECTIVES

Figure 28 : Action des neurostéroïdes et des stéroïdes neuroactifs sur le récepteur GABA_A

Figure 29 : Marquage immunohistochimique de la TSPO

Figure 30 : Marquage immunohistochimique de la PAP7 et de la StaR

Tableau 9 : Transmission inhibitrice dans la corne dorsale de la moelle épinière

Tableau 10 : Modulation des afférences primaires par une inhibition présynaptique

Tableau 11 : Transmission excitatrice dans la corne dorsale de la moelle épinière

Figure 31 : Schéma de base simplifié du réseau neuronal hypothétique impliqué dans l'intégration des informations somatosensorielles dans la corne dorsale de la moelle épinière

Figure 32 : Transmission des messages sensoriels dans les conditions physiologique de base

Figure 33 : Interaction entre les voies nociceptives et non-nociceptives dans la corne dorsale

Figure 34 : Intégration des informations nociceptives lors d'une douleur inflammatoire aiguë : composante hyperalgique

Figure 35 : Intégration des informations non-nociceptives lors d'une douleur inflammatoire aiguë : composante allodymique

Avant-propos

La douleur est définie par l'Association Internationale de l'Etude de la Douleur (AIED) comme «une expérience sensorielle et émotionnelle désagréable, associée à un dommage tissulaire présent ou potentiel, ou décrite en terme d'un tel dommage ». Un grand nombre de douleurs (inflammatoires, neuropathiques, cancéreuses) s'accompagne d'états d'hyperalgésie (augmentation de l'efficacité d'un stimulus nociceptif) et d'allodynie (situation dans laquelle un stimulus non nociceptif devient douloureux). Chez l'homme, l'allodynie est une composante importante des douleurs chroniques (douleurs qui persistent dans le temps) qui sont malheureusement résistantes à la plupart des traitements utilisés en clinique.

Le système somatosensoriel détecte les stimuli physiques grâce à des récepteurs spécialisés (nocicepteurs, mécanocpteurs, thermocepteurs, etc.) localisés dans la peau et les autres tissus de l'organisme. L'information est alors véhiculée par les fibres sensorielles primaires jusqu'au système nerveux central. Les sites de projection des afférences sensorielles nociceptives et non nociceptives dans la corne dorsale de la moelle épinière sont clairement séparés d'un point de vue anatomique, mais les données fonctionnelles suggèrent l'existence d'une interaction entre les réseaux neuronaux ciblés par ces deux types d'afférences.

Dans la corne dorsale de la moelle épinière, la transmission synaptique inhibitrice joue un rôle essentiel dans l'intégration et la modulation des informations somatosensorielles nociceptives (lamina II) et non nociceptives (laminae III et IV). La transmission synaptique inhibitrice est fortement impliquée dans la modulation spinale de ces messages sensoriels. Les phénomènes de sensibilisation centrale de la transmission nociceptive et de désinhibition dans la corne dorsale de la moelle épinière représentent deux phénomènes fondamentaux dans la mise en place des états d'hyperalgésie et d'allodynie.

Enfin, les stéroïdes $3\alpha,5\alpha$ -réduits qui sont de puissants modulateurs du récepteur GABA_A, peuvent être synthétisés de manière endogène dans la moelle épinière. Dans la lamina II, cette synthèse est élevée durant les 15 premiers jours postnataux, puis diminue au cours du développement postnatal jusqu'à des niveaux n'ayant plus d'effet modulateur détectable sur les courants GABAergiques. Notre laboratoire a montré que, lors d'une

inflammation périphérique chez le rat adulte, la production endogène de stéroïdes 3 α 5 α -réduits était réactivée

Alors que les caractéristiques de la transmission inhibitrice dans la lamina II sont bien documentées, il n'existe pas de données détaillées sur les propriétés de cette transmission dans les laminae III et IV, ni sur son éventuelle modulation par des stéroïdes 3 α 5 α -réduits endogènes. Notre objectif a été de caractériser la transmission synaptique inhibitrice dans les laminae III-IV de la moelle épinière et de comparer ses propriétés à celles de la transmission inhibitrice dans la lamina II. Par la suite, nous avons cherché à déterminer si la transmission inhibitrice dans les laminae III-IV était comme dans la lamina II, sous le contrôle de modulateurs endogènes tels que les stéroïdes 3 α 5 α -réduits.

Notre travail porte sur l'intégration de l'information somatosensorielle dans les laminae II et III-IV de la corne dorsale de la moelle épinière, nous allons donc dans l'introduction de cette thèse, commencer par faire le point sur la structure anatomo-fonctionnelle de la corne dorsale de la moelle épinière et sur sa place dans le système somatosensoriel. Dans une seconde partie, nous présenterons l'état des connaissances actuelles sur la transmission synaptique inhibitrice dans le système nerveux central, et plus précisément dans la corne dorsale de la moelle épinière. Enfin, nous terminerons cette introduction par un rappel sur les neurostéroïdes et les stéroïdes neuroactifs. Nous présenterons plus en détail, la synthèse endogène des stéroïdes 3 α 5 α -réduits ainsi que leurs puissants effets modulateurs sur le récepteur GABA_A.

Introduction

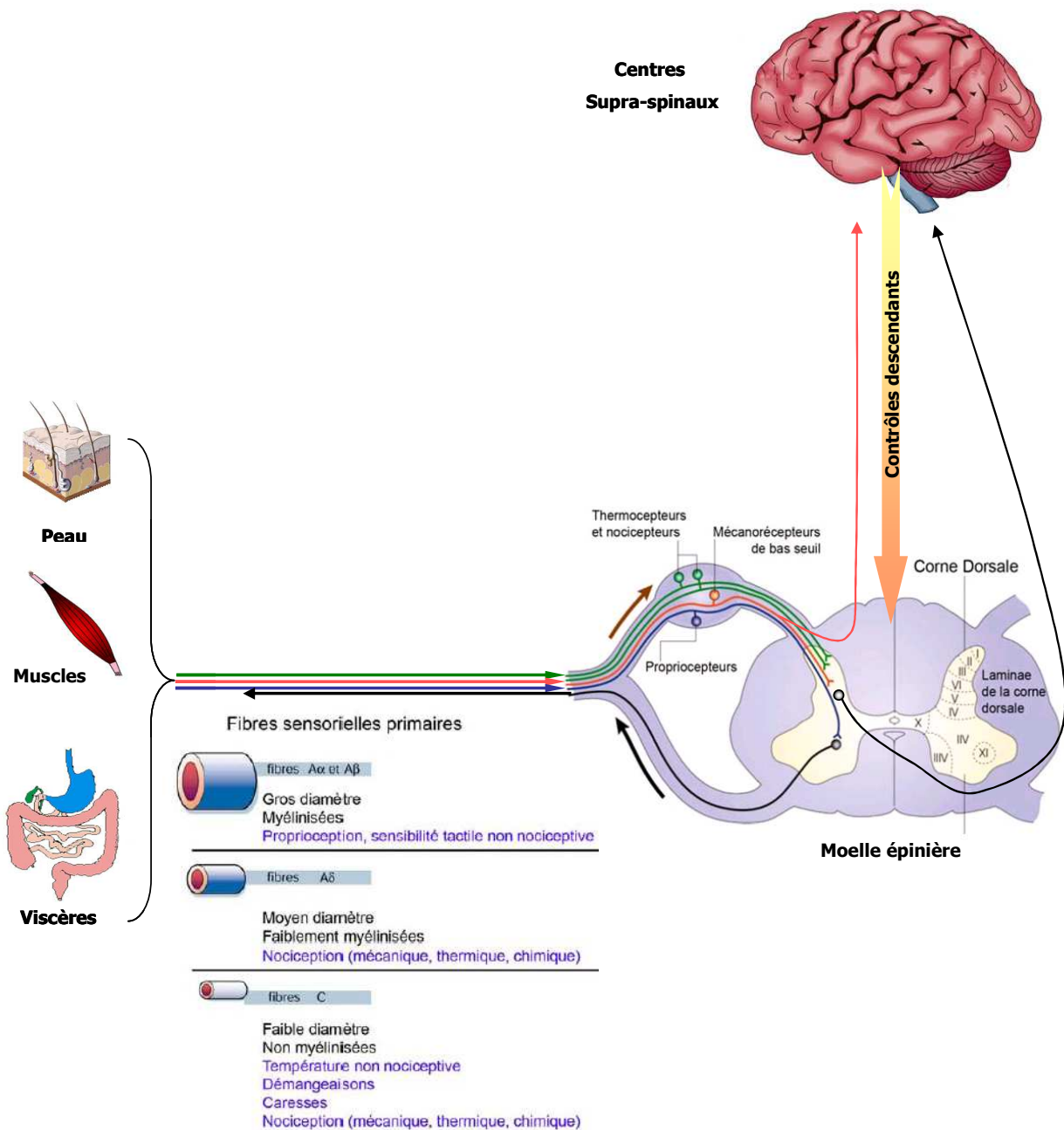


Figure 1 : Système somatosensoriel

Les fibres sensorielles sont activées en périphérie (peau, muscles et viscères) par différentes modalités sensorielles. Ces fibres sont de trois types, chacun avec des caractéristiques de taille, de modalité et de conduction différentes. Les informations captées en périphérie sont acheminées par les neurones afférents primaires aux structures supraspinales, directement ou avec un passage dans la corne dorsale de la moelle épinière où elles sont traitées avant d'être transmises aux centres supraspinaux. En réponse à ces informations, les structures supraspinales émettent des contrôles descendants qui vont moduler le traitement spinal. (Modifié d'après Julius & Basbaum, 2001 et Patapoutian et al., 2003)

I. La corne dorsale de la moelle épinière au sein du système somatosensoriel

Les informations somatosensorielles captées en périphérie (peau, muscles et viscères) sont véhiculées jusqu'aux cornes dorsales (CDs) de la moelle épinière par les axones de neurones sensoriels primaires dont les corps cellulaires sont localisés dans les ganglions rachidiens dorsaux. Ces axones sont de type A β (fortement myélinisés), A δ (finement myélinisés) ou C (non myélinisés). C'est dans les cornes dorsales que s'établissent les premiers relais synaptiques avec des interneurons locaux ou des neurones de projection dans le cas du système nociceptif (Brown, 1982 ; Besson et Chaouch, 1987; Millan, 1999). Les cornes dorsales de la moelle épinière jouent un rôle fondamental dans la réception, l'intégration et la transmission de l'information nociceptive et non-nociceptive en provenance de la périphérie (Besson et Chaouch, 1987; Millan, 1999). L'information intégrée dans la corne dorsale est ensuite acheminée vers les centres supraspinaux. Ces structures peuvent alors en retour exercer des contrôles réciproques sur le réseau neuronal des cornes dorsales, modulant ainsi le traitement des informations (Figure 1).

Rexed (1952) a divisé la moelle épinière de chat en une série de 10 *laminae* dont les 6 premières constituent la corne dorsale. Cette cartographie est basée sur les différences de cyto-architecture, c'est-à-dire de taille et de densité des corps cellulaires des neurones. Elle prend aussi en considération le schéma de projection des fibres afférentes primaires. Ce schéma a depuis été généralisé, et s'applique à plusieurs espèces, dont l'humain et les rongeurs (Figure 2).

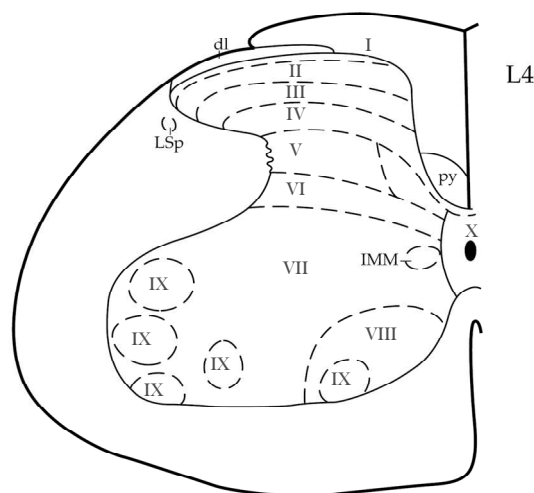


Figure 2 : Laminae de Rexed (1952)

I à X : couches de la moelle épinière; CeCv : noyau cervical central; dl : faisceau dorsolatéral; IMM : colonne intermédiaire médiane; LSp : noyau spinal latéral; py : tractus pyramidal. (Rexed, 1952).

1. Les entrées sensorielles dans la corne dorsale

Les informations somatosensorielles acheminées dans la corne dorsale de la moelle épinière proviennent des terminaisons périphériques cutanées, musculaires et viscérales.

Les propriocepteurs (fibres de gros diamètre) projettent dans la corne ventrale de la moelle épinière et font synapse directement avec les motoneurons (couche IX). Ils émettent également des collatérales qui font synapse avec des interneurons, dans les couches VI-VII de la moelle, et des collatérales ascendantes et descendantes, projetant sur les étages voisins et vers les centres nerveux supérieurs.

Les fibres mécanocéptives à bas seuil A β sont des fibres de gros diamètre véhiculant des informations non nociceptives (tactiles). Elles entrent dans la moelle et se divisent en une branche ascendante et une branche descendante qui cheminent dans les cordons dorsaux. Des collatérales de ces fibres projettent dans la corne dorsale de la moelle épinière et se terminent par de larges arborisations principalement dans les couches intermédiaires III à V de la corne dorsale, ainsi que dans la corne ventrale pour sous-tendre des réflexes moteurs (Brown, 1982; Millan, 1999; Gauriau et Bernard, 2002) (Figure 3). Au cours du développement, les fibres afférentes de gros diamètre sont les premières fibres afférentes à entrer dans la corne dorsale de la moelle épinière dès le 15^{ème} jour de vie embryonnaire.

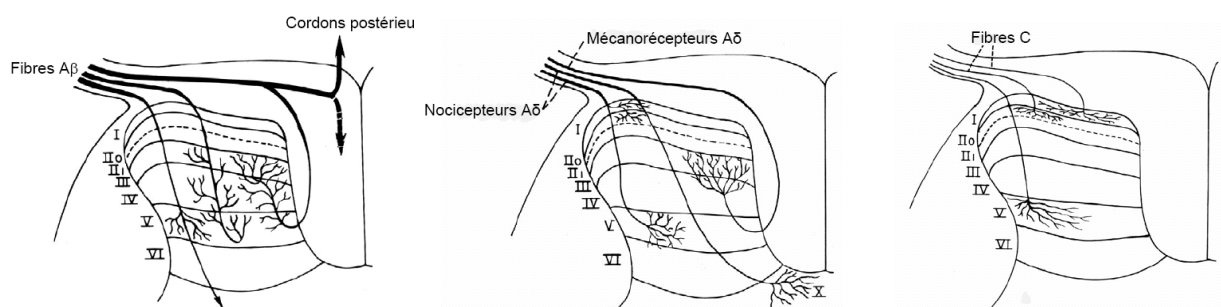


Figure 3 : Projection des afférences primaires A β , A δ et C vers la corne dorsale de la moelle épinière

Les afférences nociceptives (fibres non et peu myélinisées de petit diamètre) se terminent essentiellement dans les couches I et V de Rexed pour ce qui concerne les fibres A δ , et dans les couches II et X pour ce qui concerne les fibres C (Figure 3). Les fibres de type C commencent à entrer dans la moelle épinière au 19^{ème} jour de vie embryonnaire. Cependant,

la maturation des connexions entre les fibres afférentes et les neurones de la moelle épinière ne se fait qu'entre le 3^{ème} et le 10^{ème} jour de vie postnatale.

2. Structure de la corne dorsale

Les informations acheminées vers la moelle épinière y sont intégrées, modulées puis transmises aux centres supraspinaux.

a. Les laminae de Rexed

Les laminae I et II, communément appelées « couches superficielles » de la corne dorsale, sont les principales zones d'entrée des informations afférentes nociceptives.

La lamina I, appelée *zone marginale de Waldeyer*, constitue une couche très fine de neurones (30 à 40 µm) localisée entre la substance blanche dorsale et la lamina II. L'orientation dendritique des neurones y suit l'axe rostro-caudal (Chery et al., 2000). La majorité des neurones ont des dendrites restant au sein de la lamina I (Figure 4). La lamina I contient des neurones de projection et des interneurones.

La lamina II, appelée *substance gélatineuse de Rolando*, est la plus étudiée de la corne dorsale (Besson and Chaouch, 1987; Millan, 1999). Cette structure apparaît comme un croissant « translucide » en microscopie optique, en lumière transmise, du fait du faible nombre de fibres myélinisées. Elle est composée d'interneurones multipolaires de petite taille dont l'arborisation axonale est limitée. Les neurones de la lamina II sont classés en 2 catégories : les cellules en tige (*stalked cells*) et les cellules en îlots (*islet cells*) (Figure 4).

Les couches III-IV, regroupées sous le terme *nucleus proprius*, ont une densité cellulaire assez faible ; elles contiennent des neurones de projection ainsi que des interneurones locaux et sont considérées comme une structure de transition entre les couches superficielles (I-II) et profondes (V) de la corne dorsale (Brown, 1982). Les neurones de projection sont de grande taille et de deux types : des neurones exprimant les récepteurs NK1 des tachykinines et des neurones n'exprimant pas de récepteurs NK1. Les interneurones locaux des couches III-IV sont de petite taille (comme dans les couches I-II), et présentent soit des arborisations rostro-caudales restant dans la couche III, soit des arborisations dorso-ventrales traversant les limites des couches supérieures (I-II) et profondes (V) (Maxwell et al., 1985) (Figure 4). Ces derniers peuvent recevoir à la fois des informations provenant

d'afférences non nociceptives se terminant dans les couches III-IV et d'afférences nociceptives se terminant dans les couches I-II ou V. Par conséquent ces interneurons pourraient être particulièrement importants pour intégrer les messages nociceptifs et non-nociceptifs. Des données immunocytochimiques indiquent que, parmi ces interneurons, certains sont GABAergiques et/ou glycinergiques (Todd et Sullivan, 1990) et que d'autres co-localisent de l'acétylcholine (ACh) et du GABA (Todd, 1991). Il est probable que des interneurons glutamatergiques soient également présents dans les couches III-IV.

La lamina V contient des neurones avec des formes et des tailles très hétérogènes. Les neurones recevant à la fois des entrées nociceptives et des entrées mécaniques non-nociceptives sont plus gros que ceux ne recevant qu'une seule de ces modalités. La lamina V contient également un grand nombre de neurones de projection, qui ne sont pas spécifiques d'une modalité, c'est-à-dire qu'ils reçoivent des informations nociceptives et non-nociceptives convergentes. Ce sont les neurones dits à convergence ou « wide dynamic range » (WDR).

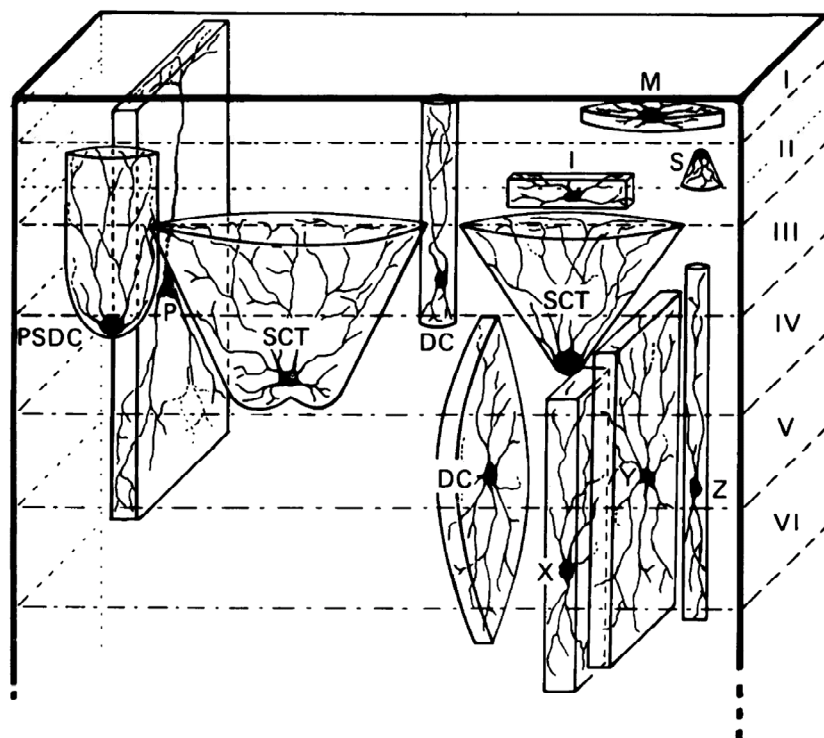


Figure 4 : Représentation des arborisations dendritiques des neurones des différentes couches de la corne dorsale

M : cellule marginale de la lamina I ; I : cellule en îlot ; S : cellule en tige ; P : cellule pyramidale de la lamina III ; PSDC : neurones de la voie postsynaptique des cordons dorsaux ; SCT : cellules du tractus spinocervical ; X, Y et Z : interneurons des laminae V et VI. (d'après Brown, 1982)

b. Les interactions entre les laminae

Bien que les projections anatomiques des afférences primaires nociceptives et non nociceptives soient assez clairement distinctes, il existe des interactions fonctionnelles importantes entre ces deux voies sensorielles. Ceci devient particulièrement apparent dans le cas des changements plastiques observés dans le traitement des informations nociceptives lors de douleurs inflammatoires ou neuropathiques. En effet, dans ces situations, on note l'apparition d'états hyperalgésiques (augmentation de l'efficacité d'un stimulus nociceptif) et allodyniques (situation dans laquelle un stimulus non-nociceptif devient douloureux) (Melzack et Wall, 1965; Besson et Chaouch, 1987; Yaksh et al., 1999; Woolf et Salter, 2000). L'allodynie est particulièrement représentative de la plasticité fonctionnelle des réseaux de neurones de la corne dorsale. En effet, les stimuli non-nociceptifs activent les fibres A β (Woolf et Doubell, 1994) et ces fibres ne projettent pas vers les couches I-II, où se terminent la plupart des fibres afférentes nociceptives. De plus, les états d'allodynie apparaissent très rapidement dans le temps, ce qui exclut, dans les stades précoces, une réorganisation anatomique majeure des connexions neuronales dans les cornes dorsales.

Des arguments morphologiques et fonctionnels suggèrent l'existence d'une interaction entre les couches intermédiaires (III-IV) et superficielles (I-II) de la corne dorsale. Les interneurones de la couche II ont généralement des axones qui restent dans la couche II ou remontent dans la couche I (Brown, 1982; Maxwell et al., 1985). Cependant, il existe des données morphologiques indiquant que des neurones de la couche II projettent vers des couches plus profondes (Polgar et al., 1999b; Todd, 2002; Braz et al., 2005). Ainsi, les neurones NK1 de la couche III reçoivent des contacts synaptiques spécifiques provenant d'interneurones inhibiteurs contenant du GABA et du neuropeptide Y (NPY) dont les corps cellulaires sont situés dans la couche II (Polgar et al., 1999b; Todd, 2002). En revanche, ces interneurones n'établissent apparemment pas de contacts avec les neurones de la voie post-synaptique des cordons dorsaux ou avec les interneurones de la couche III-IV (Todd, 2002).

Interneurones cholinergiques

Par ailleurs, des arguments morphologiques et fonctionnels indiquent que des neurones des couches III-IV projettent vers les couches superficielles. Ainsi, les couches III-IV renferment des interneurones qui contiennent à la fois de l'ACh et du GABA (Todd, 1991). Au plan immunohistochimique, les neurones cholinergiques sont présents dans les couches III-IV et un plexus de fibres envahit les couches superficielles I-II et les couches plus profondes. Certaines projections vers les couches I-II sont à l'origine de contacts

présynaptiques avec les terminaisons intraspinales des afférences nociceptives, suggérant un rôle direct de ces neurones cholinergiques dans le contrôle des messages nociceptifs afférents (Borges et Iversen, 1986; Ribeiro-da-Silva et Cuello, 1990). Au plan fonctionnel, l'ACh en agissant par l'intermédiaire de récepteurs nicotoniques (Pan et al., 1999; Cordero-Erausquin et Changeux, 2001; Cordero-Erausquin et al., 2004) et surtout muscariniques (Pan et al., 1999; Paqueron et al., 2003) induit un effet analgésique important. Cet effet passe en partie par la modulation de la transmission synaptique excitatrice et inhibitrice dans la couche II de la corne dorsale (Baba et al., 1998; Li et al., 2002; Wang et al., 2006). De plus la stimulation électrique des couches profondes de la corne dorsale module la transmission inhibitrice dans la couche II par un effet qui est bloqué par l'atropine, un antagoniste des récepteurs muscariniques de l'ACh (Baba et al., 1998).

Interneurones GABA/glycine

La couche III contient également une population importante d'interneurones GABAergiques et/ou glycinergiques (Todd et Sullivan, 1990). Une étude récente utilisant des souris transgéniques exprimant l'EGFP (« Enhanced Green Fluorescent Protein ») placée sous le contrôle du promoteur du transporteur neuronal de la glycine (GlyT2) a montré que les corps cellulaires des neurones glycinergiques sont abondants dans les couches III-IV, rares dans la couche I, et virtuellement absents dans la couche II de la corne dorsale de la moelle épinière (Zeilhofer et al., 2005). Il a récemment été démontré qu'une partie des contacts synaptiques inhibiteurs dans la lamina II met en jeu une cotransmission GABA/glycine (Keller et al., 2001 ; 2004). Ces résultats indiquent également que cette cotransmission semble «disparaître» durant le développement postnatal (Keller et al., 2004), mais peut «réapparaître» suite à l'induction d'une situation de douleur inflammatoire (Poisbeau et al., 2005). L'ensemble de ces données indique que la grande majorité des corps cellulaires des neurones glycinergiques de la corne dorsale se trouve dans les couches III-IV. De plus, une sous-population de neurones glycinergiques co-libère le GABA et la glycine. Par conséquent, les courants synaptiques glycinergiques et GABA/glycine enregistrés dans les neurones de la couche II témoignent probablement d'une projection inhibitrice provenant des neurones des couches III-IV.

L'ensemble de ces considérations suggère l'existence d'interactions fonctionnelles entre les couches intermédiaires et superficielles de la corne dorsale. Ces interactions

pourraient avoir un rôle dans le développement des états d'hyperalgésie et surtout d'allodynie dans les douleurs inflammatoires et neuropathiques.

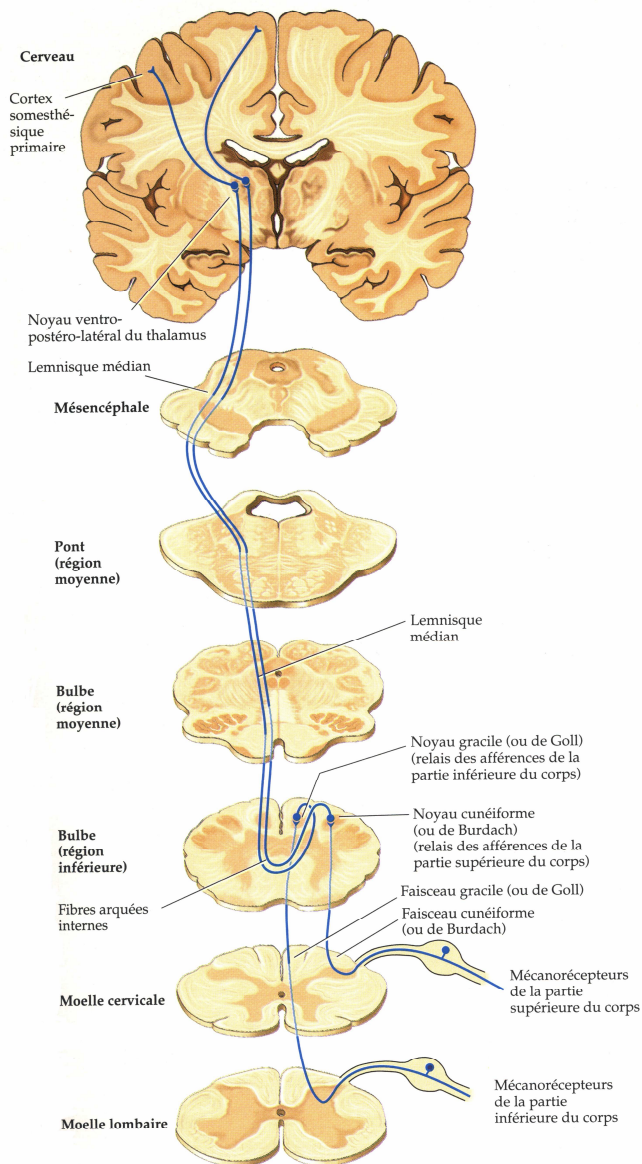
3. Les voies de sortie de la corne dorsale

Les informations issues des récepteurs sensoriels somatiques, après avoir été intégrées dans la corne dorsale, atteignent le cerveau par différentes voies pour atteindre le cortex somesthésique primaire. Les neurones avec des axones projetant vers l'encéphale sont présents en grand nombre dans la lamina I et dans les laminae III à VI.

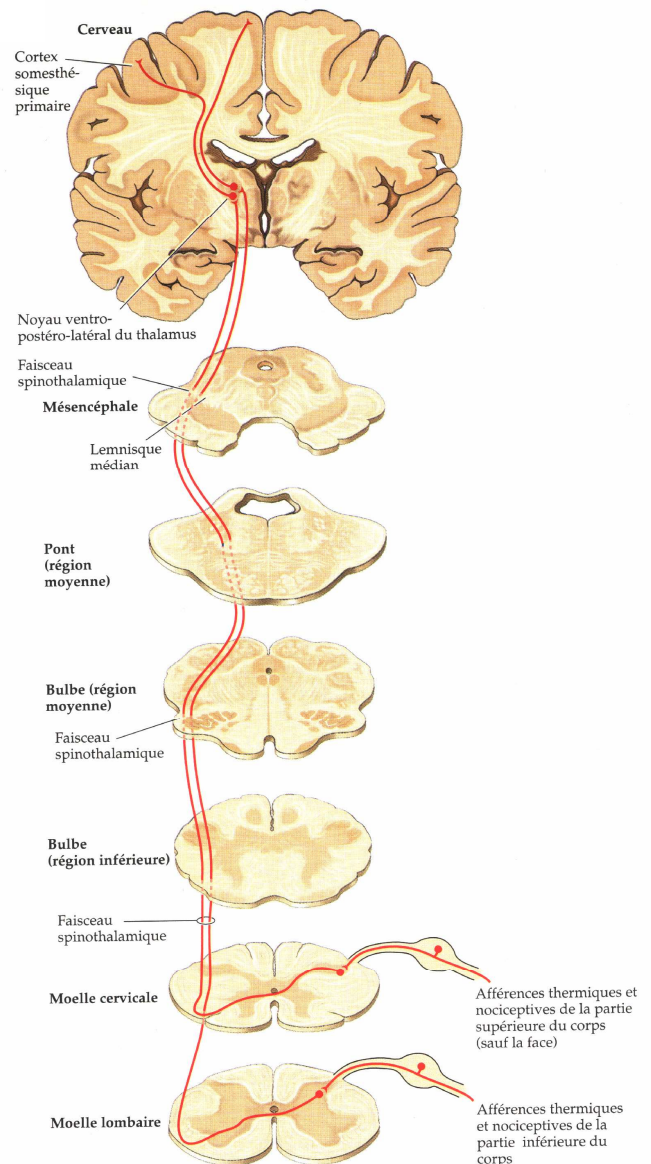
Les voies spino-cérébelleuses dites de la proprioception inconsciente véhiculent des informations proprioceptives provenant des muscles et des articulations vers le cervelet. Les informations ne parviennent pas au cortex et participent au contrôle de la posture.

Les informations cutanées tactiles et les informations proprioceptives conscientes provenant des muscles et des articulations passent par la voie des cordons dorsaux ou voie lemniscale (Figure 5). La branche ascendante des axones sensoriels de gros diamètre emprunte la voie des cordons dorsaux ipsilatéraux. Il s'agit d'un faisceau de fibres myélinisées à conduction rapide établissant des connexions directes avec le tronc cérébral (premier relais bulbaire) sans synapse au niveau médullaire. Les premiers relais synaptiques s'effectuent dans les noyaux des cordons dorsaux : noyau gracile et noyau cunéiforme. Les axones de ces neurones de deuxième ordre décussent, forment le lemnisque médian et se terminent dans le noyau ventral postérieur latéral (VPL) du thalamus après avoir traversé le bulbe rachidien, le pont et le mésencéphale. Le deuxième relais synaptique de cette voie se fait dans le VPL. Les neurones de troisième ordre projettent vers le cortex somesthésique primaire (gyrus post central du cortex pariétal).

Les fibres de petit diamètre véhiculant les informations douloureuses et thermiques nociceptives effectuent leur premier relais dans la corne dorsale de la moelle épinière (principalement dans les couches I, II et V). Les axones des neurones de projection de deuxième ordre présentent une décussation basse et remontent dans la voie antérolatérale (notamment dans le faisceau spinothalamique).



Voie des cordons dorsaux



Voie spinothalamique

Figure 5 : Représentation schématisique des principales voies ascendantes

La voie des cordons dorsaux–lemnisque médian (gauche) transmet les informations mécaniques issues du tiers postérieur de la tête et du reste du corps. La voie spinothalamique(droite) achemine les sensations thermiques et nociceptives.

(D'après Purves et al., 1999)

Les fibres du faisceau spinothalamique (Figure 5) véhiculant les informations douloureuses et thermiques parcourent la moelle jusqu'au bulbe, traversent le pont et le mésencéphale près des fibres du lemnisque médian et atteignent le thalamus. Les fibres de ce faisceau véhiculant les informations du tact nociceptif grossier (faisceau spinothalamique antérieur) rejoignent celles du lemnisque médian. Le neurone thalamique de troisième ordre véhiculant les informations douloureuses et thermiques projette vers des régions corticales beaucoup plus larges que celles liées aux informations proprioceptives et tactiles véhiculées par le lemnisque médian.

En plus de la voie spinothalamique, d'autres voies véhiculant des informations douloureuses et thermiques issues des neurones spinaux de la corne dorsale de la moelle épinière (neurones spinaux de deuxième ordre) projettent vers de nombreux noyaux à tous les niveaux du tronc cérébral avant d'atteindre le thalamus et le cortex. Parmi les structures cibles, on peut citer : la formation réticulée bulbaire et le mésencéphale (substance grise périaqueducale). Ces faisceaux spino-réticulaire et spino-mésencéphalique sont liés à l'aspect émotionnel et végétatif de la douleur. D'autres faisceaux ascendants minoritaires sont décrits, tels que le faisceau spino-brachial et le faisceau spino-hypothalamique.

La diversité des voies ascendantes reflète la complexité des mécanismes impliqués dans le traitement des informations nociceptives.

4. Les contrôles descendants

Les centres supra-spinaux peuvent moduler l'activité des réseaux spinaux par des contrôles descendants. Ces contrôles sont inhibiteurs ou facilitateurs (pour revue, Millan, 2002). Ils sont nombreux et de nature neurochimique très variée. Ces voies descendantes peuvent être directes (monosynaptiques) ou indirectes (polysynaptiques), mais elles empruntent toujours les faisceaux dorsolatéraux ou ventrolatéraux pour rejoindre la moelle épinière (pour revue Millan, 2002).

Les contrôles descendants monoaminergiques (noradrénaline, dopamine et sérotonine) peuvent faciliter ou inhiber la transmission du message nociceptif en fonction du type de récepteur exprimé à la surface du neurone spinal modulé. Les contrôles descendants monoaminergiques prennent leur origine dans le tronc cérébral et descendent au niveau des couches superficielles de la corne dorsale.

Des noyaux riches en sérotonine, dans la formation réticulée ventromédiane ainsi que dans le noyau du *raphe magnus* projettent largement vers différentes régions de la moelle épinière, où ils inhibent l'activité des neurones.

A ces voies sérotoninergiques s'ajoutent des voies descendantes noradrénergiques inhibitrices issues du *locus coeruleus* et modulant l'activité des neurones situés dans les laminae I, II, V et X. Des contrôles descendants dopaminergiques provenant des régions périventriculaire et postérieure de l'hypothalamus projettent vers la colonne intermédiolatérale et sont observés dans la corne dorsale et la lamina X. Il existe beaucoup d'autres neuromédiateurs d'origines diverses dans ces contrôles descendants : l'histamine (noyau tubéromammillaire), la mélanocortine (noyau arqué), la cholécystokinine et la substance P (substance grise périaqueducule) ont une action pro-nociceptive, alors que la vasopressine (noyau paraventriculaire) et la β -endorphine (noyau arqué) ont une action anti-nociceptive (pour revue Millan, 2002).

Les données anatomo-fonctionnelles (présentées dans la partie 2b) suggèrent l'existence d'interactions fonctionnelles entre les couches intermédiaires et les couches superficielles de la corne dorsale. Ces interactions pourraient jouer un rôle dans le développement des états hyperalgésiques et allodyniques lors de douleurs chroniques.

Dans la corne dorsale de la moelle épinière, l'intégration des informations en provenance de la périphérie implique un réseau d'interneurones excitateurs et inhibiteurs. La transmission synaptique inhibitrice joue un rôle essentiel dans l'intégration et la modulation des informations somatosensorielles nociceptives (lamina II) et non nociceptives (laminae III-IV).

La sensibilisation centrale et la déshinhibition dans la corne dorsale sont les deux phénomènes qui semblent impliqués dans la mise en place des états d'hyperalgie et d'allodynie. Cependant, la baisse d'inhibition synaptique dans les couches superficielles et profondes n'a pas les mêmes effets et conséquences. Ainsi, un blocage des récepteurs GABA_A dans la couche II serait responsable de la mise en place de l'hyperalgésie thermique, alors que le blocage des récepteurs GABA_A et/ou de la glycine dans les couches profondes pourrait induire une allodynie (Sorkin et al., 1996 ; Sorkin et al., 1998 ; Cronin et al., 2004).

Il s'agit dans un premier temps de comprendre le substrat et les propriétés fonctionnelles de la transmission inhibitrice dans la corne dorsale de la moelle épinière. Dans la seconde partie de l'introduction, nous allons faire le point sur les connaissances actuelles concernant cette transmission inhibitrice.

II. La transmission synaptique inhibitrice dans la corne dorsale de la moelle épinière

La transmission synaptique inhibitrice joue un rôle fondamental dans le développement de l'hyperalgésie thermique et de l'allodynie mécanique (Yaksh, 1999; Yaksh et al., 1999). Cette transmission met en jeu deux neurotransmetteurs rapides, l'acide γ -aminobutyrique (GABA) et la glycine, par l'intermédiaire de récepteurs-canaux GABA_A et de la glycine.

1. Les terminaisons synaptiques inhibitrices

a. Synthèse du GABA et de la glycine

Le GABA est synthétisé à partir du glutamate (lui-même synthétisé à partir du glucose, de la glutamine ou de l'aspartate) sous l'effet d'une décarboxylase (GAD). Les ARN messagers de deux isoformes de GAD, la GAD 65 (avec une localisation synaptique) et la GAD 67 (avec une localisation cytoplasmique plus diffuse), sont détectés dans la moelle épinière à partir du 11^{ème} jour embryonnaire (Somogyi et al., 1995 ; Tran et al., 2003). Dans la moelle épinière, les neurones GABAergiques sont principalement localisés dans les couches I à III de la corne dorsale et dans la lamina X (Spike et al., 1993).

La glycine est un acide aminé synthétisé à partir de la sérine. Elle est présente dans toutes les cellules de l'organisme. Dans la moelle épinière, on trouve de nombreux neurones glycinergiques dans les cornes dorsales et dans des couches plus profondes (Todd et Sullivan, 1990). L'immunoréactivité contre la glycine est observée dans la moelle épinière dès le 8^{ème} jour de vie embryonnaire, ce qui coïncide avec l'expression du transporteur GlyT2 (Poyatos et al., 1997). Au 12^{ème} jour de vie embryonnaire, le motif de distribution des neurones glycinergiques semble comparable à celui observé dans la corne dorsale chez l'adulte.

b. Transporteur vésiculaire

Le GABA et la glycine sont synthétisés dans le cytoplasme et transportés dans les vésicules synaptiques par le transporteur vésiculaire des acides aminés inhibiteurs (VIAAT ; Sagné et al., 1997 ; Gasnier, 2000). Le VIAAT permet l'entrée par antiport d'un acide aminé neutre (GABA ou glycine) contre la sortie d'un proton (Figure 6). L'accumulation du GABA et de la glycine dans les vésicules implique aussi une ATPase à protons de type V, qui permet l'acidification de l'intérieur de la vésicule et la création d'une différence de potentiel. La capacité du VIAAT à transporter le GABA et la glycine est fonction de leur concentration cytosolique, dépendant elle-même de la synthèse de GABA et de la recapture de GABA et de glycine dans le milieu extracellulaire par leurs transporteurs membranaires spécifiques.

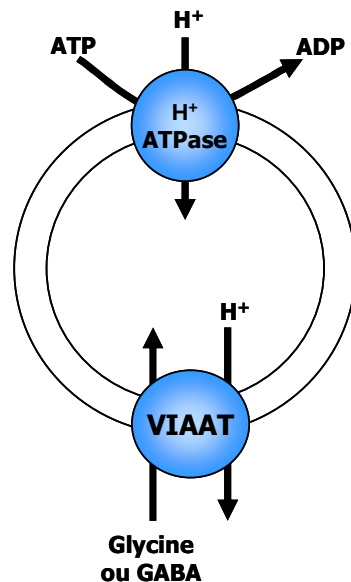


Figure 6 : Transporteur vésiculaire de acides aminés inhibiteurs (VIAAT)

L'accumulation du GABA et de la glycine dans les vésicules synaptiques est réalisée par un mécanisme de transport actif faisant intervenir deux protéines de la membrane vésiculaire : une ATPase pompe à protons, qui acidifie les vésicules, et un transporteur (VIAAT), qui échange les protons contre des molécules de neurotransmetteur.

c. Transporteurs membranaires

Deux transporteurs spécifiques de la glycine sont présents dans la moelle épinière, GlyT1 (a-c) et GlyT2 (a-b). GlyT1 est exprimé à la membrane des cellules gliales et GlyT2 à la membrane des éléments présynaptiques (Jursky et al., 1994 ; Zafra et al., 1995a et b ; Spike et al., 1997). Il s'agit d'un symport de $\text{Na}^+/\text{Cl}^-/\text{glycine}$ (Figure 7). Selon Roux et collaborateurs (2000), la stœchiométrie est de $2\text{Na}^+/1\text{Cl}^-/1\text{glycine}$ pour GlyT1b et de $3\text{Na}^+/1\text{Cl}^-/1\text{glycine}$ pour GlyT2a.

Quatre transporteurs membranaires du GABA ont été décrits, GAT1 à 4 (Mager et al., 1993). GAT1 et GAT4 sont principalement localisés à la surface des neurones tandis que GAT2 et GAT3 sont majoritairement exprimés par les cellules gliales. Il s'agit d'un symport impliquant $2\text{Na}^+/1\text{Cl}^-/1\text{GABA}$ (Figure 7).

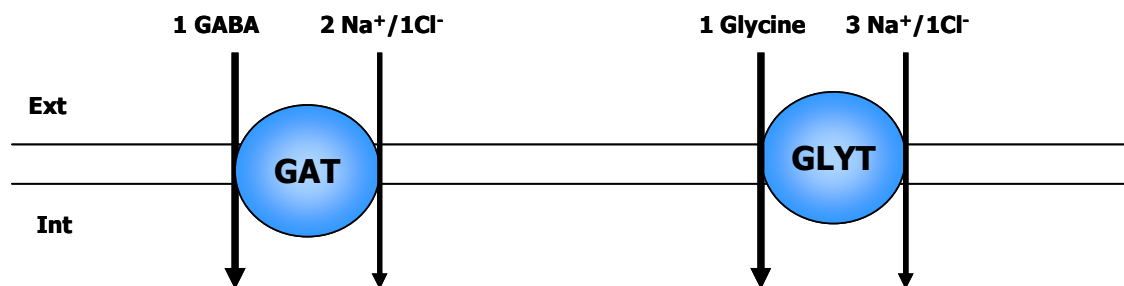


Figure 7 : Transporteurs membranaires du GABA (GAT) et de la glycine (GlyT)

Après libération dans la fente synaptique, le GABA et la glycine sont recapturés par des transporteurs spécifiques respectivement GAT (1 à 4) et GlyT (1 et 2).

d. Trois types de terminaisons inhibitrices

Dans la moelle épinière, il existe 3 types de terminaisons synaptiques inhibitrices GABAergique et/ou glycinergique. C'est l'expression de la GAD et des différents transporteurs qui va déterminer la nature neurochimique d'une terminaison.

Le premier type de terminaison est la terminaison contenant dans ses vésicules synaptiques et libérant dans la fente synaptique uniquement du GABA. Ces terminaisons sont caractérisées par la présence de l'enzyme de synthèse du GABA, la GAD, et l'expression du transporteur membranaire GAT.

Le deuxième type de terminaison est la terminaison glycinergique. Les terminaisons glycinergiques expriment à leur membrane plasmique le transporteur neuronal de la glycine GlyT2 (Aubrey et al., 2007), mais ne contiennent pas de GAD. Pour cette raison, les vésicules ne contiendront que de la glycine.

Enfin, le troisième et dernier type de terminaison possible est la terminaison mixte GABA/glycine dont les vésicules synaptiques contiennent à la fois les deux neurotransmetteurs. Ce phénomène s'explique par la co-expression de l'enzyme de synthèse du GABA, la GAD, et du transporteur membranaire de la glycine GlyT2. Le GABA et la glycine présents dans le cytosol sont alors transportés par le VIAAT (Gasnier et al., 2000), stockés dans une même vésicule et co-libérés dans la fente synaptique (Jonas et al., 1998). Les neurones co-exprimant la GABA et la glycine sont présents dans la moelle épinière dès le 9^{ème} jour postnatal et leur nombre reste constant au cours du développement (Berki et al., 1995).

Une fois les neurotransmetteurs libérés dans la fente synaptique, ils vont interagir avec des récepteurs spécifiques localisés sur l'élément postsynaptique. Les propriétés des transmissions et co-transmissions inhibitrices rapides vont donc dépendre de la nature et des propriétés des récepteurs-canaux activés. Nous allons faire le point sur les sous-types de récepteurs GABA_A et de la glycine exprimés dans la corne dorsale de la moelle épinière au cours du développement et chez l'adulte.

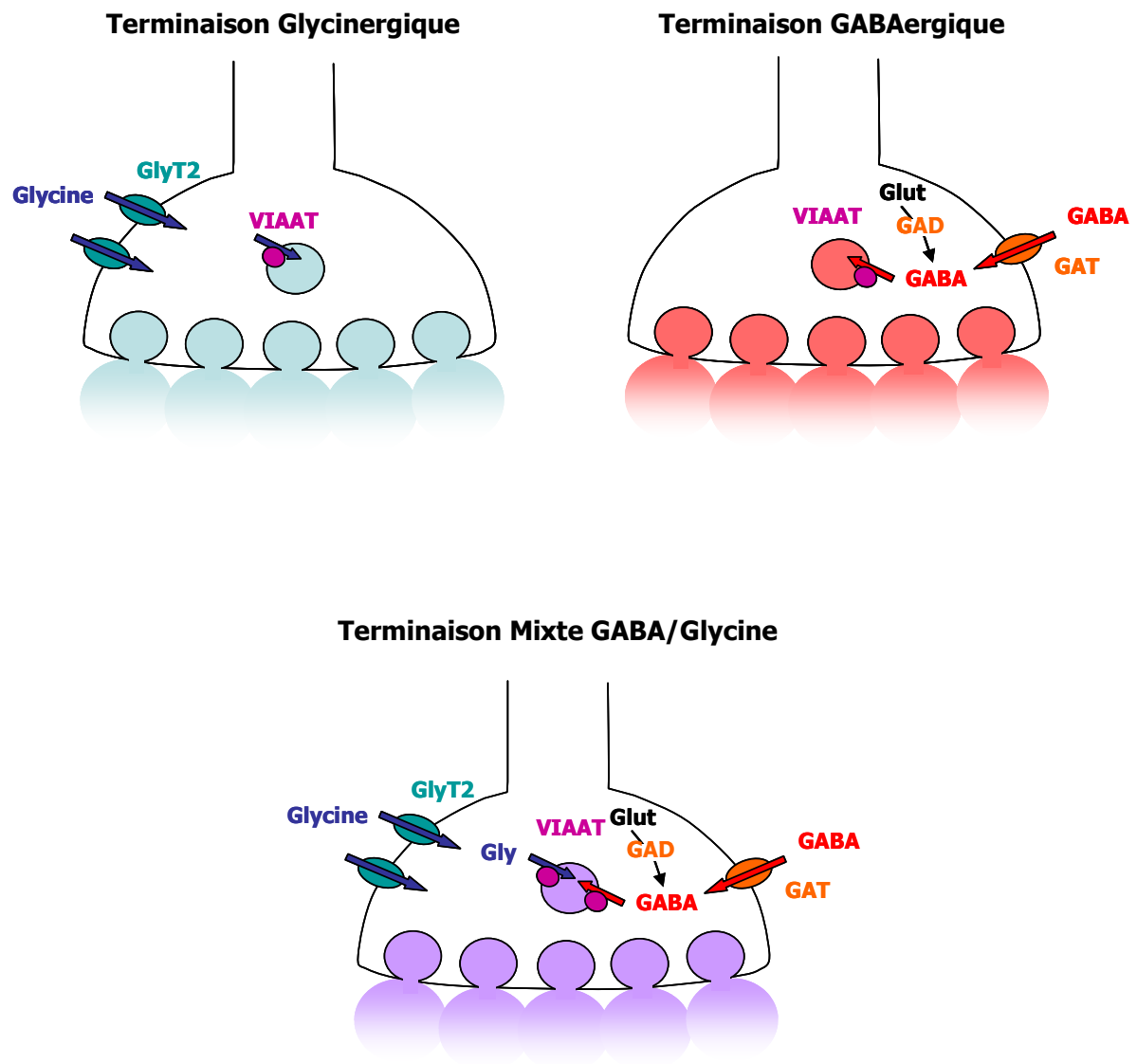


Figure 8 : Les trois types de terminaison synaptique inhibitrice

Le transporteur vésiculaire VIAAT est présent dans toutes les terminaisons synaptiques inhibitrices. C'est la concentration cytoplasmique en GABA et/ou en glycine qui va déterminer le contenu vésiculaire. Ces concentrations sont déterminées par la présence de la GAD (enzyme de synthèse du GABA), et des transporteurs membranaires spécifiques du GABA (GAT) et de la glycine (GlyT). Trois types de terminaisons inhibitrices existent. La terminaison GABAergique exprime la GAD et le GAT. La terminaison glycinergique exprime GlyT. Les terminaisons mixtes GABA/glycine coexpriment la GAD, GAT et GlyT.

2. Récepteurs GABA_A

a. Structure du récepteur

Le récepteur GABA_A purifié en 1987, est composé de 5 sous-unités, sélectionnées dans une palette qui inclut les α_{1-6} , β_{1-3} , γ_{1-3} , θ , δ et π (Barnard et al., 1998), et formant un canal perméable à l'ion chlorure Cl⁻. La stœchiométrie du récepteur GABA_A est 2 α /2 β /1 autre sous-unité (Figure 9). Des estimations suggèrent l'existence d'approximativement 30 isoformes différentes de récepteur GABA_A qui ont des propriétés physiologiques et pharmacologiques distinctes selon leur composition en sous-unités. De façon intéressante, ces sous-unités sont exprimés de façon hétérogène dans le SNC (Sieghart et Sperk, 2002 ; Fritschy et Brunig, 2003).

b. Expression des sous-unités

La majorité des récepteurs GABA_A dans les neurones sont composés de sous-unités α , β et γ_2 . Des techniques d'hybridation *in situ* et de marquage immunohistochimique ont montré différents profils d'expression des sous-unités du récepteur GABA_A dans la moelle épinière. Ces motifs évoluent au cours du développement embryonnaire et postnatal, ce qui va se répercuter sur les propriétés fonctionnelles et/ou pharmacologiques du récepteur (Figure 9).

La plupart des récepteurs GABA_A sont sensibles aux stéroïdes potentialisateurs ou inhibiteurs (Belelli et al., 2002) et la composition en sous-unités du récepteur a relativement peu d'importance. Cependant, la présence d'une sous-unité δ augmente fortement la sensibilité aux stéroïdes potentialisateurs (stéroïdes 3 α 5 α -réduits, voir chapitre III). Dans la corne dorsale de la moelle épinière, la sous-unité δ n'est jamais exprimée. Les ARNm des sous-unités α_1 , α_2 , α_5 , β_3 , γ_1 et γ_2 , sont détectés dès le 13^{ème} jour de vie embryonnaire et fortement exprimés de façon homogène durant tout le développement embryonnaire. Il y a un pic d'expression des ARNm des différentes sous-unités du récepteur GABA_A à la fin du développement embryonnaire. Puis, au cours du développement postnatal, cette expression diminue et les ARNm des sous-unités α_4 , α_5 , β_1 , β_2 , γ_1 et γ_3 deviennent quasiment indétectables. Par contre, l'expression des ARNm des sous-unités α_2 , α_3 , β_3 et γ_2 persiste chez l'adulte, mais avec des distributions régionalisées (Ma et Narahashi, 1993). Des marquages immunohistochimiques montrent une expression localisée des sous-unités α_2 et α_3 dans les cellules de la couche II et des sous-unités α_1 et α_5 dans les couches plus profondes (laminae

III-IV). En revanche, les sous-unités $\beta_{2/3}$ et γ_2 sont exprimées uniformément dans toute la corne dorsale de la moelle épinière chez le rat adulte (Bohlhalter et al., 1996).

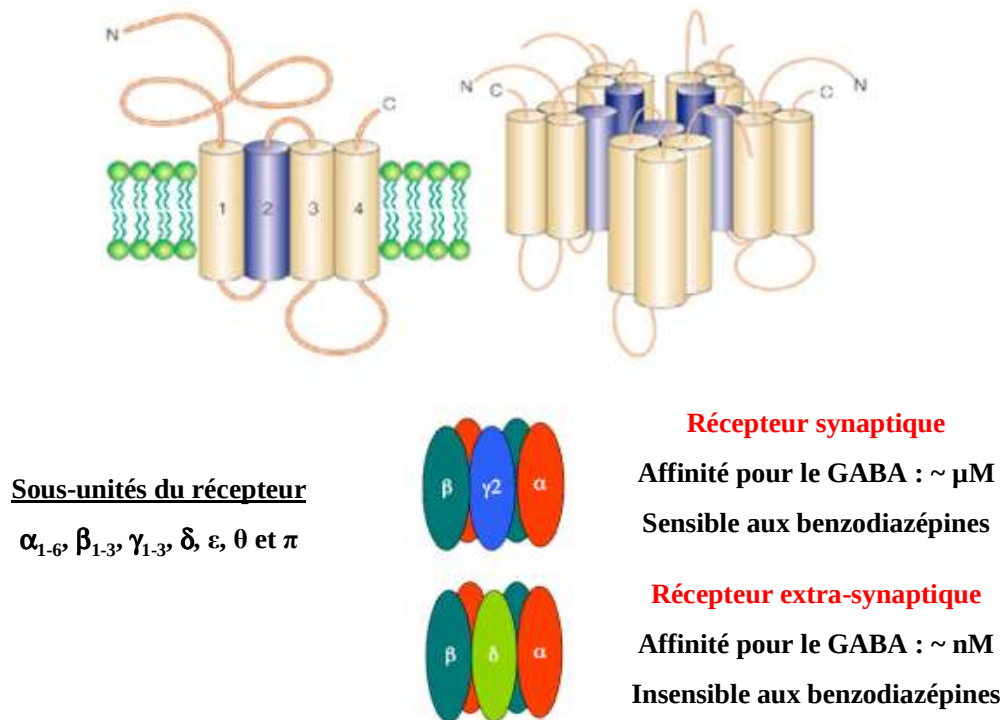


Figure 9 : Le récepteur GABA de type A (<http://www.ucl.ac.uk/Pharmacology/research/sm.html>)

Les récepteurs GABA_A sont des hétéro-oligomères pentamériques qui peuvent être assemblés à partir de 7 classes de sous-unités : α (1-6), β (1-3), γ (1-3), δ , ϵ , θ et π . La majorité des sous-types de récepteurs GABA_A se compose de sous-unités α , β et γ_2 ; ce sont des récepteurs synaptiques, sensibles aux benzodiazépines. Des récepteurs extrasynaptiques, composés de sous-unités $\alpha\beta$ ou $\alpha\beta\delta$, génèrent une inhibition tonique, mais sont peu sensibles à la modulation fonctionnelle par les benzodiazépines classiques.

c. Adressage et cyclage du récepteur à la membrane

Les sous-unités du récepteur s'assemblent dans le réticulum endoplasmique, puis sont transférées à l'appareil de Golgi avant d'être adressées à la membrane plasmique sous forme de récepteurs fonctionnels (Connolly et al., 1996 ; Wisden et Moss, 1997). L'assemblage des récepteurs GABA_A fonctionnels requiert très probablement la présence des sous-unités α et/ou β , comme le montre la réduction du nombre de récepteurs exprimés à la surface membranaire chez des souris présentant une sous-unité α_5 , α_6 ou β_3 inactivée (Fritschy et al., 1997 ; Homanics et al., 1997a et b) (Figure 10).

L'accumulation de récepteurs GABA_A à la synapse est déterminante pour fixer l'efficacité de l'inhibition synaptique GABAergique rapide. Cette accumulation est régulée par l'exocytose, l'endocytose, la mobilité latérale et la stabilisation des récepteurs (Choquet et Triller, 2003 ; Kittler et Moss, 2003 ; Luscher et Keller, 2004).

L'insertion des récepteurs à la membrane plasmique par exocytose a lieu principalement dans les zones extrasynaptiques. Ces récepteurs nouvellement insérés sont alors recrutés et diffusent vers le compartiment membranaire synaptique (Bogdanov et al., 2006).

La géphyrine est co-localisée avec le récepteur GABA_A. En effet, elle lie indirectement les sous-unités γ_2 et γ_3 (Baer et al., 1999 ; Essrich et al., 1998). La protéine GABA-RAP (GABA_A-receptor associated protein) serait le lien entre le récepteur GABA_A et la géphyrine (Figure 11). Par conséquent, les sites synaptiques contiennent une importante proportion de récepteurs GABA_A contenant la sous-unité γ_2 , qui se traduit par une forte sensibilité des récepteurs synaptiques aux benzodiazépines (cf II.2.d). La géphyrine jouerait un rôle critique dans la stabilisation des agrégats de récepteur GABA_A dans la zone synaptique (Kittler et Moss, 2003 ; Jacob et al., 2005). L'insertion des récepteurs GABA_A à la membrane plasmique est aussi régulée par deux autres protéines : la GABA-RAP et la Plic-1 (protéine de type ubiquitine qui lie le récepteur GABA_A et le protéasome) (Kittler et Moss, 2003 ; Luscher et Keller, 2004).

L'endocytose du récepteur GABA_A est régulée par son état de phosphorylation. En effet, la phosphorylation du récepteur contrôle son interaction avec la protéine AP2, une adaptine jouant un rôle critique dans l'endocytose du récepteur (Figure 10). D'autre part, la sortie d'endocytose du récepteur GABA_A est régulée par la protéine HAP1 (Huntingtin-associated protein) (Kittler et al., 2004).

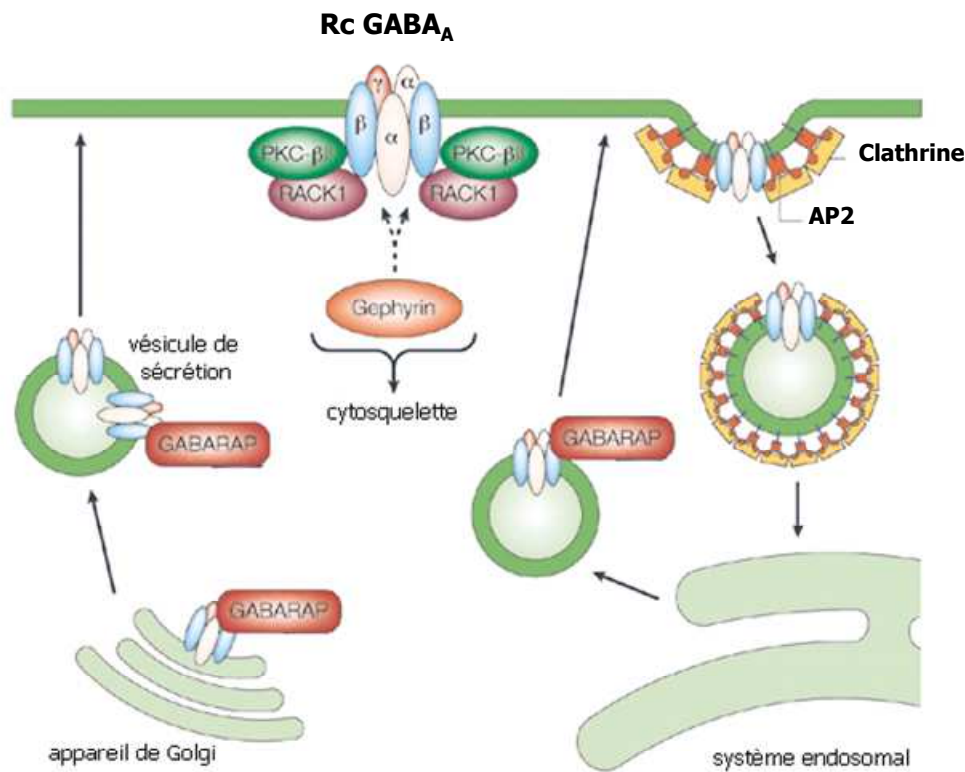


Figure 10 : Cyclage du récepteur GABA_A à la synapse

Les sous-unités des récepteurs GABA_A sont synthétisées et assemblées dans l'appareil de Golgi. Les récepteurs sont étroitement liés à la protéine kinase C de type 2β et à la protéine RACK1 (récepteur pour la PKC activée), qui négocient ensemble la phosphorylation du récepteur. L'endocytose des récepteurs au niveau des puits de clathrine fait intervenir une adaptine AP2 qui interagit avec les sous-unités β et γ du récepteur GABA_A. Les récepteurs internalisés rentrent dans le système endosomal ; ils sont alors détruits ou recyclés. La protéine GABA-RAP lie les sous-unités γ₁₋₃ et semble jouer un rôle dans le trafic intracellulaire du récepteur et son ancrage à la géphyrine. Cette protéine est spécifiquement localisée aux membranes intracellulaires. L'insertion des récepteurs à la membrane se fait dans les zones extrasynaptiques, puis le récepteur est recruté dans la zone synaptique.

(D'après Moss et Smart, 2001)

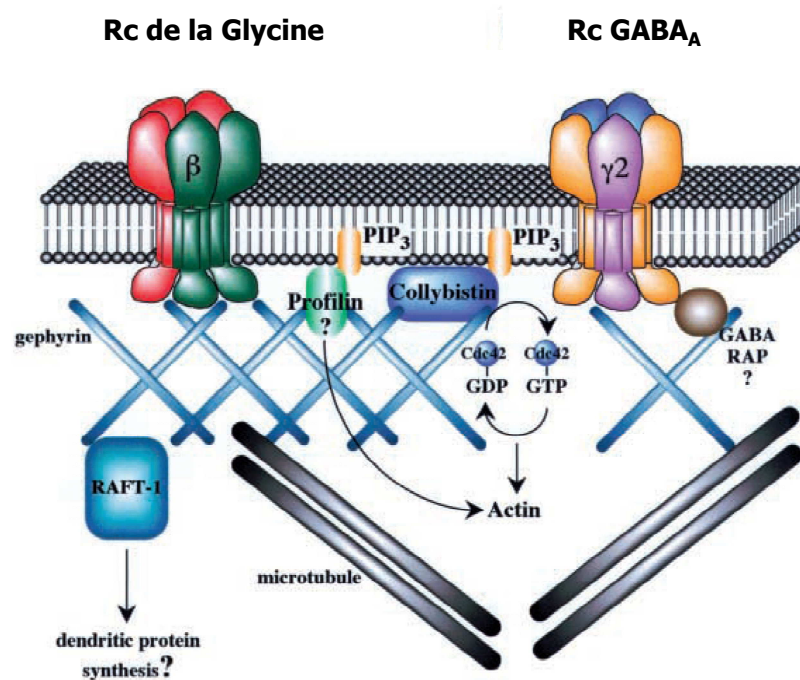


Figure 11 : Ancrage des récepteurs GABA_A et de la glycine à la membrane postsynaptique

Le récepteur GABA_A est relié indirectement à la géphyrine qui permet l'ancrage du récepteur dans la zone synaptique. La GABA-RAP serait la protéine liant la sous-unité γ₂ du récepteur GABA_A à la géphyrine.

Le récepteur de la glycine est lui aussi ancré à la membrane plasmique des zones synaptiques par la géphyrine, mais par liaison directe de la sous-unité β du récepteur de la glycine à la géphyrine.

(D'après Legendre, 2001)

d. Pharmacologie

La liaison du GABA se fait à l'interface entre les sous-unités α et β . Le site de liaison du GABA reconnaît aussi des agonistes spécifiques des récepteurs GABA_A tels que le muscimol et l'isoguvacine. Les récepteurs GABA_A possèdent également des sites de liaison pour des substances modulant l'effet du GABA sur ces récepteurs.

Le plus connu et le plus étudié de ces sites de liaison est celui des benzodiazépines, qui constitue ce qui est appelé le récepteur central des benzodiazépines (CBR). Les benzodiazépines potentialisent les courants GABA_A, même si certaines agissent comme des antagonistes ou des agonistes inverses (pour revue Molher, 2006 ; Rudolph et Mohler, 2006). L'action de ces molécules provoque une augmentation de la fréquence d'ouverture du canal 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). Le récepteur central des benzodiazépines (CBR) est localisé à l'interface des sous-unités α et γ . L'activation des sites CBR par les benzodiazépines se traduit par des effets anxiolytiques, antiépileptiques et hypnotiques puissants (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 formant le récepteur GABA_A. Ainsi, la présence de la sous-unité α_1 confère au récepteur une forte affinité (type I), alors que la présence des sous-unités α_2 , α_3 ou α_5 dans la composition du récepteur donne un type II (Luddens et al., 1991; Luddens et Korpi, 1995; Luddens et al., 1995).

Une autre famille de modulateurs du récepteur GABA_A est celle des barbituriques, connus eux aussi pour leurs effets sédatifs et anesthésiants. Ils agissent en potentialisant allostériquement les réponses du récepteur GABA_A, mais sur un site distinct de celui des benzodiazépines (MacDonald et al., 1989 ; MacDonald et Olsen, 1994).

Les stéroïdes peuvent aussi moduler la réponse du récepteur au GABA par interaction avec un site de liaison distinct de celui du GABA et des benzodiazépines. Ce point sera développé dans la troisième partie de l'introduction.

Enfin, les effets sédatifs et anesthésiques de l'alcool sont aussi dus à une modulation positive du récepteur GABA_A par un effet direct sur le récepteur et par un effet indirect stimulant la synthèse locale de neurostéroïdes potentialisant le récepteur GABA_A (Sanna et al., 2004).

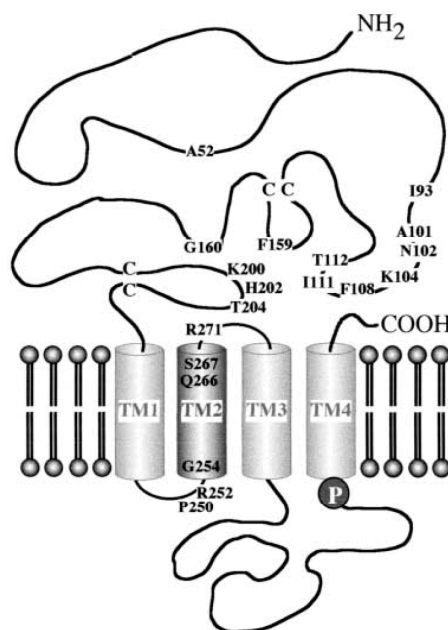
L'activité du récepteur GABA_A est modulée par la phosphorylation. Les protéines kinases de type A et C ont des effets dépresseurs en diminuant l'amplitude des réponses à l'application de GABA. En revanche, des études sur des cultures de neurones embryonnaires de corne dorsale de moelle épinière de rat ont montré que la phosphorylation par la tyrosine kinase des sous-unités β du récepteur GABA_A augmente l'amplitude des réponse à l'application de GABA (Wan et al., 1997).

Les effets du GABA sur les récepteurs GABA_A sont antagonisés par des antagonistes compétitifs tels que la bicuculline ou le SR9553 (gabazine), ou par la picrotoxine qui bloque le canal de ces récepteurs.

3. Récepteurs de la glycine

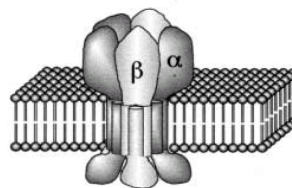
a. Structure du récepteur

Les récepteurs de la glycine ont été purifiés au début des années 1980 en mettant à profit la liaison à forte affinité de la strychnine (antagoniste sélectif) (Pfeiffer et Betz, 1981; Pfeiffer et al., 1982). Le récepteur de la glycine est, comme le récepteur GABA_A, un canal hétéro-oligomérique perméable à l'ion chlorure. C'est un pentamère constitué par l'assemblage de sous-unités α (α_{1-4}) et β transmembranaires (Langosch et al., 1988). Les stœchiométries majoritaires sont $3\alpha/2\beta$ et de $2\alpha/3\beta$ (Grudzinska et al., 2005). Cependant des récepteurs homomériques α ont été décrits (Figure 12).



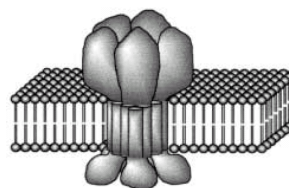
Sous-unités du récepteur

α_{1-4} et β



Récepteur synaptique
récepteur hétéromérique

3 α et 2 β



Récepteur extra-synaptique
récepteur homomérique

5 α

Figure 12 : Le récepteur de la glycine

Le récepteur de la glycine est composé de 5 sous-unités α (1 à 4) et/ou β . Chaque sous-unité comporte 4 domaines transmembranaires. Les récepteurs hétéromériques composés de sous-unités α et β sont synaptiques, alors que les récepteurs homomériques composés de 5 sous-unités α sont extrasynaptiques (d'après Legendre, 2001).

b. Expression des sous-unités

Dans les neurones immatures, la sous-unité α_2 est la plus abondante et peut se trouver sous forme homomérique. Ce récepteur homomérique α_2 a une activation assez lente et ne semble pas sous-tendre une transmission synaptique rapide. L'expression de α_2 diminue au cours du développement postnatal jusqu'à complète disparition au 21^{ème} jour postnatal (Figure 13).

Dans les neurones matures, la sous-unité α_1 domine et est exprimée sous forme de récepteur hétéromérique avec la sous-unité β (Becker et al., 1988). Ce changement d'expression de sous-unité α a lieu pendant les premiers jours de vie postnatale et semble complet au 20^{ème} jour postnatal (Figure 13). La sous-unité α_1 confère des cinétiques plus rapides aux récepteurs la contenant (Takahashi et al., 1992).

La sous-unité α_3 est exprimée dans les neurones matures, avec un profil d'expression au cours du développement similaire à celui de la sous-unité α_1 , mais en moindre quantité. Dans la moelle épinière la sous-unité α_3 est localisée exclusivement dans les couches superficielles et joue un rôle essentiel dans la voie de signalisation des prostaglandines lors d'une douleur inflammatoire (Harvey et al., 2004). En effet, le récepteur PGE2 activé par la prostaglandine permet la phosphorylation (PKA-dépendante) de la sous-unité α_3 , ce qui diminue fortement le courant chlorure produit par l'ouverture du canal du récepteur de la glycine. Ce phénomène jouerait un rôle important dans la désinhibition centrale responsable de la mise en place des douleurs chroniques.

La sous-unité α_4 est très rare. Quant à la sous-unité β , elle est exprimée dans tout le système nerveux et sans profil d'expression particulier au cours du développement.

c. Adressage et cyclage du récepteur à la membrane

Les récepteurs sont formés dans le réticulum endoplasmique et acheminés vers la membrane postsynaptique par les vésicules émanant de l'appareil de Golgi. La quantité de récepteurs exprimés à la membrane dépend d'un équilibre entre les récepteurs libres, mobiles à la membrane, et les récepteurs stabilisés à la membrane postsynaptique (Meier et al., 2001).

A la synapse, les récepteurs sont regroupés dans les densités postsynaptiques, un ensemble de molécules parmi lesquelles on retrouve les récepteurs-canaux. La géphyrine joue un rôle essentiel dans la mise en place et le maintien de ces regroupements (Figure 11). Il s'agit d'une protéine qui co-précipite avec le récepteur de la glycine. La géphyrine lie d'une part la sous-unité β du récepteur de la glycine et d'autre part interagit avec les microtubules

sous-synaptiques et les microfilaments (Kisch et al., 1995 ; Giesemann et al., 2003). Par conséquent, elle établit un lien entre le cytosquelette et le récepteur de la glycine et de ce fait régule la densité de récepteurs présents à la membrane synaptique.

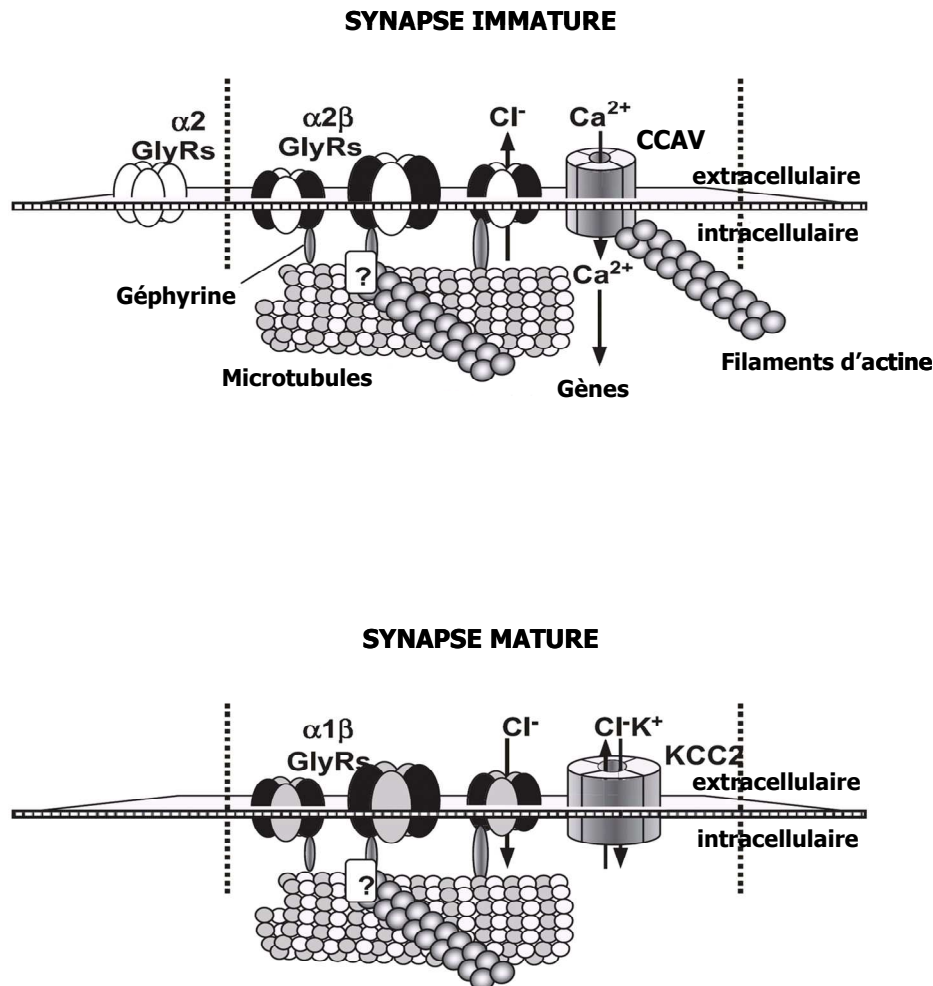


Figure 13 : Maturation des récepteurs de la glycine

Au cours du développement, la composition en sous-unités du récepteur de la glycine change. Dans les neurones immatures, les récepteurs sont homomérique α ou hétéromérique $\alpha_2\beta$, puis deviennent hétéromériques $\alpha_1\beta$. Du fait de ces changements de composition en sous-unités, la taille des agrégats postsynaptiques augmente au cours du développement.

La maturation est associée à l'apparition du co-transporteur KCC2, qui change la direction du courant Cl^- de dépolarisant en hyperpolarisant.

(d'après Aguayo et al., 2004)

Etant donné que la géphyrine se lie aux sous-unités β du récepteur de la glycine, les récepteurs homomériques α ne peuvent pas être séquestrés à la synapse. Les récepteurs homomériques α_2 seraient donc des récepteurs extrasynaptiques et joueraient un rôle dans le développement neuronal. Par contre les récepteurs hétéromériques α_2/β seraient maintenus à la synapse par la géphyrine (Lynch, 2004). Durant les premiers jours postnataux (P0-1), les neurones de la lamina II ne présentent que des CPSIm GABAergiques, malgré le fait qu'ils possèdent des récepteurs de la glycine fonctionnels (Baccei et Fitzgerald, 2004). Ceci pourrait s'expliquer par les niveaux bas de géphyrine à ce stade du développement et par conséquent par l'absence de récepteurs de la glycine au niveau de la synapse.

L'endocytose des récepteurs peut être induite par la liaison d'un antagoniste ou la dissociation de la liaison entre les récepteurs et la géphyrine (Rasmussen et al., 2002).

d. Pharmacologie

La glycine est le principal agoniste physiologique des récepteurs de la glycine, mais la taurine et la β -alanine libérées par les cellules gliales peuvent aussi les activer à de fortes concentrations (Rajendra et al., 1995). L'antagoniste sélectif le plus connu du récepteur de la glycine est la strychnine. Il ne possède pas le même site de liaison que la glycine, mais des résidus aminés communs seraient impliqués (O'Connor et al., 1996).

L'activité du récepteur de la glycine peut être modulée par différents composés (pour revue, Legendre, 2001). Le zinc agit de façon dose-dépendante. En effet, une faible concentration de zinc augmente l'amplitude de la réponse du récepteur à l'application de glycine, alors qu'une concentration élevée diminue cette réponse. La picrotoxine supprime la réponse du récepteur à la glycine en bloquant le pore du canal. L'alcool et certains agents anesthésiques augmentent l'amplitude de la réponse du récepteur de la glycine.

4. La co-transmission GABA/glycine

La co-transmission GABA/glycine implique à la fois la co-libération des deux neurotransmetteurs par l'élément présynaptique et leur co-détection par l'élément post-synaptique.

Nous avons vu au début de ce chapitre qu'il existait 3 types de terminaisons synaptiques inhibitrices dans la moelle épinière. Parallèlement, trois types d'éléments post-synaptiques peuvent être décrits : ceux contenant uniquement des récepteurs GABA_A, ou uniquement des récepteurs de la glycine ou ceux dans lesquels les deux types de récepteurs sont co-localisés (Bohlhalter et al., 1994). Une co-libération et une co-détection synaptique de GABA et de la glycine ont été mises en évidence dans les couches I et II de la moelle épinière par des enregistrements électrophysiologiques sur des tranches de moelle épinière de rat (Chery et De Koninck., 1999; Keller et al., 2001).

Cette co-transmission se traduit par l'existence de courants postsynaptiques inhibiteurs mixtes GABA/glycine. Ces courants mixtes sont présents dans la corne dorsale de rats immatures (P8-P23) mais disparaissent au cours du développement (Chery et De Koninck, 1999 ; Keller et al., 2001). Cependant, ils réapparaissent chez les rats adultes après induction d'une inflammation périphérique (Poisbeau et al., 2005). La présence de ces courants mixtes est corrélée avec la synthèse locale de neurostéroïdes 3 α 5 α -réduits (Keller et al., 2004 ; et voir résultats).

5. Gradient des ions Cl^-

Les récepteurs GABA_A et de la glycine sont des récepteurs canaux perméables aux anions, principalement à l'ion chlorure Cl^- , mais également aux ions HCO_3^- . Le gradient électrochimique des anions et en particulier des ions chlorures est par conséquent fondamental pour l'inhibition spinale. Il est contrôlé par des protéines transmembranaires qui sont des co-transporteurs cation/chlorure. Dans le système nerveux, le contrôle du gradient des ions Cl^- repose sur l'activité des transporteurs NKCC1 ($\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{Cl}^-$) et KCC2 (K^+/Cl^-). Ces deux transporteurs sont électroneutres. Le co-transporteur NKCC1 effectue son transport de l'extérieur vers l'intérieur de la cellule, ceci ayant pour conséquence l'accumulation de Cl^- dans le milieu intracellulaire. A l'inverse, le transporteur KCC2 fait sortir le K^+ et le Cl^- de la cellule, favorisant ainsi les concentrations intracellulaires faibles de Cl^- (Figure 14).

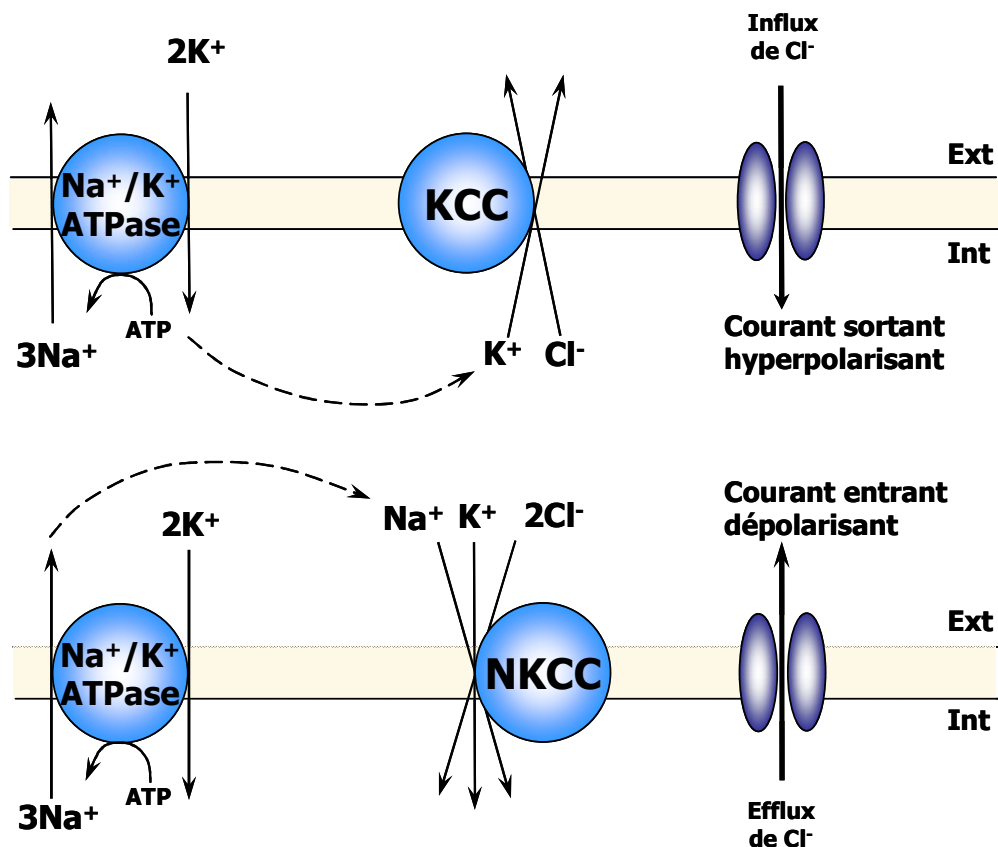


Figure 14 : Co-transporteurs chlorure-cation

Le transport de l'ion chlorure par les co-transporteurs chlorure-cation détermine le gradient transmembranaire de l'ion Cl^- . Le gradient de K^+ produit par la pompe Na^+/K^+ -ATPase fournit l'énergie pour l'extrusion d'ion Cl^- par le transporteur KCC ; ceci a pour conséquence l'établissement d'un gradient électrochimique d'ion Cl^- dirigé vers l'intérieur générant des courants Cl^- hyperpolarisants (haut). Le transport de 2Cl^- par le transporteur NKCC est permis principalement par l'énergie du gradient Na^+ . Le gradient électrochimique chlorure qui en résulte rend les courants chlorure dépolarisants (bas).

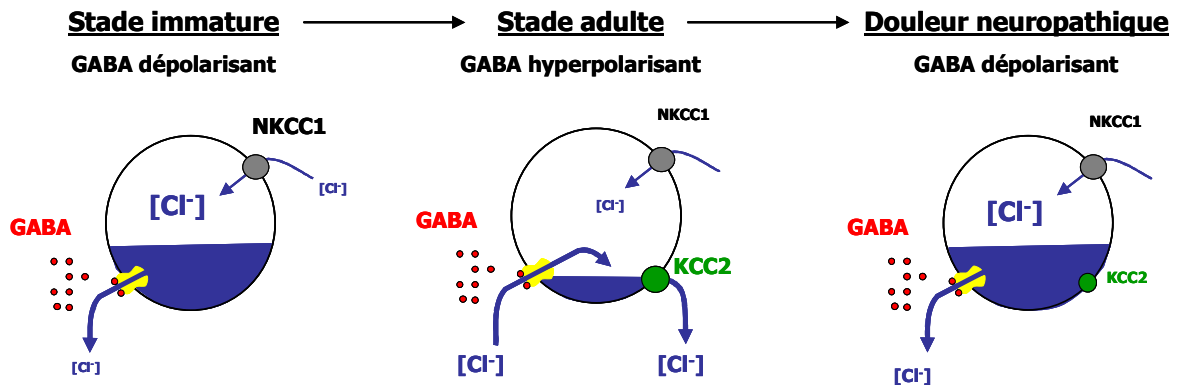
(d'après Payne et al., 2003)

L'expression de ces deux co-transporteurs est régulée au cours du développement post-natal. NKCC1 est fortement exprimé durant les stades précoces contrairement au transporteur KCC2. Puis, le transporteur KCC2 est exprimé après la première semaine postnatale et devient majoritaire (Payne et al., 2003). Des études *in vitro* sur tranche de moelle épinière ont démontré que chez des rats nouveau-nés (P0-1), l'activation du récepteur GABA_A dépolarise les neurones (Figure 15). Puis, à la fin de la première semaine postnatale (P6-7) suite à l'inversion du gradient Cl⁻, les réponses du récepteur GABA_A deviennent exclusivement hyperpolarisantes (Baccei et Fitzgerald, 2004). Cependant, le potentiel d'équilibre des ions chlorure est plus négatif que le seuil de déclenchement des potentiels d'action à P0-1, suggérant que les réponses dépolarisantes du GABA peuvent encore être inhibitrices dans la corne dorsale.

Récemment, il a été démontré que lors d'une lésion par constriction du nerf sciatique (modèle de neuropathie), l'expression membranaire de KCC2 est diminuée dans la corne dorsale de la moelle épinière, ceci étant corrélé avec une augmentation de la concentration intracellulaire en ions chlorure (Figure 15). Ce phénomène a pour conséquence une diminution de l'inhibition synaptique (GABA et glycine), voire même une transformation de cette inhibition en excitation, en rendant le gradient Cl⁻ dépolarisant (Coull et al., 2003).

D'autre part, lors d'une inflammation périphérique, l'activité de NKCC1 est augmentée dans les neurones sensoriels primaires (Figure 15). De ce fait, le GABA, déjà dépolarisant dans ces neurones en condition contrôle, le devient d'avantage, entraînant une excitation croisée entre les fibres afférentes (Morales-Aza et al., 2004). Plus récemment, il a été montré que, suite à une transsection du nerf sciatique, le même effet était observé (Pieraut et al., 2007). Cet effet peut s'expliquer par la phosphorylation du transporteur NKCC1 sur son domaine N-terminal intracellulaire. Cette phosphorylation potentialise le transport des ions chlorure par NKCC1 (Darman et Forbusch, 2002).

Neurones de la corne dorsale



Neurones sensoriels primaires

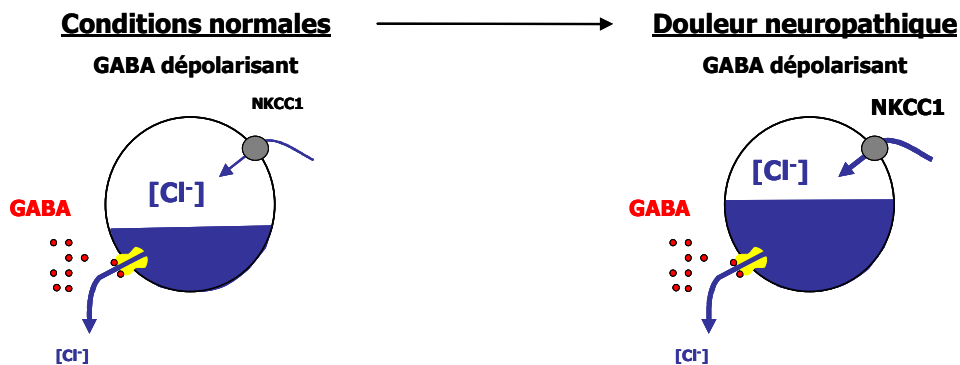


Figure 15 : Rôle des transporteurs de l'ion chlorure dans la régulation du gradient Cl^-

Dans les neurones de la corne dorsale de la moelle épinière (haut), durant les stades précoces, la concentration intracellulaire de Cl^- est élevée ; de ce fait, l'activation du récepteur $GABA_A$ induit une conductance chlorure dépolarisante. Durant les premiers jour de vie postnatale, l'expression du transporteur KCC2 permet l'inversion du gradient chlorure, et l'apparition de courants $GABA_A$ ergiques hyperpolarisants. Lors du développement de douleurs neuropathiques, l'expression de KCC2 est inhibée, ce qui a pour effet d'inverser le gradient chlorure et de rendre le GABA dépolarisant.

Dans les neurones sensoriels primaires, en condition contrôle, le GABA est dépolarisant, ce qui résulte de l'expression du transporteur NKCC1. Lors de la mise en place d'une douleur inflammatoire ou neuropathique, l'expression de ce récepteur est augmentée, ceci amplifiant le caractère dépolarisant du gradient chlorure. (d'après Price et al., 2005; Rajalu et al., 2006)

III. Les neurostéroïdes

1. Concept de neurostéroïde

Les stéroïdes exercent des fonctions importantes dans le développement, la croissance, la maturation et la différenciation du système nerveux central et périphérique (McEwen, 1994a,b ; McEwen et Woolley, 1994). En 1990, Robel et Baulieu ont démontré que les neurones et les cellules gliales peuvent eux-mêmes synthétiser des stéroïdes *de novo* à partir du cholestérol : on parle alors de neurostéroïdes (Baulieu et Robel, 1990 ; Robel et Baulieu, 1995). Ces stéroïdes peuvent agir de façon paracrine ou autocrine et peuvent atteindre des concentrations locales très élevées de plusieurs nM à quelques μ M. D'un point de vue structural, ces stéroïdes synthétisés par le SNC sont les mêmes que ceux synthétisés en périphérie par les glandes stéroïdogènes, cependant ils sont produits même en absence des tissus stéroïdogènes périphériques (Baulieu, 1997). Cette situation permet le contrôle de la production de neurostéroïdes dans le SNC par le SNC lui-même, indépendamment des niveaux de stéroïdes circulants. Cependant, les niveaux de stéroïdes circulants sont susceptibles d'intervenir dans le contenu en stéroïdes dans les tissus du SNC en s'ajoutant aux neurostéroïdes produits localement.

Baulieu et ses collègues (Robel and Baulieu, 1995 ; Baulieu, 1997, 1998) définissent les neurostéroïdes comme étant synthétisés *de novo* à partir du cholestérol, un phénomène qui implique un nombre variable d'étapes enzymatiques en fonction du stéroïde synthétisé. Ceci implique que dans le cas d'un neurostéroïde donné, toutes les enzymes nécessaires pour sa synthèse soient présentes et proches spatialement.

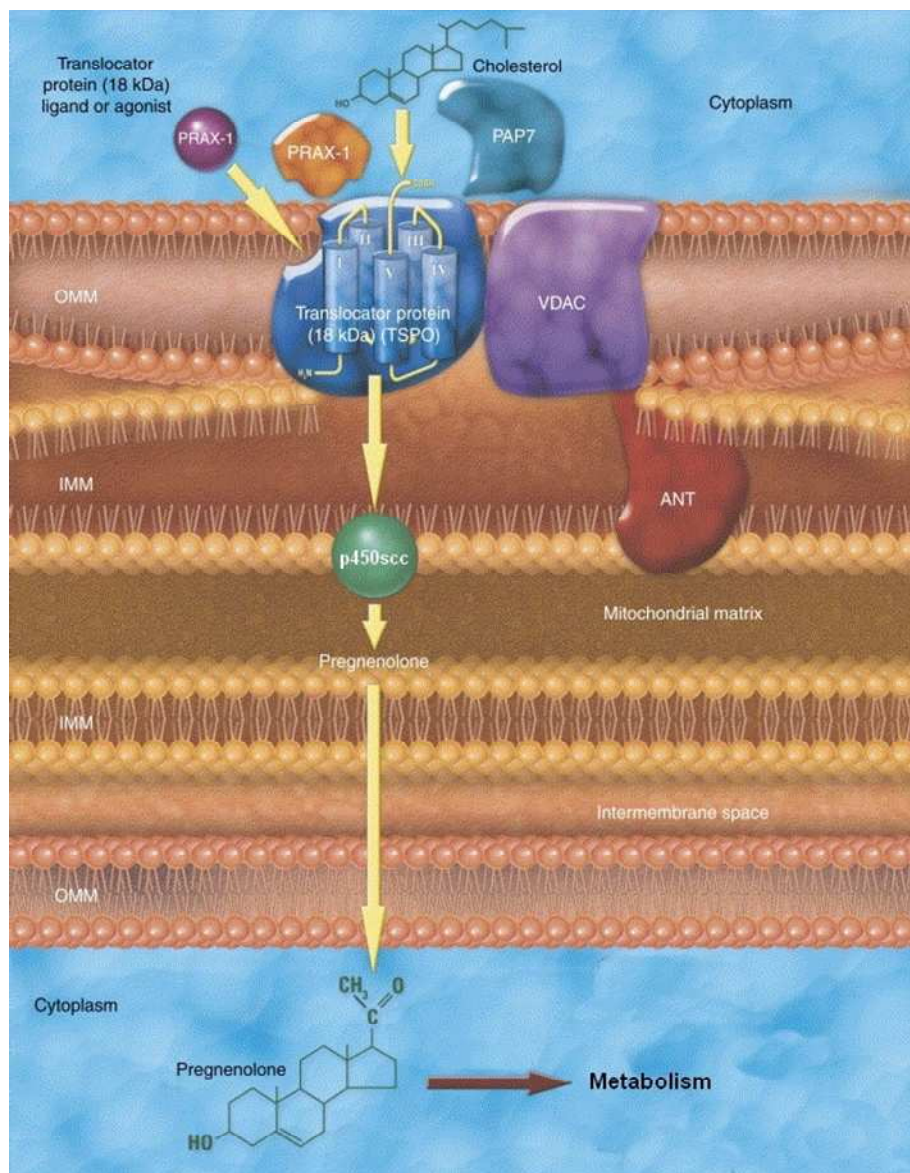


Figure 16 : Modèle du transport du cholestérol dans la mitochondrie par la TSPO

Le TSPO interagit avec le VDAC et l'ANT (située à la membrane mitochondriale interne MMI) pour former un complexe localisé préférentiellement aux sites de contact de la membrane mitochondriale externe (MME) et MMI. Les protéines PRAX-1 et PAP7 sont des protéines associées au TSPO, qui facilitent la formation du complexe et/ou le ciblage du cholestérol au TSPO. On trouve aussi dans le complexe, le VDAC (voltage-dépendent anion channel) et l'ANT (adenine nucleotide transporter). Le transport du cholestérol à travers la MME par le TSPO est activé par la liaison de ligands spécifiques. Le cholestérol délivré à la p450scc située à la MMI est transformé en prégnénolone avant d'être métabolisé en stéroïdes par les enzymes présentes dans le réticulum cytoplasmique (D'après Papadopoulos et al., 2006)

2. 2La biosynthèse

Le type de stéroïde présent dans une structure donnée du SNC dépendra très fortement de la nature, de la distribution et de l'activité des enzymes de la neurostéroïdogénèse présentes dans ce tissu.

Les neurostéroïdes sont formés à partir du cholestérol, suite à plusieurs transformations enzymatiques dans la mitochondrie et le réticulum endoplasmique. La première étape dans la voie de biosynthèse des neurostéroïdes est la transformation du cholestérol en prégnénolone.

a. Du cholestérol à la prégnénolone

Une des étapes cruciales dans la biosynthèse des neurostéroïdes est l'engagement du cholestérol dans cette biosynthèse par son transport à l'intérieur de la mitochondrie.

i) Le complexe protéique de la membrane externe mitochondriale

L'étape déterminante pour la neurostéroïdogénèse est le transport du précurseur, le cholestérol à l'intérieur de la mitochondrie. Ce transport du cholestérol dans la mitochondrie implique la formation d'un complexe macromoléculaire composé de la protéine de translocation de la membrane mitochondriale externe (Translocator protein of 18 kDa, TSPO) (Papadopoulos et al., 2006 ; 2007) (Figure 16).

La TSPO a été identifiée en 1977 par des études cherchant à déterminer les sites de liaison des benzodiazépines, d'où son ancien nom de récepteur périphérique des benzodiazépines ou PBR (pour revue, Lacapère et Papadopoulos, 2003).

La TSPO est une protéine hydrophobe de 18 kDa, à 5 domaines transmembranaires avec un site de liaison du cholestérol sur son extrémité carboxy-terminale (Li et al, 2001b). Le gène codant la TSPO est hautement conservé au cours de l'évolution, des bactéries à l'homme. L'activité de la TSPO peut être stimulée ou inhibée par différents ligands indiqués dans le tableau ci-dessous.

Tableau 1 : Ligands inhibiteurs et stimulateurs du TSPO.

Ligand inhibiteur	Ligands stimulateurs
PK11195	CB 34, CB 50, CB 54 (PBR)
	Ro5-4864 = 4'chlorodiazépam (PBR>CBR)
	Diazépam (PBR=CBR)
	Clonazépam (PBR<CBR)

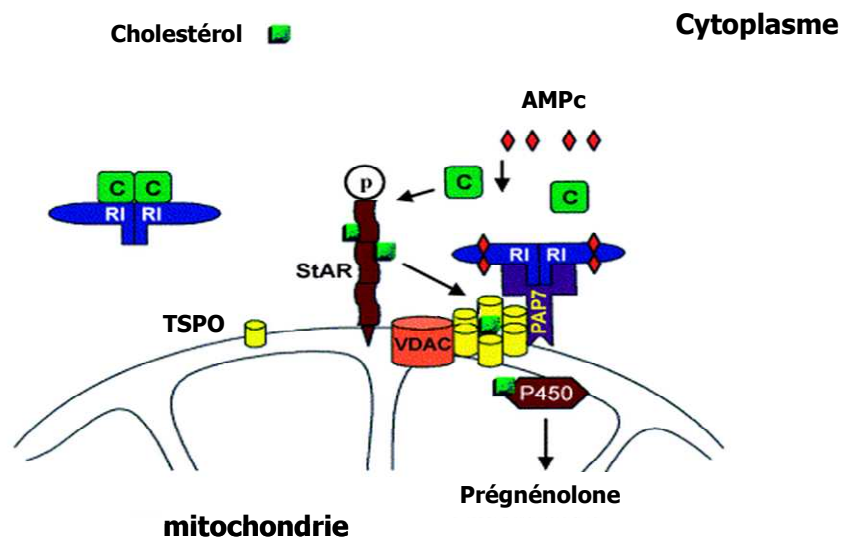
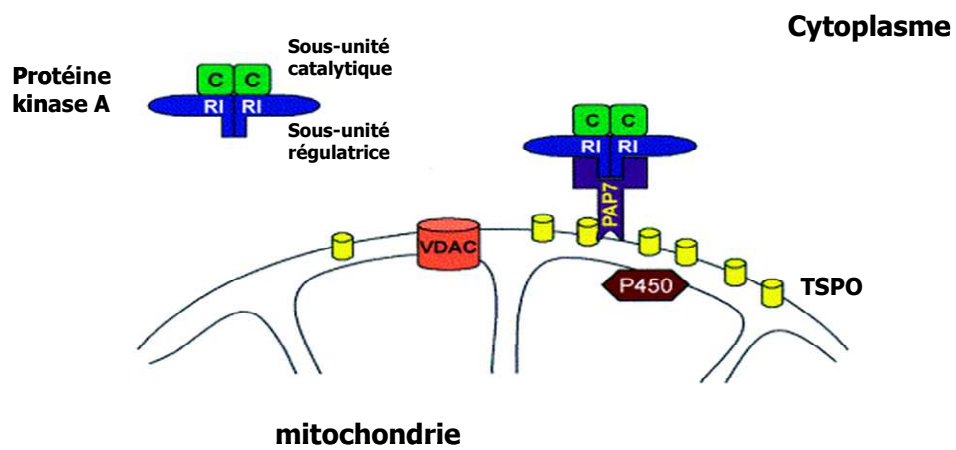


Figure 17 : Représentation schématique de l'activation du complexe mitochondrial

Le schéma du haut illustre l'état basal, où le complexe PAP7-TSPO-VDAC peut recruter la protéine kinase de type A (PKA) à la mitochondrie. Dans le schéma du bas l'activation du complexe par l'accumulation d'AMPc permet la synthèse *de novo* de la protéine StAR, son adressage à la membrane mitochondriale externe, et sa phosphorylation par la PKA recrutée au niveau du complexe. (Liu et al., 2003)

A l'échelle subcellulaire, la TSPO se trouve essentiellement dans la membrane mitochondriale externe (MME) et en particulier aux zones de contact des membranes mitochondriales externe et interne (MMI). Cependant, la TSPO peut aussi être présente dans le noyau (Venturini et al., 1998), l'aire périnucléaire (Hardwick et al., 1999) et la membrane plasmique (Oke et al., 1992).

La TSPO est le composant essentiel d'un complexe multimérique de 140-200 kD comprenant, entre autres, un canal perméable aux anions et dépendant du potentiel membranaire, VDAC. Ce canal mitochondrial de 32 kDa est crucial pour la liaison des benzodiazépines. Un autre participant du complexe est la protéine PAP7, associée à la sous-unité régulatrice RI α de la protéine kinase A (Figure 16).

Lors de la stimulation de la stéroïdogénèse (Figure 17) par des hormones dans des préparations non-neuronales, c'est l'AMPC qui déclenche l'activation du complexe, première étape de la biosynthèse. L'AMPC se lie aux sous-unités régulatrices de la PKA de façon coopérative positive, ce qui permet la dissociation de l'enzyme en un dimère de sous-unités régulatrices et deux sous-unités catalytiques actives. La TSPO quant à elle se réorganise en agrégats, ce qui laisse suggérer l'existence de polymères de TSPO (Boujrad et al., 1996). La PAP7 est principalement localisée au niveau de l'appareil trans-golgien et de la mitochondrie (Liu et al., 2003 ; 2006). La PAP7 lie la sous-unité régulatrice RI α de la PKA activée et l'incorpore dans le complexe mitochondrial. La sous-unité catalytique C pourrait alors phosphoryler des protéines spécifiques étroitement liées au complexe, et entre autres la StAR (Steroid acute regulatory protein) localisée au niveau de la mitochondrie (Clark et al., 1994 ; Stocco et Clark., 1996). Il semblerait que l'association de la StAR et du complexe PKARI α -PAP7-TSPO-VDAC puisse permettre la phosphorylation de la StAR, lui conférant son activité biologique optimale. La StAR phosphorylée agit à la membrane mitochondriale externe où elle initie le transport du cholestérol en le transférant au TSPO.

Le cholestérol stéroïdogène peut venir soit du cholestérol cytosolique associé à des protéines soit du cholestérol déjà présent dans la membrane mitochondriale externe. La TSPO assurerait alors le transfert de la membrane mitochondriale externe à la membrane mitochondriale interne par liaison directe du cholestérol sur son domaine carboxy-terminal.

Cependant, d'autres études privilégient un scénario différent dans lequel c'est la StAR qui assurerait le transport du cholestérol et l'amènerait à la membrane mitochondriale interne.

Dans cette hypothèse, la TSPO, par son domaine carboxy-terminal, permettrait le recrutement du pool de cholestérol cytosolique pour la StAR (pour revue, Miller, 2007).

Il reste beaucoup à apprendre sur les mécanismes d'action de la StAR ; cependant, l'ensemble des acteurs cités ci-dessus jouent un rôle essentiel dans le processus de transfert du cholestérol de la MME à la MMI où va se poursuivre la neurostéroïdogenèse, car si l'un des éléments du complexe est supprimé, la stéroïdogenèse ne se fait plus.

ii) P450scc

A la membrane mitochondriale interne, le cholestérol est converti en prégnénolone par le cytochrome p450scc (p450 side chain cleavage). Il catalyse une série de réactions impliquant la formation de 22R-hydroxycholestérol et de 20,22R-hydroxycholestérol suite aux clivages successifs des liaisons en C20 et C22 (Hall, 1985) (Figure 18). Il s'agit d'une des étapes les plus lentes de la stéroïdogenèse avec un rendement ne pouvant excéder une molécule de cholestérol/molécule d'enzyme/seconde (Compagnone et Mellon, 2000).

La protéine p450scc est présente et active dans le SNC (Le Goascogne et al., 1987 ; Hu et al., 1987). Dans la moelle épinière, la p450scc est localisée dans les couches I et II de la corne dorsale, dans des fibres allant de la corne dorsale vers la corne ventrale, dans les motoneurones, et dans les cellules gliales autour du canal central. 80% des cellules exprimant la protéine sont des neurones et 20% sont des astrocytes (Patte-Mensah et al., 2003).

La p450scc est exprimée tout au long du développement et reste exprimée à l'âge adulte (Compagnone et Mellon, 2000).

Suite à sa synthèse, la prégnénolone sort de la mitochondrie pour subir des transformations enzymatiques dans le réticulum endoplasmique.

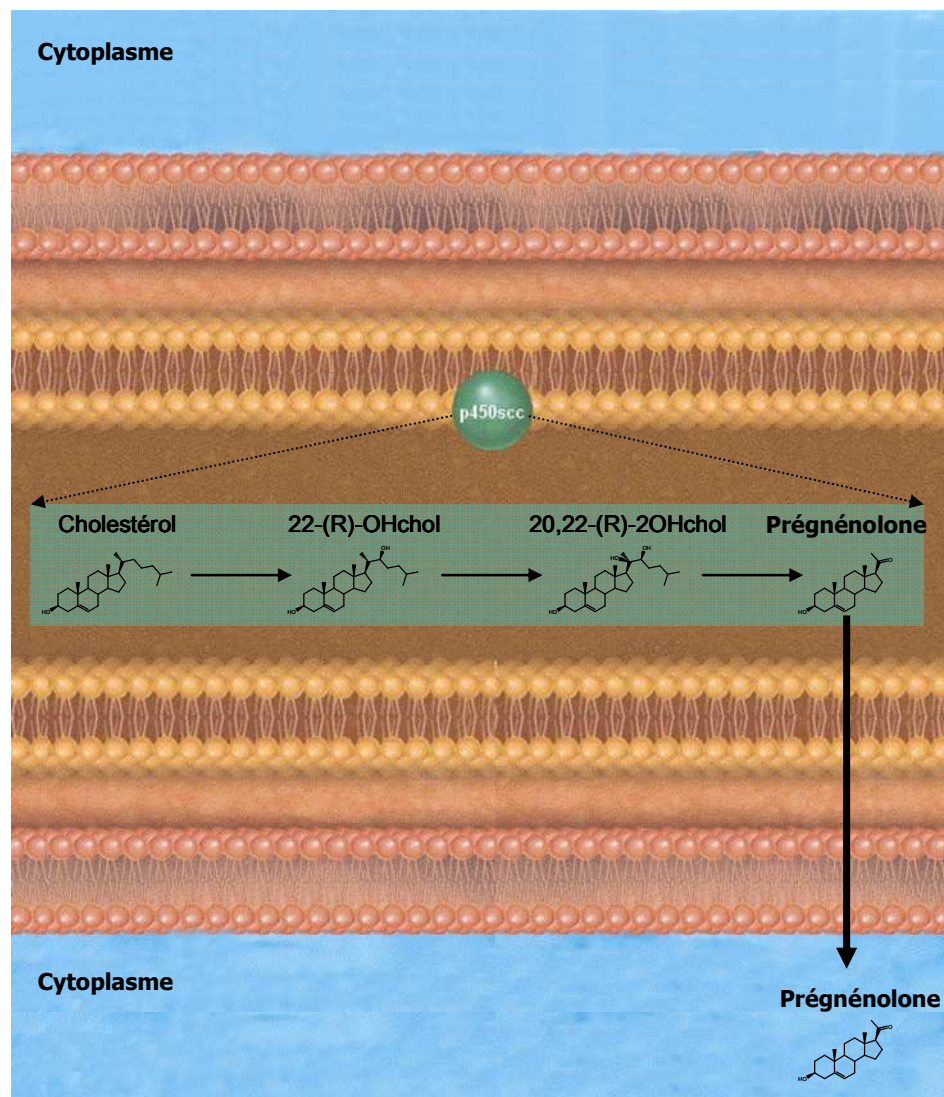


Figure 18 : Activité enzymatique de la p450scc

La p450scc, localisée à la membrane mitochondriale interne MMI, transforme le cholestérol en prégnénolone, en passant par le 22(R)OH-cholestérol puis le 20,22(R)OH-cholestérol. La prégnénolone sort ensuite de la mitochondrie pour subir d'autres transformations enzymatiques dans le réticulum endoplasmique (adapté d'après Papadopoulos et al., 2006).

b. La biosynthèse

Le schéma de la neurostéroïdogénèse (Figure 19) est complexe. Plusieurs voies de synthèse sont possibles à partir de la prégnénolone et le type de stéroïde produit dépendra des enzymes exprimées dans la cellule. Dans mon travail de thèse, je me suis intéressée à la modulation de la transmission synaptique inhibitrice par les stéroïdes $3\alpha,5\alpha$ -réduits : je ne développerai donc que cette voie de synthèse (Figure 20).

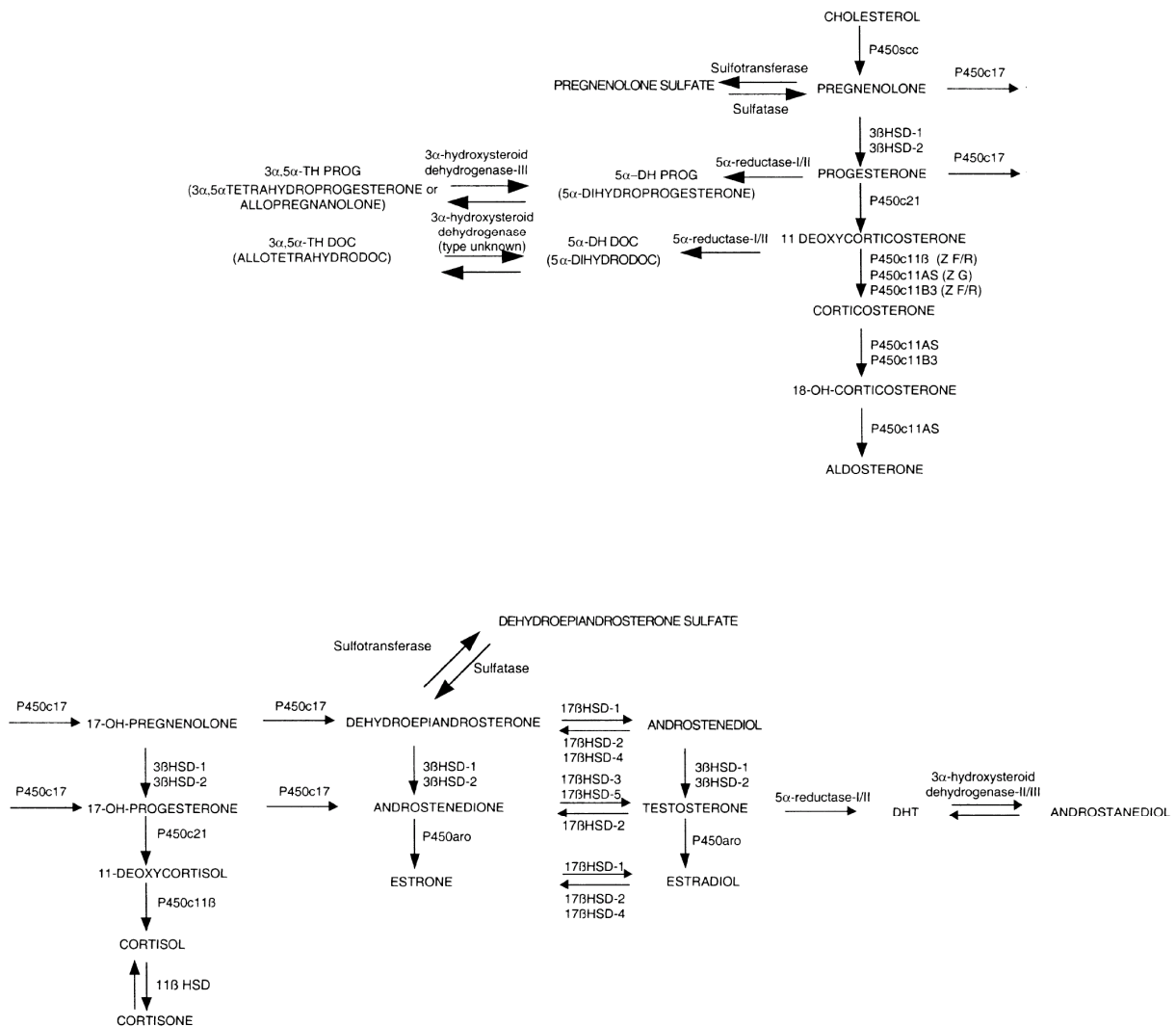


Figure 19 : Voies de biosynthèse des neurostéroïdes dans le système nerveux

(d'après Mellon et al., 2001).

c. La voie de synthèse des neurostéroïdes 3 α 5 α -réduits dans la moelle épinière

Une particularité de la synthèse des neurostéroïdes 3 α 5 α -réduits est que les étapes enzymatiques ne sont pas réversibles sauf dans le cas de la 3 α HSOR.

i) La 3 β -hydroxystéroïde déshydrogénase : 3 β -HSD

La prégnénolone produite à partir du cholestérol peut être métabolisée en progestérone par la 3 β -HSD. Il s'agit de la première étape dans la voie de synthèse des stéroïdes 3 α 5 α -réduits.

La 3 β -HSD est présente et active dans le SNC, dans des neurones et des cellules gliales (Jung-Testas et al., 1989a et b; Bauer et Bauer, 1989). L'ARNm et la protéine ont été détectés par dans différentes régions du cerveau de rat telles que le bulbe olfactif, l'hypothalamus, l'hippocampe, le *noyau accumbens* et le cervelet (Guennoun et al., 1995). L'ARN messenger de la 3 β -HSD a aussi été détecté dans la moelle épinière. On note une forte expression dans les cornes dorsales et une expression plus faible dans la lamina X et les cornes ventrales (Sanne et Krueger, 1995 ; Coirini et al., 2002). La présence de la protéine a été confirmée ainsi que sa fonctionnalité (Coirini et al., 2002). En revanche, la localisation subcellulaire de l'enzyme reste discutée : elle serait localisée à la membrane mitochondriale interne ou dans le réticulum endoplasmique.

ii) P450c21

Cette enzyme permet la transformation de la progestérone en 11désoxycorticostérone (DOC). Elle est présente dans le réticulum endoplasmique lisse. Peu d'informations sont disponibles sur la localisation de cette enzyme dans le SNC. La transformation de la progestérone en DOC a été mesurée dans le cerveau de rat, alors que ni l'ARNm, ni la protéine de la P450c21 n'ont pu y être détectés (Compagnone et Mellon, 2000). Suite à l'incubation de coupes de moelle épinière avec de la [3 H]-Preg, un pic de [3 H]-DOC a été détecté en HPLC. La p450c21 est donc présente et fonctionnelle dans la moelle épinière de rat (Poisbeau et al., 2005).

iii) 5 α -réductase : 5 α Red

La 5 α -réductase permet la réduction de la progestérone et de la DOC en position 5 α et aboutit à la formation de 5 α -dihydroprogestérone (DHP) et de 5 α -dihydrodésoxycorticostérone (DHDOC) respectivement.

Deux isoformes de la 5 α -réductase ont été trouvées chez le rat et l'homme (Pozzi et al., 2003). La 5 α -réductase de type 1 (5 α Red1) est largement exprimée dans le cortex cérébral, l'hippocampe, l'hypothalamus, le thalamus et le cervelet, mais semble peu présente dans la moelle épinière (Pelletier et al., 1994 ; Celotti et al., 1997). La 5 α Red1 est très légèrement exprimée dans la substance blanche de la moelle épinière, et aucune expression n'a été observée dans la substance grise (sauf dans les cornes ventrales de la moelle épinière lombaire ; Patte-Mensah et al., 2004b).

La 5 α -réductase de type 2 (5 α Red2) est modérément exprimée dans la substance blanche, par contre son expression est importante dans la substance grise de la moelle épinière. Les cellules exprimant la 5 α Red2 dans la moelle épinière de rat sont des astrocytes (15 %), des neurones (25 %) et des oligodendrocytes (60%) (Patte-Mensah et al., 2004b).

La 5 α Red1 est exprimée tout au long du développement, tandis que la 5 α Red2 n'est exprimée que transitoirement (Compagnone et Mellon, 2000). Il a été démontré par RT-PCR que l'ARNm de la 5 α Red2 est présent chez le rat à la fin de la gestation (E18) et pendant la période néonatale, mais une forte diminution de son expression est observée après le 14^{ème} jour de vie postnatale (P14) jusqu'à sa disparition à P28.

iv) 3 α -hydroxystéroïde oxydoréductase : 3 α -HSOR

Cette enzyme permet la réduction de la DHDOC en tétrahydrodésoxycorticostérone (THDOC) et de la DHP en tétrahydroprogestérone (THP) couramment appelée allopregnanolone (AP). La réaction catalysée par cette enzyme est réversible, la 3 α -HSOR a donc également la capacité d'oxyder la THDOC et la THP en DHDOC et DHP. Il s'agit d'un équilibre réactionnel. Ce point est important car la THP et la THDOC n'ont pas d'activité génomique, alors que la DHP et la DOC se lient aux récepteurs nucléaires de la progestérone et des corticoïdes.

La 3 α -HSOR est présente dans le SNC et sa fonctionnalité a été démontrée dans des cultures d'astrocytes, d'oligodendrocytes et de neurones (Melcangi et al., 1993 ; Khanna et al., 1995).

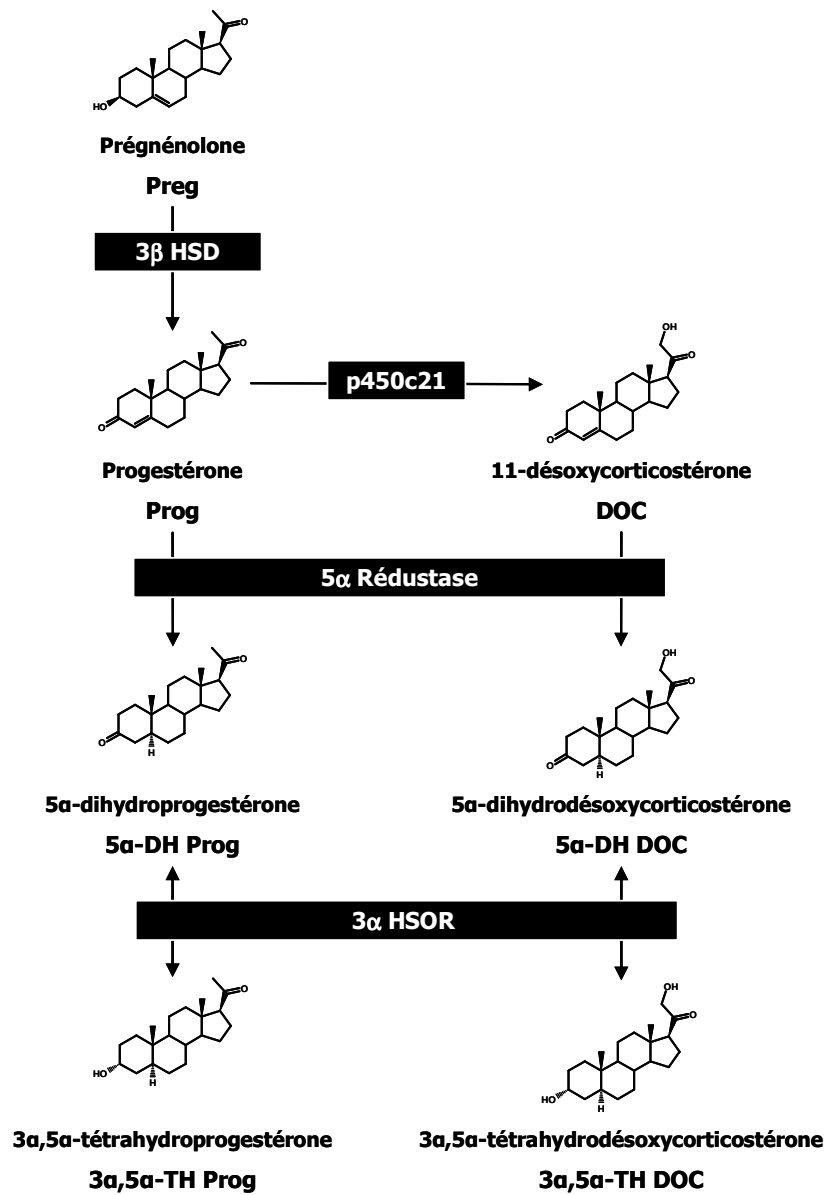


Figure 20 : Voie de synthèse des stéroïdes 3α5α-réduits

Dans la moelle épinière, la 3 α -HSOR est fortement exprimée dans la substance blanche et la substance grise. Les cellules l'exprimant sont des astrocytes (20 %), des neurones (35%) et des oligodendrocytes (45%) (Patte-Mensah et al., 2004b).

L'activité de la 3 α -HSOR est bien supérieure à celle de la 5 α Red ; l'étape de 5 α -réduction est donc une étape qui limite le rendement de la biosynthèse des stéroïdes 3 α 5 α -réduits (Penning et al., 1985 ; Russel et al., 1994 ; Mitev et al., 2003).

Une étude récente sur des cerveaux de rat a mis en évidence que la 5 α Red et la 3 β -HSOR sont exprimées dans des neurones recevant des contacts synaptiques GABAergiques (Agis-Balboa et al., 2006). Ceci permettrait une synthèse localisée de stéroïdes 3 α 5 α -réduits à proximité des récepteurs GABA_A. De façon très intéressante, les stéroïdes 3 α 5 α -réduits sont de puissants modulateurs allostériques positifs de ces récepteurs (Belelli et Lambert, 2005).

L'ensemble des enzymes de synthèse des stéroïdes 3 α 5 α -réduits peut être spécifiquement inhibées (Tableau 2).

Tableau 2 : Inhibiteurs des enzymes de la voie de synthèse des stéroïdes 3 α 5 α -réduits.

	Inhibiteur
P450scc	Aminogluthétimide
3α-HSD	Epostane Trilostane
5α-réductase	Finastéride SKF 105111
3α-HSOR	Provéra Indométhacine

3. Mode d'action des stéroïdes : des modulateurs de la transmission synaptique

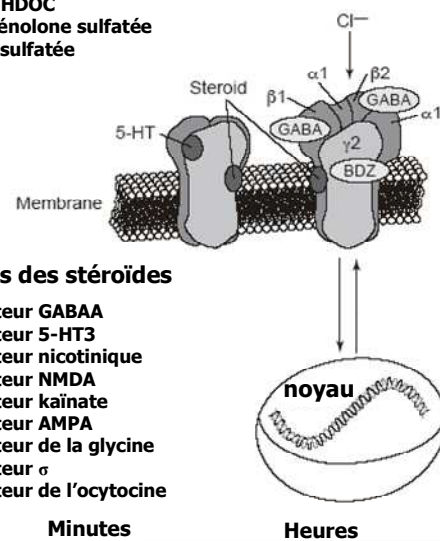
Les stéroïdes exercent de nombreuses actions biologiques dans le système nerveux central, durant le développement embryonnaire mais aussi chez l'adulte. Les mécanismes par lesquels les stéroïdes agissent sur le SNC incluent des effets génomiques et des effets non-génomiques (Figure 21).

Séroïdes neuroactifs

17 β -oestradiol
Progestérone
3 α 5 α TH Prog
3 α 5 α THDOC
Pregnénolone sulfatée
DHEA sulfatée

Cibles des stéroïdes

récepteur GABA_A
récepteur 5-HT₃
récepteur nicotinique
récepteur NMDA
récepteur kaïnate
récepteur AMPA
récepteur de la glycine
récepteur σ
récepteur de l'ocytocine



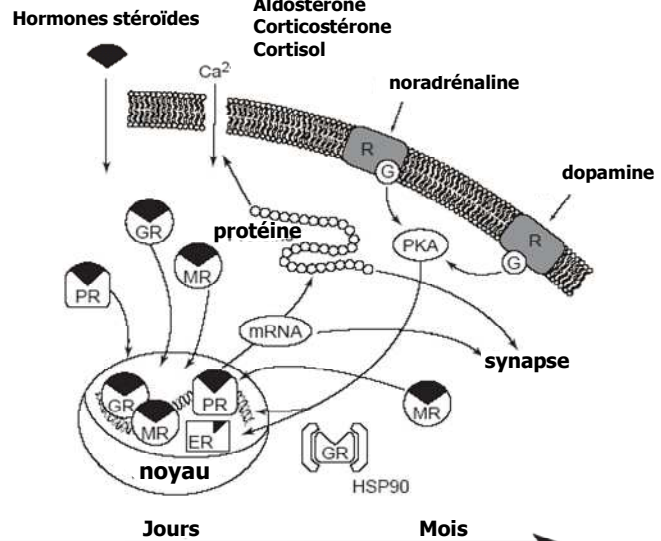
Minutes

Heures

Effets nongénomiques

Hormones stéroïdes

17 β -oestradiol
Dihydrotestostérone
Progestérone
Aldostérone
Corticostérone
Cortisol



Jours

Mois

Effets génomiques

Figure 21 : Mode d'action des stéroïdes

Les stéroïdes peuvent moduler l'activité des récepteurs des neurotransmetteurs par des effets non-génomiques rapides allant de plusieurs minutes à quelques heures. Ils peuvent aussi agir via des récepteurs intracellulaires, par une action génomique pouvant se prolonger à plusieurs mois.

(D'après Rupprecht et Holsboer, 1999)

a. Action génomique

Les stéroïdes peuvent se lier à des récepteurs intracellulaires (pour revue Robyr et al, 2000) qui lors de cette liaison, se dissocient de leurs protéines chaperonnes et peuvent ainsi migrer dans le noyau. Ils forment alors des homodimères ou des hétérodimères grâce à leur séquence de liaison de l'ADN, puis ces dimères interagissent avec des séquences qui sont localisées dans les régions régulatrices des promoteurs des gènes hormono-sensibles. L'action génomique des hormones peut durer de quelques minutes à plusieurs mois.

Par cette voie d'action, les stéroïdes agissent comme des facteurs de transcription dans la régulation de l'expression génique (Evans, 1988). Tous les stéroïdes ne se lient pas à des récepteurs nucléaires. Ainsi, la DHP et la DOC se fixent à de tels récepteurs, alors que la THP et THDOC ne se lient pas sur ces récepteurs intracellulaires (Rupprecht et al., 1993 ; Rupprecht et Holsboer, 1999)

b. Récepteurs membranaires spécifiques

Il a récemment été démontré que certains stéroïdes agissent en se fixant sur des récepteurs membranaires spécifiques. Le récepteur membranaire de la progestine a été le premier cloné à partir d'ovocytes de poisson (Zhu et al., 2003a). Il s'agit d'un récepteur couplé à une protéine G. Il existe 3 types de récepteur de la progestine (mPR α , β et γ). Le mPR β est fortement exprimé dans le SNC de souris et particulièrement dans la moelle épinière (Zhu et al., 2003b).

Récemment, l'existence d'un récepteur de la déhydroépiandrostérone (DHEA) couplé aux protéines G a été démontrée sur des membranes isolées d'hippocampe de rat. La liaison de la DHEA sur ce site aurait un effet neuroprotecteur (Charalampopoulos et al., 2006).

c. Modulation de la transmission synaptique

Certains stéroïdes peuvent moduler l'excitabilité neuronale en se liant aux récepteurs des neurotransmetteurs (Majewska et al., 1986 ; Paul and Purdy, 1992 ; Rupprecht et Holsboer, 1999). Le terme de « stéroïde neuroactif » a été adopté pour les stéroïdes ayant ces propriétés. Ces effets ont lieu sur des fenêtres de temps allant de la milliseconde à la seconde (McEwen, 1991).

i) Modulation des récepteurs des neurotransmetteurs

Les principaux neurostéroïdes sulfatés et non-sulfatés, comme la prégnenolone sulfatée, la DHEA sulfatée, la pregnénolone, la progestérone et l'allopregnanolone modulent

les récepteurs des neurotransmetteurs et par conséquent exercent une fonction de neuromodulateurs endogènes.

Tableau 3 : Effets des stéroïdes neuroactifs sur les récepteurs des neurotransmetteurs (Adapté d'après Rupprecht et Holsboer, 1999)

Récepteur	Stéroïde	Effet modulateur	Concentration
GABA_A	3α5α-THP	Positif	10 ⁻⁸ à 10 ⁻⁵
	3α5β-THP	Positif	10 ⁻⁸ à 10 ⁻⁵
	3α5α-THDOC	Positif	10 ⁻⁸ à 10 ⁻⁵
	Prégnénolone sulfate	Négatif	10 ⁻⁵ à 10 ⁻³
	DHEA-sulfate	Négatif	10 ⁻⁵ à 10 ⁻³
Nicotinique de l'Acétylcholine	Progestérone	Négatif	10 ⁻⁶ à 10 ⁻⁴
	3α5α-THP	Négatif	10 ⁻⁵ à 10 ⁻⁴
Glycine	Prégnénolone sulfate	Négatif	10 ⁻⁴
	Progestérone	Négatif	10 ⁻⁵ à 10 ⁻³
	Prégnanolone	Négatif	10 ⁻⁸ à 10 ⁻⁵
5HT₃	Oestradiol	Négatif	10 ⁻⁶ à 10 ⁻⁴
	Progestérone	Négatif	10 ⁻⁶ à 10 ⁻⁴
	Testostérone	Négatif	10 ⁻⁵
	3α5α-THP	Négatif	10 ⁻⁵
NMDA	Prégnénolone sulfate	Positif	10 ⁻⁶ à 10 ⁻³
	17β-oestradiol	Négatif	5. 10 ⁻⁵
AMPA	Prégnénolone sulfate	Négatif	10 ⁻⁴
Kaïnate	Prégnénolone sulfate	Négatif	10 ⁻⁴
	17β-oestradiol	Positif	10 ⁻⁸ à 10 ⁻⁵
	Progestérone	Positif	10 ⁻⁵ à 10 ⁻³
Ocytocine	Progestérone	Négatif	10 ⁻⁹ à 10 ⁻⁶
Sigma 1	DHEA sulfate	Positif	10 ⁻⁷ à 10 ⁻⁵
	Prégnénolone sulfate	Négatif	10 ⁻⁷ à 10 ⁻⁵
	Progestérone	Antagoniste	10 ⁻⁸ à 10 ⁻⁶
P2X	DHEA	Positif	10 ⁻⁹ à 10 ⁻⁴

Une grande variété de modulations allostériques des récepteurs membranaires des neurotransmetteurs par les stéroïdes neuroactifs a été décrite à ce jour ; l'ensemble des effets connus sur les récepteurs des neurotransmetteurs est répertorié dans le tableau 3 (pour revue Rupprecht et Holsboer, 1999 ; Schlichter et al., 2006). Comme le montre le tableau, les stéroïdes peuvent exercer des effets modulateurs positifs ou négatifs, et leurs cibles principales sont des récepteurs canaux impliqués dans la transmission synaptique rapide. Il ne faut cependant pas exclure que les stéroïdes puissent moduler (positivement ou négativement) des récepteurs de type métabotrope. Dans le cadre de cette étude, il faut noter que les stéroïdes peuvent moduler les récepteurs GABA_A et de la glycine qui sous-tendent la transmission / co-transmission inhibitrice dans la moelle épinière.

Les stéroïdes sont aussi connus pour moduler les récepteurs du glutamate, soit directement par un mécanisme allostérique, soit indirectement par activation de récepteurs $\sigma 1$ ou en passant par des mécanismes de phosphorylation. Parmi ces effets, le mieux documenté est celui du sulfate de prégénolone, qui module positivement le récepteur NMDA (Wu et al., 1991) par un mécanisme allostérique (Ceccon et al., 2001) en augmentant l'affinité pour l'agoniste (Ceccon et al., 2001) et la probabilité d'ouverture du canal (Horak et al., 2004). Cependant, cet effet est plus complexe et dépend de la composition en sous-unités du récepteur. D'autre part, la prégénolone sulfatée peut aussi agir par l'intermédiaire du récepteur $\sigma 1$. Il s'agit d'un récepteur associé étroitement au récepteur NMDA qui module les concentrations intracellulaires de calcium (Malayev et al., 2002).

Plus récemment, il a été mis en évidence que la DHEA était un modulateur positif des récepteurs P2X contenant la sous-unité P2X₂ (DeRoo et al., 2003).

ii) Modulation du récepteur GABA_A

Il est aujourd'hui clairement établi que le récepteur GABA_A est la cible principale des stéroïdes neuroactifs.

Le récepteur GABA_A peut être modulé positivement ou négativement par les stéroïdes neuroactifs. Les stéroïdes sulfatés (Preg-S et DHEA-S) sont des modulateurs négatifs du récepteur GABA_A, alors que les stéroïdes 3 α 5 α -réduits (THDOC et THP) sont de puissants modulateurs positifs du récepteur GABA_A. Les stéroïdes sulfatés et nonsulfatés agissent sur deux sites distincts du récepteur (Park-Chung et al., 1999). De ce fait, les stéroïdes modulateurs négatifs et positifs peuvent agir indépendamment ou de façon coordonnée sur le récepteur GABA_A.

Mon travail de thèse ayant porté sur l'effet modulateur positif des stéroïdes 3 α 5 α -réduits, je ne développerai ici que cet aspect des effets modulateurs. Le lecteur intéressé par les autres types de modulation pourra se référer à différents articles de synthèse portant sur ce sujet (Belelli et Lambert, 2005 ; Schlichter et al., 2005 ; Park-Chung et al., 1999).

C'est dans les années 1940 que Hans Selye a montré que certains métabolites de la progestérone avaient des effets sédatifs et anesthésiques puissants. Au début des années 1980, des études électrophysiologiques ont montré que l'effet anesthésique de certains métabolites de la progestérone (l'alphaxalone) était dû à une augmentation de l'inhibition évoquée et à une action sur le récepteur GABA_A (Harrison et Simmonds, 1984).

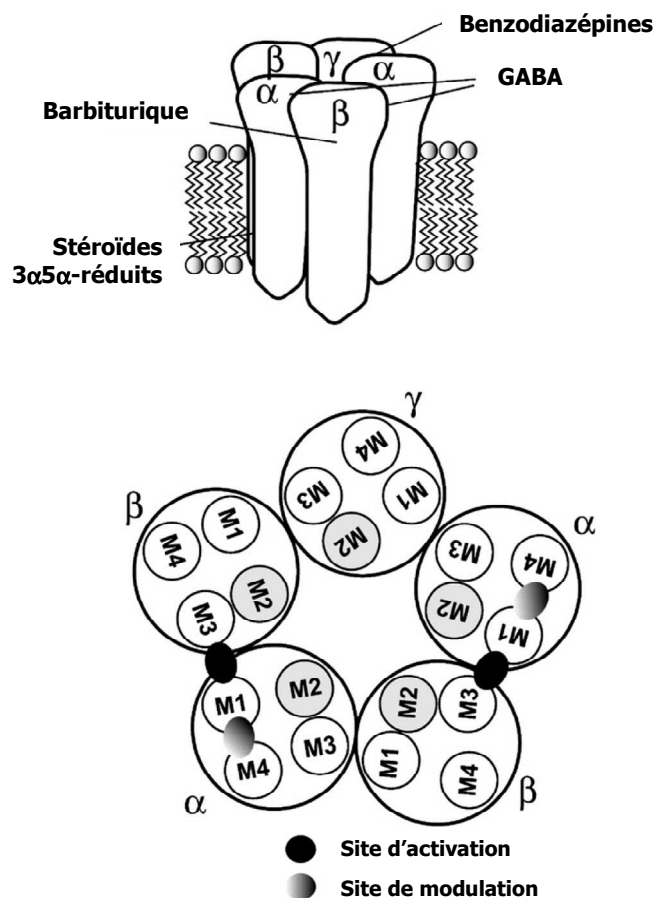


Figure 22 : Sites de liaison des stéroïdes 3α5α-réduits sur le récepteur GABA_A

Le récepteur GABA_A a plusieurs sites de liaison pour des substances modulatrices. Le site modulateur des stéroïdes 3α5α-réduits est localisé entre les domaines transmembranaires 1 et 4 de la sous-unité α du récepteur. Le site d'activation directe par les stéroïdes 3α5α-réduits se situe à l'interface des sous-unités αβ.

(D'après Akk et al., 2007)

En 1986, il a été montré pour la première fois que l'alloprégnanolone et la THDOC sont des modulateurs de l'excitabilité neuronale, via leur interaction avec le récepteur GABA_A (Majewska et al., 1986). Ces stéroïdes potentialisent l'activité du récepteur GABA_A à des concentrations nanomolaires. Ils n'ont pas d'effet sur la conductance du canal du récepteur, mais augmentent fortement l'affinité du récepteur pour le GABA et le temps d'ouverture du canal (Shu et al., 2004). De plus, à des concentrations élevées (>100 nM), ces stéroïdes peuvent activer directement le récepteur GABA_A, ce qui peut mener dans certains cas à une

suppression de la transmission excitatrice (Shu et al., 2004). Ces deux modes d'action très distincts s'expliquent par l'existence de 2 sites de liaison des stéroïdes $3\alpha5\alpha$ -réduits sur le récepteur GABA_A. La modulation positive du récepteur GABA_A se fait par un site de liaison situé entre les domaines transmembranaires 1 et 4 de la sous-unité α , alors que l'activation directe du récepteur est induite par la liaison des stéroïdes $3\alpha5\alpha$ -réduits sur un site localisé à l'interface des sous-unités α et β (Hosie et al., 2006 ; Figure 22). Les stéroïdes peuvent accéder aux sites de liaison sur le récepteur GABA_A lorsqu'ils sont en solution dans le milieu extracellulaire ou intracellulaire, mais du fait de leur forte lipophilie (Akk et al., 2005), ils peuvent atteindre les sites modulateurs du récepteur GABA_A par diffusion dans le milieu hydrophobe de la membrane. Il a même récemment été démontré que l'accès par le milieu extracellulaire n'était pas indispensable, mais qu'une accumulation membranaire des stéroïdes serait nécessaire pour la modulation du récepteur (Akk et al., 2005).

Les stéroïdes neuroactifs/neurostéroïdes peuvent moduler les récepteurs synaptiques et extra-synaptiques (Figure 23). Lorsque les récepteurs sont synaptiques, la présence ou l'absence de stéroïdes va se refléter sur les cinétiques des courants postsynaptiques. De plus, les stéroïdes $3\alpha5\alpha$ -réduits augmentent les constantes de temps de désactivation des courants postsynaptiques inhibiteurs GABA_A (CPSI GABA_A), ce qui prolonge la durée de ces événements postsynaptiques et augmente la charge inhibitrice (Keller et al., 2001 et 2004). Dans la plupart des régions du SNC, les neurostéroïdes ont un léger effet sur le temps d'activation et l'amplitude des CPSI GABA_A, mais l'effet majeur est observé sur la désactivation du courant, du fait de la modification de la cinétique du canal. Par conséquent, la constante de temps de désactivation des CPSI GABA_A est un excellent indicateur de présence des stéroïdes au voisinage des récepteurs post-synaptiques. En effet, plus il y aura de stéroïdes $3\alpha5\alpha$ -réduits présents à la synapse et plus la désactivation sera lente et donc la constante de temps de désactivation élevée.

La présence de stéroïdes $3\alpha5\alpha$ -réduits peut aussi révéler ou potentialiser une composante extrasynaptique. Tous les récepteurs extrasynaptiques ne sont pas sensibles de la même façon aux neurostéroïdes. Dans certains cas, comme dans les neurones granulaires du cortex cérébelleux et du gyrus denté de souris, un courant tonique porté par les récepteurs GABA_A contenant la sous-unité δ est fortement augmenté par les stéroïdes $3\alpha5\alpha$ -réduits (Stell et al., 2003). En revanche, chez le rat, le courant tonique GABAergique dans les cellules granulaires du cortex cérébelleux est insensible aux stéroïdes $3\alpha5\alpha$ -réduits (Hamann et Richter, 2002).

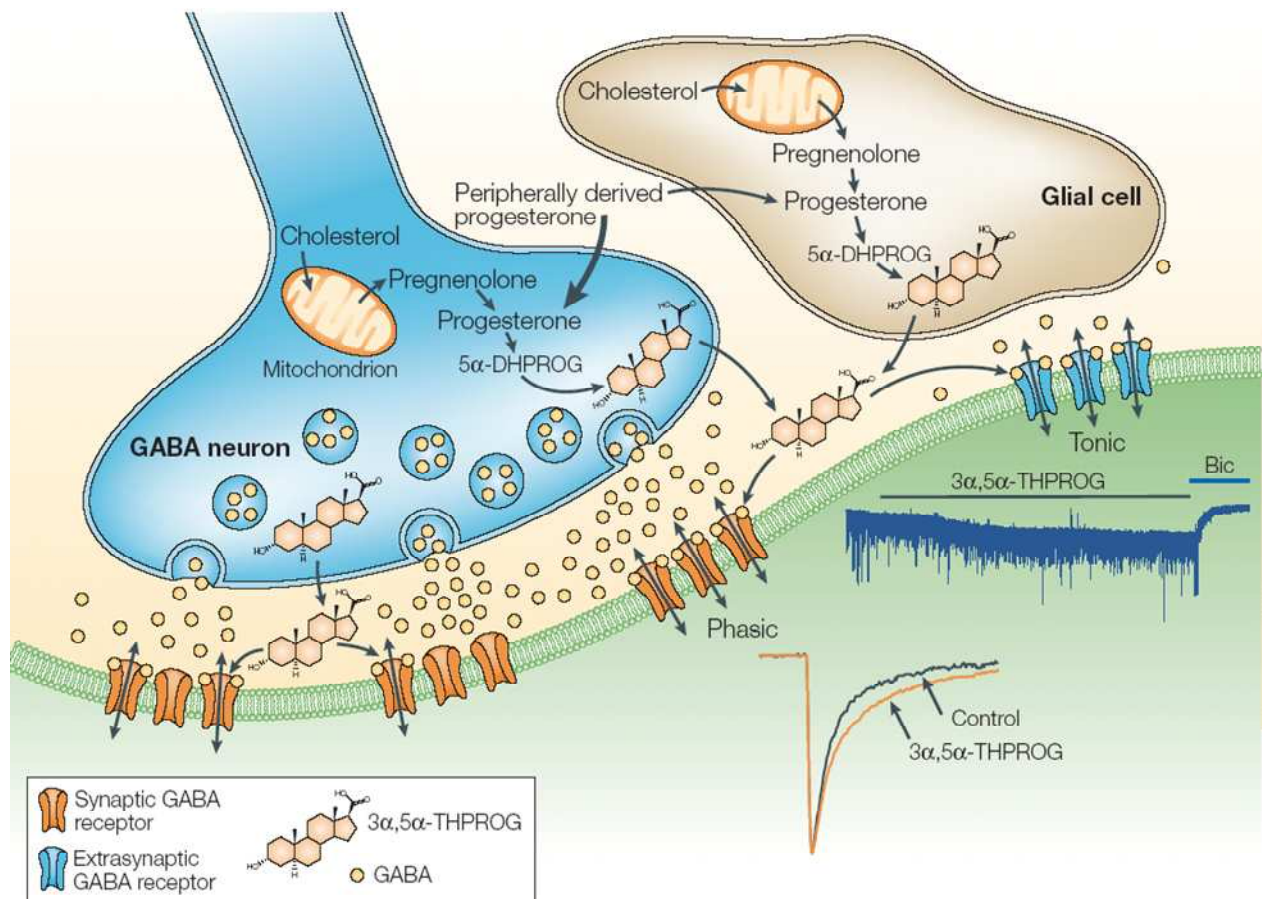


Figure 23: Modulation de la synapse GABAergique par les stéroïdes 3α5α-réduits

Le GABA qui est libéré des vésicules agit rapidement sur les récepteurs GABA_A ce qui provoque un courant postsynaptique inhibiteur miniature « phasique ». Les neurostéroïdes qui sont libérés localement prolongent la constante de temps de désactivation de ces courants, augmentant de ce fait l'inhibition synaptique. Certains neurones ont des récepteurs extrasynaptiques qui sont activés par des concentrations faibles de GABA, générant un courant « tonique ». Ce courant peut être augmenté par de basses concentrations des neurostéroïdes (d'après Belelli et Lambert, 2005)

Il existe une certaine hétérogénéité dans les modulations des stéroïdes pouvant être due à différents facteurs.

Composition en sous-unités du récepteur GABA_A

L'effet des stéroïdes sur le récepteur GABA_A est porté par les sous-unités α et β (lieux des sites de liaison) mais la nature de ces sous-unités n'influence pas la sensibilité du récepteur aux stéroïdes. En revanche, la sous-unité γ_2 confère une plus grande sensibilité que les sous-unités γ_1 et γ_3 (Belelli et al., 2002). D'autre part, la présence de la sous-unité δ augmente les effets potentialisateurs des stéroïdes $3\alpha,5\alpha$ -réduits (Mihalek et al., 1999 ; Belelli et al., 2002).

Phosphorylation

La phosphorylation du récepteur GABA_A influence aussi la sensibilité aux stéroïdes. Il s'agit d'un effet complexe qui dépend de la kinase ou de la phosphatase impliquée. Les effets de la phosphorylation dépendent des structures du SNC concernées. Par exemple, dans l'hippocampe, la phosphorylation favorise l'interaction entre les stéroïdes $3\beta,5\alpha$ -réduits et le récepteur (Harney et al., 2003), alors qu'elle inhibe l'effet modulateur des stéroïdes $3\alpha,5\alpha$ -réduits dans les neurones magnocellulaires ocytocinergiques de l'hypothalamus (Brussaard et Koksma, 2003 ; Koksma et al., 2003). Il reste à établir si la phosphorylation change la liaison ou influence les changements de cinétique induits par la liaison du stéroïde. Néanmoins, il est clair que la phosphorylation contribue à l'hétérogénéité des effets des stéroïdes sur le récepteur GABA_A.

Métabolisme

Alors que les stéroïdes périphériques peuvent atteindre le SNC en traversant la barrière hémato-encéphalique, ils n'agissent pas nécessairement uniformément dans toutes les structures du SNC (Lambert et al., 2003). Ils peuvent agir directement sans transformation, ou peuvent être métabolisés localement en dérivés plus ou moins actifs par rapport au stéroïde initial. Ceci indique l'importance du métabolisme local pour les neurostéroïdes et les stéroïdes circulants atteignant le SNC (Belelli et Herd, 2003).

4. Neurostéroïdes dans la moelle épinière

Dans les couches superficielles de la corne dorsale de la moelle épinière, toutes les enzymes nécessaires pour la synthèse de stéroïdes tels que la DHEA, la THDOC et l'alloprégnanolone sont présentes et fonctionnelles. Dans la lamina II, cette synthèse est sous le contrôle du TSPO, dont l'activité est modulée au cours du développement postnatal ou suite à l'induction d'une inflammation périphérique (Keller et al., 2004 ; Poisbeau et al., 2005). Les stéroïdes 3 α 5 α -réduits peuvent donc être produits dans la lamina II de la moelle épinière. Dans la lamina II, cette synthèse de stéroïdes 3 α 5 α -réduits est élevée durant les 15 premiers jours après la naissance, puis diminue au cours du développement postnatal jusqu'à des niveaux où les stéroïdes 3 α 5 α -réduits n'ont plus d'effet modulateur détectable sur les récepteurs GABA_A (Keller et al., 2004). La présence de stéroïdes 3 α 5 α -réduits durant les 15 premiers jours de vie postnatale dans la lamina II, se traduit également par la présence de CPSI mixtes GABA/glycine. En effet, la présence de stéroïdes 3 α 5 α -réduits augmente l'affinité des récepteurs GABA_A dans (ou au voisinage de) certaines synapses glycinergiques, ce qui permet leur activation par les faibles concentrations de GABA durant la co-libération GABA/glycine, et par conséquent l'apparition d'évènements mixtes (Keller et al., 2001, 2004). La diminution de la synthèse des stéroïdes 3 α 5 α -réduits au cours du développement, est due à une régulation négative du TSPO ; en effet, une activation pharmacologique du TSPO chez le rat adulte permet de récupérer les propriétés de transmission synaptique d'un rat immature. Malgré le fait qu'aucune étude ne s'y soit intéressée à l'heure actuelle, il n'est pas exclu que l'expression ou l'activité des autres enzymes de synthèse soit également régulées négativement au cours du développement.

Suite à l'induction d'une inflammation périphérique chez le rat adulte, la production endogène de stéroïdes 3 α 5 α -réduits est réactivée dans la lamina II (Poisbeau et al., 2005), ce qui induit une augmentation de la durée des courants synaptiques inhibiteurs impliquant les récepteurs GABA_A et la réapparition de CPSI mixtes GABA/glycine. Cette réactivation de la synthèse des stéroïdes 3 α 5 α -réduits est liée à une régulation positive de la TSPO et peut-être des autres enzymes de synthèse.

Lors d'une douleur neuropathique induite par le modèle de ligature lâche (Bennett et Xie, 1988), la quantité d'ARN messager de la P450_{scc} augmente fortement dans la corne dorsale ipsilatérale. Le nombre de neurones exprimant la protéine p450_{scc} est augmenté de 45% (Patte Mensah et al., 2004a). Par ailleurs, dans ce modèle de douleur neuropathique, les stéroïdes 3 α 5 α -réduits atténuent l'hyperalgie thermique et mécanique (Pathirathna et al.,

2005). Bien que fortement envisageable, une régulation de la TSPO dans ce modèle n'a pas été démontrée.

L'ensemble de ces résultats suggère que les enzymes de synthèse des stéroïdes $3\alpha5\alpha$ -réduits sont présentes dans la corne dorsale de la moelle épinière chez le rat adulte. La p450scc serait quant à elle principalement confinée à la lamina II. Cependant, actuellement, aucune donnée ne permet de conclure à la fonctionnalité de ces enzymes et par conséquent il est difficile de savoir si la synthèse de stéroïdes $3\alpha5\alpha$ -réduits est généralisée à toute la corne dorsale de la moelle épinière et si la transmission synaptique GABAergique dans les laminae III-IV est placée sous le tonus modulateur de ces stéroïdes, comme c'est le cas dans la lamina II.

Objectifs de la thèse

Les états d'hyperalgésie et d'allodynie caractérisent un grand nombre de douleurs (inflammatoires, neuropathiques, cancéreuses) et se développent souvent assez rapidement après une lésion ou une inflammation périphérique ou centrale du système nerveux. Bien que ces états hyperalgésiques et allodyniques soient bien documentés dans les modèles animaux et en clinique humaine, très peu de choses sont connues en ce qui concerne les mécanismes neurophysiologiques et les réseaux neuronaux qui les sous-tendent, notamment en ce qui concerne les allodynies.

L'intégration des informations en provenance de la périphérie implique des neurones excitateurs et inhibiteurs. La transmission synaptique inhibitrice joue un rôle essentiel dans l'intégration et la modulation des informations somatosensorielles nociceptives (lamina II) et non nociceptives (laminae III-IV). Cette transmission met en jeu l'acide γ -aminobutyrique (GABA) et la glycine par l'intermédiaire de récepteurs-canaux GABA_A et de la glycine.

La transmission synaptique inhibitrice mettant en jeu les récepteurs GABA_A est fortement impliquée dans la modulation spinale de ces messages sensoriels. Les stéroïdes 3 α 5 α -réduits sont des modulateurs allostériques positifs du récepteur GABA_A et peuvent être synthétisés dans la moelle épinière. Dans la lamina II, cette synthèse est élevée durant les 15 premiers jours après la naissance, puis diminue au cours du développement postnatal jusqu'à des niveaux où les stéroïdes 3 α 5 α -réduits n'ont plus d'effet modulateur détectable sur les récepteurs GABA_A (Keller et al., 2004). Notre laboratoire a montré récemment que lors d'une inflammation périphérique chez le rat adulte, la production endogène de stéroïdes 3 α 5 α -réduits était réactivée (Poisbeau et al., 2005), ce qui entraîne une augmentation de la durée des courants synaptiques inhibiteurs impliquant les récepteurs GABA_A.

A l'heure actuelle, alors que la transmission inhibitrice a été bien étudiée dans la lamina II, très peu de choses sont connues sur les propriétés de l'inhibition synaptique dans les laminae III et IV de la moelle épinière. Par ailleurs, il n'existe aucune donnée sur l'éventuelle modulation de la transmission GABAergique dans les laminae III et IV, par des stéroïdes 3 α 5 α -réduits endogènes.

Par conséquent, **le but de mon travail de thèse** a été de :

1. Caractériser les propriétés de la transmission synaptique inhibitrice (GABA/glycine) dans les laminae III et IV de la corne dorsale de la moelle épinière lombaire et de les comparer à celles de la transmission inhibitrice dans la lamina II.
2. Déterminer l'existence d'une modulation de la transmission GABAergique dans les laminae III et IV par les stéroïdes $3\alpha5\alpha$ -réduits endogènes et de mettre en évidence d'éventuelles différences de neurostéroïdogénèse entre les couches III-IV et II.
3. Caractériser la plasticité de la transmission synaptique inhibitrice et de la synthèse endogène de stéroïdes $3\alpha5\alpha$ -réduits dans les laminae III et IV consécutive à une inflammation périphérique.

Pour cela, nous avons réalisé des enregistrements électrophysiologiques (patch-clamp en configuration cellule-entière) de neurones dans des tranches aiguës de moelle épinière de rat et nous avons comparé les propriétés de la transmission synaptique inhibitrice miniature dans les laminae II et III-IV.

Matériels et Méthodes

I. Animaux et traitements

1. Animaux utilisés

L'ensemble de cette étude a été réalisée sur des rats mâles Sprague-Dawley et Wistar. Ces animaux sont nés et élevés dans notre animalerie, avec nourriture et eau à volonté, et soumis à une photopériode jour/nuite de 12heures/12heures.

Toutes les expérimentations animales ont été effectuées en conformité avec la législation européenne (directive 86/609/CEE du Conseil de l'Europe du 24 novembre 1986) et avec l'autorisation du Ministère français de l'agriculture (Licence N°. 67-107 de R.Schlichter).

Trois groupes d'animaux ont été formés en fonction de l'âge post-natal (P) auquel les animaux ont été utilisés : $P < 8$ jours, $9 < P < 15$ jours, et $P > 21$ jours.

2. Induction de l'inflammation

Nous avons utilisé le modèle de douleur inflammatoire induit par injection sous-cutanée de carragénine dans la patte postérieure qui produit une inflammation aiguë associée à de l'hyperalgie (Kayser et Guilbaud, 1987 ; Hargreaves et al., 1988 ; Joris et al., 1990) et un œdème ipsilatéral (Winter et al., 1962). La carragénine est un polysaccharide sulfaté linéaire extrait d'algues marines, qui, lors de son injection, entraîne la formation d'un œdème et la mise en place d'une douleur inflammatoire. Nous avons choisi ce modèle car il est classiquement utilisé dans la littérature. Par ailleurs, plusieurs études au laboratoire l'ont déjà bien caractérisé par des approches cellulaires et intégrées.

La carragénine- λ (Sigma-Aldrich) est utilisée à 3% diluée dans une solution de NaCl à 9%. Un volume de 10 μ L est injecté aux rats âgés de 9 à 15 jours, et un volume de 100 μ L à ceux âgés de plus de 21 jours.

Une injection unilatérale (patte gauche) intraplantaire est utilisée pour les tests comportementaux et les marquages immunohistochimiques, et une injection bilatérale est effectuée pour les enregistrements électrophysiologiques. L'injection est réalisée à l'aide

d'une aiguille de 30 gauges (rat de 9 à 15 jours) ou de 26 gauges (rats de plus de 21 jours), par voie sous-cutanée.

Les animaux du groupe contrôle reçoivent la même injection, mais avec uniquement la solution saline.

3. Injection sous-cutanée

Pour certaines expériences, les rats ont reçu une injection sous-cutanée de progestérone à 75 mg/kg. La progestérone (Sigma) est préparée dans de l'éthanol absolu à 75 mg/mL (7.5 %), puis diluée à 13% dans de l'huile d'olive vierge. Le volume injecté est ajusté en fonction du poids de l'animal. Une simple injection est réalisée en sous-cutané au niveau de la peau de la nuque des rats âgés de 9 à 15 jours.

Les animaux du groupe contrôle reçoivent la même injection, mais avec uniquement l'éthanol absolu dilué à 13% dans de l'huile d'olive.

Les injections sont réalisées entre 30 min et 2 heures avant le sacrifice de l'animal.

Tableau 4 : Composition en mM du sucrose-ACSF et de l'ACSF

	Sucrose-ACSF	ACSF
Sucrose	248	-
NaCl	-	126
NaH ₂ PO ₄	1,25	1,25
KCl	2	2,5
CaCl ₂	2	2
MgCl ₂	-	2
MgSO ₄	1,3	-
NaHCO ₃	26	26
Glucose	11	10

Tableau 5 : Substances pharmacologiques utilisées en incubation

Substance	Concentration	Temps minimum	Source
PK11195 (PK)	10 µM	>5 heures	Tocris, UK
Finastéride (Fina)	50 µM	>3 heures	Steraloids Inc, USA
Diazépam (Diaz)	1 µM	>3 heures	Sigma, France
Flumazénil (Flu)	10 µM	>3 heures	Roche, Basel
22(R)-OH-Cholestérol (22OH-Chol)	100 nM	>3 heures	Sigma, France
Pregnénolone (Preg)	100 nM	>3 heures	Sigma, France
Progestérone (Prog)	100 nM	>1 heure	Sigma, France
3α-Dihydroprogestérone (DHP)	100 nM	>1 heure	Sigma, France
Indométhacine (Indo)	10 µM	>3 heures	Sigma, France

II. Préparation des tranches transversales de moelle épinière

1. Dissection et réalisation des tranches

Les rats sont anesthésiés par une injection intra-péritonéale de kétamine (75 mg/kg Merial) et sacrifiés par décapitation. L'ensemble de la dissection est réalisée dans une solution de sucrose-ACSF (sACSF) dont la composition est indiquée dans le tableau 4. Le sACSF (Artificial CerebroSpinal Fluid) est toujours utilisé réfrigéré à 0-4°C et équilibré avec du carbogène (95% O₂/5% CO₂).

La moelle épinière est prélevée par extrusion hydraulique comme précédemment décrit (Chery et De Koninck, 1999). Brièvement, après avoir décapité l'animal, la peau du dos de l'animal est incisée et la colonne vertébrale est sectionnée aux niveaux sacré et cervical. Une pointe de micropipette automatique (200 µL) adaptée sur une seringue de 20 mL remplie de sACSF froid (0-4°C), est insérée dans le canal rachidien du côté sacré. L'injection de sACSF dans le canal vertébral permet d'expulser la moelle épinière du côté cervical (Figure 24-1). La moelle est ensuite rapidement transférée dans une boîte de Pétri remplie de sACSF froid.

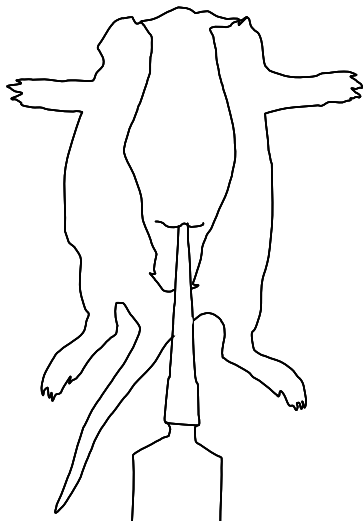
Le renflement lombaire de la moelle épinière est isolé (Figure 24-2) et placé dans un cube d'agarose à 5% (préalablement polymérisé). A cet effet, une gouttière d'une taille légèrement inférieure à celle de la moelle est découpée dans un bloc d'agar (Figure 24-3). Ceci permet le bon maintien de la moelle lors du tranchage. Le cube contenant la moelle est alors collé sur la platine du vibratome (Leica VT1000) dont la cuve est remplie de sACSF froid. Des tranches transversales de 600 µm sont réalisées, puis conservées à température ambiante sur un filet de nylon dans une boîte de stockage remplie avec de l'ACSF bullé (95% O₂/5% CO₂ ; tableau 4 ; Figure 24-4 et 5),

2. Incubation des tranches

Pour des traitements pharmacologiques nécessitant une exposition supérieure à une heure, les tranches sont pré-incubées dans l'ACSF complété avec la (les) substance(s). Les différentes drogues utilisées en incubation sont présentées dans le tableau 5, ainsi que leur concentration d'utilisation et le temps minimum d'incubation.

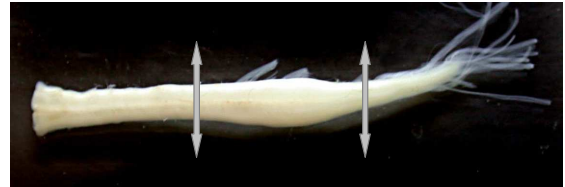
Tous les stéroïdes sont préparés sous forme de solutions stock concentrées 1000 fois dans de l'éthanol absolu, conservées au réfrigérateur (4°C). Toutes les substances sont diluées à leur concentration finale dans l'ACSF au début de chaque expérience.

1-Prélèvement de la moelle épinière

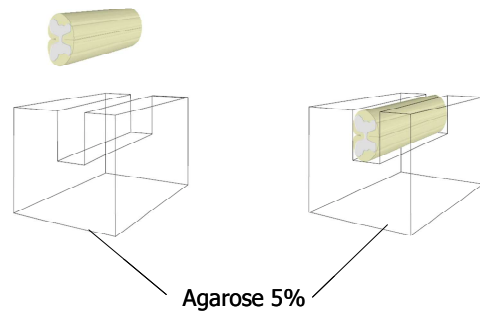


Pression hydraulique exercée dans le canal rachidien avec du s-ACSF 0-4°C

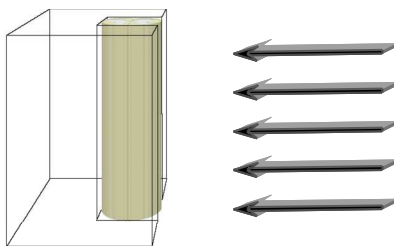
2-Sélection du segment lombaire



3-Inclusion dans l'agarose

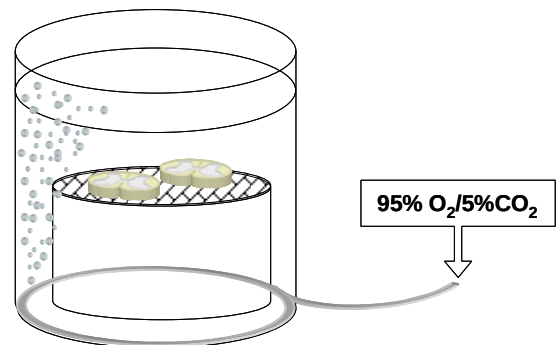


4-Coupe au vibratome



- coupes de 600 μm d'épaisseur
- sucrose-ACSF à 0-4°C

5-Stockage des tranches



- ACSF à température ambiante (20-22 °C)

Figure 24 : Prélèvement de la moelle épinière de rat par extrusion hydraulique et réalisation de tranches transversales de 600 μm d'épaisseur.

III. Enregistrements électrophysiologiques

1. Technique utilisée et type d'enregistrement

Dans cette étude, nous nous intéressons à la transmission synaptique inhibitrice dans la corne dorsale de la moelle épinière et à la modulation endogène de cette dernière par les stéroïdes $3\alpha5\alpha$ -réduits. Pour cela, nous avons étudié les caractéristiques des courants postsynaptiques inhibiteurs (CPSI). Les enregistrements ont été effectués en mode potentiel imposé en utilisant la configuration « cellule entière » du patch-clamp.

Les canaux sodium activés par le potentiel de membrane ont été bloqués par l'ajout de tétrodotoxine $0,5 \mu\text{M}$ (Latoxan) dans le milieu extracellulaire. Ceci a pour conséquence d'empêcher la genèse de potentiels d'action (PA) Na^+ -dépendants et de permettre l'enregistrement de courants post-synaptiques miniatures (CPSm), c'est-à-dire résultant de la libération spontanée de neurotransmetteur se produisant à des sites synaptiques unitaires. En effet, la genèse de PA dans l'élément pré-synaptique étant impossible, la synchronisation des différents sites de libération des neurotransmetteurs est peu probable, et la détection de la libération d'une seule vésicule de neurotransmetteur est fortement privilégiée, d'autant plus que la fréquence de libération spontanée est très faible dans notre préparation (en général $< 1 \text{ kHz}$, voir résultats). L'analyse des propriétés des CPSI miniatures donne des informations sur l'élément unitaire de la transmission synaptique (quantum). Un effet modulateur pré-synaptique se traduira par un changement de la fréquence d'apparition des événements. Par contre, dans le cas d'un effet postsynaptique, on s'attendra surtout à une modification de la cinétique des CPSI miniatures, qui dépend du nombre de récepteurs disponibles et de leurs caractéristiques structurales (composition en sous-unités) et fonctionnelles (état de phosphorylation, présence de modulateurs endogènes, etc.).

La transmission excitatrice impliquant les récepteurs ionotropiques glutamatergiques a été bloquée en ajoutant 2 mM d'acide kynurénique (Fluka) au milieu extracellulaire. Par conséquent, dans nos conditions expérimentales, nous n'enregistrons que les courants postsynaptiques inhibiteurs miniatures (CPSIm).

Les CPSIm GABAergiques et glycinergiques peuvent être distingués selon la cinétique de leur phase de désactivation (voir résultats). Ils peuvent également être isolés grâce à des moyens pharmacologiques. L'ajout de strychnine ($1 \mu\text{M}$, Sigma) ou de bicuculline (10

μM , Sigma) au milieu extracellulaire permet de bloquer respectivement les récepteurs de la glycine et les récepteurs GABA_A .

2. Montage expérimental

a. Chambre d'enregistrement et milieux extracellulaires

Pour les enregistrements électrophysiologiques, la tranche est transférée dans une chambre de perfusion à interface (Figure 25). La chambre de perfusion est composée d'une antichambre dans laquelle le milieu extracellulaire (ACSF) s'écoule par gravité. L'antichambre est reliée à la chambre principale par de petits orifices. L'évacuation du milieu se fait par gravité grâce à un papier buvard. Ce système permet de garder un niveau constant de liquide à la limite du bord supérieur de la tranche. L'électrode de référence constituée d'un fil d'argent chloruré baigne dans le milieu extracellulaire au niveau de l'antichambre.

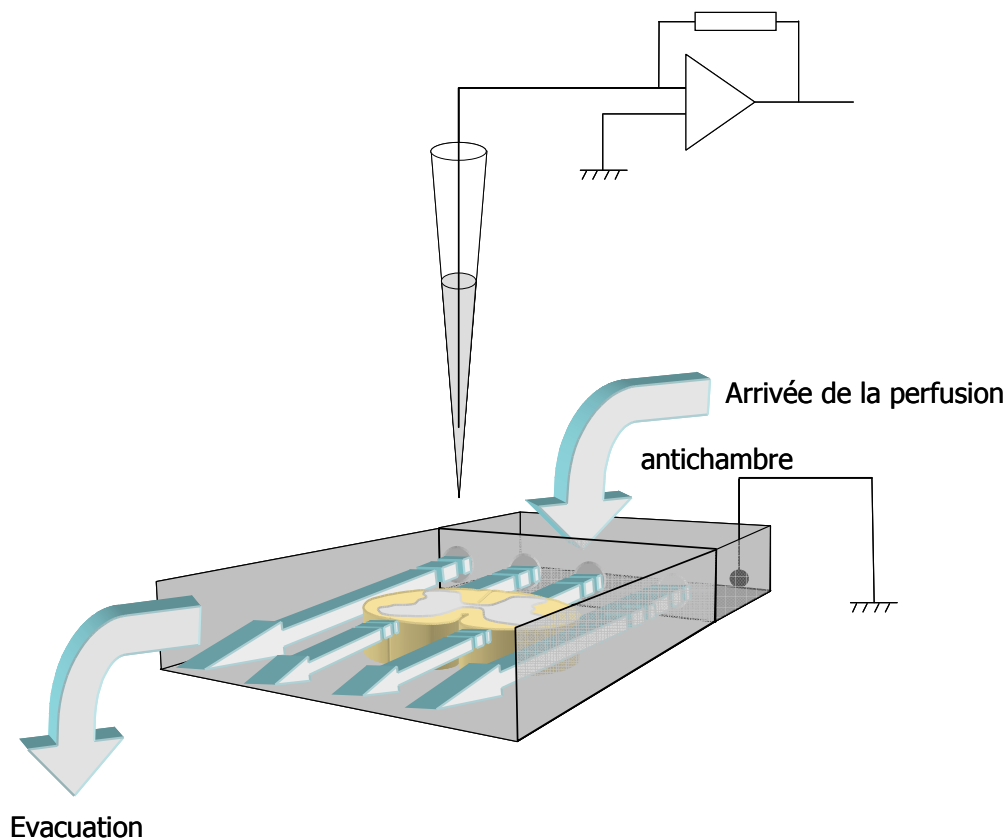


Figure 25 : Chambre de perfusion

La chambre de perfusion est placée sous une loupe binoculaire qui permet de visualiser la tranche en lumière transmise. La lamina II est reconnaissable par son aspect de croissant translucide gris (Figure 26).

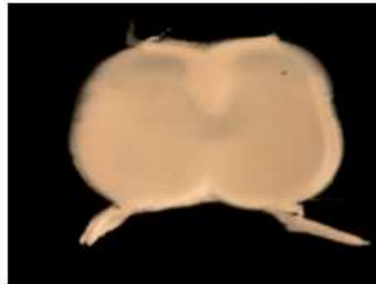


Figure 26 : Tranche de moelle épinière lombaire visualisée en lumière transmise

b. Pipettes et milieux intrapipette

Les pipettes sont fabriquées à partir de capillaires de borosilicate (diamètre externe = 1.2 mm ; diamètre interne = 0.69 mm ; Havard Apparatus, USA). Les capillaires sont étirés avec une étireuse horizontale à laser (P-200, Sutter Instruments, USA) avec 3 étirements successifs. Les micropipettes sont remplies avec le milieu suivant (en mM) : CsCl 126, MgCl₂ 2, HEPES 10, Biocytine 10. Les résistances électriques des pipettes, mesurées dans le milieu ACSF, sont comprises entre 3 et 6 MΩ.

L'osmolarité du milieu est vérifiée grâce à un osmomètre et ajustée à 300 ± 10 mOsm (mesurés) grâce à l'ajout de 35 mM de sucrose au milieu intrapipette. Le pH est ajusté à 7.3 avec CsOH. Le potentiel d'équilibre des ions chlorure est fixé à 0 mV.

La biocytine contenue dans le milieu intrapipette est utilisée pour marquer la cellule enregistrée, de façon à préciser ultérieurement sa localisation dans la tranche et à caractériser sa morphologie.

La pipette est fixée sur le porte-électrode du préamplificateur (CV 203BU, Axon Instruments) relié à un amplificateur (Axopatch 200B, Axon Instruments). La pipette est placée selon un axe vertical au dessus de la zone d'intérêt dans la tranche, visualisée grâce à

la loupe binoculaire, et descendue grâce à un micromanipulateur. La suite des opérations est réalisée à l'aveugle, en suivant uniquement l'évolution des signaux électriques enregistrés et visualisés par le logiciel d'acquisition pClamp 6 (Axon Instruments).

3. Déroulement des enregistrements

Afin d'éviter l'obturation de sa pointe, une surpression est appliquée à l'intérieur de la pipette. Un créneau de potentiel transitoire, ΔV , de 5 mV est appliqué à la pipette (Figure 27-P1) à une fréquence de 50 Hz. Le courant $\Delta I = \Delta V/R$ qui en résulte donne une mesure de la résistance de la pipette, plongée dans le milieu puis dans la tranche (Figure 27-A). Si celle-ci est convenable, la descente est poursuivie lentement jusqu'à ce qu'une cellule se présente devant la pointe de la pipette. Cela entraîne une augmentation de la résistance et donc une diminution du courant nécessaire pour réaliser le saut de potentiel (Figure 27-B et C). A ce moment, la surpression est relâchée et une légère pression négative est appliquée à l'intérieur de la pipette pour coller la membrane de la cellule à la pointe de la pipette (Figure 27-D). Le potentiel de maintien est alors fixé à -60 mV (Figure 27-P2). Les courants capacitifs transitoires dus à la capacité de la pipette sont compensés électroniquement grâce à un dispositif interne à l'amplificateur. Nous sommes en configuration « cellule attachée » (Figure 27-E). Une aspiration légère et franche est alors appliquée à l'intérieur de la pipette pour passer en configuration « cellule-entière ». De larges courants capacitifs, dus à la capacité de la membrane cellulaire, apparaissent (Figure 27-F), et sont compensés (Figure 27-G). Les enregistrements peuvent débuter.

4. Acquisition et stockage des données

Les courants synaptiques sont visualisés sur un oscilloscope (Tektronix 2211). L'acquisition est faite avec un filtre passe-bas à 5 kHz. Les enregistrements sont d'une part numérisés à 20 kHz et stockés sur bande vidéo, d'autre part numérisés à 10 kHz et enregistrés sur l'ordinateur avec le module Fetchex de pClamp 6. A la fin de l'enregistrement, la pipette est retirée délicatement.

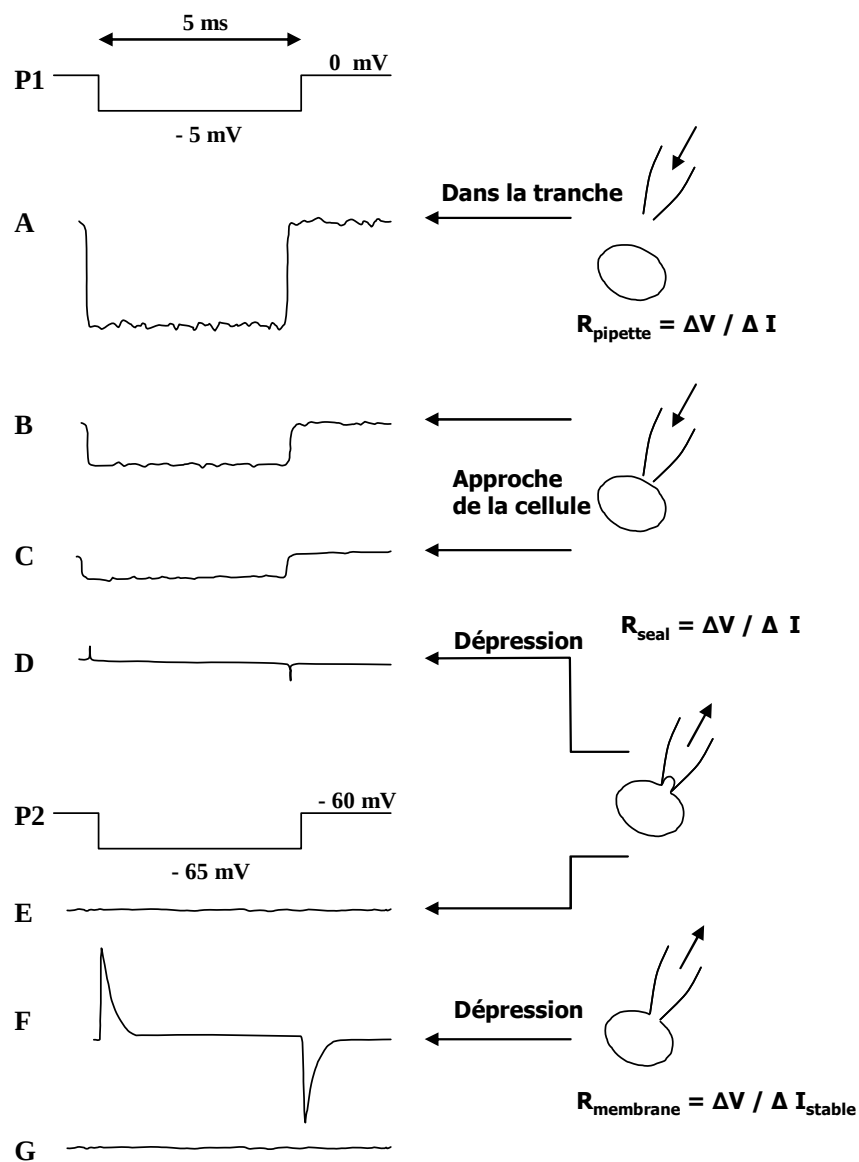


Figure 27 : Réalisation de la configuration "cellule-entière"

(d'après Joffre, 2001).

5. Révélation de la biocytine

La tranche est transférée dans une petite capsule remplie de para-formaldéhyde 4% dans du tampon phosphate (PB, 0.1 M) pour fixer le tissu et révéler la biocytine.

Après 3 lavages de 10 minutes au PBS, la tranche est incubée durant une nuit avec de l'extravidine couplée à la FITC (1/400, Sigma, France) ou avec de la streptavidine couplée à du marina-blue (1/100, Molecular Probes, USA). Après 3 lavages de 10 minutes au PBS, la tranche est montée entre lame et lamelle avec du milieu de montage Vectashield (Vector Laboratories). L'observation au microscope à fluorescence (Leica LEITZ DMRD) nous permet de vérifier la localisation du neurone injecté et d'observer sa morphologie.

Dans certains cas, nous avons révélé la protéine kinase C de type γ simultanément à la biocytine. En effet, la PKC γ est exprimée par les neurones situés dans la partie la plus ventrale de la lamina II et dans la partie la plus dorsale de la lamina III (Polgar et al., 1999a). Il s'agit donc d'un bon marqueur de la limite entre la lamina II et la lamina III.

Pour réaliser le double marquage, les tranches de 600 μ m sont individuellement incluses dans de l'agar à 2% et recoupées en tranches de 50 μ m d'épaisseur. Après 3 lavages de 10 minutes avec du PBS, les sites aspécifiques sont saturés avec du sérum de chèvre à 10 % (Dutscher, France) dans du PBS-T (PBS complété avec du triton à 0.1%) durant 45 minutes. Puis les tranches sont incubées pendant une nuit en chambre froide, sous agitation permanente, avec l'anticorps primaire anti-PKC γ produit chez le lapin (1/10000, Santa Cruz) et la streptavidine couplée à du marina-blue (1/100, Molecular probes). Le lendemain, 3 rinçages de 10 minutes avec du PBS sont réalisés. Puis les tranches sont incubées pendant 2 h avec un anticorps anti-lapin couplé à la FITC, produit chez la chèvre (1/800, Biosys). Pour finir, 3 rinçages de 10 minutes avec du PBS sont réalisés et les tranches sont montées entre lame et lamelle avec du milieu de montage Vectashield (Vector Laboratories).

6. Analyse des données

a. Détection des CPSIm

Pour la détection des courants synaptiques, nous avons utilisé le module Electrophysiology Data Recorder (WinEDR, version 2.4.8, Strathclyde Electrophysiology Software, © John Dempster, Université de Strathclyde, Glasgow, UK). Les évènements ont été détectés avec une méthode de ligne de base mobile recherchant des variations d'amplitude supérieures à un seuil donné. Nous avons configuré le logiciel pour détecter comme un évènement tout écart par rapport à la ligne de base supérieur à 3 pA sur une période de 1 ms. Tous les éléments détectés sont ensuite examinés individuellement par inspection visuelle et les erreurs de détection sont rejetées.

b. Ajustement des CPSIm

Pour l'ajustement des courants synaptiques, nous avons utilisé le module Whole Cell Program (WinWCP, version 3.5.8, Strathclyde Electrophysiology Software, © John Dempster, Université de Strathclyde, Glasgow, UK).

i) Transmission inhibitrice

Dans notre préparation, nous avons détecté des courants synaptiques inhibiteurs GABAergiques et glycinergiques. Ces courants présentaient une phase décroissante pouvant être décrite par une constante de temps monoexponentielle. Les CPSI GABAergiques étaient caractérisés par une constante de temps de désactivation monoexponentielle lente (>15 ms) tandis que les CPSI glycinergiques possédaient une constante de temps de désactivation monoexponentielle rapide (<13 ms).

La fonction de décroissance monoexponentielle utilisée :

$$y(x) = A * \exp(-x / \tau)$$

est définie par deux paramètres : l'amplitude A (en pA) et la constante de temps de décroissance τ_{decay} (en ms).

Nous avons également observé des CPSI dit mixtes, qui avaient une cinétique de désactivation ajustée par une fonction biexponentielle avec une constante de temps rapide comparable à celle des CPSIm glycinergiques et une constante de temps lente comparable à celle des CPSIm GABAergiques.

La fonction de décroissance biexponentielle :

$$y(x) = A1 * \exp(-x / \tau_1) + A2 * \exp(-x / \tau_2)$$

est définie par 4 paramètres : les amplitudes A1 et A2 (en pA) et les constantes de temps τ_1 et τ_2 (en ms).

Afin de séparer les trois types de CPSI, nous avons procédé en 2 étapes. Un premier ajustement de l'ensemble des CPSIm a été réalisé avec une fonction monoexponentielle. Les CPSIm ont ensuite été examinés individuellement. Un CPSIm correctement ajusté avec la fonction monoexponentielle, et avec une constante de temps rapide (<13 ms), était classé CPSIm glycinergique. Un CPSIm correctement ajusté avec la fonction monoexponentielle, et avec une constante de temps lente (>15 ms), était classé CPSIm GABAergique. Cette classification a été vérifiée dans un certain nombre de cas en montrant que les CPSI avec des constantes de temps inférieures à 13 ms étaient supprimés en présence de strychnine (1 μ M) et ceux avec des constantes de temps supérieur à 15 ms étaient bloqués par la bicuculline (10 μ M) (voir la 2ème partie des résultats). Lorsqu'un CPSI n'était pas ajustable avec une fonction monoexponentielle, nous l'avons ajusté avec une biexponentielle. Si l'ajustement était correct, cet événement était classé comme CPSIm mixte.

Enfin, si un courant n'était ajustable ni avec une fonction monoexponentielle, ni avec une fonction biexponentielle, il était rejeté de l'analyse.

Dans le logiciel, la fenêtre d'ajustement est divisée en 2 parties. La partie haute permet de visualiser le courant et l'ajustement réalisé. La partie inférieure indique la somme des carrés des différences entre la trace enregistrée et la trace théorique. Ceci est pour nous un très bon indicateur de la qualité de l'ajustement.

ii) Transmission GABAergique

Les CPSI GABAergiques isolés pharmacologiquement sont des courants avec une phase d'activation et une phase de désactivation toutes deux monoexponentielles. Pour ajuster ces courants, nous avons utilisé la fonction EPC (« endplate current ») du logiciel, qui nous permettait d'ajuster le déroulement des événements dans son intégralité.

La fonction EPC utilisée :

$$y(x) = A * 0.5 * (1 + \text{erf}(x / \tau_{\text{rise}})) * \exp(-x / \tau_{\text{decay}})$$

est définie par 3 paramètres : l'amplitude A (en pA), la constante de temps d'activation τ_{rise} (en ms) et la constante de temps de désactivation τ_{decay} (en ms)

c. Représentation des données

Pour chaque événement, nous avons mesuré plusieurs paramètres : l'amplitude du courant (en pA), la constante de temps d'activation (τ_{rise} en ms), la constante de temps de désactivation (τ_{decay} en ms). La fréquence moyenne d'apparition des événements est elle aussi calculée (inverse de l'intervalle entre les événements). La valeur moyenne de chaque paramètre est calculée pour chaque neurone enregistré.

d. Analyse statistique

Les analyses statistiques ont été réalisées avec le logiciel Statistica 5.1 en utilisant une ANOVA multifactorielle portant sur les facteurs traitement, âge, lamina. Lorsque les effets étaient significatifs, les comparaisons multiples entre groupes ont été faites avec le test posthoc de Tukey.

Dans le cas d'un traitement pharmacologique aigu, les données moyennes ont été comparées avant et après l'application de la drogue sur la même cellule. Dans ce cas nous avons utilisé une ANOVA avec mesures répétées.

IV. Marquages immunocytochimiques

1. Préparation des tranches de moelles épinières fixées.

Les animaux sont anesthésiés par une injection intra-péritonéale d'uréthane à 30 %. La cage thoracique est ouverte et une aiguille reliée à une pompe péristaltique est insérée dans le ventricule droit du cœur. L'oreillette gauche est incisée pour permettre l'évacuation du liquide de perfusion. Le système circulatoire est tout d'abord rincé par perfusion de PBS, puis la fixation est réalisée avec du PAF à 4% dans du tampon phosphate 0,1 M.

- Les rats âgés de 15 jours sont perfusés avec un débit de 7,5 mL/min, avec 30 mL de PBS, puis 75 mL de PAF.
- Les rats âgés de plus de 21 jours sont perfusés avec un débit de 30 mL/min, avec 150 mL de PBS, puis 300 mL de PAF 4%.

Après perfusion, la moelle épinière est prélevée et post-fixée avec du PAF 4 % dans du tampon phosphate (0,1 M ; pH 7,4) pendant 24 h au réfrigérateur.

Après la post-fixation, la moelle est conservée dans du PBS complété avec du thimérosal (Sigma, France). Une marque est réalisée dans la corne ventrale droite afin de latéraliser les tranches. La partie lombaire de la moelle est isolée et incluse dans de l'agar 2%, puis des tranches transversales de 50 μ m sont réalisées au vibratome (Leica VT1000S). Les coupes sont stockées dans du PBS-thimérosal au réfrigérateur.

Tableau 6 : Composition des tampons utilisés pour les marquages immunologiques.

	1 litre de PBS 1x	1 litre de PB à 0,2 M
NaCl	9 g	-
Na ₂ HPO ₄ (12 H ₂ O)	1,86 g	58 g
NaH ₂ PO ₄ (1 H ₂ O)	0,346 g	5,28 g

Tableau 7 : Anticorps primaires utilisés

Anticorps Primaire	Référence	Dilution
Ac polyclonal de cochon d'Inde anti-GlyT2	Chemicon, Allemagne	1/5000
Ac monoclonal anti-GAD67	Chemicon, Allemagne	1/2500
Ac polyclonal de lapin anti-PKCγ	SantaCruz, USA	1/10000
Ac monoclonal anti-GFAP	Sigma, France	1/1000
Ac polyclonal de lapin anti-GFAP	US Biological, USA	1/500
Ac polyclonal de lapin anti-P450scc	Chemicon, Allemagne	1/5000
Ac polyclonal de lapin anti-PBR	Don du Dr Papadopoulos	1/500
Ac polyclonal de lapin anti-PAP7	Don du Dr Papadopoulos	1/500
Ac monoclonal anti-NeuN	Chemicon, Allemagne	1/5000
Ac polyclonal de lapin anti-StAR	Abcam, UK	1/500

Tableau 8 : Anticorps secondaires utilisés

Anticorps secondaire	Référence
Anti-lapin conjugué FITC produit chez la chèvre	Biosys, France
Anti-lapin conjugué Cy3 produit chez l'âne	Jackson ImmunoResearch, USA
Anti lapin conjugué AMCA produit chez l'âne	Jackson ImmunoResearch, USA
Anti-souris conjugué FITC produit chez l'âne	Jackson ImmunoResearch, USA
Anti-souris conjugué Cy3 produit chez l'âne	Jackson ImmunoResearch, USA
Anti-cochon d'Inde conjugué FITC produit chez l'âne	Chemicon, Allemagne

2. Immunohistochimie

Nous avons réalisé des marquages par la technique d'immunofluorescence sur coupe flottante. Le protocole utilisé est le suivant :

- 3 fois 10 minutes de rinçage avec du PBS.
- 45 minutes d'incubation avec du sérum (10% dans du PBS-T) de l'espèce productrice de l'anticorps secondaire pour saturer les sites aspécifiques.
- Les tranches sont incubées toute la nuit à 4 °C sur un plateau agitateur, avec le(s) anticorps primaire(s) dilués dans du PBS-T. Les différents anticorps primaires utilisés sont indiqués dans le tableau 7, ainsi que la dilution à laquelle ils ont été utilisés.
- 3 fois 10 minutes de rinçage avec du PBS.
- 2 h d'incubation avec l'anticorps secondaire (Tableau 8) dilué au 1/2000 dans du PBS-T.
- 3 fois 10 minutes de rinçage avec du PBS

Les coupes sont alors montées entre lame et lamelle avec du milieu de montage Vectashield (normal ou hardest). Un contrôle négatif est effectué pour chaque expérience en suivant le même protocole, mais sans anticorps primaire.

Les images numériques des coupes sont acquises à l'aide d'un microscope Leica LEITZ DMRD.

Résultats

Article 1

**Contribution différentielle de la transmission GABAergique
et glycinergique dans la lamina II et les laminae III-IV
de la corne dorsale de la moelle épinière de rat**

Situation du sujet

Dans un premier temps, nous avons cherché à caractériser les propriétés de la transmission synaptique inhibitrice globale dans la corne dorsale de la moelle épinière. Nous avons étudié cette transmission synaptique inhibitrice dans les laminae III-IV puis nous avons comparé ses propriétés à celles de la lamina II.

Dans la corne dorsale, la transmission synaptique inhibitrice est portée par le GABA et la glycine. Nous avons observé que dans les laminae III-IV, tous les neurones enregistrés recevaient des entrées synaptiques GABAergiques et glycinergiques. Dans la lamina II, 55% des neurones reçoivent des entrées synaptiques GABAergiques et glycinergiques ; alors que les 45% des neurones ne reçoivent qu'une composante synaptique GABAergique.

Dans les laminae III-IV, la transmission glycinergique est prépondérante, alors que la transmission GABAergique est dominante dans la lamina II. D'autre part, une fraction de synapses inhibitrices dans la lamina II co-libèrent du GABA et de la glycine et la co-détection de ces deux neurotransmetteurs est possible dans des conditions où il y a une synthèse endogène de stéroïdes $3\alpha,5\alpha$ -réduits. En revanche, nous n'avons jamais détecté cette co-transmission dans les laminae III-IV, même dans des conditions où la production endogène de stéroïdes est stimulée, comme par exemple lors de l'incubation des tranches avec de la progestérone, l'injection sous-cutanée de progestérone ou l'induction d'une inflammation périphérique.

Nos résultats indiquent qu'il existe des différences dans les propriétés des transmissions synaptiques inhibitrices dans la lamina II et les laminae III-IV qui pourraient sous-tendre des différences dans la modulation et l'intégration des informations sensorielles en fonction de la région de la corne dorsale concernée.

Differential contribution of GABAergic and glycinergic components to inhibitory synaptic transmission in lamina II and laminae III–IV of the young rat spinal cord

Perrine INQUIMBERT, Jean-Luc RODEAU, Rémy SCHLICHTER

European Journal of Neuroscience, 2007, vol. 26, n° 10, pages 2940-2949

Pages 90-99 :

La publication présentée ici dans la thèse est soumise à des droits détenus par un éditeur commercial.

Les utilisateurs de l'UdS peuvent consulter cette publication sur le site de l'éditeur :

<http://www3.interscience.wiley.com/cgi-bin/fulltext/118542737/PDFSTART>

La version imprimée de cette thèse peut être consultée à la bibliothèque ou dans un autre établissement via une demande de prêt entre bibliothèques (PEB) auprès de nos services :

<http://www-sicd.u-strasbg.fr/services/peb/>

Article 2

**Dans la corne dorsale de la moelle épinière de rat,
le transport mitochondrial du cholestérol détermine les différences
régionales de cinétiques de désactivation des CPSIm GABAergiques**

Situation du sujet

Après avoir caractérisé les propriétés de la transmission synaptique inhibitrice globale, nous avons étudié la transmission synaptique GABAergique et sa modulation différentielle par la synthèse locale de stéroïdes $3\alpha5\alpha$ -réduits.

Dans le système nerveux central, la transmission synaptique inhibitrice passant par l'activation des récepteur $GABA_A$ joue un rôle fondamental dans l'intégration des messages sensoriels. Les stéroïdes $3\alpha5\alpha$ -réduits sont de puissants modulateurs allostériques positifs du récepteur $GABA_A$. De plus, ils peuvent être synthétisés localement dans la lamina II de la moelle épinière et ainsi potentialiser la transmission synaptique GABAergique. Cette synthèse endogène, forte durant les premiers jours après la naissance, diminue à partir du 15^{ème} jour de vie postnatale. Chez l'animal adulte, cette synthèse n'est plus détectée, mais peut être stimulée pharmacologiquement ou lors d'une inflammation périphérique. Alors que beaucoup d'études ont caractérisé la transmission synaptique GABAergique dans la lamina II et sa modulation par les neurostéroïdes, très peu d'informations claires sont disponibles à ce sujet en ce qui concerne les laminae III-IV.

Nous avons donc décidé de commencer par caractériser la transmission GABAergique dans les laminae III-IV et de comparer ses propriétés à celle observées dans la lamina II de la corne dorsale de la moelle épinière de rat. Nous avons réalisé cette partie de l'étude sur des rats âgés de 10 à 15 jours afin de se placer à un stade du développement où la synthèse endogène de stéroïdes $3\alpha5\alpha$ -réduits est maximale dans la lamina II, ce qui se traduit par des courants postsynaptiques GABAergiques avec des cinétiques de désactivation très lentes. Ceci va nous permettre d'évaluer si cette synthèse est aussi présente dans les laminae plus profondes III et IV ; ou encore si les stéroïdes $3\alpha5\alpha$ -réduits synthétisés dans la lamina II diffusent vers les couches plus profondes. Puis nous avons cherché à savoir s'il existait une modulation de cette synthèse au cours du développement ou lors de l'induction d'une inflammation périphérique.

Nous avons réalisé des enregistrements électrophysiologiques en patch-clamp sur des tranches aiguës de moelle épinière lombaire afin de mesurer les cinétiques de désactivation des courants postsynaptiques GABAergiques miniatures (CPSIm), et par conséquent d'estimer la présence ou l'absence de stéroïdes $3\alpha5\alpha$ -réduits à la proximité des récepteurs $GABA_A$.

Nous avons observé qu'entre le 9^{ème} et le 10^{ème} jour de vie postnatale, les CPSIm $GABA_A$ présentent des cinétiques de désactivation significativement plus rapides dans les

laminae III-IV que dans la lamina II. Nos résultats montrent que ce phénomène est dû à une synthèse localisée de stéroïdes $3\alpha5\alpha$ -réduits dans la lamina II. Une telle synthèse est absente dans les laminae III-IV à ce stade du développement.

Durant les premiers jours suivant la naissance ($P < 8$), dans les laminae II et III-IV, les CPSIm présentent également des cinétiques de déactivation lentes du fait d'une production locale de stéroïdes $3\alpha5\alpha$ -réduits. Cette production résulte de l'activité tonique de la TSPO, qui contrôle la synthèse des neurostéroïdes en régulant le transport du cholestérol à travers les membranes mitochondriales. L'activité de la TSPO disparaît dans les laminae III-IV après le 8^{ème} jour de vie postnatale, puis est négativement régulée dans la lamina II après le 15^{ème} jour de vie postnatale. Ce phénomène se traduit par une accélération des cinétiques des CPSIm. Entre le 9^{ème} et le 15^{ème} jour de vie postnatale, la synthèse de stéroïde $3\alpha5\alpha$ -réduits résultant de l'activité du TSPO est localement restreinte à la lamina II, où elle est maximale. Les stéroïdes alors synthétisés dans la lamina II ne diffusent pas dans les laminae III-IV voisines. Après le 8^{ème} jour de vie postnatale, les enzymes nécessaires pour la synthèse des stéroïdes $3\alpha5\alpha$ -réduits restent fonctionnelles dans les laminae III-IV. En effet, des stéroïdes $3\alpha5\alpha$ -réduits sont synthétisés dans les tranches, à partir de différents précurseurs ou suite à une injection sous-cutanée de progestérone. De plus, suite à l'induction d'une inflammation périphérique par une injection intraplantaire de carragénine, l'activité maximale de la TSPO est restaurée dans les laminae III-IV.

Nos résultats indiquent que les cinétiques de déactivation des CPSIm GABAergiques dans la corne dorsale de la moelle épinière sont fortement contrôlées par la synthèse locale de stéroïdes $3\alpha5\alpha$ -réduits, notamment dans des situations de douleur inflammatoire ou de fluctuations de stéroïdes circulants servant de précurseurs pour la synthèse de ces stéroïdes $3\alpha5\alpha$ -réduits.

Regional differences in the decay kinetics of GABA_A receptor-mediated mIPSCs in the dorsal horn of the rat spinal cord are determined by mitochondrial transport of cholesterol.

Abbreviated title: Cholesterol transport and synaptic inhibition

Authors:

Perrine INQUIMBERT, Jean-Luc RODEAU, Rémy SCHLICHTER.

Authors address:

Institut des Neurosciences Cellulaires et Intégratives, Centre National de la Recherche Scientifique / Université Louis Pasteur
21 rue René Descartes, F-67084 Strasbourg, France

Corresponding author:

Prof Rémy Schlichter at the above address (schlichter@neurochem.u-strasbg.fr)

Tel: (33) 3 90 24 14 53 / fax: (33) 3 88 61 33 47

Number of figures and tables: 6 figures and no table

Number of pages: 28

Keywords: Peripheral benzodiazepine receptor, synaptic transmission, synaptic inhibition, somatosensory, inflammation, neurosteroid.

Acknowledgements: We thank Francine Herzog for excellent technical assistance and Sylvain Hugel and Pierrick Poisbeau for helpful discussion and comments on the manuscript. This work was supported by Centre National de la Recherche Scientifique, Université Louis Pasteur and Institut UPSA de la Douleur.

Abstract

We examined the possibility of a differential spatial control in the endogenous production of $3\alpha,5\alpha$ -reduced steroids and its consequences on GABA_A receptor-mediated miniature inhibitory post-synaptic currents (mIPSCs) in laminae II and III-IV of the rat spinal cord dorsal horn (DH). Early in post-natal development (P<8), mIPSCs displayed slow decay kinetics in laminae II and III-IV due to a continuous local production of $3\alpha,5\alpha$ -reduced steroids. This was mediated by the tonic activity of the translocator protein of 18 kDa (TSPO), that controls neurosteroid synthesis by regulating the transport of cholesterol across the mitochondrial membrane system. TSPO activity disappeared in laminae III-IV after P8 and was functionally down-regulated in lamina II after P15, resulting in a marked reduction of mIPSC duration in these laminae. TSPO-mediated synthesis of $3\alpha,5\alpha$ -reduced steroids was spatially restricted since, at P9-15, when their production was maximal in lamina II, no signs of spillover to laminae III-IV were apparent. Interestingly, after P8, the enzymes necessary for the synthesis of $3\alpha,5\alpha$ -reduced steroids remained functional in laminae III-IV and could produce such steroids from various precursors or after a single subcutaneous injection of progesterone. Moreover, induction of an acute peripheral inflammation by intraplantar injection of carrageenan, restored a maximal TSPO-mediated neurosteroidogenesis in laminae III-IV. Our results indicate that the decay kinetics of GABA_A receptor-mediated mIPSCs in the DH of the spinal cord are largely controlled by $3\alpha,5\alpha$ -reduced steroids which can be produced from circulating steroid precursors and/or, in a spatially-restricted manner, by the modulation of the activity of TSPO.

Introduction

Fast inhibitory synaptic transmission in the central nervous system (CNS) is mainly mediated by the activation of GABA_A receptors and plays a fundamental role in the integration and processing of sensory and motor messages. GABA_A receptors are potently modulated by endogenous molecules such as neurosteroids or neuroactive steroids (Lambert et al., 2003; Belelli and Lambert, 2005; Schlichter et al., 2006). Neurosteroids are synthesized in the nervous system by glial cells and/or neurons from cholesterol, independently of circulating peripheral steroids (Baulieu, 1997; Compagnone and Mellon, 2000), whereas neuroactive steroids are produced by local metabolism of circulating steroids or steroid precursors (Baulieu, 1997; Lambert et al., 2003; Belelli et al., 2006). Neurosteroids modulate synaptic transmission in the CNS during development (Keller et al., 2004; Mameli et al., 2005) and in physiological and pathological situations (Reddy and Rogawski, 2002; Leroy et al., 2004; Sanna et al., 2004; Poisbeau et al., 2005; Mameli and Valenzuela, 2006). The 3 α 5 α -reduced derivatives of progesterone (allopregnanolone, AP) or of corticosterone (tetrahydrodeoxycorticosterone, THDOC) represent the most powerful endogenous positive allosteric modulators of GABA_A receptors (Lambert et al., 2003; Belelli et al., 2006; Schlichter et al., 2006). Recently, two distinct binding sites for 3 α 5 α -reduced steroids have been identified at GABA_A receptors and were shown to be responsible for a positive allosteric modulation of the receptors at low concentrations and a direct activation of the receptors at higher concentrations, respectively (Shu et al., 2004; Hosie et al., 2006). Therefore, the type and concentration/amount of neurosteroid or neuroactive steroid present in the vicinity of synaptic GABA_A receptors (Akk et al., 2005) will strongly influence the properties of the synaptic GABA_A receptor-mediated currents.

In lamina II of the dorsal horn (DH) of the spinal cord, we have recently shown that 3 α 5 α -reduced neurosteroids (3 α 5 α -NS) are synthesized locally and potentiate the function of synaptic GABA_A receptors. The production of these 3 α 5 α -NS was developmentally regulated (Keller et al., 2004) and, in the adult, neurosteroidogenesis could be stimulated in lamina II after induction of a peripheral inflammation (Poisbeau et al., 2005). The control of neurosteroid production could therefore be part of a mechanism implicated in the fine tuning of neuronal networks in the spinal cord as well as in other areas of the CNS (Belelli et al., 2006; Schlichter et al., 2006).

However, most studies on the modulatory effects of 3 α 5 α -reduced steroids on GABA_A receptor function have been carried out on recombinant GABA_A receptors or in

culture systems using exogenous applications of steroids (Belelli et al., 2002; Shu et al., 2004; Akk et al., 2005). Although these experimental models and situations give important indications on the mechanism of action of such steroids, they do not allow to address important issues related to the synthesis and role of endogenous steroids, their eventual local diffusion within the tissue or the mechanisms regulating their production. We have addressed these points by investigating the consequences of manipulating endogenous neurosteroidogenesis on the properties of synaptic GABA_A receptors in anatomically close but distinct laminae (II versus III-IV) of the dorsal horn of the spinal cord.

Materials and Methods

Animals. All experiments were performed on spinal cord slices from 6 to 30 days-old male Wistar or Sprague-Dawley rats born in the animal house of the laboratory. Three groups were considered according to post-natal age (P in days): $P < 8$, $9 \leq P \leq 15$, and $P > 21$. All experiments were conducted in conformity with the rules of the European Communities Council Directive of 24 November 1986 (86/609/EEC) and the French Department of Agriculture (License No. 67-107 to R. Schlichter).

Induction of inflammation. Inflammation was induced in P9-15 rats by a bilateral intraplantar injection of λ -carrageenan (Sigma, France; 10 μ L of 3% solution in 0.9% NaCl); control rats were injected with 0.9% NaCl only (10 μ L). Inflammation developed overnight and the animals were sacrificed 15 h after the injection.

Subcutaneous injections. In some experiments rats were injected in the neck region with a single subcutaneous dose of progesterone (75 mg/kg) in olive oil. The effect of progesterone was assessed by comparing the results obtained with progesterone-injected animals to those obtained with animals injected with the same volume of vehicle.

Preparation of slices. As previously described (Keller et al., 2001; Keller et al., 2004) rats were deeply anesthetized with ketamine (75 mg/kg, i.p.) and killed by decapitation. The spinal cord was removed by hydraulic extrusion and washed in ice-cold ($\leq 4^\circ\text{C}$) sucrose-ACSF (artificial cerebrospinal fluid) containing (in mM): 248 sucrose, 11 glucose, 26 NaHCO_3 , 2 KCl, 1.25 KH_2PO_4 , 2 CaCl_2 , 1.3 MgSO_4 (bubbled with 95% O_2 and 5% CO_2). The lumbar segment was embedded in 5% agarose and 600 μm thick transverse slices were cut with a vibratome (Leica VT1000S, Germany). Slices were stored at room temperature in a chamber filled with normal ACSF containing (in mM): 126 NaCl, 26 NaHCO_3 , 2.5 KCl, 1.25 NaH_2PO_4 , 2 CaCl_2 , 2 MgCl_2 , 10 glucose (bubbled with 95% O_2 /5% CO_2 ; pH = 7.3; 310 mOsm measured).

Electrophysiological recordings. Slices were transferred to a recording chamber and continuously superfused with oxygenated ACSF containing 0.5 μM tetrodotoxin (TTX, Latoxan, France), 2 mM kynurenic acid (Fluka, France) and 1 μM strychnine (Sigma, France), in order to block glutamate and glycine-mediated fast synaptic currents and to record GABA_A miniature inhibitory postsynaptic currents (mIPSCs) in isolation. Neurons from lamina II or laminae III-IV were recorded in the whole-cell configuration using a blind-patch approach. During electrophysiological experiments, lamina II was visually identified as a

translucent crescent in the superficial dorsal horn. Patch pipettes were pulled from borosilicate glass capillaries (Harvard Apparatus, UK) using a P-2000 puller (Sutter Instrument Company, USA). They were filled with a solution containing (in mM): 130 CsCl, 10 HEPES, 2 MgCl₂ and 10 biocytine (Sigma) (pH = 7.3, adjusted with CsOH; osmolarity 290 ± 10 mOsm adjusted with sucrose) (3-5 MΩ). Voltage-clamp recordings were performed with an Axopatch 200B amplifier (Molecular Devices, USA) at a holding potential fixed at -60 mV. The equilibrium potential for Cl⁻ ions was set at 0 mV. Recordings were low-pass filtered (5 kHz) and acquired with the Fetchex module of pClamp 6 (Molecular Devices, USA). Current traces were digitized and stored on the hard disk of a personal computer (10 kHz) and on videotape (20 kHz). All experiments were made at room temperature (20-25 °C).

At the end of the experiments, slices were individually fixed with 4% para-formaldehyde. Neurons injected with biocytine were revealed with FITC-labelled extravidine (Sigma, diluted 1:100) or Marina Blue-labelled streptavidin (Invitrogen, diluted 1:100), allowing the localization of the recorded neuron in either lamina II or laminae III-IV. Some slices were included in 5% agarose and cut again in 50 µm thick transverse slices with a vibratome (Leica VT1000S, Germany). These slices were incubated overnight with Marina blue-labelled streptavidin and a rabbit antibody against protein kinase type γ (PKCγ, Santa Cruz Biotechnology, diluted 1:10.000, USA), followed by a 1h incubation in secondary antibody (goat anti-rabbit IgG conjugated with FITC, diluted 1:400, Biosys, France). PKCγ is present in a subpopulation of neurons in the inner part of lamina II (Polgar et al., 1999) and allows a good localization of the border between laminae II and III. This staining was used to determine if the recorded neuron was located in lamina II or in laminae III-IV, i.e. dorsal or ventral to the PKCγ-like immunoreactivity respectively.

Pharmacological substances. Blockade of GABA_A receptors was achieved by adding bicuculline methiodide (10 µM; Sigma, France) to the ACSF. The short-term effects of allopregnanolone (100nM, AP; 5α-pregnan-3α-ol-20-one; Sigma, France) or of all other acutely applied substances were determined after 20 min of general bath superfusion in order to be sure that the concentration of substance close to the recorded neuron had reached a steady state. For other drugs requiring at least 1h of exposure, slices were pre-incubated in ACSF containing the substance to be tested. Diazepam (1 µM, Diaz), pregnenolone (100 nM, Preg, 3β-hydroxy-5-pregnen-20-one), progesterone (100 nM, Prog), dihydro-progesterone (100 nM, DHP, 3α-hydroxy-5α-pregnan-20-one), 22(R)-hydroxy-cholesterol (100 nM, 22OH-Chol.), indomethacin (10 µM, Indo), RU486 (1 µM, mifepristone) (all from Sigma, France),

flumazenil (10 μ M, Flu, Ro 15-1788, gift from Roche, Basel, Switzerland), PK11195 (10 μ M, PK, Tocris, UK) and finasteride (50 μ M, Fina, Steraloids, USA) were prepared as 1000 $\times$ concentrated stock solutions (in 95-99% ethanol) and stored at 0-5°C. All substances were diluted to their final concentrations in ACSF at the beginning of each experiment.

Data analysis. Individual mIPSCs were analyzed off-line using the Strathclyde Electrophysiology Software, WinEDR/WinWCP (courtesy of Dr. J. Dempster, University of Strathclyde, Glasgow, UK). Individual events were detected with a threshold method using a baseline-tracking amplitude threshold algorithm. The general principals for analysis of synaptic currents were similar to those previously described (Keller et al., 2004; Poisbeau et al., 2005). In this study, mIPSCs were fitted with the product of an error function and an exponential decay (enplate current fitting function of WinWCP) to determine the time constants of the rising and decaying phases of the miniature synaptic currents, respectively.

Statistics. Data are expressed as arithmetic mean $\pm$ standard error of the mean (SEM). Mean values of the amplitude, rise time constant, decay time constant and frequency of occurrence of mIPSCs were compared between different laminae and after treatment with pharmacological substances. Comparison of group means was performed with Statistica 5.1 (Statsoft, Tulsa, Oklahoma, USA) using one- or two-way ANOVA, with factors *lamina*, *treatment* and/or *age* depending on experiments. When the ANOVA test was significant, the Tukey test was used for post-hoc multiple comparisons between individual groups. Differences were considered significant for $p < 0.05$.

RESULTS

We have previously shown that the endogenous production of $3\alpha5\alpha$ -reduced neurosteroids ($3\alpha5\alpha$ -NS) is elevated in lamina II of the spinal cord at early stages of post-natal development (before P15) and is responsible for the slow decaying kinetics of GABA_A receptor-mediated mIPSCs (Keller et al., 2004). The values of the decay time constants of GABA_A receptor-mediated mIPSCs can therefore be used as very sensitive indicators for the local production of $3\alpha5\alpha$ -NS in a given anatomical region and in the vicinity of synapses. Here we chose to record from P9-15 animals in order to address two major and related questions: (1) is the high level of production of $3\alpha5\alpha$ -NS a general phenomenon in the dorsal horn (DH) of the spinal cord during early stages of post-natal development and/or (2) can $3\alpha5\alpha$ -NS produced in a given region of the spinal cord easily diffuse to adjacent anatomical regions and influence the characteristics of synaptic receptors in these regions?

Properties of GABA_AR-mediated mIPSCs:

As a first approach to the questions raised above, we characterized the properties of GABA_A receptor-mediated mIPSCs recorded in neurons from laminae III-IV of the spinal cord dorsal horn of 9-15 days-old (P9-15) rats and compared their properties to those observed in lamina II (Fig. 1A-B). In all cases tested (lam II, $n = 21$ and lam III-IV, $n = 19$) superfusion with bicuculline ($10 \mu\text{M}$) totally blocked the mIPSCs (Fig. 1C-D), indicating that they were mediated by the activation of GABA_A receptors.

GABA_A receptor-mediated mIPSCs had significantly smaller decay time constants (τ_{decay}) in laminae III-IV neurons ($\tau_{\text{decay}} = 26.7 \pm 1.7 \text{ ms}$, $n = 14$) than in lamina II neurons ($\tau_{\text{decay}} = 41.1 \pm 1.2 \text{ ms}$, $n = 28$, $p < 0.001$). By contrast, the amplitudes (lam II, $A = -23.0 \pm 1.1 \text{ pA}$, $n = 28$; lam III-IV, $A = -25.6 \pm 2.6 \text{ pA}$, $n = 14$), rise time constants (lam II, $\tau_{\text{rise}} = 1.2 \pm 0.1 \text{ ms}$, $n = 28$; lam III-IV, $\tau_{\text{rise}} = 1.3 \pm 0.1 \text{ ms}$, $n = 28$) and frequencies of occurrence (lam II, $\text{Freq} = 0.23 \pm 0.003 \text{ Hz}$, $n = 28$; lam III-IV, $\text{Freq} = 0.23 \pm 0.003 \text{ Hz}$, $n = 14$) of GABA mIPSCs were not statistically different ($p > 0.05$) between lamina II and laminae III-IV.

Localization of the recorded neuron was confirmed at the end of the experiment by immunohistochemical revelation of biocytin injected via the patch pipette. In some cases, the limit between laminae II and III was verified using an immunohistochemical staining against PKC γ (Fig. 1E-F) which reveals a population of neurons in the inner part of lamina II and allows a relatively precise delineation of the border between laminae II and III (Polgar et al., 1999).

We observed no difference in the mean peak amplitude or the mean τ_{rise} values of the GABA_A receptor-mediated mIPSCs between the different laminae or following the different pharmacological treatments described in the following sections. Therefore we will only comment on the τ_{decay} and frequency of occurrence values of mIPSCs in the results below.

Differential synthesis of 3 α 5 α -NS in different laminae of the dorsal horn determines the kinetics of GABA_A receptor-mediated mIPSCs

We next asked whether or not the difference in decay kinetics of mIPSCs recorded in lamina II and laminae III-IV neurons was due to a difference in the local synthesis of 3 α 5 α -NS. The first step in steroidogenesis or neurosteroidogenesis depends on the obligatory activation of a protein complex in the membrane of mitochondria (Papadopoulos et al., 2006a; Papadopoulos et al., 2007) which among different partners contains a protein, formerly termed peripheral benzodiazepine (PBR) and recently renamed translocator protein of 18 kDa (TSPO) (Papadopoulos et al., 2006b). This protein participates in the transport of cholesterol across the mitochondrial membrane system, a process that allows the first step of steroidogenesis/neurosteroidogenesis (i.e. synthesis of pregnenolone) to take place inside the mitochondria. The function of this protein is functionally antagonised by PK11195 (Fig. 4A) (Costa et al., 1994; Casellas et al., 2002; Keller et al., 2004).

As illustrated in Fig. 2A, incubation of spinal cord slices with PK11195 (10 μ M), for at least 5 hours, decreased significantly τ_{decay} values of mIPSCs recorded in lamina II neurons ($\tau_{\text{decay}} = 30.4 \pm 1.4$ ms; $n = 11$, $p < 0.001$), but had no effect on the other properties of the mIPSCs (Fig. 2C). Similarly, incubation of the slices for at least 3 hours with finasteride, an inhibitor of 5 α -reductase involved in the synthesis of 3 α 5 α -reduced steroids, decreased significantly the values of τ_{decay} in lamina II neurons ($\tau_{\text{decay}} = 27.2 \pm 1.8$ ms, $n = 6$, $p < 0.001$, Fig. 2A) but finasteride did not affect the amplitude or the τ_{rise} of the mIPSCs (Fig. 2C). In laminae III-IV neurons, the decay time constants of GABA_A receptor-mediated mIPSCs were not affected by PK11195 ($\tau_{\text{decay}} = 29.0 \pm 2.2$ ms; $n = 5$; $p > 0.05$) or finasteride ($\tau_{\text{decay}} = 28.8 \pm 1.9$ ms; $n = 9$; $p > 0.05$) when compared to control slices ($\tau_{\text{decay}} = 26.6 \pm 1.7$ ms; $n = 14$).

Taken together these results indicated that, under basal conditions, mIPSCs in lamina II were tonically modulated (facilitated) by endogenously- and locally-produced 3 α 5 α -NS. This was however not the case in laminae III-IV.

It must be noticed that we consistently observed that incubation of slices with finasteride resulted in a significant increase in the frequency of occurrence of GABA_A

mIPSCs both in lamina II (Freq = 0.88 ± 0.22 Hz; $p < 0.001$) and in laminae III-IV (Freq = 0.55 ± 0.09 Hz; $p < 0.05$) (Fig. 2C). Such increases in the frequency of the mIPSCs were noted in all experimental conditions in which finasteride (50 μ M) was present and suggested that finasteride acted presynaptically to facilitate synaptic GABA release. By contrast, in slices of P9-15 animals incubated with PK11195 (10 μ M), no significant change in mIPSC frequency was detected, neither in lamina II nor in laminae III-IV neurones (Fig. 2C). This observation indicated that the facilitatory presynaptic action of finasteride was probably not directly related to its blocking effect on the synthesis of $3\alpha 5\alpha$ -NS.

Sensitivity of synaptic GABA_A receptors to exogenously applied $3\alpha 5\alpha$ -NS.

One possibility to explain the results presented above could be that, by contrast to lamina II, synaptic GABA_A receptors in laminae III-IV were insensitive or less sensitive to $3\alpha 5\alpha$ -NS. In order to check this point we tested the effect of an exogenous application of allopregnanolone (AP). As shown in Fig. 3, application of AP (100 nM) significantly increased τ_{decay} in laminae III-IV neurons (before AP, $\tau_{\text{decay}} = 30.4 \pm 1.4$ ms; during AP, $\tau_{\text{decay}} = 42.1 \pm 2.0$ ms; $n = 6$; $p < 0.001$) but had no significant effect on peak amplitude, τ_{rise} and frequency occurrence of mIPSCs (data not shown). In lamina II, AP (100 nM) had no apparent effect on τ_{decay} (before AP, $\tau_{\text{decay}} = 36.9 \pm 2.2$ ms; during AP, $\tau_{\text{decay}} = 39.2 \pm 3.1$ ms; $n = 5$), peak amplitude, τ_{rise} and frequency occurrence of GABA mIPSCs. Interestingly, in the presence of AP, τ_{decay} values of mIPSCs in laminae III-IV neurons were not significantly different from those of laminae II neurons under control conditions or in the presence of AP (100 nM) ($p > 0.05$).

Taken together, these results suggested that, although GABA_A receptors in laminae III-IV were sensitive to $3\alpha 5\alpha$ -NS, only synaptic GABA_A receptors in lamina II neurons were under the tonic control of endogenously- and locally-produced $3\alpha 5\alpha$ -NS in the spinal cord dorsal horn of immature (P9-15) rats.

Pharmacological stimulation of the TSPO

One possibility for explaining the absence of a tonic production of $3\alpha 5\alpha$ -NS in laminae III-IV could be the absence of an adequate signal to activate the TSPO. We therefore decided to stimulate TSPO activity by a pharmacological protocol which has been validated in our previous studies on neurosteroidogenesis in the dorsal horn of the spinal cord (Keller et al., 2004; Poisbeau et al., 2005). TSPO can be activated by diazepam (Papadopoulos et al.,

2006b), but this benzodiazepine also binds to the GABA_A receptor to potentiate its activity (Barnard et al., 1998). However, the benzodiazepine binding to GABA_A receptors is specifically antagonized by flumazenil (Barnard et al., 1998). Specific pharmacological stimulation of the TSPO was therefore achieved by incubating spinal cord slices for at least 5 hours with diazepam (1 μ M) in the presence of flumazenil (10 μ M) (Diaz + Flu). No significant effect on mIPSCs was observed, neither in lamina II neurons ($\tau_{\text{decay}} = 41.4 \pm 1.4$ ms; n = 9) nor in laminae III-IV neurons ($\tau_{\text{decay}} = 27.5 \pm 1.3$ ms; n = 8). Incubation of slices with flumazenil (10 μ M) alone had no effect on the properties of the GABA_A mIPSCs (lam II: $\tau_{\text{decay}} = 40.8 \pm 2.7$ ms; n = 7; lam III-IV: $\tau_{\text{decay}} = 29.5 \pm 1.8$ ms; n = 5). As outlined above, when neurosteroid production was globally inhibited with PK11195 (10 μ M; see Fig. 2), the value of τ_{decay} in lamina II neurons decreased (to ~30 ms) and became similar to mIPSCs recorded in laminae III-IV neurons. When slices were incubated with diazepam and PK11195, the mean τ_{decay} value was increased in lamina II and in laminae III-IV neurons (lam II: $\tau_{\text{decay}} = 45.1 \pm 1.3$ ms; n = 4; Lam III-IV: $\tau_{\text{decay}} = 45.1 \pm 3.4$ ms; n = 4) with respect to the values observed in slices incubated only with PK11195. This effect of diazepam was completely antagonized by flumazenil (10 μ M) in lamina II as well as in laminae III-IV neurons (lam II: $\tau_{\text{decay}} = 30.9 \pm 1.6$; n = 8; p<0.01; lam III-IV: $\tau_{\text{decay}} = 32.0 \pm 0.5$ ms; n = 5; p<0.05) and reflected an action of diazepam at the benzodiazepine binding site of synaptic GABA_A receptors.

Key role of TSPO in the synthesis of 3 α 5 α -reduced neurosteroids

In order to study in more detail the steroidogenic potential of laminae III-IV, we evaluated the effect of incubating the slices with different precursors of allopregnanolone (Fig. 4A). We started with the closest precursor and progressively tested the effect of farther precursors. This protocol allowed us to test for the presence and the functionality of the different enzymes necessary for the complete synthesis of 3 α 5 α -NS. The results obtained with each precursor and the effects of inhibitors of key enzymes governing the synthesis of 3 α 5 α -NS are summarized in Fig. 4 (B-C).

As illustrated in Fig. 4A, the closest precursor to allopregnanolone is dihydroprogesterone (DHP). Incubation of the slices with DHP for >1 hour, significantly increased the decay time constant of mIPSCs in laminae III-IV neurons ($\tau_{\text{decay}} = 48.5 \pm 3.3$ ms; n = 5; p<0.001) but had no effect in lamina II ($\tau_{\text{decay}} = 47.2 \pm 2.8$ ms; n = 8; p>0.005). The effect of DHP in laminae III-IV neurons was blocked ($\tau_{\text{decay}} = 29.0 \pm 1.6$ ms; n = 4; p<0.001)

by co-incubation of slices with indomethacin, an inhibitor of 3α -hydroxysteroid oxidoreductase (3α HSOR) (Belelli et al., 2006), thus demonstrating that the effect of DHP was due to its conversion to allopregnanolone and that DHP had no direct effect of mIPSC kinetics.

Incubation of slices with progesterone (Prog) for >1 hour increased the decay time constant of mIPSCs in laminae III-IV neurons ($\tau_{\text{decay}} = 51.1 \pm 2.6$ ms; $n = 7$; $p < 0.001$) but had no supplementary effect in lamina II ($\tau_{\text{decay}} = 45.0 \pm 2.5$ ms; $n = 10$; $p > 0.005$). This effect of Prog in laminae III-IV was blocked by co-incubation with finasteride ($\tau_{\text{decay}} = 29.3 \pm 2.0$ ms; $n = 5$; $p < 0.001$) indicating that in laminae III-IV, Prog was metabolized to $3\alpha 5\alpha$ -NS which prolonged the duration of GABA_A receptor-mediated mIPSCs. In laminae III-IV, the effect of Prog on decay time constants of GABA_A receptor-mediated mIPSCs was not affected by RU486 (1 μ M), an antagonist of nuclear progesterone receptors ($\tau_{\text{decay}} = 41.2 \pm 2.6$ ms, $n = 7$; $p > 0.05$). RU486 (1 μ M) applied alone for > 3 hours had no effect of the decay time constants of mIPSCs in either lamina (lam II: $\tau_{\text{decay}} = 38.6 \pm 1.2$ ms; $n = 7$; lam III-IV: $\tau_{\text{decay}} = 26.9 \pm 1.9$ ms; $n = 7$; $p > 0.05$).

Incubation of the slices with pregnenolone for >3 hours, also increased the value of the decay time constant in laminae III-IV neurons ($\tau_{\text{decay}} = 42.5 \pm 2.7$ ms; $n = 6$; $p < 0.001$) but had no significant effect in lamina II ($\tau_{\text{decay}} = 42.2 \pm 2.1$ ms, $n = 6$; $p > 0.05$). The effect of pregnenolone in laminae III-IV was completely blocked by co-incubation with finasteride ($\tau_{\text{decay}} = 28.2 \pm 2.1$ ms; $n = 6$; $p < 0.05$) indicating that pregnenolone was metabolized to a $3\alpha 5\alpha$ -NS.

Finally, we tested the effect of 22OH-cholesterol (22OH-Chol), a cholesterol analogue which is able to freely cross the mitochondrial membranes (Castillo et al., 2006) and therefore bypasses the transport process mediated by TSPO. Incubation of slices with 22OH-Chol for > 5 hours, increased the decay time constant of mIPSCs in laminae III-IV ($\tau_{\text{decay}} = 44.1 \pm 3.1$ ms, $n = 6$; $p < 0.001$) but had no effect in lamina II ($\tau_{\text{decay}} = 37.5 \pm 1.3$ ms; $n = 6$). The effect of 22OH-Chol in laminae III-IV was totally blocked by co-incubation with finasteride ($\tau_{\text{decay}} = 27.6 \pm 2.3$ ms; $n = 5$; $p < 0.01$).

Taken together these results indicated that all the enzymes necessary for the synthesis of $3\alpha 5\alpha$ -NS from cholesterol are present and functional in laminae III-IV and that the apparent limiting factor for the synthesis of $3\alpha 5\alpha$ -NS in laminae III-IV is the transport of cholesterol across the mitochondrial membrane system.

Developmental regulation of neurosteroidogenesis in lamina II and laminae III-IV

A previous study by our laboratory has shown that, in lamina II, the synthesis of 3 α 5 α -NS is elevated during the first 15 days of post-natal life and subsequently decreases with development (Keller et al., 2004). Therefore, we decided to investigate and compare the properties of GABA_A receptor-mediated mIPSCs properties in lamina II and laminae III-IV during post-natal development with special reference to the role of endogenously-produced 3 α 5 α -NS on mIPSC kinetics (Fig. 5). In young animals (P<8), τ_{decay} was elevated and had similar values in lamina II ($\tau_{\text{decay}} = 39.7 \pm 2.5$ ms; n = 6) and in laminae III-IV ($\tau_{\text{decay}} = 37.5 \pm 3.4$ ms; n = 7) neurons (Fig. 5A). At later ages, τ_{decay} showed a significant and rapid decrease in lamina III-IV between the first and the second week of post-natal life (P9-15: $\tau_{\text{decay}} = 26.6 \pm 1.7$ ms; n = 14; p<0.01) and remained stable thereafter (P>21 : $\tau_{\text{decay}} = 22.0 \pm 1.7$ ms; n = 5; p<0.001 with respect to P<8 and p>0.05 with respect to P9-15). By contrast, in lamina II, the τ_{decay} value remained high, and similar to that observed for the P<8 group, until the end of the second post-natal week (P9-15: $\tau_{\text{decay}} = 41.1 \pm 1.2$ ms, n = 29; p>0.05) and then decreased between the second and third post-natal weeks (P>21: $\tau_{\text{decay}} = 27.7 \pm 1.8$ ms; n = 6; p>0.05 with respect to P<8 and p<0.001 with respect to P9-15). Most importantly, at P>21 the values of decay time constants of mIPSCs were not significantly different in lamina II and laminae III-IV neurons (p>0.05).

In laminae III-IV, at P<8, the high τ_{decay} value was decreased when slices were incubated with PK11195 ($\tau_{\text{decay}} = 29.7 \pm 0.8$ ms; n = 5; p<0.05) or with finasteride ($\tau_{\text{decay}} = 28.6 \pm 1.4$ ms; n = 7; p<0.01) (Fig. 5B). In lamina II, the τ_{decay} values were also significantly reduced at P<8 in PK11195 ($\tau_{\text{decay}} = 28.7 \pm 1.62$ ms; n = 5; p<0.01) or finasteride-incubated slices ($\tau_{\text{decay}} = 25.3 \pm 1.3$ ms; n = 7; p<0.001) compared to control slices. At P>21, incubation with PK11195 or finasteride had no significant effect in lamina II (PK11195: $\tau_{\text{decay}} = 23.2 \pm 0.7$ ms, n = 5; finasteride: $\tau_{\text{decay}} = 30.4 \pm 1.7$ ms; n = 4; p>0.05) or in laminae III-IV (PK11195: $\tau_{\text{decay}} = 27.4 \pm 2.4$ ms; n = 5; Finasteride: $\tau_{\text{decay}} = 27.0 \pm 1.6$ ms; n = 4; p>0.05).

These results indicated that a tonic modulation by 3 α 5 α -NS was detected at the synaptic level in laminae III-IV neurons of very young rats (P<8). Moreover the synthesis of 3 α 5 α -NS was placed under the control of the TSPO (because it was blocked by PK11195) indicating that, at P<8, TSPO is functional in laminae III-IV. Our results also suggest a differential temporal maturation of endogenous tonic 3 α 5 α -NS production between lamina II and laminae III-IV resulting in a differential modulation of synaptic GABA_A receptors kinetics in these laminae.

Effect of peripheral inflammation:

In lamina II of the adult rat, endogenous production of $3\alpha5\alpha$ -NS can be stimulated after induction of an inflammatory pain state by intraplantar injection of carrageenan (Poisbeau et al., 2005). Thus we tested the consequences of such a protocol on the mIPSC kinetics in lamina II and in laminae III-IV in P9-15 rats. In laminae III-IV neurons from inflamed animals, 15 hours after the injection of carrageenan into the hind paws, mIPSCs had significantly longer τ_{decay} values ($\tau_{\text{decay}} = 41.4 \pm 2.3$ ms; $n = 9$) than those of saline-injected controls ($\tau_{\text{decay}} = 28.0 \pm 2.8$ ms; $n = 7$; $p < 0.001$) (Fig. 6A). This effect was totally blocked when the slices from inflammatory animals were incubated in the presence of finasteride (50 μ M) for >3 hours ($\tau_{\text{decay}} = 30.1 \pm 1.2$; $n = 6$, $p < 0.05$) or in the presence of PK11195 (10 μ M) for >6 hours ($\tau_{\text{decay}} = 27.9 \pm 1.9$; $n = 6$; $p < 0.01$). By contrast, the carrageenan-induced inflammation had no effect on decay kinetics of mIPSCs in lamina II (inflamed: $\tau_{\text{decay}} = 43.1 \pm 2.1$ ms; $n = 9$; saline: $\tau_{\text{decay}} = 39.6 \pm 2.2$ ms; $n = 5$; $p > 0.05$). However, incubation of the slices with finasteride or PK11195 significantly reduced the τ_{decay} values in lamina II neurons (finasteride: $\tau_{\text{decay}} = 29.2 \pm 1.1$ ms; $n = 6$; $p < 0.001$; PK11195 : $\tau_{\text{decay}} = 28.4 \pm 1.3$ ms; $n = 6$; $p < 0.001$). These values were comparable to those observed in lamina III-IV neurons under control condition (Fig. 6A).

These results indicated that peripheral inflammation was able to reactivate the synthesis of $3\alpha5\alpha$ -NS in laminae III-IV neurons by restoring the functionality of the TSPO. However, peripheral inflammation was apparently unable to further prolong the duration of mIPSCs in lamina II, possibly indicating that the tonic production of $3\alpha5\alpha$ -NS in lamina II of these animals was already maximal at least with respect to its modulatory effect of synaptic GABA_A receptors.

Effect of a subcutaneous injection of progesterone

Above we have shown that if the step of cholesterol translocation across the inner mitochondrial membrane mediated TSPO was bypassed, a complete synthesis of $3\alpha5\alpha$ -NS was possible in laminae III-IV. We therefore wondered if a peripherally circulating steroid or steroid precursor could gain access to laminae III-IV and serve locally as a precursor for $3\alpha5\alpha$ -reduced steroid synthesis. In order to test this hypothesis we prepared slices from P9-15 rats having received a subcutaneous injection of progesterone (75 mg/kg) 30-90 minutes prior to sacrifice of the animals for slice preparation. In laminae III-IV, mIPSCs recorded in neurons from animals injected with progesterone had significantly longer τ_{decay} values ($\tau_{\text{decay}} = 44.2 \pm 2.8$ ms; $n = 6$) compared to those of vehicle-injected controls ($\tau_{\text{decay}} = 25.4 \pm 1.4$ ms; $n = 6$; $p < 0.001$) (Fig. 6B). This effect was totally reversed when slices were incubated for >3 hours with 50 μ M finasteride ($\tau_{\text{decay}} = 30.1 \pm 3.3$ ms; $n = 7$; $p < 0.01$). The progesterone

injection had no significant effect on decay kinetics of mIPSCs in lamina II neurons (Prog: $\tau_{\text{decay}} = 45.0 \pm 2.3$ ms; n = 8; vehicle: $\tau_{\text{decay}} = 39.0 \pm 2.2$ ms; n = 5). Incubation with finasteride reduced the decay time constant value of mIPSCs in lamina II neurons to levels observed in laminae III-IV under control conditions or after incubation of slices from progesterone-injected animals with finasteride (Fig. 6B).

These results indicated that steroids of peripheral origin, such as progesterone, can access the spinal cord and be locally metabolized to $3\alpha5\alpha$ -reduced neuroactive steroids which in turn modulate the kinetics of GABA_A receptor-mediated mIPSCs.

Discussion

We found that the decay kinetics of GABA_A receptor-mediated mIPSCs were clearly distinct in the neurons from two anatomically close regions of the DH of the spinal cord of P9-15 rats, due to a difference in the tonic and local production of endogenous 3 α 5 α -NS. This phenomenon seemed to be mediated by a differential and developmentally-controlled down-regulation of cholesterol transport across the mitochondrial membrane system involving a reduction in the activity (lamina II) or the functionality (laminae III-IV) of TSPO. Interestingly, after its down-regulation in laminae III-IV, the activity of TSPO could no longer be stimulated pharmacologically but was fully restored following the induction of a peripheral inflammation. Moreover, all steroidogenic enzymes remained functional in laminae III-IV, even after the apparent disappearance of TSPO activity, and allowed the synthesis of 3 α 5 α -reduced neuroactive steroids from circulating peripheral steroids such as progesterone.

In P9-15 rat spinal cord slices, the decay time constants of pharmacologically-isolated GABA_A receptor-mediated mIPSCs were significantly shorter in laminae III-IV neurons ($\tau_{\text{decay}} \sim 30$ ms) than in lamina II neurons ($\tau_{\text{decay}} \sim 40$ ms), although their mean amplitudes or rise time constants were similar. However, after incubation of the slices with either finasteride, which selectively blocks the production of 3 α 5 α -NS, or with PK11195, which antagonizes the activity of the TSPO and therefore acts as a general blocker of steroidogenesis and neurosteroidogenesis, the kinetics of mIPSCs in lamina II were accelerated to values characteristic of lamina III-IV-neurons, whereas mIPSCs recorded in laminae III-IV neurons showed no change in decay kinetics. These observations clearly argued in favor of the existence of a tonic endogenous production of 3 α 5 α -NS in lamina II (Keller et al., 2004) but not in laminae III-IV of immature rats. Interestingly, at P9-15, the level of 3 α 5 α -NS production in lamina II was high (Keller et al., 2004) and probably maximal (see below), but under these conditions there was no sign of modulation of GABA_A receptor-mediated mIPSCs in laminae III-IV, indicating that the 3 α 5 α -NS produced in lamina II remained confined locally and did not spill over to laminae III-IV.

Alternatively, it might be that 3 α 5 α -NS diffused into laminae III-IV, but that the synaptic GABA_A receptors in laminae III-IV were insensitive to these neurosteroids. This was unlikely because the large majority of GABA_A receptors are sensitive to 3 α 5 α -NS (Belelli et al., 2002; Belelli et al., 2006). Indeed, we found that exogenous application of AP (100 nM) increased the values of τ_{decay} of mIPSCs in laminae III-IV neurons to values similar to that observed in lamina II neurons. Yet, under the same conditions, mIPSCs in lamina II were not

affected by AP application. These observations suggested that synaptic GABA_A receptors of lamina III-IV neurons were sensitive to 3 α 5 α -NS and that, under control conditions, synaptic GABA_A receptors of lamina II neurons were probably already potentiated by endogenous 3 α 5 α -NS to a level comparable to that normally achieved by the application of 100 nM AP. These results are consistent with the existence of a local synthesis of 3 α 5 α -NS in lamina II (but not in laminae III-IV) which allows a potent positive allosteric modulation of synaptic GABA_A receptor function without triggering the direct activation of these receptors (Shu et al., 2004; Hosie et al., 2006).

Another issue to consider was that laminae III-IV were perhaps unable to synthesize 3 α 5 α -NS. This was not the case because, when the spinal cord slices were incubated with one of the precursors of AP, the values of τ_{decay} of mIPSCs in laminae III-IV increased to values similar to that observed in lamina II, and this increase in τ_{decay} values was blocked by pharmacological inhibitors of the synthesis of 3 α 5 α -reduced steroids (3 α 5 α -RS). By contrast, and similar to the observations made during exogenous application of AP (100 nM), the τ_{decay} values in lamina II neurons were not further increased in the presence of 3 α 5 α -NS precursors. This observation reinforced the idea that a maximal production rate of 3 α 5 α -NS was probably already reached under control conditions in lamina II. Interestingly, a single subcutaneous injection of progesterone mimicked the effect of incubating the spinal cord slices with precursors of AP, suggesting that peripheral fluctuations in steroid or steroid precursor levels might affect the production of neuroactive steroids in the spinal cord. Similar observations have been made in other areas of the CNS after peripheral injections of steroids (Reddy et al., 2004; Reddy et al., 2005) or following endogenous fluctuations of steroid levels associated with ovarian cycle (Maguire and Mody, 2007) or stress (Reddy and Rogawski, 2002).

When examining the properties of mIPSCs at earlier developmental stages we found that a tonic production of 3 α 5 α -NS was present in laminae III-IV in very young rats (P<8) and that, at this developmental stage, the deactivation kinetics of mIPSCs were slow and identical in lamina II and laminae III-IV. However the tonic production of 3 α 5 α -NS disappeared abruptly in laminae III-IV after P8 whereas it was maintained in lamina II for another two weeks before showing a similar reduction. This indicated the existence of a differential time-course in the developmental reduction of 3 α 5 α -NS modulatory effect in laminae III-IV, that we interpret as a differential reduction in their production. This phenomenon seems to be due to a change in P450_{scc} substrate availability, attributable to a down-regulation of TSPO activity. Interestingly, once this down-regulation had occurred in

laminae III-IV neurons, it was impossible to induce the production of $3\alpha5\alpha$ -NS by pharmacological stimulation the TSPO with diazepam, whereas such a stimulation was still efficient in lamina II as previously shown (Keller et al., 2004; Poisbeau et al., 2005). A marked finasteride- and PK11195-sensitive prolongation of mIPSCs was also observed in laminae III-IV, but not in lamina II, of P9-15 rats following the induction of a peripheral inflammation by an intraplantar injection of carageenan, indicating that inflammatory conditions allowed to induce/restore the conditions necessary for the synthesis of $3\alpha5\alpha$ -NS in laminae III-IV.

How is it then possible to explain the apparently contradictory observations that pharmacological stimulation of TSPO was ineffective, whereas peripheral inflammation was able to stimulate $3\alpha5\alpha$ -NS synthesis in laminae III-IV? The activation of TSPO is an obligatory and fundamental step in the synthesis of neurosteroids because it allows the translocation of cholesterol across the mitochondrial membrane system (Papadopoulos et al., 2006a; Papadopoulos et al., 2007). In non neuronal systems, it has been shown that steroidogenesis requires the formation of a protein complex incorporating several partners including TSPO and steroid acute regulatory protein (StAR) (Hauet et al., 2002; Liu et al., 2006; Papadopoulos et al., 2007). When the functional complex is formed, a constitutive synthesis of steroids/neurosteroids takes place (Liu et al., 2006). Such a synthesis can be stimulated by diazepam or blocked by PK11195 via an action at the TSPO (Keller et al., 2004). It is therefore possible to speculate that, when one of the partners in the complex is missing or if the assembly of the complex is hindered, steroidogenesis is blocked at the earliest stage, i.e. the transport of cholesterol across the mitochondrial membrane. This was the case in laminae III-IV, since incubation of the slices with 22-OH cholesterol, which bypasses the transport via the TSPO, fully restored the synthesis of $3\alpha5\alpha$ -NS. The fact that it remained possible to stimulate pharmacologically the synthesis of $3\alpha5\alpha$ -NS in lamina II but not in laminae III-IV, indicated that in lamina II the complex was still functional, but was expressed at a lower level or had a lower basal activity in the adult. By contrast, in laminae III-IV the complex was probably dissociated or functionally blocked, but its association/functionality could be restored following peripheral inflammation. Unfortunately, for the moment these points cannot be directly tested experimentally in spinal cord slices with the currently available molecular and pharmacological tools.

In conclusion, our results show that endogenously produced $3\alpha5\alpha$ -NS are potent modulators of synaptic GABA_A receptors in the dorsal horn of the spinal cord. The synthesis

of these molecules is regulated during development in a time- and region-specific manner. Moreover, circulating steroids can gain access to the spinal cord and contribute to the local production of $3\alpha,5\alpha$ -reduced neuroactive steroids. Our results are also consistent with the idea that $3\alpha,5\alpha$ -NS are produced by post-synaptic neurons in order to control locally the activity of synaptic GABA_A receptors. A restricted local modulation might be possible due to the lipophilic nature of $3\alpha,5\alpha$ -NS which essentially confines the synthesized steroids to the plasma membrane of the cell in which they are produced, the membrane serving as a reservoir from which steroids gain access to the GABA_A receptors without excessive diffusion in the hydrophilic extracellular medium (Akk et al., 2005; Hosie et al., 2006). In line with this possibility, it has been shown recently that the key enzymes for the synthesis of $3\alpha,5\alpha$ -NS are expressed at post-synaptic sites of various CNS neurons receiving GABAergic synapses (Agis-Balboa et al., 2006).

References

- Agis-Balboa RC, Pinna G, Zhubi A, Maloku E, Veldic M, Costa E, Guidotti A (2006) Characterization of brain neurons that express enzymes mediating neurosteroid biosynthesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103:14602-14607.
- 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.
- Barnard EA, Skolnick P, Olsen RW, Mohler H, Sieghart W, Biggio G, Braestrup C, Bateson AN, Langer SZ (1998) International Union of Pharmacology. XV. Subtypes of gamma-aminobutyric acidA receptors: classification on the basis of subunit structure and receptor function. *Pharmacol Rev* 50:291-313.
- Baulieu EE (1997) Neurosteroids: of the nervous system, by the nervous system, for the nervous system. *Recent Prog Horm Res* 52:1-32.
- Belelli D, Lambert JJ (2005) Neurosteroids: endogenous regulators of the GABA(A) receptor. *Nat Rev Neurosci* 6:565-575.
- Belelli D, Casula A, Ling A, Lambert JJ (2002) The influence of subunit composition on the interaction of neurosteroids with GABA(A) receptors. *Neuropharmacology* 43:651-661.
- Belelli D, Herd MB, Mitchell EA, Peden DR, Vardy AW, Gentet L, Lambert JJ (2006) Neuroactive steroids and inhibitory neurotransmission: mechanisms of action and physiological relevance. *Neuroscience* 138:821-829.
- Casellas P, Galiegue S, Basile AS (2002) Peripheral benzodiazepine receptors and mitochondrial function. *Neurochem Int* 40:475-486.
- Castillo AF, Maciel FC, Castilla R, Duarte A, Maloberti P, Paz C, Podesta EJ (2006) cAMP increases mitochondrial cholesterol transport through the induction of arachidonic acid release inside this organelle in Leydig cells. *Febs J* 273:5011-5021.
- Compagnone NA, Mellon SH (2000) Neurosteroids: biosynthesis and function of these novel neuromodulators. *Front Neuroendocrinol* 21:1-56.
- Costa E, Auta J, Guidotti A, Korneyev A, Romeo E (1994) The pharmacology of neurosteroidogenesis. *J Steroid Biochem Mol Biol* 49:385-389.
- Hauet T, Liu J, Li H, Gazouli M, Culty M, Papadopoulos V (2002) PBR, StAR, and PKA: partners in cholesterol transport in steroidogenic cells. *Endocr Res* 28:395-401.
- Hosie AM, Wilkins ME, da Silva HM, Smart TG (2006) Endogenous neurosteroids regulate GABAA receptors through two discrete transmembrane sites. *Nature* 444:486-489.

- Keller AF, Breton JD, Schlichter R, Poisbeau P (2004) Production of 5 α -reduced neurosteroids is developmentally regulated and shapes GABA(A) miniature IPSCs in lamina II of the spinal cord. *J Neurosci* 24:907-915.
- 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.
- Lambert JJ, Belelli D, Peden DR, Vardy AW, Peters JA (2003) Neurosteroid modulation of GABAA receptors. *Prog Neurobiol* 71:67-80.
- Leroy C, Poisbeau P, Keller AF, Nehlig A (2004) Pharmacological plasticity of GABA(A) receptors at dentate gyrus synapses in a rat model of temporal lobe epilepsy. *J Physiol* 557:473-487.
- Liu J, Rone MB, Papadopoulos V (2006) Protein-protein interactions mediate mitochondrial cholesterol transport and steroid biosynthesis. *J Biol Chem* 281:38879-38893.
- Maguire J, Mody I (2007) Neurosteroid synthesis-mediated regulation of GABA(A) receptors: relevance to the ovarian cycle and stress. *J Neurosci* 27:2155-2162.
- Mameli M, Valenzuela CF (2006) Alcohol increases efficacy of immature synapses in a neurosteroid-dependent manner. *Eur J Neurosci* 23:835-839.
- Mameli M, Carta M, Partridge LD, Valenzuela CF (2005) Neurosteroid-induced plasticity of immature synapses via retrograde modulation of presynaptic NMDA receptors. *J Neurosci* 25:2285-2294.
- Papadopoulos V, Liu J, Culty M (2007) Is there a mitochondrial signaling complex facilitating cholesterol import? *Mol Cell Endocrinol* 265-266:59-64.
- Papadopoulos V, Lecanu L, Brown RC, Han Z, Yao ZX (2006a) Peripheral-type benzodiazepine receptor in neurosteroid biosynthesis, neuropathology and neurological disorders. *Neuroscience* 138:749-756.
- Papadopoulos V, Baraldi M, Guilarte TR, Knudsen TB, Lacapere JJ, Lindemann P, Norenberg MD, Nutt D, Weizman A, Zhang MR, Gavish M (2006b) Translocator protein (18kDa): new nomenclature for the peripheral-type benzodiazepine receptor based on its structure and molecular function. *Trends Pharmacol Sci* 27:402-409.
- Poisbeau P, Patte-Mensah C, Keller AF, Barrot M, Breton JD, Luis-Delgado OE, Freund-Mercier MJ, Mensah-Nyagan AG, Schlichter R (2005) Inflammatory pain upregulates spinal inhibition via endogenous neurosteroid production. *J Neurosci* 25:11768-11776.
- Polgar E, Fowler JH, McGill MM, Todd AJ (1999) The types of neuron which contain protein kinase C gamma in rat spinal cord. *Brain Res* 833:71-80.

- Reddy DS, Rogawski MA (2002) Stress-induced deoxycorticosterone-derived neurosteroids modulate GABA(A) receptor function and seizure susceptibility. *J Neurosci* 22:3795-3805.
- Reddy DS, O'Malley BW, Rogawski MA (2005) Anxiolytic activity of progesterone in progesterone receptor knockout mice. *Neuropharmacology* 48:14-24.
- Reddy DS, Castaneda DC, O'Malley BW, Rogawski MA (2004) Anticonvulsant activity of progesterone and neurosteroids in progesterone receptor knockout mice. *J Pharmacol Exp Ther* 310:230-239.
- Sanna E, Talani G, Busonero F, Pisu MG, Purdy RH, Serra M, Biggio G (2004) Brain steroidogenesis mediates ethanol modulation of GABAA receptor activity in rat hippocampus. *J Neurosci* 24:6521-6530.
- Schlichter R, Keller AF, De Roo M, Breton JD, Inquimbert P, Poisbeau P (2006) Fast nongenomic effects of steroids on synaptic transmission and role of endogenous neurosteroids in spinal pain pathways. *J Mol Neurosci* 28:33-51.
- Shu HJ, Eisenman LN, Jinadasa D, Covey DF, Zorumski CF, Mennerick S (2004) Slow actions of neuroactive steroids at GABAA receptors. *J Neurosci* 24:6667-6675.

FIGURES

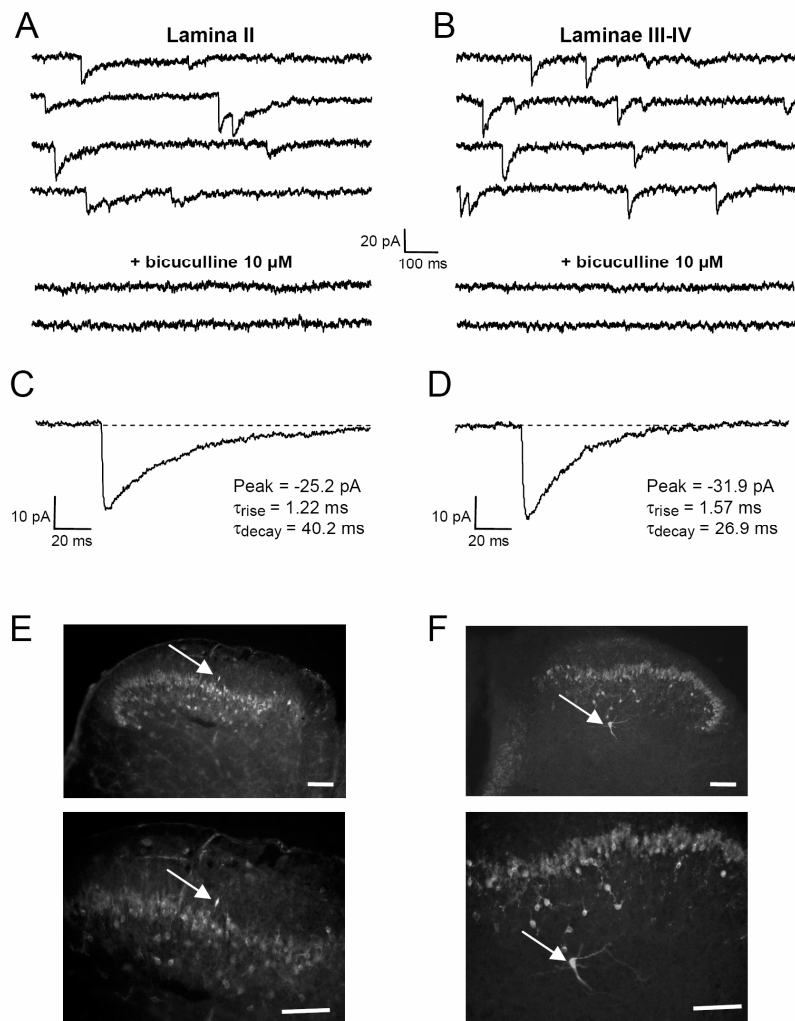


Figure 1. Properties of GABA_A receptor-mediated mIPSCs in the dorsal horn of P9-15 rat spinal cord slices **A-B**, mIPSCs recorded in lamina II (**A**) and laminae III-IV (**B**) neurons in the presence of kynurenic acid (2mM) and strychnine (1 μM), were blocked by the competitive GABA_A receptor antagonist bicuculline (10 μM). **C-D**, Averaged traces of 10 individual mIPSCs recorded from the neurons illustrated in **A** and **B**, respectively. Decay kinetics of mIPSCs were slower in lamina II (**C**) than in laminae III-IV (**D**). The numbers beside the traces indicate the values of peak amplitude (Peak), rise time constant (τ_{rise}) and monoexponential decay time constant (τ_{decay}) determined by the fitting procedure. **E-F**, Immunocytochemical labelling of the slices with an antibody against PKC γ was used to localize the border between lamina II and lamina III. The recorded biocytin-filled neuron (indicated by arrow) was judged to be localized in lamina II if situated within, or dorsal to, the PKC γ -like immunoreactivity (**E**) or in laminae III-IV if situated ventral to the PKC γ -like immunoreactivity (**F**). Scale bar: 100 μm.

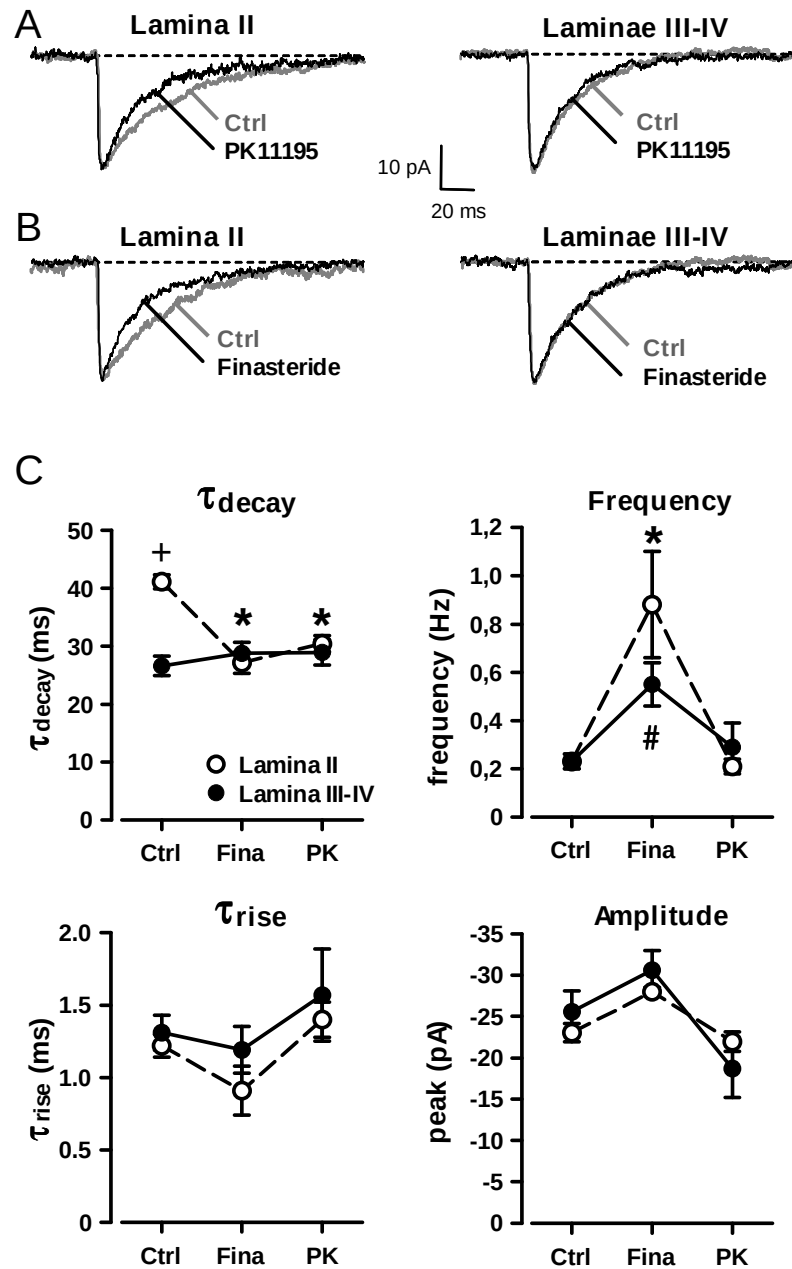


Figure 2. Pharmacological inhibition of the biosynthesis of $3\alpha5\alpha$ -NS accelerates the decay kinetics of GABA_A receptor-mediated mIPSCs only in lamina II of P9-15 animals. **A-B**, Averaged traces of 10 individual mIPSCs recorded from lamina II or laminae III-IV neurons after incubation of slices in normal ACSF (Ctrl; grey traces), or in the presence of either the TSPO inhibitor PK11195 (10 μM ; black traces in **A**) or the 5α -reductase inhibitor finasteride (50 μM ; black traces in **B**). **C**, PK11195 (PK) and finasteride (Fina) significantly reduced the value of the decay time constant (τ_{decay}) of mIPSCs in lamina II (open circles) with respect to control, to a value that was no longer different from that in laminae III-IV (filled circles). Values of τ_{decay} in laminae III-IV were not modified by PK or Fina. The frequency of mIPSCs was significantly increased by finasteride in both laminae but their rise time constants (τ_{rise}) or their peak amplitudes were unchanged. Two-way ANOVA with factors *lamina*

and *treatment* showed a significant interaction of *lamina* and *treatment* for τ_{decay} ($F_{2,68} = 12.78$, $p < 0.001$), and an effect of *treatment* for the frequency of occurrence mIPSCs ($F_{2,68} = 28.15$, $p < 0.001$).

In this and following figures the symbols +, * and # indicate statistically significant differences. The symbols stand for the following comparisons: +: significant effect between lamina II and laminae III-IV for the same treatment; *: significant effect of treatment within lamina II; #: significant effect of treatment within laminae III-IV.

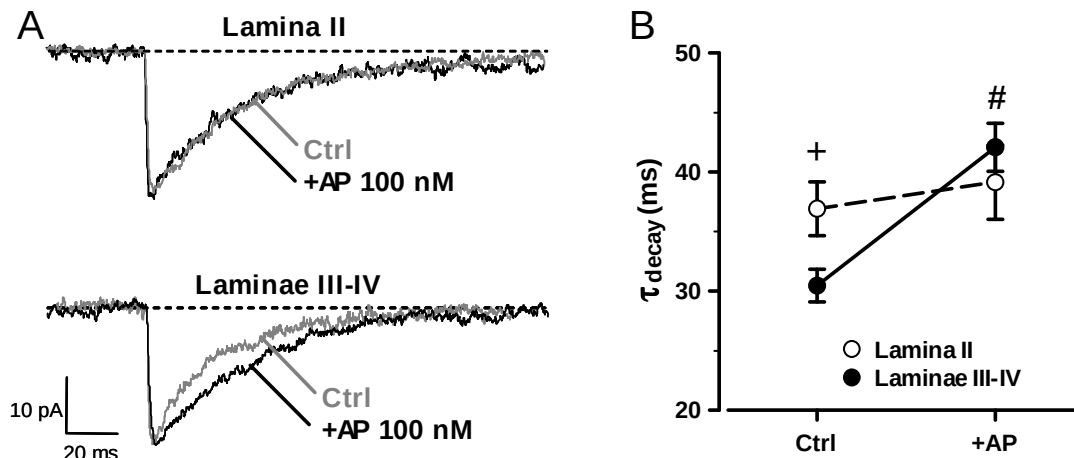


Figure 3. Differential effect of the 3 α 5 α -NS allopregnanolone (AP) on the decay kinetics of GABA_A receptor-mediated mIPSCs in lamina II and laminae III-IV. **A**, Averaged traces of 10 individual mIPSCs recorded a lamina II or a laminae III-IV neuron, before (Ctrl; grey traces) and after bath application of AP (100 nM; black traces) for at least 20 minutes. **B**, Under control conditions, the value of the decay time constant (τ_{decay}) of GABA_A receptor-mediated mIPSCs was significantly smaller in laminae III-IV neurons (filled circles) than in lamina II neurons (white circles). AP significantly increased the value of τ_{decay} of mIPSCs in laminae III-IV neurons but left that of lamina II neurons unaffected. Two-way ANOVA with factors *lamina* (between) and *AP treatment* (repeated measures) showed a significant interaction for *lamina* and treatment for τ_{decay} ($F_{1,9} = 20.71$, $p < 0.01$). Note also that in the presence of AP, the values of τ_{decay} of mIPSCs were similar in lamina II and laminae III-IV neurons.

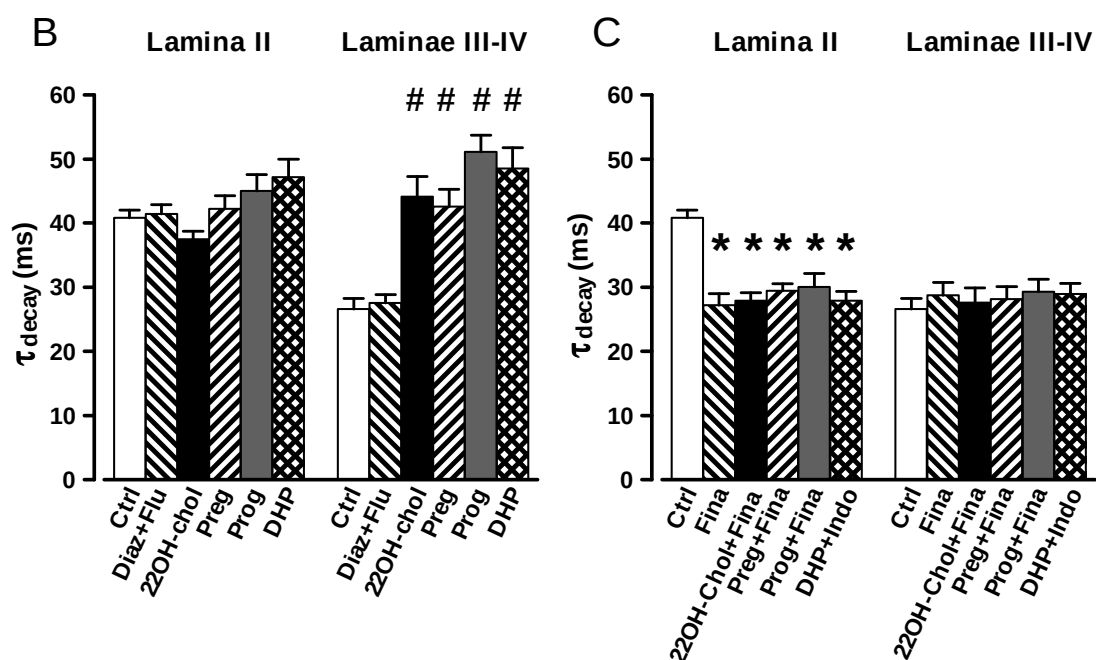
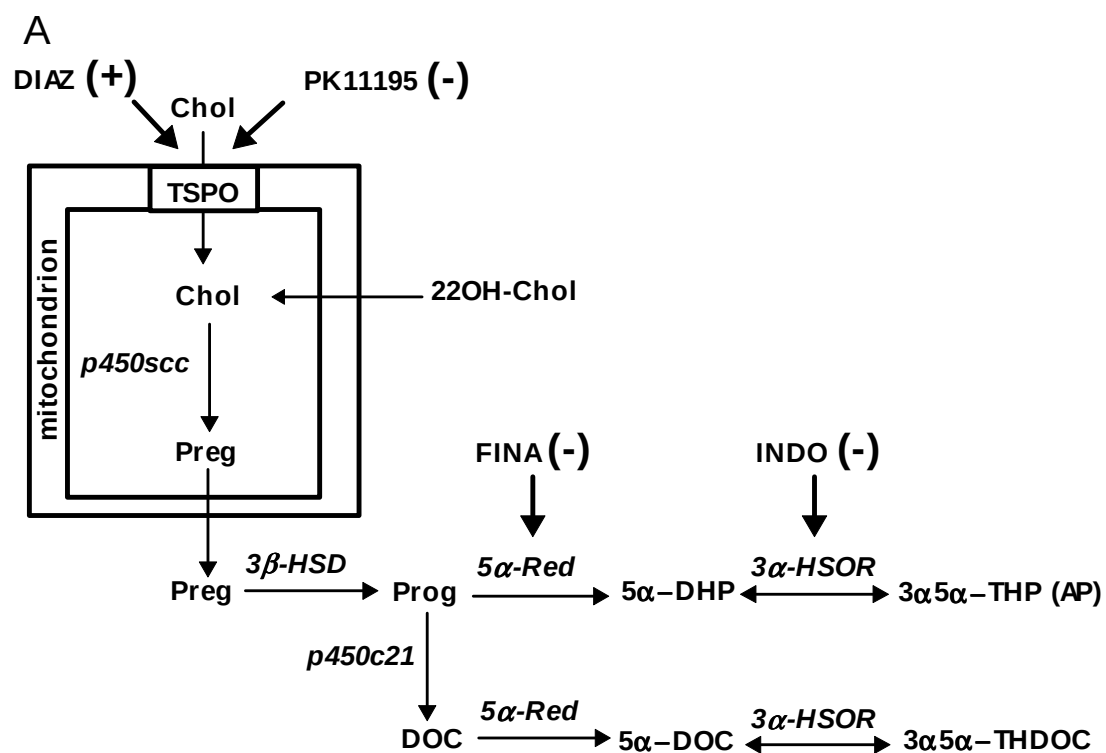


Figure 4. Bypassing mitochondrial cholesterol transport mediated by TSPO allows to induce the synthesis of $3\alpha5\alpha$ -NS in laminae III-IV. **A.** Schematic representation of the biosynthetic pathways leading to the production of $3\alpha5\alpha$ -NS. The names of the different enzymes as well as the site of action of the different pharmacological agents used in our experiments are indicated. **B.** Histogram presenting the mean values ($\pm$ SEM) of τ_{decay} for lamina II (*left*) and laminae III-IV (*right*) neurons incubated with either diazepam (1 μ M, Diaz), Diaz + flumazenil (10 μ M, Flu) (Diaz+Flu), 22OH-cholesterol (100 nM; 22OH-Chol), pregnenolone (100 nM; Preg), progesterone (100 nM; Prog), or dihydroprogesterone (100 nM; DHP). In lamina II, none of these treatments was able to increase significantly the value of τ_{decay} with respect to its value in control conditions. By contrast, in laminae III-IV, all the treatments, except Diaz + Flu, significantly increased τ_{decay} to values observed for mIPSCs recorded in lamina II. **C.** Protocol similar to that in **B**, but in the presence of finasteride (50 μ M; Fina) an inhibitor of the 5α -reductase, or indomethacin (10 μ M; Indo) an inhibitor of the 3α -HSOR. In lamina II, all treatments significantly reduced τ_{decay} to the values of mIPSCs recorded in laminae III-IV neurons, whereas in laminae III-IV neurons no change in τ_{decay} was observed for any treatment. Two-way ANOVA with factors *lamina* and *treatment* showed a significant interaction ($F_{13,193} = 6.07$, $p < 0.001$)

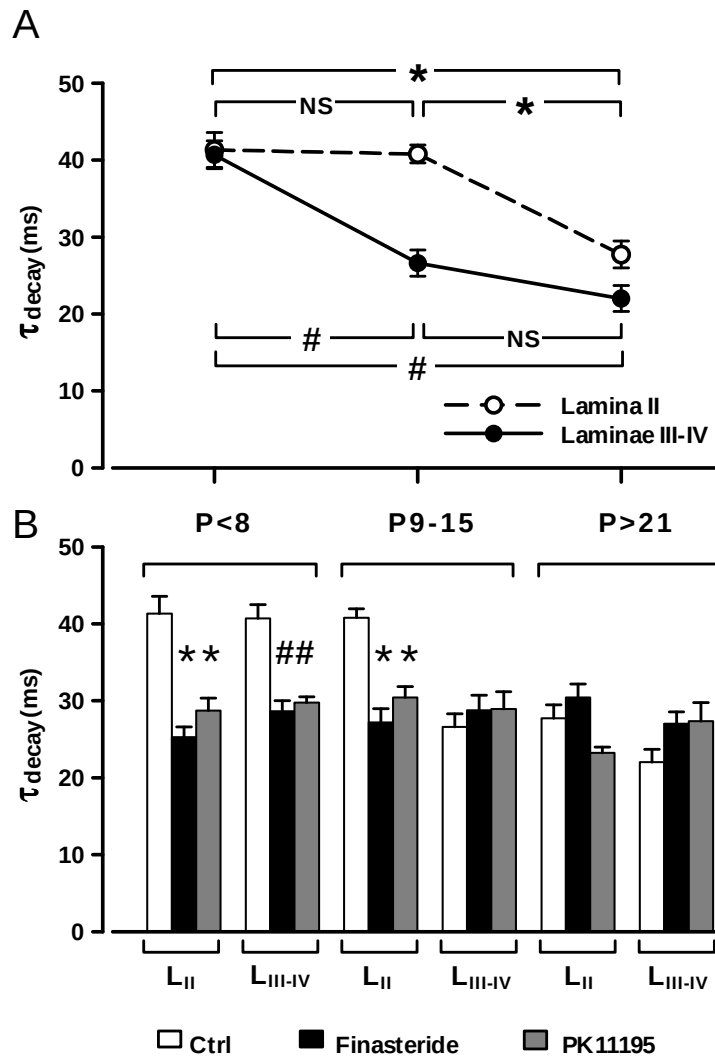


Figure 5. The tonic biosynthesis of $3\alpha5\alpha$ -NS is regulated during post-natal development. **A**, In young animals ($P < 8$), τ_{decay} values were elevated and similar in lamina II (open circles) and laminae III-IV (filled circles) neurons. At $P9-15$, τ_{decay} was significantly decreased in laminae III-IV but remained elevated lamina II neurons. At $P > 21$, τ_{decay} was decreased in lamina II neurons reaching values similar to that in lamina III-IV neurons. Two-way ANOVA with factors *age* and *lamina* showed a significant interaction ($F_{2,62} = 5.63$, $p < 0.01$). **B**, Incubation spinal cord slices for >5 hours with PK11195 ($10 \mu\text{M}$; grey bars) or >3 hours with finasteride ($50 \mu\text{M}$; black bars) significantly reduced τ_{decay} values (white bars) in both lamina II and laminae III-IV at $P < 8$ but only in lamina II at $P9-15$. Both substances had no significant effect at $P > 21$, neither in lamina II nor in laminae III-IV. One-way ANOVA for factor *treatment* for each lamina at each age.

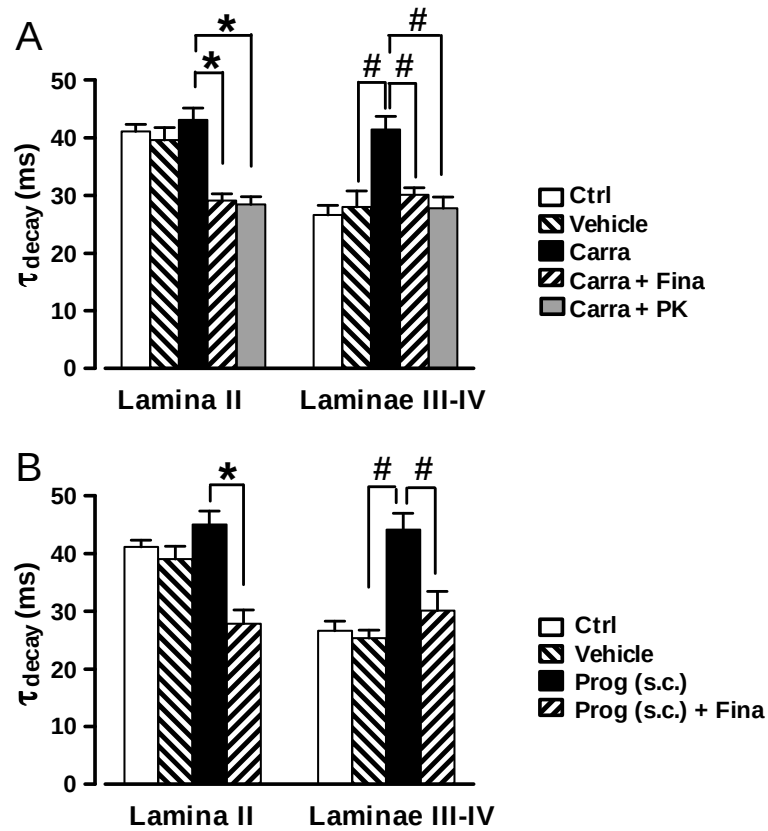


Figure 6. The biosynthesis of $3\alpha,5\alpha$ -reduced neurosteroids can be stimulated in laminae III-IV following carrageenan-induced inflammation or after a subcutaneous (s.c) injection of progesterone. **A**, Histogram showing the mean values ($\pm$ SEM) of τ_{decay} in lamina II and laminae III-IV neurons from naive control (Ctrl, white bars), saline-injected (Vehicle, down-hatched bars) or carrageenan-injected (Carra, black bars) animals. Before recording, spinal cord slices from carrageenan-injected animals were incubated in normal ACSF, in ACSF containing finasteride ($50 \mu\text{M}$; Carra + Fina; up-hatched bars) or in ACSF containing PK11195 ($10 \mu\text{M}$; Carra + PK; grey bars). In lamina II, the high control values of τ_{decay} were not affected by inflammation, but were significantly reduced by finasteride or PK11195. In laminae III-IV inflammation induced a significant increase in the τ_{decay} value with respect to control, an effect that was abolished by finasteride or PK11195 treatment. Two-way ANOVA with factors *lamina* and *treatment* showed a significant interaction ($F_{4,90} = 7.88$, $p < 0.001$). **B**, Histogram representing the mean values ($\pm$ SEM) of τ_{decay} in lamina II and laminae III-IV neurons from naive controls (Ctrl, white bars), oil-injected (vehicle, down-hatched bars) or progesterone-injected (Prog (s.c), black bars) animals. As in **A**, slices from progesterone-injected animals were incubated without or with finasteride ($50 \mu\text{M}$; Prog (s.c) + Fina; up-hatched bars). As observed in the case of inflammatory animals, progesterone injection in healthy animals induced a significant increase in τ_{decay} values in laminae III-IV, an effect which was reversed by finasteride. Note that the progesterone injection had no effect on mIPSC kinetics in lamina II. Two-way ANOVA with factors *lamina* and *treatment* showed a significant interaction ($F_{3,75} = 8.37$, $p < 0.001$).

Discussions et Perspectives

L'ensemble de ce travail a permis pour la première fois de caractériser la transmission synaptique inhibitrice rapide dans les laminae III-IV de la corne dorsale de la moelle épinière. Comme dans la lamina II, cette transmission implique le GABA et la glycine. Cependant, nos résultats ont révélé des différences dans les propriétés de cette transmission synaptique inhibitrice entre les laminae III-IV et la lamina II.

Premièrement, c'est la transmission glycinergique qui est prépondérante dans les laminae III-IV, alors que la transmission GABAergique domine dans la lamina II. D'autre part, une fraction de synapses inhibitrices dans la lamina II co-libère du GABA et de la glycine et la co-détection de ces deux neurotransmetteurs est possible dans des conditions où il y a une synthèse endogène de stéroïdes $3\alpha5\alpha$ -réduits. En revanche, cette co-transmission n'a jamais été détectée dans les laminae III-IV.

Deuxièmement, nous avons observé qu'entre le 9ème et le 15ème jour de vie postnatale, les CPSIm GABAergiques présentent des cinétiques de désactivation significativement plus lentes dans la lamina II que les laminae III-IV. Ce phénomène est dû à une synthèse localisée de stéroïdes $3\alpha5\alpha$ -réduits dans la lamina II. Une telle synthèse est absente dans les laminae III-IV à ce stade du développement.

Troisièmement, la synthèse endogène de stéroïdes $3\alpha5\alpha$ -réduits est placée sous le contrôle de la TSPO qui permet le transport du cholestérol à l'intérieur de la mitochondrie, ce qui constitue la première étape de la neurostéroïdogenèse. L'activité de la TSPO est régulée au cours du développement. Nos résultats montrent qu'elle est maximale dans toute la corne dorsale durant la première semaine de vie postnatale, puis disparaît au 8ème jour dans les laminae III-IV. Suite à cette perte d'activité, la TSPO n'est plus stimuable pharmacologiquement dans les laminae III-IV. Plus tard, à partir du 15ème jour de vie postnatale, l'activité de la TSPO diminue également dans la lamina II et n'influence plus les cinétiques des CPSIm GABA_A dans des conditions basales. En revanche, l'activité de la TSPO reste stimuable pharmacologiquement dans la lamina II. De manière particulièrement intéressante, dans les laminae III-IV, suite à l'induction d'une douleur inflammatoire périphérique, l'activité de la TSPO redevient maximale, permettant ainsi une synthèse généralisée de stéroïdes $3\alpha5\alpha$ -réduits dans la corne dorsale.

Enfin, notre travail a montré que les stéroïdes circulants pouvaient servir de précurseurs pour la synthèse de stéroïdes neuroactifs dans la corne dorsale de la moelle

épinière. En effet, suite à une simple injection sous-cutanée de progestérone, nous avons observé une prolongation importante des CPSIm GABA_A dans les laminae III-IV et ce phénomène dépend de la production locale de stéroïdes 3 α 5 α -réduits.

Dans cette dernière partie, nous allons maintenant discuter ces différents résultats et tenter de les replacer dans leur contexte physiologique.

I. La transmission synaptique inhibitrice dans la corne dorsale de la moelle épinière

1. Propriétés de la transmission synaptique inhibitrice.

a. Les entrées synaptiques inhibitrices.

Dans notre préparation, la transmission synaptique inhibitrice est portée par le GABA et la glycine. Nous avons observé que dans les laminae III-IV, tous les neurones enregistrés recevaient des entrées synaptiques GABAergiques et glycinergiques. Dans la lamina II, 55% des neurones reçoivent des entrées synaptiques GABAergiques et glycinergiques ; alors que les 45% des neurones restants ne reçoivent qu'une composante synaptique GABAergique. Durant les premiers jours postnatals (P0-1), les neurones de la lamina II ne présentent que des CPSIm GABAergiques, malgré l'expression de récepteurs de la glycine fonctionnels (Baccei et Fitzgerald, 2004). Les entrées synaptiques glycinergiques se développent après le 2ème jour de vie postnatale, ce qui fait que la proportion des neurones ne recevant que des entrées synaptiques inhibitrices GABAergiques diminue au cours du développement postnatal. Ceci est corrélé avec les faibles niveaux d'expression de la géphyrine durant les premiers jours de vie postnatale, qui se traduisent par une absence d'adressage des récepteurs de la glycine à la synapse. L'innervation glycinergique devient fonctionnellement mature durant la 2ème semaine de vie post-natale (Baccei et Fitzgerald, 2004 ; Keller et al., 2001). Par ailleurs, entre le 9ème et le 15ème jour de vie postnatale (stade auquel nous avons réalisé cette étude), la proportion des neurones ne recevant que des entrées synaptiques GABAergiques ne varie pas. Au 9ème jour de vie postnatale, le schéma de l'innervation inhibitrice dans la corne dorsale de la moelle épinière (i.e. 3ème partie de la discussion) semble mature. D'autant plus que la participation relative du GABA et de la glycine dans les neurones recevant la double entrée est comparable à celle observée chez le rat adulte dans la lamina II (Keller et al., 2001).

b. La co-transmission

La co-transmission GABA/glycine a été étudiée dans la lamina I (Chery et al., 2000), la lamina II (Keller et al., 2001) et la corne ventrale de la moelle épinière (Jonas et al., 1998 ; O'Brien et Berger, 1999). Dans notre étude, bien que tous les neurones aient présenté des CPSIm GABAergiques et glycinergiques dans les laminae III-IV de la corne dorsale de la moelle épinière, nous n'avons jamais détecté de co-transmission GABA/glycine.

Deux hypothèses sont possibles pour tenter d'expliquer l'absence de co-transmission dans les laminae III-IV : (1) une absence de co-libération par l'élément présynaptique et/ou (2) une absence de co-détection par l'élément postsynaptique.

Co-libération :

Comme nous l'avons vu dans l'introduction, la terminaison mixte se caractérise par l'expression concomitante de l'enzyme de synthèse du GABA (GAD) et du transporteur membranaire neuronal de la glycine (GlyT2).

Dans la moelle épinière, les enzymes de synthèse du GABA (GAD65 et GAD67) sont exprimées dans toute la substance grise (Mackie et al., 2003) et les neurones GABAergiques sont principalement localisés dans les couches I à III de la corne dorsale et dans la lamina X (Spike et al., 1993). Les corps cellulaires des neurones glycinergiques sont abondants dans les couches III-IV et rares dans les couches I et II de la corne dorsale de la moelle épinière (Todd et Sullivan, 1990 ; Zeilhofer et al., 2005). Enfin, le GABA et la glycine sont co-localisés dans 64% des corps cellulaires neuronaux dans les laminae III-IV (Todd et Sullivan, 1990). De plus, le GABA et la glycine coexistent dans des terminaisons synaptiques dans les laminae III et IV (Todd et al., 1995 ; 1996) et pourraient par conséquent être co-libérés par un nombre important de boutons synaptiques dans ces couches.

Cependant, dans toutes les vésicules contenant du GABA et de la glycine, la concentration de chaque neurotransmetteur pourrait être variable et éventuellement différer d'un neurone à l'autre. En effet, le contenu d'une vésicule va dépendre des concentrations cytoplasmiques de GABA et de glycine. Ces concentrations dépendent respectivement de la synthèse présynaptique de GABA par la GAD (Nabekura et al., 2004) et de l'expression de GlyT2 (Aubrey et al., 2007). Ainsi les neurones exprimant GlyT2 et faisant synapse dans les laminae III-IV pourraient posséder des vésicules contenant principalement de la glycine, mais peu de GABA, d'où l'absence de CPSIm mixtes. Pour éclaircir ce point, il faudrait pouvoir déterminer l'activité de synthèse des différentes isoformes de GAD dans la lamina II d'une part et dans les laminae III-IV d'autre part. Ceci est techniquement impossible à l'heure actuelle.

Co-détection :

La co-transmission GABA/glycine nécessite aussi une co-détection par l'élément postsynaptique et donc la présence des deux types de récepteurs au site postsynaptique et en face du site de libération présynaptique des neurotransmetteurs. Les récepteurs GABA_A et de la glycine sont présents dans toute la corne dorsale. Ils peuvent être exprimés dans un même neurone et au même site postsynaptique (Todd et al., 1996).

Dans les laminae I et II, l'absence de co-transmission GABA/glycine chez l'animal adulte s'explique par la localisation péri- ou extrasynaptiques des récepteurs GABA_A. Dans ces conditions, les récepteurs sont en contact avec une concentration faible de GABA et par conséquent leur affinité pour le GABA va être déterminante pour leur activation. Dans les conditions basales, ces récepteurs ne sont pas activés de manière significative par le GABA. Cependant en présence de modulateurs allostériques positifs du récepteur tels que les benzodiazépines ou les stéroïdes 3 α 5 α -réduits, on note l'apparition/réapparition de la co-transmission car l'affinité du récepteur a été augmentée et les concentrations même faibles de GABA suffisent pour activer significativement les récepteurs (Chery et De Koninck, 2000 ; Keller et al., 2001, 2004 ; Poisbeau et al., 2005). Cependant, dans les laminae III-IV, nous avons montré que, même en situation de synthèse endogène forte de stéroïdes 3 α 5 α -réduits ou lors d'application exogène d'allopregnanolone, la co-transmission est absente. Ces résultats excluent a priori une absence de co-transmission liée à une affinité trop basse des récepteurs GABA_A.

Des marquages immunocytochimiques des récepteurs de la glycine et de la sous-unité α 1 du récepteur GABA_A, ont montré que les récepteurs étaient co-localisés dans les laminae III et les couches plus profondes. Cette co-localisation diffère en fonction du type de neurone mais aussi de la localisation cellulaire (dendrite ou corps cellulaire) (Bohlhalter et al., 1994). Dans les laminae III-IV, les récepteurs GABA_A sont probablement localisés trop loin du site de libération et même la présence d'un modulateur allostérique positif puissant comme l'allopregnanolone ne permet pas leur activation. Une étude plus fine en microscopie électronique a montré qu'aux sites postsynaptiques contenant des récepteurs GABA_A et des récepteurs de la glycine, les agrégats des deux types de récepteurs peuvent être soit mélangés soit clairement séparés (Todd et al., 1996). Lorsque les agrégats de récepteurs sont séparés, la distance entre ces agrégats est importante. On peut spéculer dans ce cas que les neurotransmetteurs libérés n'activeront que les récepteurs faisant face au site de libération.

Par conséquent, si le GABA et la glycine sont co-libérés par la même vésicule, la nature de l'évènement postsynaptique généré dépendra de la nature de l'agrégat de récepteurs situé juste en face du site de libération.

Dans les laminae III-IV de la corne dorsale de la moelle épinière, tous les éléments semblent réunis pour qu'une co-libération GABA/glycine soit possible. Cependant dans nos conditions expérimentales, nous n'avons jamais observé de co-détection du GABA et de glycine. Des études sur la transmission synaptique spontanée et évoquée pourraient être utiles pour approfondir la question de la co-transmission. Cependant, il faudrait pouvoir réaliser cette étude sur des paires de neurones connectés synaptiquement, car une stimulation extracellulaire générale risquerait d'activer des axones provenant de plusieurs neurones présynaptiques, certains pouvant libérer du GABA et d'autres de la glycine.

2. Cinétiques des courants postsynaptiques inhibiteurs miniatures (CPSIm)

Dans les laminae III-IV, nous avons observé des courants postsynaptiques inhibiteurs miniatures GABAergiques et glycinergiques. Ces courants peuvent être discriminés par leurs cinétiques. Les CPSIm glycinergiques ont des temps d'activation et de désactivation rapides ainsi qu'une amplitude importante. Nous n'avons pas observé de différences de cinétiques des courants postsynaptiques glycinergiques entre les laminae III-IV et la lamina II. En revanche, nous avons observé des différences dans les propriétés des CPSIm GABA_A dues à la synthèse locale de stéroïdes 3 α 5 α -réduits. En effet, lorsque leur synthèse est bloquée par du finastéride ou du PK11195, il n'y a plus aucune différence de cinétique entre les CPSIm de la lamina II et ceux des laminae III-IV.

Toutefois ce résultat est étonnant, étant donné que la composition en sous-unité des récepteurs GABA_A est différente entre la lamina II et les laminae III-IV. En effet, chez l'adulte, dans la lamina II, seules les sous-unités α 2, α 3, β 2, β 3 et γ 2 des récepteurs GABA_A sont exprimées, alors que dans les laminae III-IV, les sous-unités α 1 et α 5 sont également exprimées (Bohlhalter et al., 1996). De plus, la sous-unité α 1 est présente aux sites synaptiques (Bohlhalter et al., 1994). La composition des récepteurs GABA_A dans les laminae III-IV de la moelle épinière chez le rat adulte est donc potentiellement plus hétérogène que

celle rencontrée dans la lamina II. Cependant, nous n'avons pas noté d'hétérogénéité dans les cinétiques des CPSIm enregistrés au sein d'un même neurone dans les différentes laminae. D'autre part, l'expression de la sous-unité $\alpha 3$ dans la lamina II ne confère pas aux récepteurs de cette lamina des cinétiques plus lentes, comme cela a été montré dans des systèmes d'expression hétérologues (Barberis et al., 2007). Il est envisageable qu'entre 9 et 15 jours de vie postnatale, le profil d'expression des sous-unités ne soit pas encore mature. Cependant, en absence de toute modulation par des stéroïdes $3\alpha 5\alpha$ -réduits, nous avons pu établir qu'entre le 6ème et le 30ème jour de vie postnatale, il n'y avait aucune modification significative des cinétiques des CPSIm GABA_A. De ce fait, le profil d'expression des sous-unités du récepteur GABA_A semble être définitif très tôt au cours du développement postnatal. La différence de composition en sous-unités entre les laminae II et III-IV ne semble pas influencer les propriétés des CPSIm GABA_A.

Entre le 10ème et 15ème jour de vie postnatale, les CPSIm GABA_A ont des cinétiques de désactivation plus lentes dans la lamina II que dans les laminae III-IV. Mais, lorsque l'on bloque toute modulation endogène par des neurostéroïdes, les CPSIm GABA_A enregistrés dans la lamina II sont accélérés et leurs caractéristiques deviennent similaires dans les laminae II et III-IV. Inversement, l'induction d'une synthèse locale de stéroïdes $3\alpha 5\alpha$ -réduits ou l'application exogène d'un stéroïde $3\alpha 5\alpha$ -réduit ralentit les cinétiques de désactivation des CPSIm GABA_A dans les laminae III-IV jusqu'à des niveaux comparables à ceux observés dans la lamina II en condition contrôle. Les différences de constantes de temps de désactivation des CPSIm GABA_A, entre 9 et 15 jours de vie postnatale, sont donc exclusivement attribuables à la présence locale de stéroïdes $3\alpha 5\alpha$ -réduits. Nous avons mis en évidence que dans la lamina II, entre le 9ème et le 15ème jour de vie postnatale, il y avait une synthèse de stéroïdes $3\alpha 5\alpha$ -réduits et que ces stéroïdes ne diffusent pas dans les couches voisines. Les récepteurs GABA_A des laminae III-IV sont sensibles aux stéroïdes $3\alpha 5\alpha$ -réduits de la même façon que ceux de la lamina II.

L'effet des stéroïdes sur le récepteur GABA_A est porté par les sous-unités α et β (sites de liaison) mais la nature de ces sous-unités n'influence pas la sensibilité du récepteur aux stéroïdes. En revanche, la présence de la sous-unité δ augmente les effets potentialisateurs des stéroïdes $3\alpha 5\alpha$ -réduits (Mihalek et al., 1999 ; Belelli et al., 2002). Les récepteurs contenant la sous-unité δ sont extrasynaptiques et responsables d'une inhibition tonique. Nous n'avons jamais enregistré de courant tonique GABAergique dans la lamina II et dans les laminae III-

IV de la corne dorsale de la moelle épinière, ce qui suggère l'absence de récepteurs GABA_A contenant la sous-unité δ .

L'ensemble de ces éléments montre que dans la corne dorsale les récepteurs GABA_A ont les mêmes propriétés malgré des différences éventuelles de composition des récepteurs. Les différences de cinétique entre les différentes laminae de la corne dorsale s'expliquent uniquement par la présence de modulateurs endogènes, les stéroïdes 3 α 5 α -réduits. Par conséquent, c'est la synthèse locale des stéroïdes 3 α 5 α -réduits qui va déterminer les caractéristiques de l'inhibition synaptique GABAergique en un point précis de la corne dorsale.

II. Synthèse locale de stéroïdes 3 α 5 α -réduits

1. Synthèse différentielle de stéroïdes 3 α 5 α -réduits dans la corne dorsale

a. Les CPSIm GABA_A : des détecteurs fins de la présence de stéroïdes 3 α 5 α -réduits

Les stéroïdes 3 α 5 α -réduits augmentent les constantes de temps de désactivation des courants postsynaptiques, faisant des cinétiques de désactivation des CPSIm GABA_A d'excellents indicateurs de la présence des stéroïdes 3 α 5 α -réduits au voisinage des récepteurs postsynaptiques (Keller et al., 2004).

Les approches biochimiques et morphologiques de la littérature ne donnent malheureusement pas d'indication précise sur la présence de stéroïdes 3 α 5 α -réduits au niveau synaptique. En revanche, notre approche électrophysiologique nous a permis d'étudier à l'échelle de la synapse unique l'action modulatrice des stéroïdes 3 α 5 α -réduits produits de manière endogène ou appliqués de façon exogène. Nous avons ainsi pu déterminer si cette modulation était homogène dans la cellule, ou si la présence de stéroïdes était variable d'un site postsynaptique à l'autre d'un même neurone. En effet, si tous les sites postsynaptiques GABAergiques ne sont pas en contact avec la même quantité de stéroïdes, ceci devrait se refléter par la présence de plusieurs populations de CPSI GABA_A avec des cinétiques de désactivation différentes. Dans notre étude, nous n'avons pas remarqué d'hétérogénéité significative des cinétiques au sein d'une cellule, suggérant une présence de stéroïdes 3 α 5 α -réduits relativement homogène et influençant de manière similaire l'ensemble des récepteurs synaptiques de la cellule. Ce résultat va dans le sens d'une étude récente sur le cerveau de rat, qui a mis en évidence que la 5 α -réductase et la 3 α -HSOR sont exprimées dans les neurones recevant des contacts synaptiques GABAergiques (Agis-Balboa et al., 2006). Nous pouvons donc envisager que le neurone synthétiserait lui-même les stéroïdes 3 α 5 α -réduits qui modulent les récepteurs GABA_A qu'il exprime. Ce phénomène permettrait au neurone d'ajuster les caractéristiques de ses courants synaptiques inhibiteurs et par conséquent les caractéristiques de l'inhibition synaptique à laquelle il est soumis.

b. Absence de diffusion extracellulaire des stéroïdes

Notre travail a montré pour la première fois que, dans le tissu nerveux, les stéroïdes endogènes sont confinés au niveau de leur site de synthèse, et que leur diffusion à l'intérieur du tissu est probablement très limitée. Ceci s'explique par le caractère lipophile des stéroïdes $3\alpha5\alpha$ -réduits, leur coefficient de partage entre la membrane plasmique et le milieu extracellulaire étant de l'ordre de 78000 (Akk et al., 2005). La membrane plasmique peut donc être considérée comme un piège/réservoir à stéroïdes.

Il faut également noter que les sites modulateurs des stéroïdes $3\alpha5\alpha$ -réduits situés sur le récepteur $GABA_A$ ne sont pas accessibles par le milieu aqueux extracellulaire (Akk et al., 2005). D'autre part, il a été montré que la diffusion latérale dans la membrane plasmique est importante et que c'est par ce type de diffusion que les stéroïdes accèdent à leur site d'action sur le récepteur $GABA_A$. Le réservoir membranaire intracellulaire de stéroïdes n'est pas nécessaire pour la modulation du récepteur $GABA_A$; cependant, il pourrait servir de réserve permettant d'équilibrer en stéroïdes $3\alpha5\alpha$ -réduits le compartiment de la membrane plasmique en quelques secondes (Akk et al., 2005). Par ailleurs, étant donné leur caractère lipophile, il est à prévoir que les stéroïdes circulants, tels que la corticostérone et la progestérone, soient facilement piégés par les membranes plasmiques des cellules. Ainsi, le pool membranaire de stéroïdes pourrait être en équilibre rapide avec le pool cytoplasmique qui est métabolisé par les enzymes de synthèse présentes (Figure 28).

Le fort caractère lipophile des stéroïdes joue un rôle essentiel dans leur durée d'action. La durée des effets des stéroïdes va être influencée par leur dégradation mais à l'heure actuelle rien n'est connu sur l'inactivation ou la dégradation des stéroïdes qui se trouvent en fin de chaîne de transformation du cholestérol.

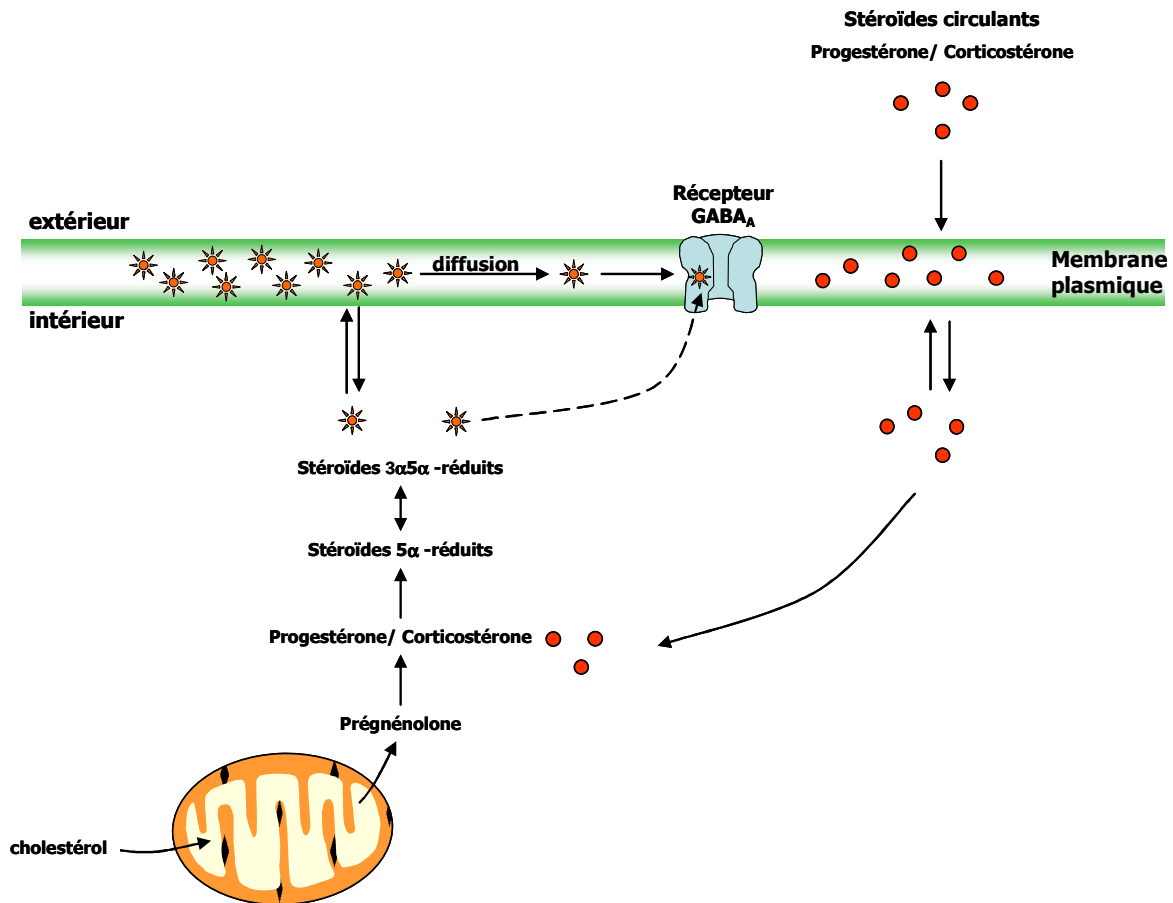


Figure 28 : Action des neurostéroïdes et des stéroïdes neuroactifs sur le récepteur GABA_A

Les stéroïdes synthétisés dans le cytoplasme, sont captés par la membrane du fait de leur fort caractère lipophile. Dans la membrane, ils vont diffuser jusqu'à leurs site de liaison sur le récepteur GABA_A; l'accès à ce site est aussi possible par voie intracellulaire, mais pas par voie extracellulaire. L'accumulation membranaire de stéroïdes est requise pour la modulation du récepteur.

Les stéroïdes circulants vont être piégés par la membrane du fait du fort coefficient de partage entre la membrane plasmique et le milieu extracellulaire. Par un équilibre rapide ils vont passer dans le compartiment cytoplasmique où ils pourront être métabolisés en stéroïdes neuroactifs.

c. Enzymes présentes et fonctionnelles

En utilisant des précurseurs et des inhibiteurs spécifiques des différentes enzymes de la voie de synthèse des stéroïdes $3\alpha5\alpha$ -réduits, nous avons montré qu'elles étaient toutes présentes et fonctionnelles dans la lamina II et les laminae III-IV. Cependant, ce n'est pas une condition suffisante pour qu'il y ait une synthèse de stéroïdes $3\alpha5\alpha$ -réduits. En effet, une enzyme peut être présente et fonctionnelle, mais en absence de substrat, elle ne synthétisera pas de produit actif. Ceci semble être le cas dans les laminae III-IV, où malgré la présence et la fonctionnalité des enzymes, les stéroïdes $3\alpha5\alpha$ -réduits ne sont pas synthétisés après le 8ème jour de vie postnatale. En fait, il se pourrait qu'il y ait une synthèse de base très faible mais qui ne soit pas détectable sous forme d'une modulation des courants postsynaptiques. Une synthèse basale de stéroïdes $3\alpha5\alpha$ -réduits à partir de [3H]-Pregnénolone a été mise en évidence dans la corne dorsale chez le rat adulte (Poisbeau et al., 2005) bien que chez ce dernier, les CPSIm GABA_A ne soient pas influencés de manière tonique par ces stéroïdes. Cependant, cette approche biochimique est globale et indirecte ; et elle ne permet pas d'avoir une résolution cellulaire ou même de distinguer les situations dans les différentes laminae. Le substrat nécessaire pour les enzymes de synthèse peut provenir de 2 sources. L'engagement du cholestérol dans la voie de synthèse des stéroïdes par son transfert dans la mitochondrie est une première source de précurseur, et nous avons montré que la synthèse de stéroïdes $3\alpha5\alpha$ -réduits était dépendante de l'activité de la TSPO qui assure ce transfert. Dans ce cas, l'ensemble des précurseurs pour les enzymes de la stéroïdogénèse sont produits localement à partir du cholestérol. Une autre possibilité est l'origine périphérique de ces précurseurs. En effet, une simple injection de progestérone par voie sous-cutanée a permis dans nos conditions, la synthèse locale de stéroïdes $3\alpha5\alpha$ -réduits dans les laminae III-IV. Ces différentes possibilités sont discutées ci-dessous.

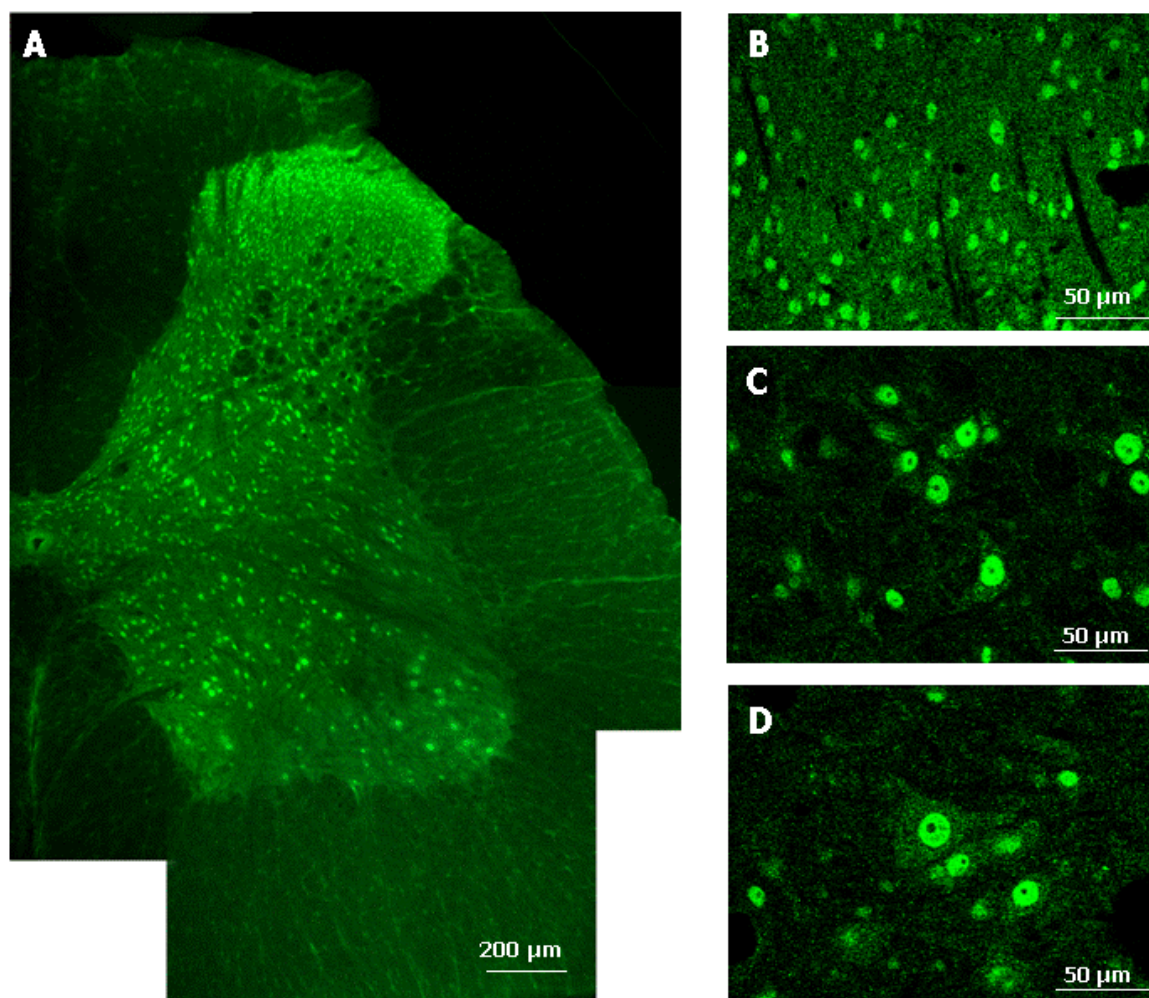


Figure 29 : Marquage immunohistochimique de la TSPO

Le marquage immunochimique a été réalisé avec un anticorps primaire de lapin dirigé contre la TSPO et un anticorps secondaire d'âne anti-lapin couplé à la FITC. La TSPO est exprimée dans toute la moelle épinière (A). L'utilisation de la microscopie confocale a permis de localiser la TSPO dans l'aire périnucléaire et dans le cytoplasme des cellules des laminae I-II (B), des laminae III-IV (C) et des motoneurones (D).

2. TSPO : absence ou dysfonctionnement du complexe ?

La première étape dans la synthèse des stéroïdes est le transfert du cholestérol à l'intérieur de la mitochondrie par la TSPO (Papadopoulos et al., 2006, 2007). Nos résultats montrent que l'activité de la TSPO est régulée négativement au cours du développement selon un gradient ventro-dorsal. En effet, l'activité de la TSPO diminue d'abord dans les laminae III-IV puis dans la lamina II. Dans la lamina II, il a été montré que l'activité de la TSPO est suffisante pour la neurostéroïdogenèse jusqu'au 15^{ème} jour de vie postnatale puis «disparaît» chez le rat adulte. Cependant, elle peut être réactivée pharmacologiquement et suite à l'induction d'une inflammation périphérique (Keller et al., 2004 ; Poisbeau et al., 2005). De façon similaire, l'activité de la TSPO dans les laminae III-IV est suffisante pour fournir les précurseurs pour la synthèse de stéroïdes $3\alpha,5\alpha$ -réduits jusqu'au 8^{ème} jour de vie postnatale. Après le 8^{ème} jour, l'activité de la TSPO n'est plus stimulable pharmacologiquement, mais réapparaît lors d'une inflammation périphérique. Ceci démontre que l'activité de la TSPO n'a pas disparu de façon irréversible.

Afin de savoir si la protéine TSPO était présente dans les laminae III-IV après le 8^{ème} jour de vie postnatale, nous avons réalisé des expériences préliminaires utilisant des techniques de marquages immunocytochimiques et un anticorps dirigé contre la TSPO. Nous avons réalisé ces marquages sur des tranches transversales de moelle épinière de rats âgés de 24 jours. A cet âge l'activité de la TSPO a disparu dans la corne dorsale, mais peut être réactivée pharmacologiquement dans la lamina II contrairement aux laminae III-IV. Les marquages immunocytochimiques montrent que la TSPO est présente dans toute la corne dorsale de la moelle épinière. A l'échelle subcellulaire, la protéine se trouve dans la région périnucléaire et sous forme d'un marquage punctiforme dans le cytoplasme (figure 29). Le marquage cytoplasmique pourrait correspondre à une localisation mitochondriale, mais un double marquage sera nécessaire pour vérifier cette hypothèse. Des marquages effectués sur des coupes de moelle épinière provenant de rats âgés de 6 jours, 10 jours, 15 jours et de plus de 30 jours n'ont pas permis de mettre en évidence de différences d'expression de la TSPO au cours du développement postnatal. L'induction d'une inflammation périphérique unilatérale n'a entraîné aucun changement dramatique d'expression de la protéine. Par conséquent, l'absence de transfert du cholestérol à travers les membranes mitochondriales ne peut pas s'expliquer par des variations d'expression de la TSPO. La TSPO paraît être présente, mais semble ne pas être fonctionnelle.

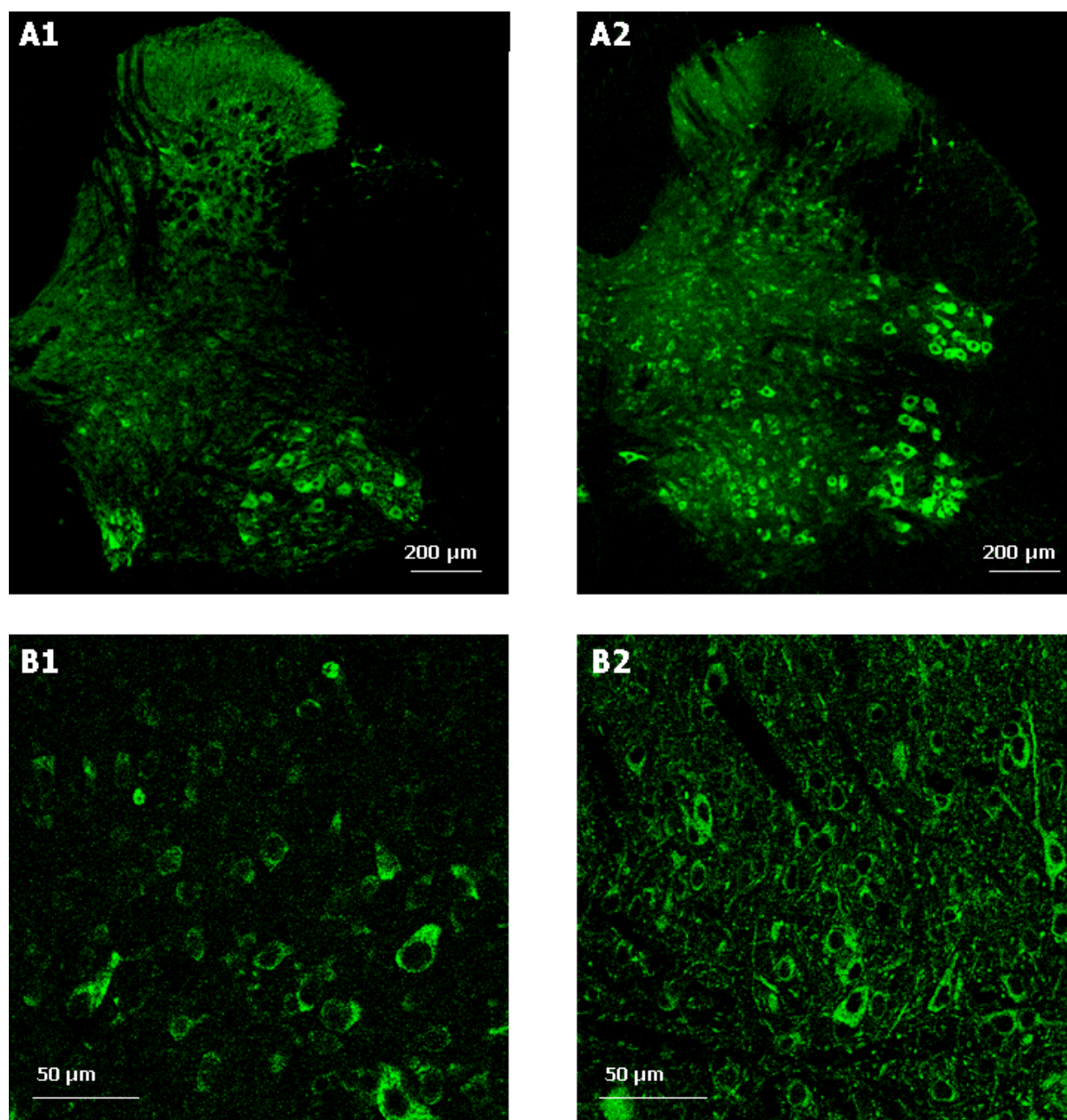


Figure 30 : Marquage immunohistochimique de la PAP7 (gauche) et de la StAR (droite).

Le marquage immunochimique a été réalisé avec des anticorps primaires de lapin dirigés contre la PAP7 ou la StAR et un anticorps secondaire d'âne anti-lapin couplé à la FITC. La PAP7 (A1) et la StAR (A2) sont exprimées dans toute la moelle épinière. L'utilisation de la microscopie confocale (en bas) a permis de localiser la PAP7 (B1) et al StAR (B2) dans le cytoplasme des cellules des couches superficielles de la corne dorsale.

Il a été montré que le transport du cholestérol dans la mitochondrie ne dépend pas que de la TSPO, mais qu'il nécessite la formation d'un complexe mitochondrial qui comprend plusieurs protéines : PAP7, StaR, PKA-RI α (Li et al ; 2001a ; Liu et al., 2003 ; Papadopoulos et al., 2006). On peut donc envisager que, dans notre cas, l'absence d'activité de la TSPO soit due à l'absence de l'un des partenaires du complexe. Nous avons réalisé des marquages immunocytochimiques avec des anticorps dirigés contre la PAP7 et la StaR. La PAP7 et la StaR sont présentes dans toute la corne dorsale, et aucune différence d'expression n'apparaît entre les laminae II, III et IV (figure 30). L'absence d'un de ces partenaires du complexe peut donc a priori peu probable. A l'échelle subcellulaire, on retrouve la PAP7 et la StaR dans le compartiment cytoplasmique, et peut-être au niveau de certains organites (figure 30).

Les marquages immunocytochimiques montrent que les principaux éléments du complexe sont présents dans la corne dorsale de la moelle épinière. Cependant il est envisageable que les différents partenaires du complexe soient exprimés dans les cellules mais ne soient pas associés. Pour vérifier cette hypothèse, il serait nécessaire de réaliser des expériences de doubles marquages des différents éléments du complexe. Malheureusement, les anticorps contre la TSPO, la PAP7 et la StaR dont nous disposons sont tous les trois produits chez le lapin.

Nous avons vu dans l'introduction que l'activation du complexe passe par l'activation de la PKA par l'AMPc et son recrutement dans le complexe via la sous-unité régulatrice RI α (Liu et al., 2003, 2006 ; Papadopoulos et al., 2007). L'absence de la PKA-RI α ou de son activation pourraient être les causes de l'absence d'activité de la TSPO.

L'isoforme RI α est exprimée dans tous les tissus de mammifères (McKnight et al., 1998). Au sein du système nerveux, elle est présente dans toutes les structures sous sa forme hydrosoluble, mais aussi sous forme d'agrégats liés au cytosquelette. Sous cette forme, elle est restreinte à quelques neurones. Dans la moelle épinière, les agrégats de l'isoforme RI α sont pratiquement absents durant la première semaine après la naissance. Au 7^{ème} jour de vie postnatale, de petits agrégats sont dispersés dans toute la substance grise et, par la suite, ils disparaissent pour ne persister que dans la lamina II chez l'animal adulte (Mucignat-Caretta et Caretta, 2002). La fonction de ces agrégats reste inconnue. Ils pourraient affecter les effets de l'AMPc par différents mécanismes. Il a été proposé qu'ils puissent agir comme des pièges pour les isoformes catalytiques de la PKA et de ce fait éviter des excès de phosphorylation ou

qu'ils permettent de concentrer l'activité de phosphorylation des sous-unités catalytiques à proximité des protéines cibles (Mucignat-Caretta et Caretta, 2002).

L'absence ou la présence de la PKA-RI α devrait être vérifiable par des marquages immunocytochimiques avec un anticorps dirigé contre la sous-unité RI α de la PKA. Le cas échéant, on pourrait envisager des expériences de co-marquage pour étudier la co-localisation de la sous-unité RI α avec les autres membres du complexe, ce qui nous donnerait une information sur l'assemblage du complexe mitochondrial.

Si la PKA est présente, l'absence d'activité du complexe vient peut-être d'une activation insuffisante de la PKA. Il serait possible de tester cette hypothèse dans des expériences futures en stimulant pharmacologiquement la PKA et en évaluant la modulation du récepteur GABAA induite par la synthèse de novo de stéroïdes 3 α 5 α -réduits.

L'implication de la PKA est une hypothèse séduisante, car il a été montré que la PKA intervient dans les mécanismes spinaux de la mise en place des douleurs aiguës et persistantes (Basbaum, 1999). En effet, suite à une inflammation, la PKA intervient dans le développement de l'inflammation et dans la douleur qui y est associée (Taiwo et al., 1989). Cependant, dans ces phénomènes, c'est l'isoforme RI α qui semble être impliquée (Malmberg et al., 1997) et un rôle de la sous-unité RI α dans l'activation du complexe mitochondrial impliqué dans le transport du cholestérol n'est pas documenté actuellement.

3. Stéroïdes circulants

Nous avons montré que chez des rats âgés de 9 à 15 jours, une simple injection sous-cutanée de progestérone (75 mg/kg) permettait une synthèse locale de stéroïdes 3 α 5 α -réduits, dans les laminae III-IV de la moelle épinière, comparable à celle observée suite à l'incubation des tranches avec de la progestérone. Les fluctuations des niveaux de stéroïdes circulants peuvent donc affecter la production de stéroïdes neuroactifs dans le système nerveux central. De telles observations ont également été faites dans d'autres régions du SNC suite à une injection périphérique de stéroïdes (Reddy et al., 2004 ; Reddy, 2006). Les stéroïdes circulants pourraient donc être une source de précurseurs pour les enzymes de synthèse présentes et fonctionnelles dans la corne dorsale de la moelle épinière.

a. Variation de concentration de stéroïdes circulants

Au cours du cycle ovarien, la quantité d'allopregnanolone dans le SNC et les niveaux de progestérone circulants varient de façon similaire (Genazzani et al. 1998). Ceci s'accompagne de changements dans l'expression de la sous-unité δ du récepteur GABA_A pendant le cycle ovarien. A la fin du dioestrus (concentration de progestérone circulante élevée), l'expression de la sous-unité δ du récepteur GABA_A est augmentée, ce qui induit une augmentation de l'inhibition tonique et une réduction de l'excitabilité neuronale dans le gyrus denté et l'aire CA1 de l'hippocampe (Maguire et al., 2005). Ce phénomène réduit le niveau d'anxiété et l'intensité des crises épileptiques (Maguire et al., 2005).

De façon comparable, lors d'une situation de stress aigu, les niveaux d'allopregnanolone et de THDOC sont fortement augmentés dans le plasma mais également dans le cerveau (Reddy et Rogawski, 2002 ; Reddy, 2003). Comme lors des fluctuations de stéroïdes durant le cycle ovarien, cette augmentation des niveaux de stéroïdes s'accompagne d'un changement de la composition en sous-unités du récepteur GABA_A, avec une augmentation d'expression des sous-unités δ . L'augmentation de l'expression de la sous-unité δ , favorise l'inhibition tonique ainsi que la modulation positive des récepteurs GABA_A par les stéroïdes $3\alpha5\alpha$ -réduits. De plus, le stress aigu augmente l'influx d'ions Cl⁻ lors de l'activation du récepteur GABA_A (Schwartz et al., 1987). Cependant, il est à noter que, lors d'un stress chronique, la fonction GABAergique est diminuée (Serra et al., 2000) du fait d'une augmentation de l'expression de la sous-unité $\alpha4$ du récepteur et de la diminution des niveaux de stéroïdes $3\alpha5\alpha$ -réduits (Reddy, 2006 ; Maguire et Mody, 2007 ; Serra et al., 2007). Il reste à déterminer si ce changement d'expression pourrait en partie être dû à une exposition prolongée aux stéroïdes $3\alpha5\alpha$ -réduits.

Les effets décrits ci-dessus ont été observés dans l'hippocampe, mais rien n'exclut que de tels effets se produisent également dans la moelle épinière. En l'occurrence, l'injection intraplantaire de carragénine produit une augmentation biphasique des niveaux plasmatiques de corticostérone (Stenberg et al., 1990). Le niveau plasmatique de corticostérone augmente rapidement et présente un premier pic 20 minutes après l'injection de carragénine. Ce pic initial est attribué à l'effet de l'injection. Un deuxième pic de corticostérone plasmatique (12 fois supérieur au niveau basal) est observé 7 heures après l'injection de carragénine et est attribuable à l'inflammation induite par la carragénine (Stenberg et al., 1990).

Nous pouvons donc envisager que lors de notre protocole d'inflammation de la patte postérieure avec de la carragénine, des élévations des taux de stéroïdes circulants pourraient être la source de précurseurs pour les enzymes de synthèse des stéroïdes $3\alpha5\alpha$ -réduits dans la corne dorsale. Ceci ne semble pas être le cas car les effets de la carragénine sont entièrement bloqués par le PK11195 et par conséquent mettent en jeu une activation de la TSPO. Par analogie avec ce qui se passe durant le cycle ovarien et lors d'un stress aigu, nous pourrions nous attendre à une modification de la composition des récepteurs GABA_A dans la moelle épinière, par exemple, à une augmentation de l'expression de la sous-unité δ dans la moelle, ce qui se traduirait par l'apparition de courants toniques. Cependant, nous n'avons jamais observé de courant GABAergiques toniques dans les neurones de la corne dorsale, et par conséquent l'expression de sous-unité δ semble peu probable.

En conclusion, les variations importantes des niveaux de stéroïdes circulants, associées à différentes conditions physiologiques et pathologiques, pourraient contribuer à moduler la synthèse locale de stéroïdes neuroactifs dans la moelle. Cependant, dans le cas des stéroïdes périphériques, l'accès au système nerveux central nécessite de franchir la barrière hémato-encéphalique (cf. ci-dessous).

b. Perméabilité de la barrière hémato-encéphalique

La barrière hémato-encéphalique est critique pour la régulation et le maintien du microenvironnement du SNC. Elle agit comme une barrière physique et métabolique modulant le passage des molécules de la circulation périphérique vers le SNC. La perméabilité de la barrière hémato-encéphalique n'est pas constante au cours du développement et dans des conditions pathologiques. Ainsi, chez les rats âgés de 10-11 jours, les corticostéroïdes circulants pénètrent plus facilement dans le cerveau que chez les rats adultes, car la barrière hémato-encéphalique ne serait pas mature (Arya et al., 2006). D'autre part, lors d'une inflammation périphérique chronique (Brooks et al., 2005), la perméabilité de la barrière hémato-encéphalique est augmentée du fait de l'altération des protéines de jonction. Ceci pourrait faciliter le passage des stéroïdes circulants vers le système nerveux central.

L'ensemble de ces données suggèrent que lors d'une inflammation périphérique, le taux de corticostérone plasmatique augmente et la barrière hémato-encéphalique devient plus perméable aux stéroïdes. La corticostérone pourrait alors facilement accéder à la corne dorsale de la moelle épinière où elle pourrait être métabolisée en THDOC qui va potentialiser la transmission synaptique GABAergique. La corticostérone est également susceptible d'avoir une action génomique en se liant à des récepteurs intracellulaires. L'existence d'un effet de ce type pourrait être vérifiée par l'utilisation d'antagonistes des récepteurs intracellulaires de la corticostérone. Une modification de la composition en sous-unités du récepteur GABA_A est aussi envisageable, mais très peu probable. En revanche, lors d'une inflammation chronique, on ne peut pas exclure une diminution de la fonction GABAergique similaire à celle observée lors d'un stress chronique, mais ce point demande à être vérifié expérimentalement.

Le scénario envisagé ci-dessus ne peut intervenir seul, car nous avons clairement démontré que les effets observés lors de l'inflammation étaient dépendants de l'activation de la TSPO et par conséquent font intervenir la synthèse de stéroïdes 3 α 5 α -réduits à partir du cholestérol. Néanmoins, on ne peut exclure que les effets génomiques induits par l'activation des récepteurs intracellulaires puissent contribuer à l'activation de la TSPO, par exemple en régulant l'expression d'une ou de plusieurs protéines participant à l'assemblage ou à la régulation fonctionnelle du complexe mitochondrial permettant l'engagement du cholestérol dans la neurostéroïdogénèse.

Tableau 9 : Transmission inhibitrice dans la corne dorsale de la moelle épinière

	Neurochimie	Terminaisons	Entrées synaptiques	Co-transmission
Lamina I	GABA glycine (-)	GABA glycine GABA/glycine	glycine	OUI
Lamina II	GABA	GABA glycine GABA/glycine	GABA (45%) GABA/gly (55%)	OUI
Laminae III-IV	GABA GABA/glycine (64%) glycine	GABA glycine GABA/glycine	GABA/gly	NON

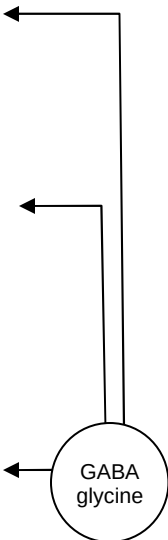
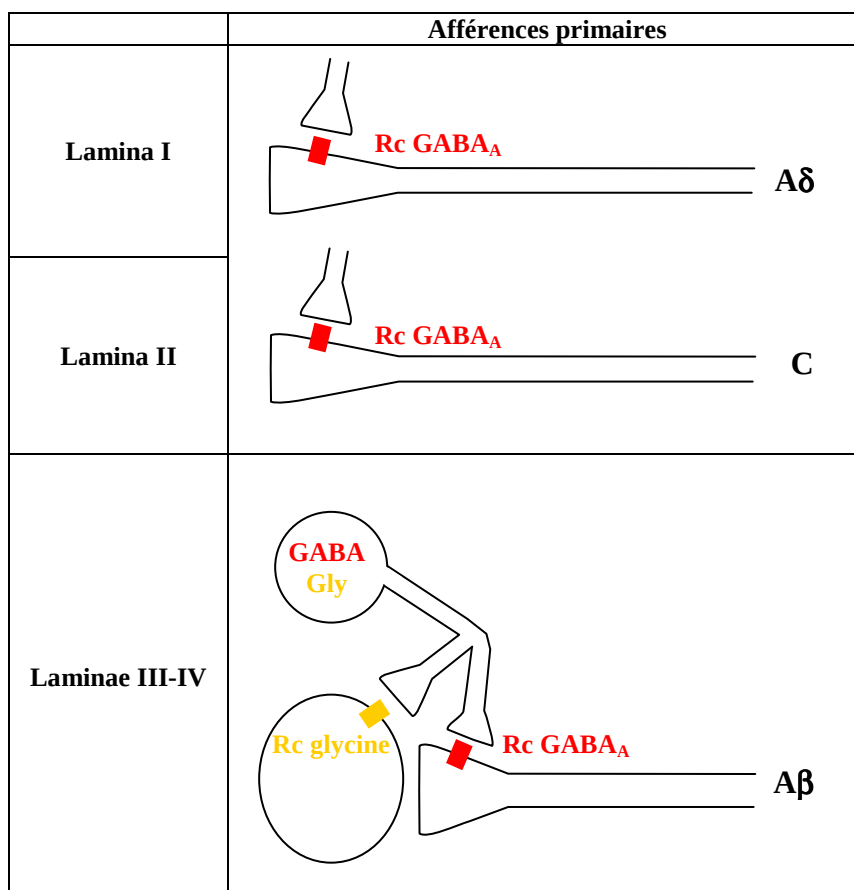


Tableau 10 : Modulation des afférences primaires par une inhibition présynaptique



III. Relations fonctionnelles entre les laminae III-IV et la lamina II : rôle potentiel dans le traitement de l'information somatosensorielle.

En nous fondant sur nos propres résultats discutés ci-dessus et sur les données de la bibliographie, nous allons tenter de proposer un schéma du réseau neuronal spinal impliqué dans l'intégration des informations somatosensorielles nociceptives et non-nociceptives.

1. Transmission inhibitrice (Tableaux 9 et 10)

Caractéristiques neurochimiques des corps cellulaires (Tableau 9)

Les corps cellulaires des neurones GABAergiques sont localisés dans les couches I à III de la corne dorsale (Spike et al., 1993). Les corps cellulaires des neurones glycinergiques sont abondants dans les couches III-IV, rares dans la lamina I et absents dans la lamina II de la corne dorsale de la moelle épinière (Todd et Sullivan, 1990 ; Zeilhofer et al., 2005). Enfin, le GABA et la glycine sont co-localisés dans 64% des corps cellulaires neuronaux dans les laminae III-IV (Todd et Sullivan, 1990).

Caractéristiques neurochimiques des terminaisons nerveuses (Tableau 9)

Les trois types de terminaisons synaptiques inhibitrices (GABA seul, glycine seule et GABA/glycine) sont présents dans l'ensemble des laminae de la corne dorsale de la moelle épinière. En ce qui concerne les terminaisons glycinergiques et les terminaisons mixtes GABA/glycine, les corps cellulaires contenant de la glycine ne sont présents que dans les laminae III-IV. On peut donc en conclure que les neurones des laminae III-IV contenant de la glycine (seule ou avec du GABA) projettent vers les laminae plus superficielles de la corne dorsale. Une co-transmission GABA/glycine est observée dans les laminae I-II mais est absente dans les laminae III-IV.

Inhibition présynaptique des afférences primaires (Tableau 10)

L'entrée des informations sensorielles dans la moelle épinière peut être modulée par une inhibition présynaptique sur les fibres afférentes primaires. En effet, dans les laminae I-II, les neurones GABAergiques sont impliqués dans l'inhibition présynaptique des fibres afférentes primaires de type C et A δ (Barber et al, 1978 ; Mitchell et al, 1993). Dans les laminae III-IV, les neurones GABA/glycine établissent des synapses axo-axoniques avec les terminaisons des fibres afférentes primaires de type A β , mais seuls des récepteurs GABA_A sont présents sur ces terminaisons (Todd et al., 1996 ; Watson et al., 2002 ; Watson, 2003). Ces mêmes neurones GABA/glycine peuvent aussi contacter des neurones intrinsèques des laminae III-IV, et dans ce cas, seule la composante glycinergique ou GABAergique sera détectée (car il n'y a pas de co-détection dans les laminae III-IV).

Dans les laminae I et II, la présence de synapses présynaptiques mixtes sur les afférences primaires n'est pas exclue. Cela montrerait que les neurones des laminae III-IV peuvent venir moduler l'information nociceptive dès son entrée dans les laminae I-II. Ceci est fortement envisageable puisque ce type d'interaction a clairement été montré au plan anatomique pour les neurones cholinergiques. En effet, dans la corne dorsale, les corps cellulaires des neurones cholinergiques ne sont présents que dans les laminae III-IV. Les axones de ces neurones sont à l'origine de contacts présynaptiques sur les terminaisons des afférences nociceptives dans les laminae I-II. Ces données suggèrent l'existence d'un contrôle direct des messages nociceptifs afférents par les neurones cholinergiques (Borges et Iversen, 1986 ; Ribiero-da-silva et Cuello, 1990). De plus les neurones cholinergiques contiennent aussi du GABA (Todd et Spike, 1993).

L'ensemble des informations sur l'inhibition synaptique dans la corne dorsale de la moelle épinière du rat suggère l'existence d'interactions entre les laminae I-II et les laminae III-IV. Cette inhibition permet la modulation des messages nerveux afférents en s'opposant à la transmission excitatrice.

2. Transmission excitatrice (Tableau 11)

A l'aide des données bibliographiques disponibles, nous pouvons aussi proposer une représentation schématique de l'organisation de la transmission synaptique excitatrice dans les cornes dorsales.

Tableau 11 : Transmission excitatrice dans la corne dorsale de la moelle épinière

	Neurochimie		ARNm	Terminaisons	Afférences primaires
Lamina I	Glutamate	Neurones de projection Interneurones	VGLUT1 VGLUT2	VGLUT2	VGLUT2
Lamina II	Glutamate	Interneurones			
Laminae III-IV	Glutamate	Interneurones Neurones de projection	VGLUT1 VGLUT2	VGLUT1 VGLUT3 (+/-)	VGLUT1

Caractéristiques neurochimiques des corps cellulaires

Dans les laminae I à IV, les corps cellulaires de neurones expriment les transporteurs vésiculaires du glutamate VGLUT1 et VGLUT2 (Landry et al., 2004). Seul un marquage faible de l'isoforme VGLUT3 a été observé dans les laminae III-IV.

Caractéristiques neurochimiques des terminaisons nerveuses :

Des marquages immunocytochimiques de ces transporteurs vésiculaires du glutamate ont montré que les terminaisons contenant VGLUT2 prédominent dans les laminae I-II. En revanche, dans les laminae III-IV, ce sont les terminaisons VGLUT1 qui sont majoritairement

présentes (Landry et al., 2004). Il est notable que les terminaisons des afférences primaires A δ et C contiennent VGLUT2, alors que les terminaisons des fibres A β contiennent VGLUT1 (Todd et al., 2003 ; Landry et al., 2004) contribuant ainsi à l'immunoréactivité VGLUT1 et VGLUT2 dans les laminae III-IV et I-II respectivement.

Les neurones des laminae I-II dont les corps cellulaires contiennent VGLUT1, ne contactent pas d'autres neurones des mêmes laminae (absence de terminaisons VGLUT1). Il se pourrait donc qu'il s'agisse soit de neurones de projection à destination supraspinale, soit de neurones projetant vers des couches plus profondes. D'ailleurs, Braz et coll. ont montré à l'aide de traceurs transynaptiques qu'il existait des projections d'interneurones de la lamina II vers la lamina V (Braz et al., 2005). Néanmoins, de telles projections n'ont jamais été décrites en ce qui concerne les neurones de la lamina I.

Enfin, l'absence de terminaisons VGLUT2 dans les laminae III-IV montre que les neurones des laminae III-IV contenant VGLUT2 projettent probablement vers d'autres laminae, c'est-à-dire, les laminae I-II ou des couches plus profondes. Par ailleurs, certains des neurones des laminae III-IV peuvent aussi être des neurones de projection, notamment ceux exprimant les récepteurs NK1 des tachykinine ou ceux faisant partie de la voie postsynaptique des cordons dorsaux (Brown, 1982).

Ces données suggèrent qu'il existerait des interactions glutamatergiques entre les laminae I-II et les laminae III-IV, mais ne permet pas de préjuger du sens dans lequel ces interactions se font.

Les données de la littérature et nos résultats électrophysiologiques suggèrent que des neurones des laminae III-IV, inhibiteurs ou excitateurs, projettent probablement vers les laminae I-II. Ceci nous permet aussi de proposer un schéma du réseau neuronal spinal permettant l'intégration des informations somatosensorielles dans la corne dorsale de la moelle épinière et de spéculer sur leur rôle dans les situations d'hyperalgie et d'allodynie associées aux douleurs inflammatoires.

3. Réseau spinal et intégration des informations sensorielles

Les informations sensorielles nociceptives et non-nociceptives sont détectées en périphérie, puis véhiculées jusqu'aux laminae I-II et III-IV de la corne dorsale. Dans la lamina I, l'information est transmise au neurone de projection (NP), directement ou par l'intermédiaire d'un interneurone glutamatergique (Glu). Dans la lamina II, l'information sensorielle peut être reçue par des interneurons GABAergiques ou glutamatergiques. Le réseau d'interneurones de la lamina II intègre l'information avant de la transmettre via un neurone glutamatergique au neurone de projection de la lamina I. Dans les laminae III-IV, l'information non-nociceptive est transmise à des neurones glutamatergiques projetant vers la lamina II, ou à des neurones GABA/glycine projetant vers les laminae I et II (Figure 31).

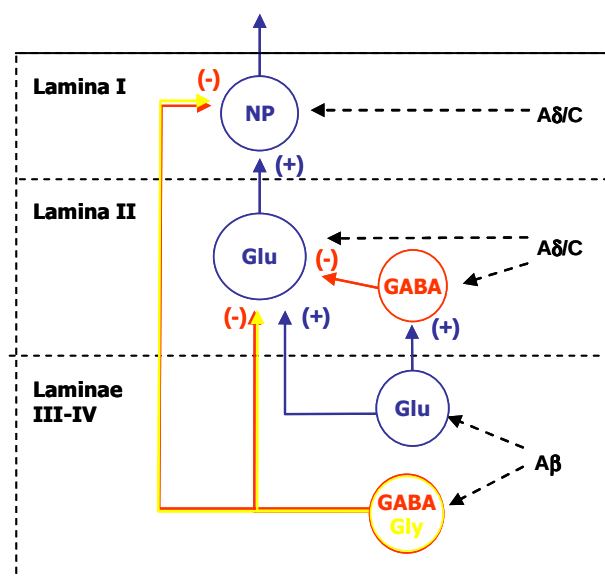


Fig 31 : Schéma de base simplifié du réseau neuronal hypothétique impliqué dans l'intégration des informations somatosensorielles dans la corne dorsale de la moelle épinière

Les informations somatosensorielles nociceptives sont acheminées dans les laminae I et II de la corne dorsale de la moelle épinière par les fibres afférentes primaires de type Aδ/C. Les informations non nociceptives arrivent dans les laminae III-IV de la corne dorsale par les fibres afférentes primaires Aβ. Le réseau d'interneurones intrinsèque à la moelle va intégrer le message somatosensoriel avant de le transmettre à un neurone de projection situé dans la lamina I.

Glu = glutamate; Gly = glycine

Dans ce réseau, une stimulation nociceptive (Figure 32A) active les fibres afférentes A δ et C, ce qui induit une augmentation de la fréquence des CPSE enregistrés dans le neurone glutamatergique (Glu) cible dans la lamina II (Narikawa et al., 2000). Cette excitation sera transmise au neurone de projection de la lamina I via un neurone glutamatergique de la lamina II.

Lors d'une stimulation mécanique non nociceptive (Figure 32B), on observe une augmentation des CPSE glutamatergiques et des CPSI GABAergiques et glycinergiques dans les neurones de la lamina II (Narikawa et al., 2000). Ceci montre que lors d'une stimulation non-nociceptive, les fibres afférentes de type A β activent des interneurones inhibiteurs et excitateurs qui s'articulent sur des neurones de la lamina II. L'activation des voies inhibitrices et excitatrices est équivalente et les deux ont donc tendance à s'éliminer mutuellement. D'autre part, les neurones GABA/glycine inhibent le neurone de projection dans la lamina I par l'intermédiaire de récepteurs de la glycine (Chery et De Koninck, 2000). Les excitations et les inhibitions se compensent dans la lamina II et l'inhibition domine dans la lamina I. Par conséquent, aucun message ne sera émis par le NP de la lamina I.

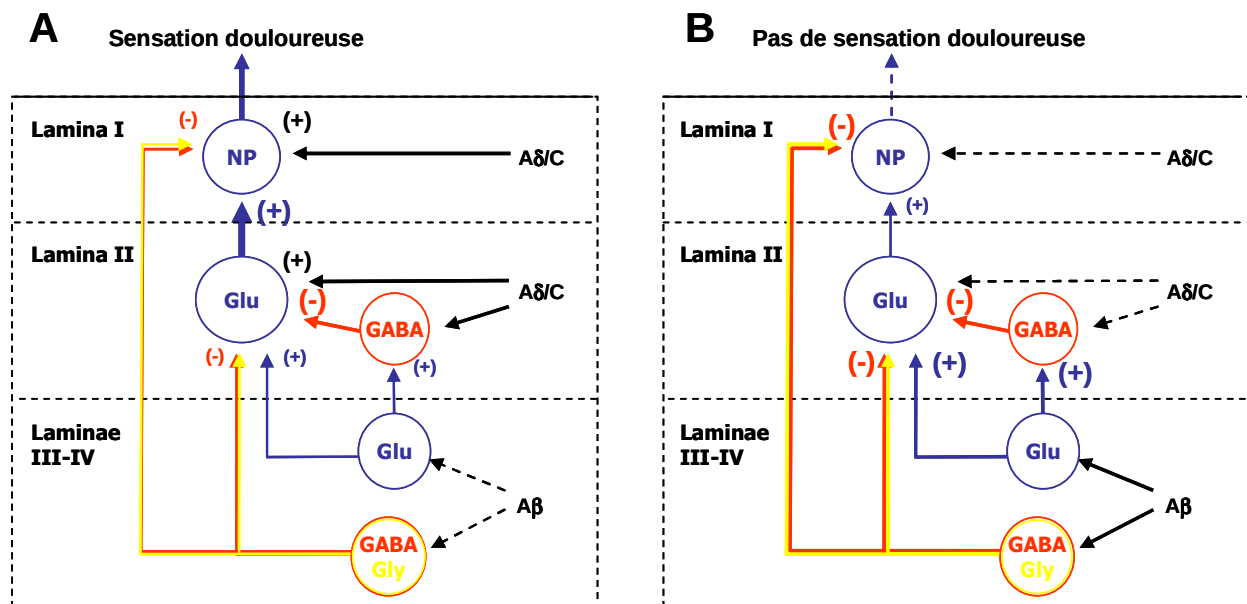


Fig 32 : Transmission des messages sensoriels dans les conditions physiologiques de base

Les stimulations illustrées sont celles correspondant à une stimulation nociceptive aiguë (stimulation des fibres A δ /C, panneau de gauche) ou à une stimulation non nociceptive (stimulation des fibres A β , panneau de droite). Les flèches pleines représentent les axones des neurones activés, et les flèches en pointillé représentent les axones des neurones silencieux.

En revanche, lors d'une stimulation nociceptive, si les fibres afférentes de type A β sont co-stimulées, on peut imaginer que l'inhibition induite par les neurones GABA/glycine des laminae III-IV sur les neurones des laminae I et II va diminuer l'excitabilité du réseau et par conséquent diminuer l'intensité du message nociceptif. Ce type de modulation de l'information nociceptive par une stimulation non-nociceptive (Figure 33) est connu sous le terme de « gate control theory » ou « théorie du portillon » (Melzack et Wall, 1965).

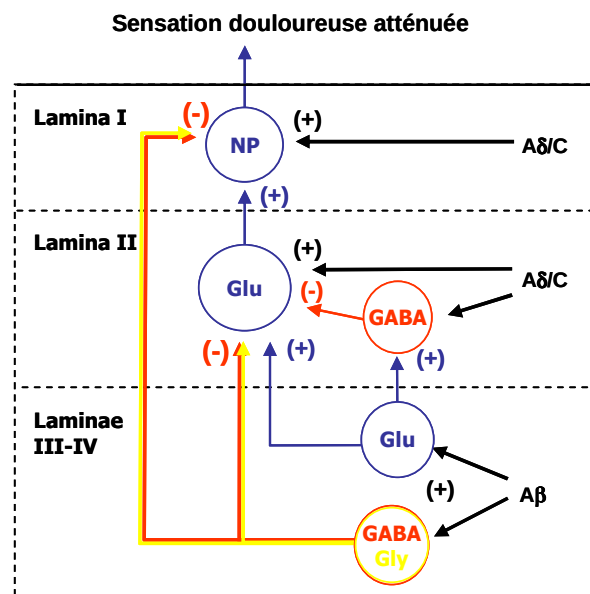
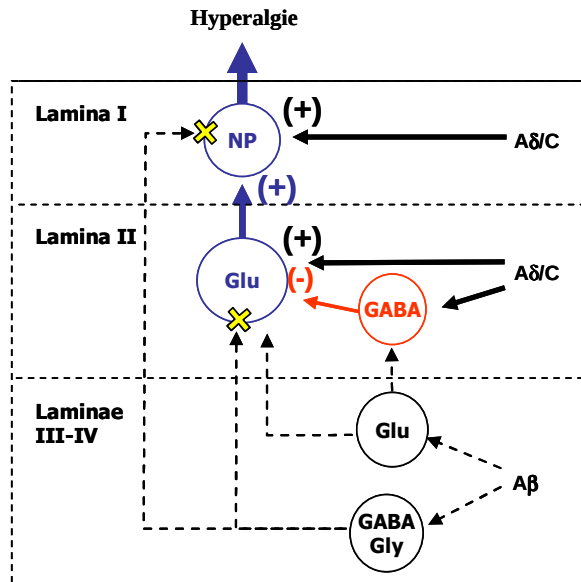
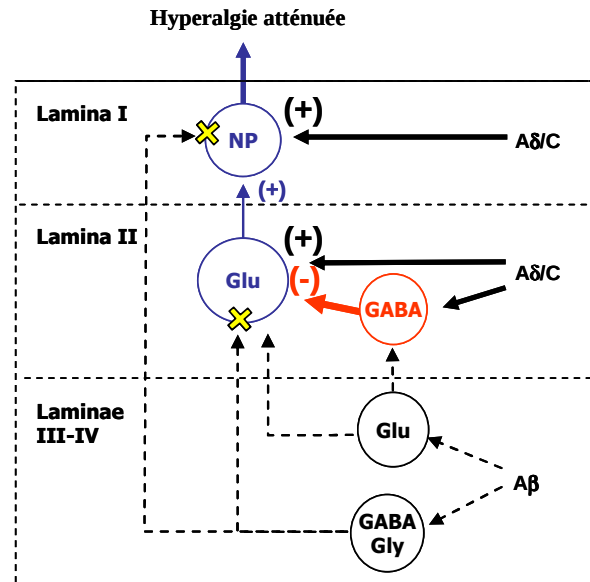


Fig 33 : Interaction entre les voies nociceptives et non nociceptives dans la corne dorsale

Dans la situation illustrée, il y a une co-stimulation des afférences nociceptives A δ /C et des afférences non nociceptives A β . Le neurone (Glu) de la lamina II reçoit un contrôle inhibiteur renforcé du fait de la stimulation des fibres A β . Ceci diminue l'excitation du neurone de la lamina II et du NP de la lamina I par les entrées A δ /C. Le message transmis par le NP est atténué par rapport à une situation où seules les afférences A δ /C seraient stimulées (Figure 32A)

DOULEUR INFLAMMATOIRE

A**1^{ère} phase : Désinhibition glycinergique par la PGE2****B****2^{ème} phase : Potentialisation de la transmission GABAergique par les stéroïdes 3α5α-réduits**

✗ PGE2 → inhibition des récepteurs de la glycine contenant $\alpha 3$

Fig 34 : Intégration des informations nociceptives lors d'une douleur inflammatoire aiguë : composante hyperalgique

Les deux schémas correspondent aux phases précoces (A) et tardives (B) de la douleur inflammatoire aiguë. Dans un premier temps, il y a une augmentation de la production de PGE2 dans les différentes couches de la corne dorsale (A), puis s'ajoute à cette production de PGE2, une augmentation de la production locale de neurostéroïdes 3 α 5 α -réduits (B).

Lors d'une inflammation, la présence de prostaglandine PGE2 entraîne une perte d'inhibition glycinergique via la phosphorylation de la sous-unité $\alpha 3$ du récepteur de la glycine. Ce phénomène est spécifique des récepteurs de la glycine et est responsable de la mise en place d'une hyperalgie car le neurone Glu de la lamina II et le NP de la lamina I sont moins inhibés (A). La synthèse endogène de stéroïdes 3 α 5 α -réduits va potentialiser la transmission GABAergique, ce qui va compenser en partie la perte d'inhibition glycinergique et atténuer l'hyperalgie (B).

Douleur inflammatoire

Lors de douleurs inflammatoires, le processus se complique. Dans un premier temps, la prostaglandine E2 (PGE2), produite en réponse à l'inflammation, active les récepteurs des prostaglandines de type 2. L'activation de ces récepteurs couplés aux protéines G augmente la production d'AMPC, ce qui active la PKA et induit la phosphorylation de la sous-unité $\alpha 3$ du récepteur de la glycine. Cette phosphorylation a pour effet de diminuer la transmission glycinergique (Ahmadi et al., 2002). Il est à noter que, dans la moelle épinière, la sous-unité $\alpha 3$ du récepteur de la glycine est uniquement exprimée dans les laminae I-II (Harvey et al., 2004). D'autre part, la PGE2 peut dépolariser les neurones des laminae III-IV (Baba et al., 2001). La PGE2 facilite donc la transmission nociceptive dans la corne dorsale de la moelle épinière en diminuant sélectivement la transmission glycinergique dans les laminae I et II (Pour revue, Zeilhofer, 2005).

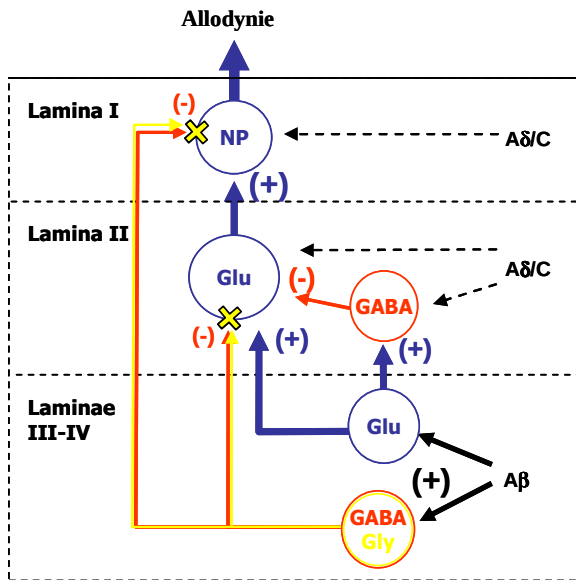
Dans un deuxième temps, l'inflammation induit la synthèse de stéroïdes $3\alpha 5\alpha$ -réduits dans la lamina II (Poisbeau et al., 2005) et dans les laminae III-IV (résultats de cette thèse). Cette synthèse de stéroïdes $3\alpha 5\alpha$ -réduits dans la corne dorsale, suite à l'induction d'une inflammation périphérique, pourrait être un moyen mis en place pour compenser la perte d'inhibition glycinergique par une potentialisation de la transmission GABAergique, afin de rétablir l'excitabilité du réseau.

Par conséquent, lors d'une stimulation nociceptive en situation d'inflammation (Figure 34), la désinhibition glycinergique du réseau va se traduire par une amplification du message nociceptif et l'apparition d'une hyperalgie principalement due aux effets de la PGE2 décrits ci-dessus (Figure 34A). Puis, la synthèse endogène de stéroïdes $3\alpha 5\alpha$ -réduits viendrait compenser en partie cette perte d'inhibition en potentialisant la transmission GABAergique (Figure 34B). Cette régulation pourrait permettre d'atténuer l'hyperalgie induite par l'inflammation périphérique. C'est effectivement ce que l'on observe chez le rat adulte (Poisbeau et al., 2005).

DOULEUR INFLAMMATOIRE

A

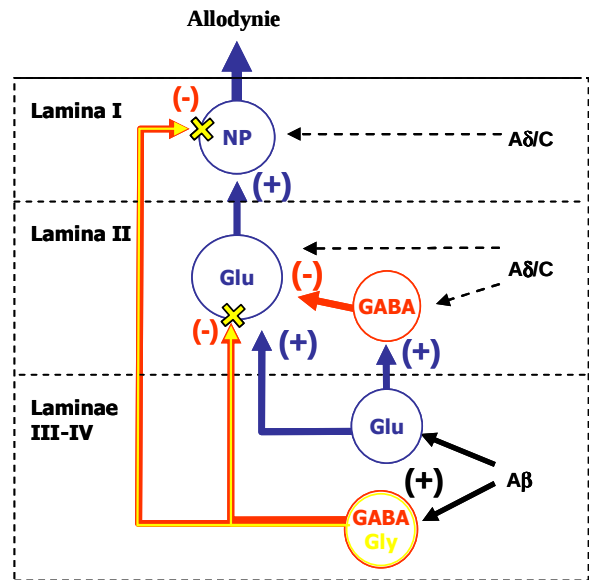
1^{ère} phase : Désinhibition glycinergique par la PGE2



1^{ère} phase : Désinhibition glycinergique par la PGE2

B

2^{ème} phase : Potentialisation de la transmission GABAergique par les stéroïdes 3α5α-réduits



2^{ème} phase : Potentialisation de la transmission GABAergique par les stéroïdes 3α5α-réduits

⊗ PGE2 → inhibition des récepteurs de la glycine contenant α3

Fig 35 : Intégration des informations non nociceptives lors d'une douleur inflammatoire aiguë : composante allodynique

Il s'agit de la même situation que dans la figure 34. A, la phase précoce de la douleur inflammatoire due à l'action de la PGE2. B, la phase tardive où s'ajoute la contribution des stéroïdes 3α5α-réduits.

Lors d'une inflammation, la présence de prostaglandine PGE2 entraîne une perte d'inhibition glycinergique en via la phosphorylation de la sous-unité α3 du récepteur de la glycine (A). Ce phénomène est responsable de la mise en place d'une allodynie car la PGE2 empêche la glycine d'inhiber l'activité des NP dans la lamina I suite à la stimulation des fibres Aβ. La synthèse endogène de stéroïdes 3α5α-réduits va alors potentialiser la transmission GABAergique, mais ceci ne suffira pas pour compenser la perte d'inhibition glycinergique et aura peu d'incidence sur l'intensité de l'allodynie (B) car les stéroïdes 3α5α-réduits ne vont pas influencer le contrôle glycinergique de la lamina I.

Lors d'une stimulation non-nociceptive, en situation d'inflammation (Figure 35), la désinhibition glycinergique (due à la PGE₂) va se traduire par un excès d'excitation dans le réseau, une perte de l'équilibre excitation/inhibition et par conséquent l'apparition d'une allodynie. La synthèse de stéroïdes 3 α 5 α -réduits, suite à l'induction d'une inflammation périphérique, potentialise la transmission GABAergique, mais cela est insuffisant pour compenser la perte d'inhibition glycinergique sur le neurone de projection de la lamina I, et l'allodynie persiste.

Par conséquent, la modulation positive des récepteurs GABA_A par les stéroïdes 3 α 5 α -réduits limite l'hyperalgie, mais affecte relativement peu l'allodynie (Poisbeau et al., 2005).

Le message sensoriel efférent de la corne dorsale résulte donc d'une modulation fine. C'est une balance extrêmement sensible entre l'excitation et l'inhibition spinale qui va définir l'intensité du message envoyé aux centres supraspinaux. Le moindre déséquilibre dans ce système, comme une déshinhibition, va faire basculer l'équilibre dans le sens des états hyperalgiques et/ou allodyniques.

En conclusion, nos résultats indiquent qu'il existe des différences dans la modulation des informations sensorielles en fonction de la modalité sensorielle et de la région de la corne dorsale concernée. De plus, ils indiquent l'existence d'interactions fonctionnelles entre les laminae III-IV et la lamina II qui pourraient expliquer certains aspects des changements observés durant les douleurs neuropathiques ou inflammatoires.

Afin de vérifier nos hypothèses sur la structure du réseau synaptique de la corne dorsale et sur les interactions entre les laminae III-IV et la lamina II, l'utilisation de traceurs rétrogrades et antérogrades trans-synaptiques injectés de manière très localisée serait une approche intéressante qui devrait permettre de reconstituer l'organisation du réseau. De plus, il serait intéressant d'utiliser des stimulations électriques locales pour caractériser plus en détail les relations synaptiques entre les neurones des différentes laminae.

Cependant, la modélisation du système, telle que nous l'avons présentée, ne prend en compte que les phénomènes locaux dans la moelle épinière. En effet, nous n'avons pas considéré le rôle des contrôles descendants qui est essentiel dans la mise en place des états allodyniques (Ossipov et al., 2000 ; Porreca et al., 2002). Par ailleurs, il ne faut pas oublier que les neurotransmetteurs peuvent également activer des récepteurs métabotropiques, eux aussi impliqués dans la transmission et la modulation des messages nociceptifs. Il faut donc envisager un réseau beaucoup plus complexe dans lequel interviennent d'autres protagonistes.

Il reste beaucoup à apprendre sur la structure et le fonctionnement du réseau nociceptif spinal dans des conditions de base, mais aussi dans des situations de douleurs inflammatoires ou neuropathiques. L'élucidation de la connectique du réseau neuronal impliqué dans le traitement de l'information somatosensorielle, nécessitera une combinaison d'approches de neuroanatomie fine (traçage trans-synaptique) et d'électrophysiologie.

Par ailleurs, les résultats présentés dans cette thèse permettent de suggérer que les laminae III-IV de la corne dorsale de la moelle épinière doivent être considérées comme un élément du réseau impliqué dans l'intégration de l'information nociceptive.

Références bibliographiques

- Agis-Balboa, R. C., Pinna, G., Zhubi, A., Maloku, E., Veldic, M., Costa, E., and Guidotti, A. (2006). Characterization of brain neurons that express enzymes mediating neurosteroid biosynthesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 14602-14607.
- Aguayo, L. G., van Zundert, B., Tapia, J. C., Carrasco, M. A., and Alvarez, F. J. (2004). Changes on the properties of glycine receptors during neuronal development. *Brain Res Brain Res Rev* 47, 33-45.
- Ahmadi, S., Lippross, S., Neuhuber, W. L., and Zeilhofer, H. U. (2002). PGE(2) selectively blocks inhibitory glycinergic neurotransmission onto rat superficial dorsal horn neurons. *Nat Neurosci* 5, 34-40.
- Akk, G., Covey, D. F., Evers, A. S., Steinbach, J. H., Zorumski, C. F., and Mennerick, S. (2007). Mechanisms of neurosteroid interactions with GABA(A) receptors. *Pharmacol Ther*.
- Akk, G., Shu, H. J., Wang, C., Steinbach, J. H., Zorumski, C. F., Covey, D. F., and Mennerick, S. (2005). Neurosteroid access to the GABAA receptor. *J Neurosci* 25, 11605-11613.
- Arya, V., Demarco, V. G., Issar, M., and Hochhaus, G. (2006). Contrary to adult, neonatal rats show pronounced brain uptake of corticosteroids. *Drug Metab Dispos* 34, 939-942.
- Aubrey, K. R., Rossi, F. M., Ruivo, R., Alboni, S., Bellenchi, G. C., Le Goff, A., Gasnier, B., and Supplisson, S. (2007). The transporters GlyT2 and VIAAT cooperate to determine the vesicular glycinergic phenotype. *J Neurosci* 27, 6273-6281.
- Baba, H., Kohno, T., Moore, K. A., and Woolf, C. J. (2001). Direct activation of rat spinal dorsal horn neurons by prostaglandin E2. *J Neurosci* 21, 1750-1756.
- Baba, H., Kohno, T., Okamoto, M., Goldstein, P. A., Shimoji, K., and Yoshimura, M. (1998). Muscarinic facilitation of GABA release in substantia gelatinosa of the rat spinal dorsal horn. *J Physiol* 508 (Pt 1), 83-93.
- Baccei, M. L., and Fitzgerald, M. (2004). Development of GABAergic and glycinergic transmission in the neonatal rat dorsal horn. *J Neurosci* 24, 4749-4757.
- Baer, K., Essrich, C., Benson, J. A., Benke, D., Bluethmann, H., Fritschy, J. M., and Luscher, B. (1999). Postsynaptic clustering of gamma-aminobutyric acid type A receptors by the gamma3 subunit in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 12860-12865.
- Barber, R. P., Vaughn, J. E., Saito, K., McLaughlin, B. J., and 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, A., Mozrzymas, J. W., Ortinski, P. I., and Vicini, S. (2007). Desensitization and binding properties determine distinct alpha1beta2gamma2 and alpha3beta2gamma2 GABA(A) receptor-channel kinetic behavior. *Eur J Neurosci* 25, 2726-2740.

- Barnard, E. A., Skolnick, P., Olsen, R. W., Mohler, H., Sieghart, W., Biggio, G., Braestrup, C., Bateson, A. N., and Langer, S. Z. (1998). International Union of Pharmacology. XV. Subtypes of gamma-aminobutyric acidA receptors: classification on the basis of subunit structure and receptor function. *Pharmacol Rev* 50, 291-313.
- Basbaum, A. I. (1999). Spinal mechanisms of acute and persistent pain. *Reg Anesth Pain Med* 24, 59-67.
- Bauer, H. C., and Bauer, H. (1989). Micromethod for the determination of 3-beta-HSD activity in cultured cells. *J Steroid Biochem* 33, 643-646.
- Baulieu, E. E. (1997). Neurosteroids: of the nervous system, by the nervous system, for the nervous system. *Recent Prog Horm Res* 52, 1-32.
- Baulieu, E. E. (1998). Neurosteroids: a novel function of the brain. *Psychoneuroendocrinology* 23, 963-987.
- Baulieu, E. E., and Robel, P. (1990). Neurosteroids: a new brain function? *J Steroid Biochem Mol Biol* 37, 395-403.
- Becker, C. M., Hoch, W., and Betz, H. (1988). Glycine receptor heterogeneity in rat spinal cord during postnatal development. *Embo J* 7, 3717-3726.
- Belelli, D., Casula, A., Ling, A., and Lambert, J. J. (2002). The influence of subunit composition on the interaction of neurosteroids with GABA(A) receptors. *Neuropharmacology* 43, 651-661.
- Belelli, D., and Herd, M. B. (2003). The contraceptive agent Provera enhances GABA(A) receptor-mediated inhibitory neurotransmission in the rat hippocampus: evidence for endogenous neurosteroids? *J Neurosci* 23, 10013-10020.
- Belelli, D., Herd, M. B., Mitchell, E. A., Peden, D. R., Vardy, A. W., Gentet, L., and Lambert, J. J. (2006). Neuroactive steroids and inhibitory neurotransmission: mechanisms of action and physiological relevance. *Neuroscience* 138, 821-829.
- Belelli, D., and Lambert, J. J. (2005). Neurosteroids: endogenous regulators of the GABA(A) receptor. *Nat Rev Neurosci* 6, 565-575.
- Belelli, D., Muntoni, A. L., Merrywest, S. D., Gentet, L. J., Casula, A., Callachan, H., Madau, P., Gemmell, D. K., Hamilton, N. M., Lambert, J. J., *et al.* (2003). The in vitro and in vivo enantioselectivity of etomidate implicates the GABAA receptor in general anaesthesia. *Neuropharmacology* 45, 57-71.
- Bennett, G. J., and Xie, Y. K. (1988). A peripheral mononeuropathy in rat that produces disorders of pain sensation like those seen in man. *Pain* 33, 87-107.
- Berki, A. C., O'Donovan, M. J., and Antal, M. (1995). Developmental expression of glycine immunoreactivity and its colocalization with GABA in the embryonic chick lumbosacral spinal cord. *J Comp Neurol* 362, 583-596.
- Besson, J. M., and Chaouch, A. (1987). Peripheral and spinal mechanisms of nociception. *Physiol Rev* 67, 67-186.

- Bohlhalter, S., Mohler, H., and Fritschy, J. M. (1994). Inhibitory neurotransmission in rat spinal cord: co-localization of glycine- and GABAA-receptors at GABAergic synaptic contacts demonstrated by triple immunofluorescence staining. *Brain Res* 642, 59-69.
- Bohlhalter, S., Weinmann, O., Mohler, H., and Fritschy, J. M. (1996). Laminar compartmentalization of GABAA-receptor subtypes in the spinal cord: an immunohistochemical study. *J Neurosci* 16, 283-297.
- Borges, L. F., and Iversen, S. D. (1986). Topography of choline acetyltransferase immunoreactive neurons and fibers in the rat spinal cord. *Brain Res* 362, 140-148.
- Boujrad, N., Vidic, B., and Papadopoulos, V. (1996). Acute action of choriogonadotropin on Leydig tumor cells: changes in the topography of the mitochondrial peripheral-type benzodiazepine receptor. *Endocrinology* 137, 5727-5730.
- Braz, J. M., Nassar, M. A., Wood, J. N., and Basbaum, A. I. (2005). Parallel "pain" pathways arise from subpopulations of primary afferent nociceptor. *Neuron* 47, 787-793.
- Brooks, T. A., Hawkins, B. T., Huber, J. D., Eggleton, R. D., and Davis, T. P. (2005). Chronic inflammatory pain leads to increased blood-brain barrier permeability and tight junction protein alterations. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 289, H738-743.
- Brown, A. G. (1982). The dorsal horn of the spinal cord. *Q J Exp Physiol* 67, 193-212.
- Brussaard, A. B., and Koksma, J. J. (2003). Conditional regulation of neurosteroid sensitivity of GABAA receptors. *Ann N Y Acad Sci* 1007, 29-36.
- Ceccon, M., Rumbaugh, G., and Vicini, S. (2001). Distinct effect of pregnenolone sulfate on NMDA receptor subtypes. *Neuropharmacology* 40, 491-500.
- Celotti, F., Negri-Cesi, P., and Poletti, A. (1997). Steroid metabolism in the mammalian brain: 5 α -reduction and aromatization. *Brain Res Bull* 44, 365-375.
- Charalampopoulos, I., Alexaki, V. I., Lazaridis, I., Dermitzaki, E., Avlonitis, N., Tsatsanis, C., Calogeropoulou, T., Margioris, A. N., Castanas, E., and Gravanis, A. (2006). G protein-associated, specific membrane binding sites mediate the neuroprotective effect of dehydroepiandrosterone. *Faseb J* 20, 577-579.
- Chery, N., and de Koninck, Y. (1999). Junctional versus extrajunctional glycine and GABA(A) receptor-mediated IPSCs in identified lamina I neurons of the adult rat spinal cord. *J Neurosci* 19, 7342-7355.
- Chery, N., Yu, X. H., and 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.
- Choquet, D., and Triller, A. (2003). The role of receptor diffusion in the organization of the postsynaptic membrane. *Nat Rev Neurosci* 4, 251-265.
- Clark, B. J., Wells, J., King, S. R., and Stocco, D. M. (1994). The purification, cloning, and expression of a novel luteinizing hormone-induced mitochondrial protein in MA-10 mouse Leydig tumor cells. Characterization of the steroidogenic acute regulatory protein (StAR). *J Biol Chem* 269, 28314-28322.

- Coirini, H., Guezou, M., Liere, P., Delespierre, B., Pianos, A., Eychenne, B., Schumacher, M., and Guennoun, R. (2002). 3 Beta-hydroxysteroid dehydrogenase expression in rat spinal cord. *Neuroscience* 113, 883-891.
- Compagnone, N. A., and Mellon, S. H. (2000). Neurosteroids: biosynthesis and function of these novel neuromodulators. *Front Neuroendocrinol* 21, 1-56.
- Connolly, C. N., Woollorton, J. R., Smart, T. G., and Moss, S. J. (1996). Subcellular localization of gamma-aminobutyric acid type A receptors is determined by receptor beta subunits. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 9899-9904.
- Cordero-Erausquin, M., and Changeux, J. P. (2001). Tonic nicotinic modulation of serotonergic transmission in the spinal cord. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 2803-2807.
- Cordero-Erausquin, M., Pons, S., Faure, P., and Changeux, J. P. (2004). Nicotine differentially activates inhibitory and excitatory neurons in the dorsal spinal cord. *Pain* 109, 308-318.
- Coull, J. A., Boudreau, D., Bachand, K., Prescott, S. A., Nault, F., Sik, A., De Koninck, P., and De Koninck, Y. (2003). Trans-synaptic shift in anion gradient in spinal lamina I neurons as a mechanism of neuropathic pain. *Nature* 424, 938-942.
- Cronin, J. N., Bradbury, E. J., and Lidieth, M. (2004). Laminar distribution of GABAA- and glycine-receptor mediated tonic inhibition in the dorsal horn of the rat lumbar spinal cord: effects of picrotoxin and strychnine on expression of Fos-like immunoreactivity. *Pain* 112, 156-163.
- Darman, R. B., and Forbush, B. (2002). A regulatory locus of phosphorylation in the N terminus of the Na-K-Cl cotransporter, NKCC1. *J Biol Chem* 277, 37542-37550.
- De Roo, M., Rodeau, J. L., and Schlichter, R. (2003). Dehydroepiandrosterone potentiates native ionotropic ATP receptors containing the P2X2 subunit in rat sensory neurones. *J Physiol* 552, 59-71.
- Essrich, C., Lorez, M., Benson, J. A., Fritschy, J. M., and Luscher, B. (1998). Postsynaptic clustering of major GABAA receptor subtypes requires the gamma 2 subunit and gephyrin. *Nat Neurosci* 1, 563-571.
- Evans, R. M. (1988). The steroid and thyroid hormone receptor superfamily. *Science* 240, 889-895.
- Fritschy, J. M., Benke, D., Johnson, D. K., Mohler, H., and Rudolph, U. (1997). GABAA-receptor alpha-subunit is an essential prerequisite for receptor formation in vivo. *Neuroscience* 81, 1043-1053.
- Fritschy, J. M., and Brunig, I. (2003). Formation and plasticity of GABAergic synapses: physiological mechanisms and pathophysiological implications. *Pharmacol Ther* 98, 299-323.
- Gasnier, B. (2000). The loading of neurotransmitters into synaptic vesicles. *Biochimie* 82, 327-337.

- Gauriau, C., and Bernard, J. F. (2002). Pain pathways and parabrachial circuits in the rat. *Exp Physiol* 87, 251-258.
- Genazzani, A. R., Petraglia, F., Bernardi, F., Casarosa, E., Salvestrone, C., Tonetti, A., Nappi, R. E., Luisi, S., Palumbo, M., Purdy, R. H., and Luisi, M. (1998). Circulating levels of allopregnanolone in humans: gender, age, and endocrine influences. *J Clin Endocrinol Metab* 83, 2099-2103.
- Giesemann, T., Schwarz, G., Nawrotzki, R., Berhorster, K., Rothkegel, M., Schluter, K., Schrader, N., Schindelin, H., Mendel, R. R., Kirsch, J., and Jockusch, B. M. (2003). Complex formation between the postsynaptic scaffolding protein gephyrin, profilin, and Mena: a possible link to the microfilament system. *J Neurosci* 23, 8330-8339.
- Grudzinska, J., Schemm, R., Haeger, S., Nicke, A., Schmalzing, G., Betz, H., and Laube, B. (2005). The beta subunit determines the ligand binding properties of synaptic glycine receptors. *Neuron* 45, 727-739.
- Guenoun, R., Fiddes, R. J., Gouezou, M., Lombes, M., and Baulieu, E. E. (1995). A key enzyme in the biosynthesis of neurosteroids, 3 beta-hydroxysteroid dehydrogenase/delta 5-delta 4-isomerase (3 beta-HSD), is expressed in rat brain. *Brain Res Mol Brain Res* 30, 287-300.
- Hamann, M., and Richter, A. (2002). Effects of striatal injections of GABA(A) receptor agonists and antagonists in a genetic animal model of paroxysmal dystonia. *Eur J Pharmacol* 443, 59-70.
- Hardwick, M., Fertikh, D., Culty, M., Li, H., Vidic, B., and Papadopoulos, V. (1999). Peripheral-type benzodiazepine receptor (PBR) in human breast cancer: correlation of breast cancer cell aggressive phenotype with PBR expression, nuclear localization, and PBR-mediated cell proliferation and nuclear transport of cholesterol. *Cancer Res* 59, 831-842.
- Hargreaves, K., Dubner, R., Brown, F., Flores, C., and Joris, J. (1988). A new and sensitive method for measuring thermal nociception in cutaneous hyperalgesia. *Pain* 32, 77-88.
- Harney, S. C., Frenguelli, B. G., and Lambert, J. J. (2003). Phosphorylation influences neurosteroid modulation of synaptic GABAA receptors in rat CA1 and dentate gyrus neurones. *Neuropharmacology* 45, 873-883.
- Harrison, N. L., and Simmonds, M. A. (1984). Modulation of the GABA receptor complex by a steroid anaesthetic. *Brain Res* 323, 287-292.
- Harvey, R. J., Depner, U. B., Wassle, H., Ahmadi, S., Heindl, C., Reinold, H., Smart, T. G., Harvey, K., Schutz, B., Abo-Salem, O. M., *et al.* (2004). GlyR alpha3: an essential target for spinal PGE2-mediated inflammatory pain sensitization. *Science* 304, 884-887.
- Homanics, G. E., DeLorey, T. M., Firestone, L. L., Quinlan, J. J., Handforth, A., Harrison, N. L., Krasowski, M. D., Rick, C. E., Korpi, E. R., Makela, R., *et al.* (1997a). Mice devoid of gamma-aminobutyrate type A receptor beta3 subunit have epilepsy, cleft palate, and hypersensitive behavior. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 4143-4148.

- Homanics, G. E., Ferguson, C., Quinlan, J. J., Daggett, J., Snyder, K., Lagenaur, C., Mi, Z. P., Wang, X. H., Grayson, D. R., and Firestone, L. L. (1997b). Gene knockout of the $\alpha 6$ subunit of the gamma-aminobutyric acid type A receptor: lack of effect on responses to ethanol, pentobarbital, and general anesthetics. *Mol Pharmacol* 51, 588-596.
- Horak, M., Vlcek, K., Petrovic, M., Chodounska, H., and Vyklicky, L., Jr. (2004). Molecular mechanism of pregnenolone sulfate action at NR1/NR2B receptors. *J Neurosci* 24, 10318-10325.
- Hosie, A. M., Wilkins, M. E., da Silva, H. M., and Smart, T. G. (2006). Endogenous neurosteroids regulate GABAA receptors through two discrete transmembrane sites. *Nature* 444, 486-489.
- Hu, Z. Y., Bourreau, E., Jung-Testas, I., Robel, P., and Baulieu, E. E. (1987). Neurosteroids: oligodendrocyte mitochondria convert cholesterol to pregnenolone. *Proc Natl Acad Sci U S A* 84, 8215-8219.
- Jacob, T. C., Bogdanov, Y. D., Magnus, C., Saliba, R. S., Kittler, J. T., Haydon, P. G., and Moss, S. J. (2005). Gephyrin regulates the cell surface dynamics of synaptic GABAA receptors. *J Neurosci* 25, 10469-10478.
- Joffre (2001). *Electrophysiologie moléculaire*: Edition Hermann).
- Jonas, P., Bischofberger, J., and Sandkuhler, J. (1998). Corelease of two fast neurotransmitters at a central synapse. *Science* 281, 419-424.
- Joris, J., Costello, A., Dubner, R., and Hargreaves, K. M. (1990). Opiates suppress carrageenan-induced edema and hyperthermia at doses that inhibit hyperalgesia. *Pain* 43, 95-103.
- Julius, D., and Basbaum, A. I. (2001). Molecular mechanisms of nociception. *Nature* 413, 203-210.
- Jung-Testas, I., Hu, Z. Y., Baulieu, E. E., and Robel, P. (1989a). Neurosteroids: biosynthesis of pregnenolone and progesterone in primary cultures of rat glial cells. *Endocrinology* 125, 2083-2091.
- Jung-Testas, I., Hu, Z. Y., Baulieu, E. E., and Robel, P. (1989b). Steroid synthesis in rat brain cell cultures. *J Steroid Biochem* 34, 511-519.
- Jursky, F., Tamura, S., Tamura, A., Mandiyan, S., Nelson, H., and Nelson, N. (1994). Structure, function and brain localization of neurotransmitter transporters. *J Exp Biol* 196, 283-295.
- Kayser, V., and Guilbaud, G. (1987). Local and remote modifications of nociceptive sensitivity during carrageenin-induced inflammation in the rat. *Pain* 28, 99-107.
- Keller, A. F., Breton, J. D., Schlichter, R., and Poisbeau, P. (2004). Production of 5α -reduced neurosteroids is developmentally regulated and shapes GABA(A) miniature IPSCs in lamina II of the spinal cord. *J Neurosci* 24, 907-915.

- Keller, A. F., Coull, J. A., Chery, N., Poisbeau, P., and 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.
- Khanna, M., Qin, K. N., and Cheng, K. C. (1995). Distribution of 3 alpha-hydroxysteroid dehydrogenase in rat brain and molecular cloning of multiple cDNAs encoding structurally related proteins in humans. *J Steroid Biochem Mol Biol* 53, 41-46.
- Kirsch, J., Kuhse, J., and Betz, H. (1995). Targeting of glycine receptor subunits to gephyrin-rich domains in transfected human embryonic kidney cells. *Mol Cell Neurosci* 6, 450-461.
- Kittler, J. T., and Moss, S. J. (2003). Modulation of GABA_A receptor activity by phosphorylation and receptor trafficking: implications for the efficacy of synaptic inhibition. *Curr Opin Neurobiol* 13, 341-347.
- Kittler, J. T., Thomas, P., Tretter, V., Bogdanov, Y. D., Haucke, V., Smart, T. G., and Moss, S. J. (2004). Huntingtin-associated protein 1 regulates inhibitory synaptic transmission by modulating gamma-aminobutyric acid type A receptor membrane trafficking. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 12736-12741.
- Koksma, J. J., van Kesteren, R. E., Rosahl, T. W., Zwart, R., Smit, A. B., Luddens, H., and Brussaard, A. B. (2003). Oxytocin regulates neurosteroid modulation of GABA(A) receptors in supraoptic nucleus around parturition. *J Neurosci* 23, 788-797.
- Lacapere, J. J., and Papadopoulos, V. (2003). Peripheral-type benzodiazepine receptor: structure and function of a cholesterol-binding protein in steroid and bile acid biosynthesis. *Steroids* 68, 569-585.
- Lambert, J. J., Belelli, D., Peden, D. R., Vardy, A. W., and Peters, J. A. (2003). Neurosteroid modulation of GABA_A receptors. *Prog Neurobiol* 71, 67-80.
- Landry, M., Bouali-Benazzouz, R., El Mestikawy, S., Ravassard, P., and Nagy, F. (2004). Expression of vesicular glutamate transporters in rat lumbar spinal cord, with a note on dorsal root ganglia. *J Comp Neurol* 468, 380-394.
- Langosch, D., Thomas, L., and 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.
- Le Goascogne, C., Robel, P., Guezou, M., Sananes, N., Baulieu, E. E., and Waterman, M. (1987). Neurosteroids: cytochrome P-450_{scc} in rat brain. *Science* 237, 1212-1215.
- Legendre, P. (2001). The glycinergic inhibitory synapse. *Cell Mol Life Sci* 58, 760-793.
- Li, D. P., Chen, S. R., Pan, Y. Z., Levey, A. I., and Pan, H. L. (2002). Role of presynaptic muscarinic and GABA(B) receptors in spinal glutamate release and cholinergic analgesia in rats. *J Physiol* 543, 807-818.

- Li, H., Degenhardt, B., Tobin, D., Yao, Z. X., Tasken, K., and Papadopoulos, V. (2001a). Identification, localization, and function in steroidogenesis of PAP7: a peripheral-type benzodiazepine receptor- and PKA (RIalpha)-associated protein. *Mol Endocrinol* 15, 2211-2228.
- Li, H., Yao, Z., Degenhardt, B., Teper, G., and Papadopoulos, V. (2001b). Cholesterol binding at the cholesterol recognition/ interaction amino acid consensus (CRAC) of the peripheral-type benzodiazepine receptor and inhibition of steroidogenesis by an HIV TAT-CRAC peptide. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 1267-1272.
- Liu, J., Li, H., and Papadopoulos, V. (2003). PAP7, a PBR/PKA-RIalpha-associated protein: a new element in the relay of the hormonal induction of steroidogenesis. *J Steroid Biochem Mol Biol* 85, 275-283.
- Liu, J., Rone, M. B., and Papadopoulos, V. (2006). Protein-protein interactions mediate mitochondrial cholesterol transport and steroid biosynthesis. *J Biol Chem* 281, 38879-38893.
- Luddens, H., and Korpi, E. R. (1995). GABA antagonists differentiate between recombinant GABAA/benzodiazepine receptor subtypes. *J Neurosci* 15, 6957-6962.
- Luddens, H., Korpi, E. R., and Seeburg, P. H. (1995). GABAA/benzodiazepine receptor heterogeneity: neurophysiological implications. *Neuropharmacology* 34, 245-254.
- Luddens, H., and Wisden, W. (1991). Function and pharmacology of multiple GABAA receptor subunits. *Trends Pharmacol Sci* 12, 49-51.
- Luscher, B., and Keller, C. A. (2004). Regulation of GABAA receptor trafficking, channel activity, and functional plasticity of inhibitory synapses. *Pharmacol Ther* 102, 195-221.
- Lynch, J. W. (2004). Molecular structure and function of the glycine receptor chloride channel. *Physiol Rev* 84, 1051-1095.
- Ma, J. Y., and Narahashi, T. (1993). Enhancement of gamma-aminobutyric acid-activated chloride channel currents by lanthanides in rat dorsal root ganglion neurons. *J Neurosci* 13, 4872-4879.
- Macdonald, R. L., and Olsen, R. W. (1994). GABAA receptor channels. *Annu Rev Neurosci* 17, 569-602.
- MacDonald, R. L., Rogers, C. J., and Twyman, R. E. (1989). Barbiturate regulation of kinetic properties of the GABAA receptor channel of mouse spinal neurones in culture. *J Physiol* 417, 483-500.
- Mackie, M., Hughes, D. I., Maxwell, D. J., Tillakaratne, N. J., and Todd, A. J. (2003). Distribution and colocalisation of glutamate decarboxylase isoforms in the rat spinal cord. *Neuroscience* 119, 461-472.
- Mager, S., Naeve, J., Quick, M., Labarca, C., Davidson, N., and Lester, H. A. (1993). Steady states, charge movements, and rates for a cloned GABA transporter expressed in *Xenopus* oocytes. *Neuron* 10, 177-188.

- Maguire, J., and Mody, I. (2007). Neurosteroid synthesis-mediated regulation of GABA(A) receptors: relevance to the ovarian cycle and stress. *J Neurosci* 27, 2155-2162.
- Maguire, J. L., Stell, B. M., Rafizadeh, M., and Mody, I. (2005). Ovarian cycle-linked changes in GABA(A) receptors mediating tonic inhibition alter seizure susceptibility and anxiety. *Nat Neurosci* 8, 797-804.
- Majewska, M. D., Harrison, N. L., Schwartz, R. D., Barker, J. L., and Paul, S. M. (1986). Steroid hormone metabolites are barbiturate-like modulators of the GABA receptor. *Science* 232, 1004-1007.
- Malayev, A., Gibbs, T. T., and Farb, D. H. (2002). Inhibition of the NMDA response by pregnenolone sulphate reveals subtype selective modulation of NMDA receptors by sulphated steroids. *Br J Pharmacol* 135, 901-909.
- Malmberg, A. B., Brandon, E. P., Idzerda, R. L., Liu, H., McKnight, G. S., and Basbaum, A. I. (1997). Diminished inflammation and nociceptive pain with preservation of neuropathic pain in mice with a targeted mutation of the type I regulatory subunit of cAMP-dependent protein kinase. *J Neurosci* 17, 7462-7470.
- Maxwell, D. J., Koerber, H. R., and Bannatyne, B. A. (1985). Light and electron microscopy of contacts between primary afferent fibres and neurones with axons ascending the dorsal columns of the feline spinal cord. *Neuroscience* 16, 375-394.
- McEwen, B. S. (1991). Non-genomic and genomic effects of steroids on neural activity. *Trends Pharmacol Sci* 12, 141-147.
- McEwen, B. S. (1994a). Corticosteroids and hippocampal plasticity. *Ann N Y Acad Sci* 746, 134-142; discussion 142-134, 178-139.
- McEwen, B. S. (1994b). How do sex and stress hormones affect nerve cells? *Ann N Y Acad Sci* 743, 1-16; discussion 17-18.
- McEwen, B. S., and Woolley, C. S. (1994). Estradiol and progesterone regulate neuronal structure and synaptic connectivity in adult as well as developing brain. *Exp Gerontol* 29, 431-436.
- McKnight, G. S., Cummings, D. E., Amieux, P. S., Sikorski, M. A., Brandon, E. P., Planas, J. V., Motamed, K., and Idzerda, R. L. (1998). Cyclic AMP, PKA, and the physiological regulation of adiposity. *Recent Prog Horm Res* 53, 139-159; discussion 160-131.
- Meier, J., Vannier, C., Serge, A., Triller, A., and Choquet, D. (2001). Fast and reversible trapping of surface glycine receptors by gephyrin. *Nat Neurosci* 4, 253-260.
- Melcangi, R. C., Celotti, F., Castano, P., and Martini, L. (1993). Differential localization of the 5 alpha-reductase and the 3 alpha-hydroxysteroid dehydrogenase in neuronal and glial cultures. *Endocrinology* 132, 1252-1259.
- Mellon, S. H., Griffin, L. D., and Compagnone, N. A. (2001). Biosynthesis and action of neurosteroids. *Brain Res Brain Res Rev* 37, 3-12.
- Melzack, R., and Wall, P. D. (1965). Pain mechanisms: a new theory. *Science* 150, 971-979.

- Mihalek, R. M., Banerjee, P. K., Korpi, E. R., Quinlan, J. J., Firestone, L. L., Mi, Z. P., Lagenaur, C., Tretter, V., Sieghart, W., Anagnostaras, S. G., *et al.* (1999). Attenuated sensitivity to neuroactive steroids in gamma-aminobutyrate type A receptor delta subunit knockout mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 12905-12910.
- Millan, M. J. (1999). The induction of pain: an integrative review. *Prog Neurobiol* 57, 1-164.
- Millan, M. J. (2002). Descending control of pain. *Prog Neurobiol* 66, 355-474.
- Miller, W. L. (2007). StAR search--what we know about how the steroidogenic acute regulatory protein mediates mitochondrial cholesterol import. *Mol Endocrinol* 21, 589-601.
- Mitchell, K., Spike, R. C., and Todd, A. J. (1993). An immunocytochemical study of glycine receptor and GABA in laminae I-III of rat spinal dorsal horn. *J Neurosci* 13, 2371-2381.
- Mitev, Y. A., Darwish, M., Wolf, S. S., Holsboer, F., Almeida, O. F., and Patchev, V. K. (2003). Gender differences in the regulation of 3 alpha-hydroxysteroid dehydrogenase in rat brain and sensitivity to neurosteroid-mediated stress protection. *Neuroscience* 120, 541-549.
- Mohler, H. (2006). GABA(A) receptor diversity and pharmacology. *Cell Tissue Res* 326, 505-516.
- Morales-Aza, B. M., Chillingworth, N. L., Payne, J. A., and Donaldson, L. F. (2004). Inflammation alters cation chloride cotransporter expression in sensory neurons. *Neurobiol Dis* 17, 62-69.
- Moss, S. J., and Smart, T. G. (2001). Constructing inhibitory synapses. *Nat Rev Neurosci* 2, 240-250.
- Mucignat-Caretta, C., and Caretta, A. (2002). Clustered distribution of cAMP-dependent protein kinase regulatory isoform RI alpha during the development of the rat brain. *J Comp Neurol* 451, 324-333.
- Nabekura, J., Katsurabayashi, S., Kakazu, Y., Shibata, S., Matsubara, A., Jinno, S., Mizoguchi, Y., Sasaki, A., and Ishibashi, H. (2004). Developmental switch from GABA to glycine release in single central synaptic terminals. *Nat Neurosci* 7, 17-23.
- Narikawa, K., Furue, H., Kumamoto, E., and Yoshimura, M. (2000). In vivo patch-clamp analysis of IPSCs evoked in rat substantia gelatinosa neurons by cutaneous mechanical stimulation. *J Neurophysiol* 84, 2171-2174.
- O'Brien, J. A., and Berger, A. J. (1999). Cotransmission of GABA and glycine to brain stem motoneurons. *J Neurophysiol* 82, 1638-1641.
- O'Connor, V., Phelan, P. P., and Fry, J. P. (1996). Interactions of glycine and strychnine with their receptor recognition sites in mouse spinal cord. *Neurochem Int* 29, 423-434.
- Oke, B. O., Suarez-Quian, C. A., Riond, J., Ferrara, P., and Papadopoulos, V. (1992). Cell surface localization of the peripheral-type benzodiazepine receptor (PBR) in adrenal cortex. *Mol Cell Endocrinol* 87, R1-6.

- Ossipov, M. H., Lai, J., Malan, T. P., Jr., and Porreca, F. (2000). Spinal and supraspinal mechanisms of neuropathic pain. *Ann N Y Acad Sci* 909, 12-24.
- Pan, H. L., Chen, S. R., and Eisenach, J. C. (1999). Intrathecal clonidine alleviates allodynia in neuropathic rats: interaction with spinal muscarinic and nicotinic receptors. *Anesthesiology* 90, 509-514.
- Papadopoulos, V., Baraldi, M., Guilarte, T. R., Knudsen, T. B., Lacapere, J. J., Lindemann, P., Norenberg, M. D., Nutt, D., Weizman, A., Zhang, M. R., and Gavish, M. (2006a). Translocator protein (18kDa): new nomenclature for the peripheral-type benzodiazepine receptor based on its structure and molecular function. *Trends Pharmacol Sci* 27, 402-409.
- Papadopoulos, V., Lecanu, L., Brown, R. C., Han, Z., and Yao, Z. X. (2006b). Peripheral-type benzodiazepine receptor in neurosteroid biosynthesis, neuropathology and neurological disorders. *Neuroscience* 138, 749-756.
- Papadopoulos, V., Liu, J., and Culty, M. (2007). Is there a mitochondrial signaling complex facilitating cholesterol import? *Mol Cell Endocrinol* 265-266, 59-64.
- Paqueron, X., Conklin, D., and Eisenach, J. C. (2003). Plasticity in action of intrathecal clonidine to mechanical but not thermal nociception after peripheral nerve injury. *Anesthesiology* 99, 199-204.
- Park-Chung, M., Malayev, A., Purdy, R. H., Gibbs, T. T., and Farb, D. H. (1999). Sulfated and unsulfated steroids modulate gamma-aminobutyric acidA receptor function through distinct sites. *Brain Res* 830, 72-87.
- Patapoutian, A., Peier, A. M., Story, G. M., and Viswanath, V. (2003). ThermoTRP channels and beyond: mechanisms of temperature sensation. *Nat Rev Neurosci* 4, 529-539.
- Pathirathna, S., Todorovic, S. M., Covey, D. F., and Jevtovic-Todorovic, V. (2005). 5alpha-reduced neuroactive steroids alleviate thermal and mechanical hyperalgesia in rats with neuropathic pain. *Pain* 117, 326-339.
- Patte-Mensah, C., Kappes, V., Freund-Mercier, M. J., Tsutsui, K., and Mensah-Nyagan, A. G. (2003). Cellular distribution and bioactivity of the key steroidogenic enzyme, cytochrome P450side chain cleavage, in sensory neural pathways. *J Neurochem* 86, 1233-1246.
- Patte-Mensah, C., Li, S., and Mensah-Nyagan, A. G. (2004a). Impact of neuropathic pain on the gene expression and activity of cytochrome P450side-chain-cleavage in sensory neural networks. *Cell Mol Life Sci* 61, 2274-2284.
- Patte-Mensah, C., Penning, T. M., and Mensah-Nyagan, A. G. (2004b). Anatomical and cellular localization of neuroactive 5 alpha/3 alpha-reduced steroid-synthesizing enzymes in the spinal cord. *J Comp Neurol* 477, 286-299.
- Paul, S. M., and Purdy, R. H. (1992). Neuroactive steroids. *Faseb J* 6, 2311-2322.
- Payne, J. A., Rivera, C., Voipio, J., and Kaila, K. (2003). Cation-chloride co-transporters in neuronal communication, development and trauma. *Trends Neurosci* 26, 199-206.

- Pelletier, G., Luu-The, V., and Labrie, F. (1994). Immunocytochemical localization of 5 alpha-reductase in rat brain. *Mol Cell Neurosci* 5, 394-399.
- Penning, T. M., Sharp, R. B., and Krieger, N. R. (1985). Purification and properties of 3 alpha-hydroxysteroid dehydrogenase from rat brain cytosol. Inhibition by nonsteroidal anti-inflammatory drugs and progestins. *J Biol Chem* 260, 15266-15272.
- Pfeiffer, F., and Betz, H. (1981). Solubilization of the glycine receptor from rat spinal cord. *Brain Res* 226, 273-279.
- Pfeiffer, F., Graham, D., and Betz, H. (1982). Purification by affinity chromatography of the glycine receptor of rat spinal cord. *J Biol Chem* 257, 9389-9393.
- Pieraut, S., Laurent-Matha, V., Sar, C., Hubert, T., Mechaly, I., Hilaire, C., Mersel, M., Delpire, E., Valmier, J., and Scamps, F. (2007). NKCC1 phosphorylation stimulates neurite growth of injured adult sensory neurons. *J Neurosci* 27, 6751-6759.
- Poisbeau, P., Patte-Mensah, C., Keller, A. F., Barrot, M., Breton, J. D., Luis-Delgado, O. E., Freund-Mercier, M. J., Mensah-Nyagan, A. G., and Schlichter, R. (2005). Inflammatory pain upregulates spinal inhibition via endogenous neurosteroid production. *J Neurosci* 25, 11768-11776.
- Polgar, E., Fowler, J. H., McGill, M. M., and Todd, A. J. (1999a). The types of neuron which contain protein kinase C gamma in rat spinal cord. *Brain Res* 833, 71-80.
- Polgar, E., Szucs, P., Urban, L., Matesz, K., and Nagy, I. (1999b). Immunohistochemical localization of neurokinin-1 receptor in the lumbar spinal cord of young rats: morphology and distribution. *Somatosens Mot Res* 16, 361-368.
- Porreca, F., Ossipov, M. H., and Gebhart, G. F. (2002). Chronic pain and medullary descending facilitation. *Trends Neurosci* 25, 319-325.
- Poyatos, I., Ponce, J., Aragon, C., Gimenez, C., and Zafra, F. (1997). The glycine transporter GLYT2 is a reliable marker for glycine-immunoreactive neurons. *Brain Res Mol Brain Res* 49, 63-70.
- Pozzi, P., Bendotti, C., Simeoni, S., Piccioni, F., Guerini, V., Marron, T. U., Martini, L., and Poletti, A. (2003). Androgen 5-alpha-reductase type 2 is highly expressed and active in rat spinal cord motor neurones. *J Neuroendocrinol* 15, 882-887.
- Price, T. J., Cervero, F., and de Koninck, Y. (2005). Role of cation-chloride-cotransporters (CCC) in pain and hyperalgesia. *Curr Top Med Chem* 5, 547-555.
- Purves (1999). *Neurosciences: De Boeck Université*.
- Rajendra, S., Lynch, J. W., Pierce, K. D., French, C. R., Barry, P. H., and Schofield, P. R. (1995). Mutation of an arginine residue in the human glycine receptor transforms beta-alanine and taurine from agonists into competitive antagonists. *Neuron* 14, 169-175.
- Rasmussen, H., Rasmussen, T., Triller, A., and Vannier, C. (2002). Strychnine-blocked glycine receptor is removed from synapses by a shift in insertion/degradation equilibrium. *Mol Cell Neurosci* 19, 201-215.

- Reddy, D. S. (2003). Pharmacology of endogenous neuroactive steroids. *Crit Rev Neurobiol* 15, 197-234.
- Reddy, D. S. (2006). Physiological role of adrenal deoxycorticosterone-derived neuroactive steroids in stress-sensitive conditions. *Neuroscience* 138, 911-920.
- Reddy, D. S., Castaneda, D. C., O'Malley, B. W., and Rogawski, M. A. (2004). Anticonvulsant activity of progesterone and neurosteroids in progesterone receptor knockout mice. *J Pharmacol Exp Ther* 310, 230-239.
- Reddy, D. S., and Rogawski, M. A. (2002). Stress-induced deoxycorticosterone-derived neurosteroids modulate GABA(A) receptor function and seizure susceptibility. *J Neurosci* 22, 3795-3805.
- Rexed, B. (1952). The cytoarchitectonic organization of the spinal cord in the cat. *J Comp Neurol* 96, 414-495.
- Ribeiro-da-Silva, A., and Cuello, A. C. (1990). Choline acetyltransferase-immunoreactive profiles are presynaptic to primary sensory fibers in the rat superficial dorsal horn. *J Comp Neurol* 295, 370-384.
- Robel, P., and Baulieu, E. E. (1995). Neurosteroids: biosynthesis and function. *Crit Rev Neurobiol* 9, 383-394.
- Robyr, D., Wolffe, A. P., and Wahli, W. (2000). Nuclear hormone receptor coregulators in action: diversity for shared tasks. *Mol Endocrinol* 14, 329-347.
- Roux, M. J., and Supplisson, S. (2000). Neuronal and glial glycine transporters have different stoichiometries. *Neuron* 25, 373-383.
- Rudolph, U., and Mohler, H. (2006). GABA-based therapeutic approaches: GABAA receptor subtype functions. *Curr Opin Pharmacol* 6, 18-23.
- Rupprecht, R., and Holsboer, F. (1999). Neuroactive steroids: mechanisms of action and neuropsychopharmacological perspectives. *Trends Neurosci* 22, 410-416.
- Rupprecht, R., Reul, J. M., Trapp, T., van Steensel, B., Wetzell, C., Damm, K., Ziegler, W., and Holsboer, F. (1993). Progesterone receptor-mediated effects of neuroactive steroids. *Neuron* 11, 523-530.
- Russell, A. J., Wallace, A. M., Forest, M. G., Donaldson, M. D., Edwards, C. R., and Sutcliffe, R. G. (1994). Mutation in the human gene for 3 beta-hydroxysteroid dehydrogenase type II leading to male pseudohermaphroditism without salt loss. *J Mol Endocrinol* 12, 225-237.
- Sagne, C., El Mestikawy, S., Isambert, M. F., Hamon, M., Henry, J. P., Giros, B., and Gasnier, B. (1997). Cloning of a functional vesicular GABA and glycine transporter by screening of genome databases. *FEBS Lett* 417, 177-183.
- Sanna, E., Talani, G., Busonero, F., Pisu, M. G., Purdy, R. H., Serra, M., and Biggio, G. (2004). Brain steroidogenesis mediates ethanol modulation of GABAA receptor activity in rat hippocampus. *J Neurosci* 24, 6521-6530.

- Sanne, J. L., and Krueger, K. E. (1995). Expression of cytochrome P450 side-chain cleavage enzyme and 3 beta-hydroxysteroid dehydrogenase in the rat central nervous system: a study by polymerase chain reaction and in situ hybridization. *J Neurochem* 65, 528-536.
- Schlichter, R., Keller, A. F., De Roo, M., Breton, J. D., Inquimbert, P., and Poisbeau, P. (2006). Fast nongenomic effects of steroids on synaptic transmission and role of endogenous neurosteroids in spinal pain pathways. *J Mol Neurosci* 28, 33-51.
- Schwartz, R. D., Wess, M. J., Labarca, R., Skolnick, P., and Paul, S. M. (1987). Acute stress enhances the activity of the GABA receptor-gated chloride ion channel in brain. *Brain Res* 411, 151-155.
- Serra, M., Pisu, M. G., Littera, M., Papi, G., Sanna, E., Tuveri, F., Usala, L., Purdy, R. H., and Biggio, G. (2000). Social isolation-induced decreases in both the abundance of neuroactive steroids and GABA(A) receptor function in rat brain. *J Neurochem* 75, 732-740.
- Serra, M., Sanna, E., Mostallino, M. C., and Biggio, G. (2007). Social isolation stress and neuroactive steroids. *Eur Neuropsychopharmacol* 17, 1-11.
- Shu, H. J., Eisenman, L. N., Jinadasa, D., Covey, D. F., Zorumski, C. F., and Mennerick, S. (2004). Slow actions of neuroactive steroids at GABAA receptors. *J Neurosci* 24, 6667-6675.
- Sieghart, W., and Sperk, G. (2002). Subunit composition, distribution and function of GABA(A) receptor subtypes. *Curr Top Med Chem* 2, 795-816.
- Somogyi, R., Wen, X., Ma, W., and Barker, J. L. (1995). Developmental kinetics of GAD family mRNAs parallel neurogenesis in the rat spinal cord. *J Neurosci* 15, 2575-2591.
- Sorkin, L. S., and Puig, S. (1996). Neuronal model of tactile allodynia produced by spinal strychnine: effects of excitatory amino acid receptor antagonists and a mu-opiate receptor agonist. *Pain* 68, 283-292.
- Sorkin, L. S., Puig, S., and Jones, D. L. (1998). Spinal bicuculline produces hypersensitivity of dorsal horn neurons: effects of excitatory amino acid antagonists. *Pain* 77, 181-190.
- Spike, R. C., Todd, A. J., and Johnston, H. M. (1993). Coexistence of NADPH diaphorase with GABA, glycine, and acetylcholine in rat spinal cord. *J Comp Neurol* 335, 320-333.
- Spike, R. C., Watt, C., Zafra, F., and Todd, A. J. (1997). An ultrastructural study of the glycine transporter GLYT2 and its association with glycine in the superficial laminae of the rat spinal dorsal horn. *Neuroscience* 77, 543-551.
- Stell, B. M., Brickley, S. G., Tang, C. Y., Farrant, M., and Mody, I. (2003). Neuroactive steroids reduce neuronal excitability by selectively enhancing tonic inhibition mediated by delta subunit-containing GABAA receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 14439-14444.

- Stenberg, V. I., Bouley, M. G., Katz, B. M., Lee, K. J., and Parmar, S. S. (1990). Negative endocrine control system for inflammation in rats. *Agents Actions* 29, 189-195.
- Stocco, D. M., and Clark, B. J. (1996). Role of the steroidogenic acute regulatory protein (StAR) in steroidogenesis. *Biochem Pharmacol* 51, 197-205.
- Taiwo, Y. O., Bjerknes, L. K., Goetzl, E. J., and Levine, J. D. (1989). Mediation of primary afferent peripheral hyperalgesia by the cAMP second messenger system. *Neuroscience* 32, 577-580.
- Takahashi, T., Momiyama, A., Hirai, K., Hishinuma, F., and Akagi, H. (1992). Functional correlation of fetal and adult forms of glycine receptors with developmental changes in inhibitory synaptic receptor channels. *Neuron* 9, 1155-1161.
- Todd, A. J. (1991). Immunohistochemical evidence that acetylcholine and glycine exist in different populations of GABAergic neurons in lamina III of rat spinal dorsal horn. *Neuroscience* 44, 741-746.
- Todd, A. J. (1996). GABA and glycine in synaptic glomeruli of the rat spinal dorsal horn. *Eur J Neurosci* 8, 2492-2498.
- Todd, A. J. (2002). Anatomy of primary afferents and projection neurones in the rat spinal dorsal horn with particular emphasis on substance P and the neurokinin 1 receptor. *Exp Physiol* 87, 245-249.
- Todd, A. J., Hughes, D. I., Polgar, E., Nagy, G. G., Mackie, M., Ottersen, O. P., and Maxwell, D. J. (2003). The expression of vesicular glutamate transporters VGLUT1 and VGLUT2 in neurochemically defined axonal populations in the rat spinal cord with emphasis on the dorsal horn. *Eur J Neurosci* 17, 13-27.
- Todd, A. J., Spike, R. C., Chong, D., and Neilson, M. (1995). The relationship between glycine and gephyrin in synapses of the rat spinal cord. *Eur J Neurosci* 7, 1-11.
- Todd, A. J., and Sullivan, A. C. (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, A. J., Watt, C., Spike, R. C., and Sieghart, W. (1996). Colocalization of GABA, glycine, and their receptors at synapses in the rat spinal cord. *J Neurosci* 16, 974-982.
- Tran, T. S., Alijani, A., and Phelps, P. E. (2003). Unique developmental patterns of GABAergic neurons in rat spinal cord. *J Comp Neurol* 456, 112-126.
- Twyman, R. E., Rogers, C. J., and Macdonald, R. L. (1989). Differential regulation of gamma-aminobutyric acid receptor channels by diazepam and phenobarbital. *Ann Neurol* 25, 213-220.
- Venturini, I., Zeneroli, M. L., Corsi, L., Avallone, R., Farina, F., Alho, H., Baraldi, C., Ferrarese, C., Pecora, N., Frigo, M., *et al.* (1998). Up-regulation of peripheral benzodiazepine receptor system in hepatocellular carcinoma. *Life Sci* 63, 1269-1280.

- Wan, Q., Man, H. Y., Branton, J., Wang, W., Salter, M. W., Becker, L., and Wang, Y. T. (1997). Modulation of GABAA receptor function by tyrosine phosphorylation of beta subunits. *J Neurosci* 17, 5062-5069.
- Wang, X. L., Zhang, H. M., Li, D. P., Chen, S. R., and Pan, H. L. (2006). Dynamic regulation of glycinergic input to spinal dorsal horn neurones by muscarinic receptor subtypes in rats. *J Physiol* 571, 403-413.
- Watson, A. H. (2003). GABA- and glycine-like immunoreactivity in axons and dendrites contacting the central terminals of rapidly adapting glabrous skin afferents in rat spinal cord. *J Comp Neurol* 464, 497-510.
- Watson, A. H., Hughes, D. I., and Bazzaz, A. A. (2002). Synaptic relationships between hair follicle afferents and neurones expressing GABA and glycine-like immunoreactivity in the spinal cord of the rat. *J Comp Neurol* 452, 367-380.
- Winter, C. A., Risley, E. A., and Nuss, G. W. (1962). Carrageenin-induced edema in hind paw of the rat as an assay for antiinflammatory drugs. *Proc Soc Exp Biol Med* 111, 544-547.
- Wisden, W., and Moss, S. J. (1997). gamma-Aminobutyric acid type A receptor subunit assembly and sorting: gene targeting and cell biology approaches. *Biochem Soc Trans* 25, 820-824.
- Woolf, C. J., and Doubell, T. P. (1994). The pathophysiology of chronic pain--increased sensitivity to low threshold A beta-fibre inputs. *Curr Opin Neurobiol* 4, 525-534.
- Woolf, C. J., and Salter, M. W. (2000). Neuronal plasticity: increasing the gain in pain. *Science* 288, 1765-1769.
- Wu, F. S., Gibbs, T. T., and Farb, D. H. (1991). Pregnenolone sulfate: a positive allosteric modulator at the N-methyl-D-aspartate receptor. *Mol Pharmacol* 40, 333-336.
- Yaksh, T. L. (1999). Spinal systems and pain processing: development of novel analgesic drugs with mechanistically defined models. *Trends Pharmacol Sci* 20, 329-337.
- Yaksh, T. L., Hua, X. Y., Kalcheva, I., Nozaki-Taguchi, N., and Marsala, M. (1999). The spinal biology in humans and animals of pain states generated by persistent small afferent input. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 7680-7686.
- Zafra, F., Aragon, C., Olivares, L., Danbolt, N. C., Gimenez, C., and Storm-Mathisen, J. (1995a). Glycine transporters are differentially expressed among CNS cells. *J Neurosci* 15, 3952-3969.
- Zafra, F., Gomez, J., Olivares, L., Aragon, C., and Gimenez, C. (1995b). Regional distribution and developmental variation of the glycine transporters GLYT1 and GLYT2 in the rat CNS. *Eur J Neurosci* 7, 1342-1352.
- Zeilhofer, H. U. (2005). The glycinergic control of spinal pain processing. *Cell Mol Life Sci* 62, 2027-2035.

- Zeilhofer, H. U., Studler, B., Arabadzisz, D., Schweizer, C., Ahmadi, S., Layh, B., Bosl, M. R., and Fritschy, J. M. (2005). Glycinergic neurons expressing enhanced green fluorescent protein in bacterial artificial chromosome transgenic mice. *J Comp Neurol* 482, 123-141.
- Zhu, Y., Bond, J., and Thomas, P. (2003a). Identification, classification, and partial characterization of genes in humans and other vertebrates homologous to a fish membrane progesterin receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 2237-2242.
- Zhu, Y., Rice, C. D., Pang, Y., Pace, M., and Thomas, P. (2003b). Cloning, expression, and characterization of a membrane progesterin receptor and evidence it is an intermediary in meiotic maturation of fish oocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 2231-2236.