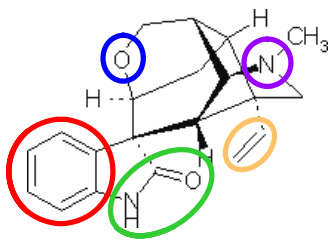


THESE DE DOCTORAT DE L'UNIVERSITE LOUIS PASTEUR STRASBOURG I

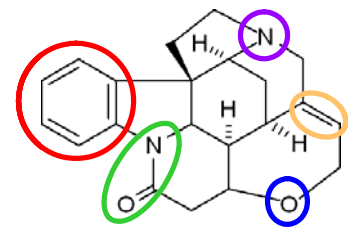
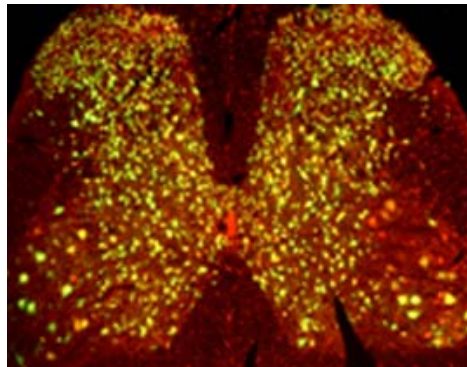
Discipline: Sciences du vivant

Spécialité: Neurosciences

Régulation de la neurostéroïdogenèse dans la moelle épinière et le système limbique par la gelsémine et *Gelsemium sempervirens*: analyse cellulaire et implications neurophysiologiques.



Gelsémine



Strychnine

**Présentée par
Christine VENARD**

Soutenue le 26 Novembre 2008

JURY

Rapporteur externe	M. L.M. GARCIA-SEGURA , Professeur, Institut CAJAL, Madrid, Espagne
Rapporteur externe	M. L. CAZIN , Professeur, Université de Rouen
Rapporteur interne	M. B. BUCHER , Directeur de Recherche, CNRS, Strasbourg
Examinatrice	Mme N. BOUJEDAINI , Chargée de Recherche, BOIRON, Sainte-Foy-lès-Lyon
Examinateur	M. A.G. MENSAH-NYAGAN , Professeur ULP, Strasbourg
Directrice de thèse	Mme C. PATTE-MENSAH , Maître de Conférences-HDR ULP, Strasbourg

REMERCIEMENTS

En premier lieu, je remercie vivement et chaleureusement Monsieur le Professeur Luis Miguel Garcia-Segura, Monsieur le Professeur Lionel Cazin et Monsieur le Directeur de Recherche Bernard Bucher d'avoir accepté d'être les membres du jury de ma thèse. Je les remercie de m'accorder le privilège d'avoir un échange scientifique avec eux.

Je voudrais remercier également chaleureusement et sincèrement le Professeur Ayikoe Guy Mensah-Nyagan, pour son encadrement, ses enseignements, son aide et son soutien tout au long de ces trois années. Je le remercie très sincèrement de m'avoir toujours accordé sa confiance et de m'avoir offert la chance de pouvoir effectuer la thèse au sein de son équipe. Je souhaite également le remercier pour avoir su m'écouter à certaines périodes de ma vie où sa disponibilité et ses conseils ont toujours su me guider. Il m'a appris énormément sur le plan scientifique en m'inculquant la passion de la recherche. Peu d'étudiants ont la chance de pouvoir attendre autant d'investissement de la part de leur responsable. Pour toutes ces raisons, je vous remercie infiniment. Merci pour tout. Ce fût un très grand plaisir d'avoir travaillé avec vous.

Je souhaite également remercier le Docteur Christine Patte-Mensah pour son soutien, son investissement (et il fut plus qu'important), ses enseignements, ses conseils et sa joie communicative. Ce fut un immense plaisir de pouvoir travailler avec toi, Christine. Merci.

Cette thèse a été réalisée dans le cadre d'une convention CIFRE (No. 659/2005, CNRS-BOIRON) entre notre équipe et les Laboratoires BOIRON que je souhaite également remercier pour leur accueil très chaleureux au sein de leur entreprise, en particulier Madame le Docteur Naoual Boujedaini, qui a accepté de faire partie des membres de mon jury et avec qui j'ai pu avoir de très bons échanges scientifiques. Merci beaucoup Naoual.

Merci également au Docteur Laurence Meyer pour son soutien, son aide et les bons moments que nous avons pu partager ensemble.

Je souhaite également remercier tous mes amis, proches et lointains, qui m'ont toujours encouragée. Un merci plus particulier à Adrien Lacaud avec qui j'ai pu travailler durant les deux premières années de mon doctorat et qui s'en est ensuite allé vers d'autres horizons. Merci à toi, Adrien, pour ton aide, ton soutien et tout simplement ton amitié.

A mes parents

A mes sœurs, Cécile, Elisabeth et Claire

Merci d'avoir toujours cru en moi. Merci pour tout l'amour et le soutien que vous m'apportez tous les jours qui font que sans vous, je n'en serai pas là aujourd'hui. Je vous aime.

SOMMAIRE

LISTE DES PUBLICATIONS ET ABSTRACTS REALISES DANS LE CADRE DE MES ETUDES DOCTORALES.....	7
RESUME.....	9
ABSTRACT.....	10
ABREVIATIONS.....	11
TABLE DES ILLUSTRATIONS ET TABLEAUX.....	13
INTRODUCTION.....	15
I. Neurostéroïdes et Stéroïdes neuroactifs.....	16
I.1. Présentation du concept des neurostéroïdes.....	16
I.1.1. Définition.....	16
I.1.2. Biosynthèse des neurostéroïdes.....	17
I.1.3. Régulation de la biosynthèse des neurostéroïdes.....	19
I.1.3.1. Régulation de la biosynthèse des neurostéroïdes par les neurotransmetteurs et/ou les neuropeptides.....	19
I.1.3.2. Mécanismes impliqués dans la régulation de la biosynthèse des neurostéroïdes.....	20
I.1.4. Mécanismes d'action des neurostéroïdes/stéroïdes neuroactifs.....	22
I.1.4.1. Action génomique.....	22
I.1.4.2. Action non génomique.....	24
II. Neurostéroïdes et douleur.....	26
II.1. Définition de la douleur.....	26
II.2. Implication des neurostéroïdes dans le contrôle de la douleur.....	31

II.2.1. Mise en évidence de la présence et de l'activité des enzymes de la neurostéroïdogenèse dans les centres nerveux nociceptifs.....	31
II.2.2. Relations anatomo-fonctionnelles.....	32
II.2.3. Modification de la neurostéroïdogenèse en situation de douleur et action des neurostéroïdes endogènes sur la sensibilité à la douleur.....	33
III. Neurostéroïdes et anxiété.....	35
III.1. Définition.....	35
III.2. L'hippocampe et l'amygdale, deux structures clefs dans le contrôle de l'anxiété.....	37
III.3. Action potentielle des neurostéroïdes dans le contrôle de l'anxiété.....	38
IV. Intérêt particulier de l'allopregnanolone ou 3α,5α-tétrahydroprogestérone	40
IV.1. Effets physiologiques de l'allopregnanolone ou 3α,5α-THP.....	40
IV.2. Régulation de la biosynthèse de 3α,5α-THP.....	43
V. L'Homéopathie.....	44
V.1. Historique et définition.....	44
V.2. Débats et critiques sur l'homéopathie.....	46
VI. <i>Gelsemium sempervirens</i>.....	48
VI.1. Description.....	48
VI.2. Observations des effets cliniques supposés de <i>Gelsemium sempervirens</i>.....	49
VI.3. Composition de <i>Gelsemium sempervirens</i>.....	50
VII. La Gelsémine.....	52
VII.1. Description.....	52
VII.2. Observations des effets cliniques supposés de la Gelsémine.....	52

VII.3. Analogie structurale avec la Strychnine.....	53
VII.4. Strychnine, Glycine et récepteurs glycinergiques.....	54
VII.4.1. Strychnine: antagoniste sélectif du récepteur glycinergique.....	54
VII.4.2. Glycine.....	55
VII.4.3. Récepteurs glycinergiques.....	55
VII.4.3.1. Récepteurs glycinergiques sensibles à la strychnine: Gly-R.....	55
VII.4.3.2. Récepteurs glycinergiques insensibles à la strychnine: rNMDA.....	58
VIII. Descriptif du projet de thèse.....	60
MATERIELS ET METHODES.....	63
I. Animaux.....	64
II. Substances pharmacologiques et produits chimiques.....	65
III. Etude de l'action de <i>Gelsemium sempervirens</i> et de Gelsémine sur la biosynthèse de 3α,5α-THP.....	66
III.1. Préparations des dilutions homéopathiques de <i>G. sempervirens</i>.....	66
III.2. Identification et quantification des constituants de <i>G. sempervirens</i>.....	67
III.3. Préparations de Gelsémine.....	69
IV. Etude de l'activité biologique des enzymes de synthèse des neurostéroïdes <i>in vitro</i>: conversion de la [³H]PROG en [³H]neurostéroïdes.....	72
IV.1. Incorporation de la progestérone tritiée dans des tranches de ME et d'H-A de rats (technique de pulse-chase).....	72
IV.2. Caractérisation des neurostéroïdes néosynthétisés dans la ME et l'H-A par le couplage HPLC-Flo/One.....	73
IV.3. Quantification de la biosynthèse des neurostéroïdes et analyse statistique..	74

V. Analyse de l'expression du gène codant la 3α-HSOR par couplage Reverse Transcription - PCR quantitative en temps réel.....	76
V.1. Principe général d'une PCR.....	76
V.2. Principe de la PCR quantitative en temps réel ou rtPCR.....	77
V.3. Protocole.....	78
V.3.1. Extraction des ARN et RT.....	78
V.3.2. PCR quantitative en temps réel.....	83
VI. Analyse de l'expression de la protéine 3α-HSOR par la technique de Western blot.....	86
VI.1. Principe.....	86
VI.2. Extraction des protéines totales.....	86
VI.3. Analyse par Western blot.....	87
VII. Localisation de la 3α-HSOR dans la ME.....	88
VII.1. Technique d'immunofluorescence.....	88
VII.1.1. Principe.....	88
VII.1.2. Préparation des coupes.....	88
VII.1.3. Réaction immunohistochimique.....	89
VIII. Analyse comportementale des effets de la 3α,5α-THP et de la Provera sur la sensibilité thermique et mécanique chez des rats témoins et neuropathiques.....	90
VIII.1. Procédure d'injection intrathécale transcutanée directe.....	90
VIII.2. Le test du PLANTAR.....	92
VIII.3. Le test des FILAMENTS DE VON FREY.....	94
VIII.4. Prétests et homogénéisation des groupes.....	95

VIII.5. Cinétique des effets dose-dépendants des injections intrathécales de 3 α ,5 α -THP ou de Provera sur les seuils nociceptifs thermique et mécanique des rats naïfs.....	95
VIII.6. Effets des administrations intrathécales de 3 α ,5 α -THP ou de Provera sur les seuils nociceptifs thermique et mécanique des rats neuropathiques.....	95
VIII.7. Tests statistiques des études comportementales.....	96
RESULTATS.....	97
I. Mise en évidence de l'action de la gelsémine sur la neurostéroïdogenèse: analyse des effets de la glycine, de la strychnine et de la gelsémine sur la biosynthèse d'allopregnanolone dans la moelle épinière de rat.....	98
I.1. Effets de la glycine sur la production de 3 α ,5 α -THP dans la ME.....	99
I.2. Caractérisation pharmacologique du récepteur relayant l'effet de la glycine.....	100
I.3. Effet de la gelsémine sur la production de 3 α ,5 α -THP dans la ME et caractérisation pharmacologique du récepteur impliqué.....	100
I.4. Effet de l'administration concomitante de glycine et de gelsemine sur la biosynthèse de 3 α ,5 α -THP.....	101
II. Etude comparative des effets pharmacologiques de la gelsémine et de <i>G. sempervirens</i> sur la biosynthèse d'allopregnanolone dans la moelle épinière et le système limbique.....	110
III. Interactions entre sensibilité à la douleur et activité 3α-hydroxystéroïde oxydo-réductase synthétisant l'allopregnanolone dans la moelle épinière: analyses <i>in vitro</i> et <i>in vivo</i>.....	144
III.1. Effets de la douleur neuropathique sur l'expression génique et protéique de la 3 α -HSOR dans la ME.....	145

III.2. Variation de l'activité enzymatique 3 α -HSOR dans la ME des rats neuropathiques.....	146
III.3. Analyse comportementale des effets d'injections intrathécales de 3 α ,5 α -THP et de Provera sur la sensibilité à la douleur.....	146
DISCUSSION.....	160
I. Mise en évidence de l'action de la gelsémine sur la neurostéroïdogénèse: analyse des effets de la gelsémine et des modulateurs du système glycinergique sur la biosynthèse de 3 α ,5 α -THP dans la ME de rat.....	161
II. Analyse comparative des effets des dilutions homéopathiques de gelsémine et de <i>G. sempervirens</i> sur la biosynthèse du neurostéroïde 3 α ,5 α -THP dans la moelle épinière et le système limbique de rat.....	167
III. Interactions entre sensibilité à la douleur et activité 3 α -hydroxystéroïde oxydo-réductase synthétisant la 3 α ,5 α -THP dans la ME.....	170
CONCLUSION GENERALE.....	176
PERSPECTIVES.....	181
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	186

LISTE DES PUBLICATIONS ET ABSTRACTS REALISES DANS LE CADRE DE MES ETUDES DOCTORALES

(Octobre 2005 – Novembre 2008)

I. Publications dans des journaux à comité de lecture

(1) VENARD C., BOUJEDAINI N., BELON P., MENSAH-NYAGAN A.G. and PATTE-MENSAH C. Regulation of neurosteroid allopregnanolone biosynthesis in the rat spinal cord by glycine and the alkaloidal analogs strychnine and gelsemine. *Neuroscience*, 153(1):154-161, 2008.

(2) MEYER L., VENARD C., SCHAEFFER V., PATTE-MENSAH C. and MENSAH-NYAGAN A.G. The biological activity of 3alpha-hydroxysteroid oxido-reductase in the spinal cord regulates thermal and mechanical pain thresholds after sciatic nerve injury. *Neurobiology of Disease*, 30(1):30-41, 2008.

(3) MENSAH-NYAGAN A.G., KIBALY C., SCHAEFFER V., VENARD C., MEYER L. and PATTE-MENSAH C. Endogenous steroid production in the spinal cord and potential involvement in neuropathic pain modulation. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 109(3-5):286-293, 2008.

(4) VENARD C., BOUJEDAINI N., MENSAH-NYAGAN A.G. and PATTE-MENSAH C. Comparative analysis of the effects of gelsemine and *Gelsemium sempervirens* on neurosteroid allopregnanolone formation in the spinal cord and limbic system. *En préparation*.

II. Publication dans un journal sans comité de lecture

MENSAH-NYAGAN A.G., KIBALY C., MEYER L., SCHAEFFER V., VENARD C. and PATTE-MENSAH C. Neurostéroïdogenèse dans la moelle épinière et modulation de la sensibilité nociceptive au cours de la douleur neurogène. *Douleurs*, 7(HS2):14-16, 2006.

III. Abstracts publiés dans le cadre de congrès internationaux

(1) **VENARD C.**, MENSAH-NYAGAN A.G. and PATTE-MENSAH C. Biochemical analysis of 3α -hydroxysteroid oxido-reductase in the spinal cord and dorsal root ganglia of neuropathic-pain rats. *International Neurex Annual Meeting*, Basel, Switzerland, March 29, 2006.

(2) **VENARD C.**, BOUJEDAINI N., BELON P., MENSAH-NYAGAN A.G. and PATTE-MENSAH C. Pharmacological modulators of the glycinergic system regulate allopregnanolone biosynthesis in the rat spinal cord. *4th International Meeting Steroids and Nervous System*, Torino, Italy, February 17-21, 2007.

(3) MEYER L., **VENARD C.**, MENSAH-NYAGAN A.G. and PATTE-MENSAH C. The enzyme 3α -hydroxysteroid oxidoreductase is a key regulator of nociceptive mechanisms in the rat spinal cord. *4th International Meeting Steroids and Nervous System*, Torino, Italy, February 17-21, 2007.

RESUME

Les neurones et les cellules gliales synthétisent des stéroïdes bioactifs ou **neurostéroïdes** qui contrôlent divers processus neurophysiologiques. Plusieurs études ont démontré que le neurostéroïde allopregnanolone ($3\alpha,5\alpha$ -THP), qui est un puissant activateur de la neurotransmission inhibitrice, module efficacement la nociception et l'anxiété en agissant par un mode paracrine et/ou autocrine. En conséquence, une hypothèse a émergé dans la littérature suggérant que les substances capables de stimuler la production de $3\alpha,5\alpha$ -THP dans le système nerveux central (SNC) seraient intéressantes pour l'élaboration de stratégies efficaces contre l'anxiété et la douleur. Toutefois, pour être thérapeutiquement efficaces, les substances candidates doivent être dénuées des effets secondaires tels que les nausées, la dépendance ou les troubles respiratoires provoqués par la majorité des antalgiques et anxiolytiques actuellement disponibles.

Depuis plusieurs années, les Laboratoires BOIRON commercialisent les préparations homéopathiques de *Gelsemium sempervirens* (*G. sempervirens*) comme des médicaments anxiolytiques et antalgiques n'induisant pas d'effets indésirables. Or, les propriétés thérapeutiques attribuées à ces médicaments homéopathiques ne s'appuient sur aucune preuve scientifique issue d'une recherche fondamentale. En particulier, il n'existe pas de données sur les effets cellulaires et les mécanismes d'action de *G. sempervirens* dans le SNC. Dans le but de clarifier cette situation ambiguë, il nous a paru indispensable d'étudier d'abord l'activité du principe actif majoritaire de *G. sempervirens*, la gelsémine, qui est une molécule bien caractérisée par les chimistes mais n'ayant fait l'objet d'aucune étude sérieuse en biologie fondamentale. Ainsi, dans un premier temps, nous avons recherché les effets de la gelsémine synthétique sur la production de $3\alpha,5\alpha$ -THP dans la moelle épinière (ME) qui joue un rôle crucial dans la nociception. Cette première partie du travail a permis de maîtriser l'ensemble des paramètres pharmacologiques, de caractériser le récepteur impliqué dans la médiation de l'effet de la gelsémine et de déterminer son mode d'action. L'analogie structurale de la gelsémine avec la strychnine, un antagoniste sélectif des récepteurs glycinergiques (Gly-Rs), nous a permis d'intégrer l'analyse de l'effet de la gelsémine sur la biosynthèse de $3\alpha,5\alpha$ -THP dans le cadre des interactions entre les modulateurs du système glycinergique et la neurostéroïdogenèse. Grâce à la combinaison des techniques de pulse-chase, d'HPLC et de détection radioactive en flux continu (Flo/One), nous avons montré que la glycine (1 à 140 μ M) et la gelsémine (10^{-10} à 10^{-6} M) stimulent de façon dose-dépendante la biosynthèse de $3\alpha,5\alpha$ -THP dans la ME. La strychnine à 10^{-5} M, qui n'induit d'elle-même aucune modification de la neurostéroïdogenèse, bloque complètement l'effet stimulateur de la glycine ou de la gelsémine, ce qui démontre l'implication des Gly-Rs dans la médiation de l'action de la glycine ou de la gelsémine sur la biosynthèse de $3\alpha,5\alpha$ -THP dans la ME.

En nous appuyant sur les conditions expérimentales établies avec la molécule de synthèse (la gelsémine), nous avons comparé les effets des dilutions homéopathiques de gelsémine et *G. sempervirens* sur la production de $3\alpha,5\alpha$ -THP dans la ME et dans le système limbique qui contrôlent respectivement la douleur et l'anxiété. Parmi les dilutions testées dans un intervalle de 5 CH (10^{-10} M en utilisant le nombre de moles de gelsémine comme référence) à 15 CH (10^{-30} M), seules les dilutions 5 CH et 9 CH de *G. sempervirens* ou de gelsémine sont efficaces pour stimuler la biosynthèse de $3\alpha,5\alpha$ -THP dans la ME et le système limbique. Le pourcentage de stimulation de la production de $3\alpha,5\alpha$ -THP induit par *G. sempervirens* est plus important que celui obtenu avec la gelsémine, suggérant l'existence d'une synergie positive entre la gelsémine et d'autres constituants de *G. sempervirens*. L'effet stimulateur de *G. sempervirens* ou de gelsémine à 5 CH est également bloqué par la strychnine, indiquant que les Gly-Rs restent impliqués dans les mécanismes d'action de ces substances même lorsque les dilutions sont réalisées par le mode homéopathique.

Dans la dernière partie de la thèse, nous avons complété les résultats des expériences *in vitro* par des analyses *in vivo* qui nous ont permis de nous assurer que des modifications de l'activité de la 3α -hydroxystéroïde oxydo-réductase ou 3α -HSOR (enzyme clef synthétisant la $3\alpha,5\alpha$ -THP) dans la ME se répercutent effectivement sur la sensibilité à la douleur. Des expériences de PCR quantitative en temps réel, de Western blot, de pulse-chase et d'HPLC-Flo/One ont révélé qu'en situation de douleur neuropathique (induite par ligature du nerf sciatique), les niveaux d'ARNm ou de protéine 3α -HSOR ne varient pas dans la ME mais l'activité enzymatique s'accélère pour entraîner une surproduction de $3\alpha,5\alpha$ -THP endogène. L'action antalgique de la $3\alpha,5\alpha$ -THP endogène a été mise en évidence par des injections intrathécales et des tests comportementaux utilisant les filaments de von Frey (sensibilité mécanique) et la méthode de Hargreaves (sensibilité thermique). La Provera (composé inhibiteur de l'activité 3α -HSOR) induit un effet pro-nociceptif et aggrave les symptômes de la douleur neuropathique alors que la $3\alpha,5\alpha$ -THP supprime ces symptômes en exerçant une action antalgique. Ces résultats, qui démontrent que l'augmentation de la concentration spinale de $3\alpha,5\alpha$ -THP *in vivo* atténue effectivement la douleur, posent les bases pour des travaux ultérieurs qui analyseront également *in vivo* le lien direct entre les probables effets antalgiques ou anxiolytiques de *G. sempervirens* et son action stimulatrice de la biosynthèse de $3\alpha,5\alpha$ -THP dans la ME et le système limbique.

Nos travaux ouvrent des perspectives intéressantes pour l'élaboration de thérapies efficaces avec la gelsémine ou *G. sempervirens* à 5 CH et 9 CH qui sont des dilutions conservant des caractéristiques pharmacologiques précises (nombre de moles, activation des Gly-Rs et stimulation de la biosynthèse de $3\alpha,5\alpha$ -THP), dénuées d'actions indésirables et susceptibles d'induire *in vivo* des effets bénéfiques.

ABSTRACT

The nervous tissue is capable of producing bioactive steroids or **neurosteroids** which control various neurophysiological processes. Several investigations have shown that neurosteroid allopregnanolone ($3\alpha,5\alpha$ -THP), a potent activator of neuroinhibition, efficiently modulates nociception and anxiety by acting through paracrine and/or autocrine modes. Therefore, has emerged in the literature, an idea suggesting that substances exhibiting a stimulatory effect on $3\alpha,5\alpha$ -THP production in the central nervous system may potentially be interesting for the development of strategies against anxiety and pain. However, to be therapeutically effective, the candidate substances must be devoid of side effects such as nausea, dependence or breathing failure induced by most of the currently available anxiolytics and analgesics.

For several years, homeopathic preparations of *Gelsemium sempervirens* (*G. sempervirens*) are advertised by the company BOIRON as anxiolytic and analgesic medicines devoid of adverse effects but, surprisingly, scientific results from basic research supporting this assertion are rare. In particular, cellular and pharmacological mechanisms of action of *G. sempervirens* are completely unknown. In our endeavor to clarify this ambiguous situation, we found important to investigate in a first step the cellular activity of gelsemine, the major active principle in *G. sempervirens* composition. Indeed, the chemical structure of the alkaloid gelsemine has been extensively studied but its cellular or biological effects remain so far unexplored. Thus, we investigated the action of gelsemine on $3\alpha,5\alpha$ -THP biosynthesis in the rat spinal cord (SC), a pivotal structure controlling nociception. This study allowed the characterization of pharmacological features of gelsemine including the receptor mediating its effect and related mechanism of action. The high structural analogy between gelsemine and another alkaloid, strychnine, a selective antagonist of glycinergic receptors (Gly-Rs), led us to investigate gelsemine effect on $3\alpha,5\alpha$ -THP production within the context of key interactions between glycinergic system and neurosteroidogenesis which determine the central inhibitory transmission. Thanks to the well-validated approach combining pulse-chase experiments, HPLC and flow scintillation detection (Flo/One), we observed that glycine (1 – 140 μ M) and gelsemine (10^{-10} – 10^{-6} M) stimulated dose-dependently $3\alpha,5\alpha$ -THP biosynthesis in the SC. Strychnine (10^{-5} M), which did not modify by itself neurosteroid formation, completely blocked the stimulatory effect induced by glycine or gelsemine, indicating that Gly-Rs are involved in the mediation of glycine and gelsemine effects on $3\alpha,5\alpha$ -THP production.

Based upon the strict experimental conditions established with the synthetic compound gelsemine, we compared the effects of homeopathic dilutions of *G. sempervirens* and gelsemine on $3\alpha,5\alpha$ -THP formation in the SC and limbic system which control pain transmission and anxiety, respectively. Gelsemine and *G. sempervirens* were tested within a dilution range from 5 to 15 CH (10^{-10} – 10^{-30} M in terms of quantity of gelsemine). Two dilutions of *G. sempervirens* or gelsemine, 5 CH and 9 CH, were able to stimulate $3\alpha,5\alpha$ -THP neosynthesis in the SC and limbic system. The stimulatory action of *G. sempervirens* was higher than that of gelsemine, suggesting a positive synergism between gelsemine and other constituents of *G. sempervirens*. Strychnine antagonized also the effect of *G. sempervirens* or gelsemine at 5 CH, indicating that Gly-Rs remain involved in their mechanisms of action independently from the homeopathic dilution mode.

To check whether changes of 3α -hydroxysteroid oxido-reductase or 3α -HSOR bioactivity (crucial for $3\alpha,5\alpha$ -THP biosynthesis) in the SC may effectively affect pain sensitivity, various analyses were performed *in vivo* to complete the data obtained *in vitro*. In rats subjected to sciatic nerve injury-evoked neuropathic pain, quantitative real time PCR, Western blot, pulse-chase and HPLC-Flo/One analyses revealed an up-regulation of 3α -HSOR activity which increased $3\alpha,5\alpha$ -THP production in the SC. Intrathecal injection of Provera (3α -HSOR inhibitor) induced a pro-nociceptive effect in naive animals and exacerbated, in neuropathic rats, pain symptoms assessed with the Hargreaves behavioral method and von Frey filament test. In contrast, enhancement of $3\alpha,5\alpha$ -THP concentration in the SC using intrathecal injection induced analgesic or anti-nociceptive effects in neuropathic or naive rats, respectively. These results constitute an important background for future investigations aiming to establish *in vivo* the direct link between *G. sempervirens* anxiolytic or analgesic effect and its stimulatory action on $3\alpha,5\alpha$ -THP formation in the SC and limbic system.

Altogether, our data open new possibilities for the development of effective therapies with gelsemine and *G. sempervirens* at 5 CH and 9 CH which are two dilutions exhibiting well-defined pharmacological features, presumably devoid of adverse effects and capable of modulating key neurophysiological functions.

ABBREVIATIONS

APA: *American Psychiatric Association*

BSA: *Bovine Serum Albumine*

CCM: *Chromatographie sur Couche Mince*

CDEX: *2-hydroxypropyl- β -cyclodextrine*

CH: *Centésimale Hahnemannienne*

CREB: *cAMP Response Element-Binding protein*

DAM/Alexa-488: *Donkey Anti-Mouse/Alexa-488*

DBD: *DNA Binding Domain*

DCM: *Dichlorométhane*

DSM: *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders*

5 α -DHDOC: *5 α -Dihydrodéoxycorticostérone (21-Hydroxy-5 α -prégnan-3,20-dione)*

DHEA: *Déhydroépiandrostérone (5-Androstèn-3 β -ol-17-one)*

DHEAS: *Sulfate de Déhydroépiandrostérone (5-Androstèn-3 β -ol-17-one-sulfate)*

5 α -DHP: *5 α -Dihydroprogestérone (5 α -Prégnan-3,20-dione)*

5 α -DHT: *5 α -Dihydrotestostérone (5 α -Androstan-17 β -ol-3-one)*

3 α DIOL: *3 α -Androstanediol (5 α -Androstan-3 α ,17 β -diol)*

DMEM: *Dulbecco's Modified Eagle Medium*

DOC: *Déoxycorticostérone (21-Hydroxy-4-prégnèn-3,20-dione)*

ERK: *Extracellular signal-Regulated Kinase*

GABA: *Gamma-Amino-Butyric Acid*

GAPDH: *Glycéraldéhyde-3-Phosphate Déshydrogénase*

GAR/Alexa-555: *Goat Anti-Rabbit/Alexa-555*

GC: *Gas Chromatography*

Gly-R: *Récepteur Glycinergique*

HPLC: *High Performance Liquid Chromatography*

HRE: *Hormon Response Element*

3 β -HSD: *3 β -Hydroxystéroïde Déshydrogénase*

17 β -HSD: *17 β -Hydroxystéroïde Déshydrogénase*

3 α -HSOR: *3 α -Hydroxystéroïde Oxydo-réductase*

H-A: *Hippocampe-Amygdale*

Hsp: *Heat shock protein*

HST: *Hydroxystéroïde Sulfotransférerase*

IASP: *International Association for the Study of Pain*

i.t.: intrathécale

JNK: *c-Jun N-terminal Kinase*

LBD: *Ligand Binding Domain*

ME: Moelle Epinière

MS: *Mass Spectrometry*

MAP-Kinase: *Mitogen-Activated Protein Kinase*

NeuN: Protéine Nucléaire Neuronale

NMDA: N-Méthyl-D-Aspartate

OMS: Organisation Mondiale de la Santé

PB: *Phosphate Buffer*

PBR: *Peripheral Benzodiazepine Receptor*

PBS: *Phosphate Buffer Saline*

P450c17: cytochrome P450c17 (ou 17 α -Hydroxylase/17,20 lyase)

P450scc: *cytochrome P450 side-chain-cleavage*

PCR: *Polymerase Chain Reaction*

PREG: Prénénolone (5-Prénén-3 β -ol-20-one)

PREGS: Sulfate de Prénénolone (5-Prénén-3 β -ol-20-one-sulfate)

PROG: Progestérone (4-Prénén-3,20-dione)

5 α -R: 5 α -Réductase

Récepteur GABA_A: Récepteur au GABA de type A

rNMDA: Récepteur au NMDA

RT: *Reverse Transcription*

rt-PCR: *real time PCR*

SEM: Standard Error of Mean

SNC: Système Nerveux Central

SP: Substance P

3 α ,5 α -THDOC: 3 α ,5 α -Tétrahydrodéoxy corticostérone (21-Hydroxy-5 α -prégnan-3 α -ol-20-one)

3 α ,5 α -THP: Allopregnanolone ou 3 α ,5 α -Tétrahydroprogestérone (5 α -Prégnan-3 α -ol-20-one)

TM: Teinture mère

VEH: Véhicule

TABLE DES ILLUSTRATIONS ET TABLEAUX

Figure 1: Voies de biosynthèse des neurostéroïdes.....	18
Figure 2: Différents domaines des récepteurs nucléaires des stéroïdes	22
Figure 3: Modèle d'activation transcriptionnelle par les récepteurs des stéroïdes.....	24
Figure 4: Induction de la douleur inflammatoire au niveau périphérique.....	28
Figure 5: Modèle de lésion par constriction du nerf sciatique (modèle de Bennett et Xie).....	30
Figure 6: Le système limbique et ses composantes.....	36
Figure 7A: Récepteur GABA _A et ses divers sites de liaison.....	41
Figure 7B: Sous-unités α , β et γ du récepteur GABA _A	41
Figure 8: Photographie de l'arbuste <i>Gelsemium sempervirens</i> ou Jasmin jaune.....	48
Figure 9: Structure chimique de la strychnine et de la gelsémine.....	54
Figure 10: Récepteur glycinergique sensible à la strychnine (Gly-R).....	57
Figure 11: Récepteur NMDA et ses divers sites de liaison pour le glutamate, le NMDA et la glycine.....	59
Figure 12: Photographie d'un nerf sciatique 10 jours après la ligature.....	65
Figure 13: Préparations des dilutions homéopathiques.....	70
Figure 14: Identification et quantification des composants de la teinture mère de <i>G. sempervirens</i>	71
Figure 15: Technique de pulse-chase.....	75
Figure 16: Mode d'action du SYBR Green I.....	78
Figure 17: Extraction des ARN totaux de la ME et des testicules.....	81
Figure 18: Transcription inverse (RT) des ARN totaux en ADNc.....	82
Figure 19: Photographie du Light Cycler permettant la réalisation de la PCR quantitative en temps réel.....	83
Figure 20: Méthode d'injection intrathécale.....	91
Figure 21: Photographie du dispositif expérimental permettant la mesure du seuil de sensibilité à la douleur thermique (test du Plantar).....	93
Figure 22: Photographie du dispositif expérimental permettant la mesure du seuil de sensibilité à la douleur mécanique (test des filaments de von Frey).....	94

Figure 23: Schéma hypothétique du mode d'action de la glycine, de la gelsémine et de <i>G. sempervirens</i> dans le contrôle de la douleur et de l'anxiété	180
Tableau 1: Equivalence entre la nomenclature de la dilution homéopathique et la valeur (au centième) de sa concentration.....	45
Tableau 2: Tableau récapitulatif des produits nécessaires à la transcription inverse....	80
Tableau 3: Tableau récapitulatif des produits nécessaires à une réaction de PCR quantitative en temps réel.....	84

INTRODUCTION

I. Neurostéroïdes et Stéroïdes neuroactifs

I.1. Présentation du concept des neurostéroïdes

I.1.1. Définition

Le terme **neurostéroïde** désigne les stéroïdes synthétisés *de novo* dans le système nerveux et y persistant après ablation des glandes stéroïdogènes telles que les surrénales, les ovaires et les testicules (Baulieu *et al.*, 1999; Mensah-Nyagan *et al.*, 1999). Sont appelés **stéroïdes neuroactifs**, tous les stéroïdes exerçant un effet sur les cellules nerveuses qu'ils soient produits directement dans le système nerveux (neurostéroïdes) ou par les glandes endocrines ou qu'ils soient des stéroïdes synthétiques ayant la capacité de franchir la barrière hémato-encéphalique après leur administration. Il est important que les critères suivants soient respectés avant qu'un stéroïde ne soit considéré comme un neurostéroïde.

- (1) Le lieu de synthèse du stéroïde doit être le système nerveux (central ou périphérique).
- (2) Le stéroïde doit être synthétisé par des cellules gliales et/ou des neurones.
- (3) Des concentrations substantielles du stéroïde doivent persister dans le système nerveux après ablation des glandes stéroïdogènes périphériques.
- (4) Les sites d'action sont membranaires et/ou nucléaires.
- (5) Le mode d'action est autocrine et/ou paracrine.

I.1.2. Biosynthèse des neurostéroïdes

A la suite de Baulieu et collaborateurs (Corpechot *et al.*, 1981, 1983) qui ont suggéré le concept de neurostéroïde, de nombreuses études ayant démontré la présence de plusieurs enzymes stéroïdogéniques dans le tissu nerveux ont confirmé définitivement la production de stéroïdes dans les cellules nerveuses à partir de précurseurs lointains tels que le cholestérol et la prégnénolone (PREG) (Baulieu *et al.*, 1999; Mensah-Nyagan *et al.*, 1999; Compagnone et Mellon, 2000; Mellon *et al.*, 2001; Mellon et Griffin, 2002). Ainsi, les voies de la neurostéroïdogenèse ont été identifiées grâce à la localisation, dans le système nerveux, d'un certain nombre d'enzymes de synthèse des stéroïdes telles que le cytochrome P450 side-chain-cleavage (P450scc), la 17 α -hydroxylase/17,20 lyase ou cytochrome P450c17 (P450c17), la 3 β -hydroxystéroïde déshydrogénase (3 β -HSD), la 17 β -hydroxystéroïde déshydrogénase (17 β -HSD), la 5 α -réductase (5 α -R), la 3 α -hydroxystéroïde oxydo-réductase (3 α -HSOR), l'aromatase et l'hydroxystéroïde sulfotransférase ou HST (Mensah-Nyagan *et al.*, 1999, 2001a,b; Patte-Mensah *et al.*, 2006) (Figure 1).

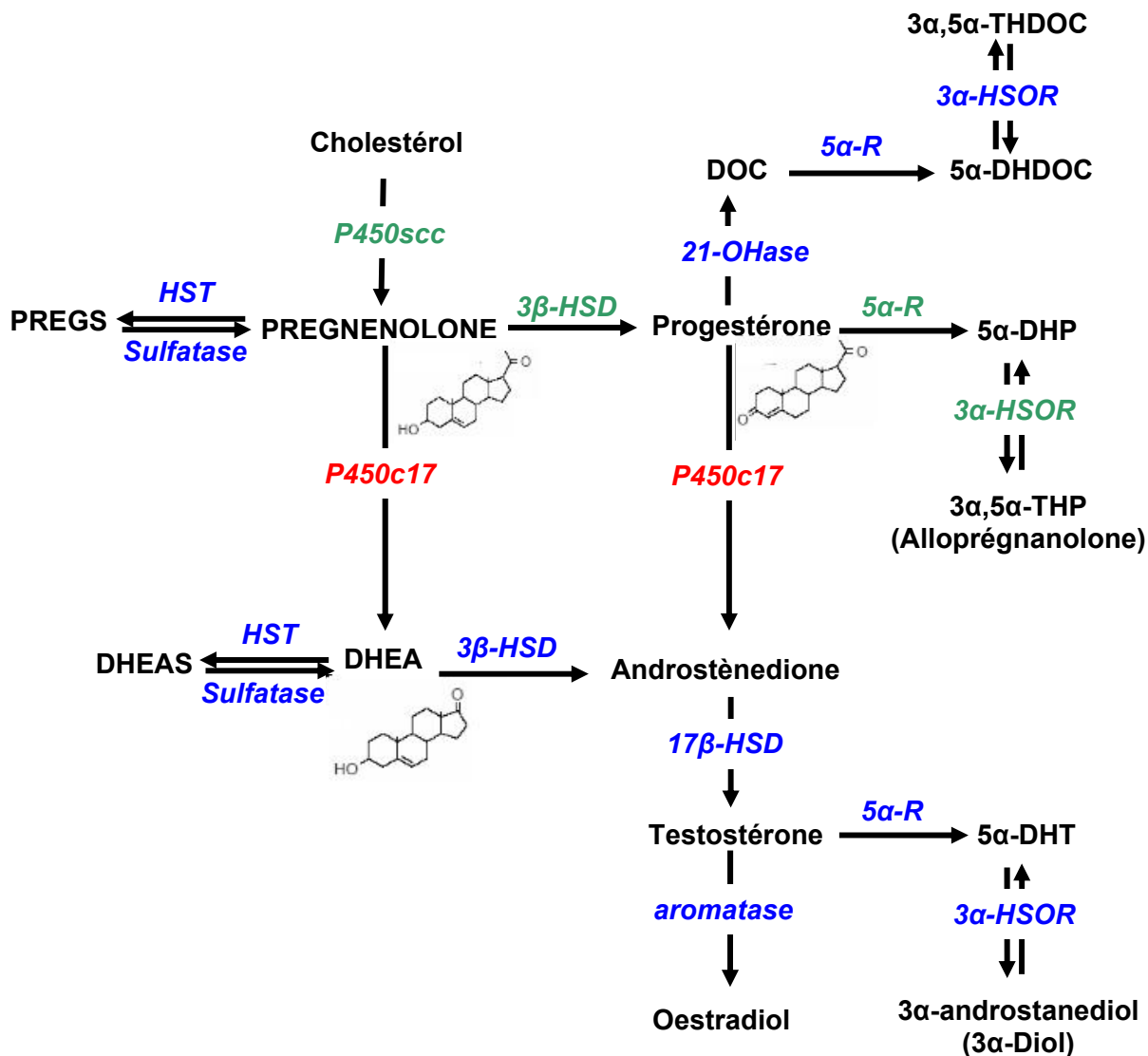


Figure 1: Voies de biosynthèse des neurostéroïdes.

P450scc: cytochrome P450 side-chain-cleavage; *P450c17*: cytochrome P450c17 ou 17 α -hydroxylase/17,20 lyase; *3 β -HSD*: 3 β -hydroxystéroïde déshydrogénase; *17 β -HSD*: 17 β -hydroxystéroïde déshydrogénase; *3 α -HSOR*: 3 α -hydroxystéroïde oxydo-réductase; *21-OHase*: 21-hydroxylase; *5 α -R*: 5 α -réductase; *HST*: sulfotransférase.

5 α -DHDOC: 5 α -dihydrodéoxycorticostérone; *DHEA*: déhydroépiandrostérone; *DHEAS*: déhydroépiandrostérone sulfate; *5 α -DHP*: 5 α -dihydroprogéstérone; *5 α -DHT*: 5 α -dihydrotestostérone; *DOC*: déoxycorticostérone; *PREGS*: prégnénolone sulfate; *3 α ,5 α -THDOC*: 3 α ,5 α -tétrahydrodéoxycorticostérone; *3 α ,5 α -THP*: 3 α ,5 α -tétrahydroprogéstérone ou alloprégnanolone.

I.1.3. Régulation de la biosynthèse des neurostéroïdes

I.1.3.1. Régulation de la biosynthèse des neurostéroïdes par les neurotransmetteurs et/ou les neuropeptides

Le concept des neurostéroïdes est clairement établi mais la régulation de la biosynthèse des neurostéroïdes reste encore peu connue. Certains travaux suggèrent que l'acide gamma-aminobutyrique (GABA), en agissant par l'intermédiaire du récepteur GABA de type A (GABA_A), modulerait la biosynthèse des neurostéroïdes (pour revue, Mensah-Nyagan *et al.*, 2001b). Par exemple, il a été montré que le GABA inhibe la conversion de prégnénolone tritiée, [³H]PREG, en métabolites radioactifs dans des tranches d'hypothalamus de grenouille (Do-Rego *et al.*, 2000). La déplétion *in vivo* de la neurotransmission GABAergique suite au blocage de la synthèse du GABA provoque une augmentation de la concentration de PREG, de progestérone (PROG) et de 3 α ,5 α -tétrahydrodéoxycorticostérone (3 α ,5 α -THDOC) dans le cerveau de rat (Barbaccia *et al.*, 1996). En revanche, dans les cellules ganglionnaires de rétine de rat, le GABA stimule la formation de PREG à partir du mévalonolactone (Guarneri *et al.*, 1995; Mensah-Nyagan *et al.*, 2001b). L'ensemble de ces observations suggère que le contrôle exercé par le GABA sur la biosynthèse des neurostéroïdes dépend probablement du type cellulaire dans lequel se déroule la neurostéroïdogénèse. Outre le GABA, il a été montré que l'isoprotérénol, un agoniste β_1 - et β_2 -adrénergique, ainsi que la sérotonine, stimulent la biosynthèse des neurostéroïdes 5 α -réduits dans les cellules C6 de gliome de rat (Morita *et al.*, 2006).

Enfin, diverses données suggèrent que les endozépines (ligands endogènes des récepteurs aux benzodiazépines) telles que le triakontatétraneuropeptide et

l'octadécaneuropeptide favorisent la production de neurostéroïdes à partir de PREG ou de cholestérol (Papadopoulos *et al.*, 1991; Do-Rego *et al.*, 2001; Mensah-Nyagan *et al.*, 2001b).

L'ensemble des données évoquées ci-dessus indique que la biosynthèse des neurostéroïdes serait modulée par divers neurotransmetteurs et/ou neuropeptides mais les modalités précises, de même que les mécanismes impliqués dans cette régulation, restent encore à clarifier. En attendant cette clarification, quelques hypothèses ou mécanismes de régulation envisageables sont discutés ci-dessous.

I.1.3.2. Mécanismes impliqués dans la régulation de la biosynthèse des neurostéroïdes

Sur la base des connaissances relatives à la biosynthèse des stéroïdes dans les glandes endocrines classiques, il paraît logique de penser que le contrôle de la neurostéroïdogénèse pourrait impliquer la régulation de l'activité et/ou l'expression des enzymes stéroïdogéniques dans les cellules nerveuses. Les enzymes nécessaires à la stéroïdogénèse telles que le P450_{scc}, la 3 β -HSD, la 11 β -HSD, la 17 β -HSD, la 5 α -R, la 3 α -HSOR et l'aromatase (Figure 1) utilisent les cofacteurs nicotinamides pour catalyser les réactions (NADPH/NADP⁺ et NADH/NAD⁺) (pour revues, Mensah-Nyagan *et al.*, 1999; Agarwal et Auchus, 2005). Ainsi, des mutations dans le site de liaison d'un cofacteur dans le système nerveux pourraient se traduire par une diminution ou une perte de l'affinité de l'enzyme pour le cofacteur, ce qui peut conduire à une réversibilité de la réaction et déplacer l'équilibre de la biosynthèse des neurostéroïdes. Des altérations similaires pourraient se produire après changement de l'état réduit-oxydé intracellulaire, c'est-à-dire lorsque le rapport NADPH/NADP⁺ est inversé (Sherbet *et al.*, 2007). Divers facteurs environnementaux tels que le pH ou les variations du milieu extra- ou intracellulaire en électrolytes peuvent également provoquer des modifications

de l'activité des enzymes et réguler la neurostéroïdogénèse. A l'appui de cette hypothèse, il est bien démontré que les activités biologiques de plusieurs enzymes clefs de la stéroïdogénèse telles que le P450scc, le P450c17, la 3 β -HSD, la 5 α -R et la 3 α -HSOR ne sont optimales que dans des intervalles de pH très limités (Smithgall et Penning, 1988; Russell et Wilson, 1994; Mensah-Nyagan *et al.*, 1999).

Plusieurs facteurs de transcription sont impliqués dans l'expression des gènes codant les enzymes de la stéroïdogénèse. La nature de ces facteurs ainsi que leur activité dépendent souvent de l'enzyme et/ou des tissus concernés. Par exemple, la transcription du gène du P450scc nécessite le *Steroidogenic Factor-1* (SF-1) dans les tissus périphériques (gonades et surrénales) alors que dans le système nerveux, ce sont les *Selective promotor factors* (Sp) tels que Sp1, Sp2 ou Sp4 qui interviennent (Hammer *et al.*, 2004). Les facteurs SF1 et Sp sont aussi présents dans les régions promotrices du P450c17, de la 3 β -HSD humaine de type 2, de l'aromatase et de la 5 α -R (Val *et al.*, 2003; Blanchard *et al.*, 2007). Par ailleurs, le gène du P450c17 possède également des sites de liaison pour les facteurs de transcription COUP-TF II (Chicken Ovalbumin Upstream Promoter-Transcription Factor II), NGF-IB (Nerve Growth Factor-Inducible protein B) et pour une phosphoprotéine nucléaire SET (Zhang *et al.*, 2001). Le gène de la 3 α -HSOR comporte des sites pour les éléments de réponse osmotique, pour les anti-oxydants et les *Activated Protein-1* ou AP-1 (Penning et Drury, 2007).

L'ensemble des données décrites ci-dessus révèle que plusieurs facteurs sont potentiellement capables d'intervenir dans la régulation de la neurostéroïdogénèse. L'identification de l'ordre chronologique dans l'intervention de ces facteurs ou la détermination de leur sélectivité d'action au sein des cellules stéroïdogéniques sera sans doute nécessaire pour élucider les mécanismes régulateurs de la biosynthèse des neurostéroïdes.

I.1.4. Mécanismes d'action des neurostéroïdes/stéroïdes neuroactifs

I.1.4.1. Action génomique

Les stéroïdes neuroactifs y compris les neurostéroïdes exercent leurs effets dans le système nerveux via des récepteurs nucléaires qui sont les récepteurs aux glucocorticoïdes (GR), aux minéralocorticoïdes (MR), aux androgènes (AR), aux œstrogènes (ER) et aux progestines (PR). Cette voie de signalisation intracellulaire est dite génomique car elle implique l'action des stéroïdes neuroactifs sur le génome en particulier sur la régulation de la transcription de gènes.

Les récepteurs nucléaires sont des protéines composées d'un domaine de liaison au stéroïde (*ligand binding domain* ou LBD), d'un domaine de fixation à l'ADN (*DNA binding domain* ou DBD) et de plusieurs autres domaines impliqués dans l'activation de la transcription tels que l'*activation function 1 and 2* ou AF1/2 (Beato et Klug, 2000; Aranda et Pascual, 2001) (Figure 2).

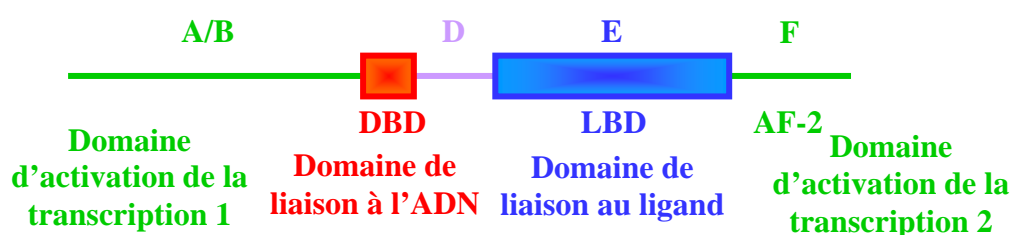


Figure 2: Différents domaines des récepteurs nucléaires des stéroïdes (Beato et Klug, 2000).

Le DBD comprend deux régions configurées en doigt de zinc, l'une (D box) permet la dimérisation des récepteurs et la seconde permet au récepteur de se lier spécifiquement à une

séquence consensus d'ADN du gène cible appelée HRE (*hormone response element*) ou élément de réponse aux hormones (Truss *et al.*, 1990, 1991). Le récepteur non lié à son ligand est associé à un large complexe multiprotéique composé de protéines chaperonnes telles que les protéines de choc thermique ou *Heat Shock Protein* (Hsp) (Beato *et al.*, 1996; Beato et Klug, 2000). La liaison du stéroïde au récepteur induit un changement dans sa conformation qui entraîne la dissociation des protéines Hsp du récepteur. Les récepteurs dimérisés et associés à leur ligand forment avec les facteurs de transcription généraux (*General Transcription Factors* ou GTF) et/ou avec des co-activateurs appelés aussi facteurs de transcription intermédiaires (*Transcription Intermediary Factors* ou TIF), un complexe d'initiation de la transcription au niveau du site de départ de la transcription (*Initial Transcription site* ou IT) situé sur le promoteur du gène cible (Beato et Klug, 2000; Aranda et Pascual, 2001). Actuellement, de nombreux co-activateurs ont été identifiés tels que les représentants de la famille p160 contenant SRC1 (*Steroid Receptor Co-activator-1*), SRC2 (GRIP1) et SRC3 qui interagissent avec le domaine AF2 des PR, GR et ER α (Onate *et al.*, 1995; Beato et Klug, 2000). Les co-activateurs p160/SRC recrutent des co-activateurs secondaires comme le CBP (*cAMP Response Element Binding Protein*) ou son homologue p300 (Tetel, 2000) ou encore *CBP-Associated Factor* (PCAF) (Blanco *et al.*, 1998) (Figure 3). Tous ces co-activateurs ont une activité Histone Acétyl Transférase (HAT) qui permet le remodelage de la chromatine et l'accès de la machinerie transcriptionnelle (RNA polymérase II et GTF) à l'ADN (Bannister et Kouzarides, 1996; Ogryzko *et al.*, 1996; Spencer *et al.*, 1997; Aranda et Pascual, 2001).

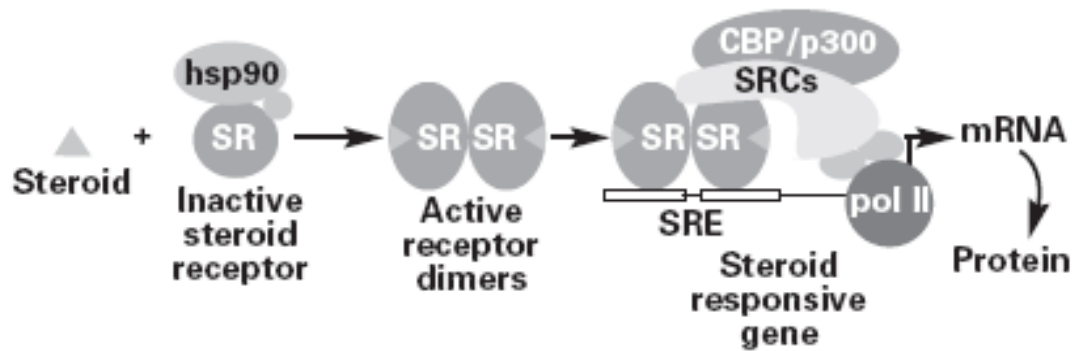


Figure 3: Modèle d'activation transcriptionnelle par les récepteurs des stéroïdes.

SR: récepteur des stéroïdes; hsp90: heat shock protein 90; SRE: Steroid Response Element; SRCs: famille des Steroid Receptor Co-activator p160s; CBP/p300: CREB-Binding Protein/p300; Pol II: RNA polymérase II.

Tetel, 2000.

Ce modèle général d'activation de la transcription par les récepteurs des stéroïdes peut présenter des variations. Dans une lignée de cellules de Schwann, il a été montré que les co-activateurs du récepteur des glucocorticoïdes sont SRC1 et la β -caténine qui module aussi l'activité transcriptionnelle des AR et ER (Kouzmenko *et al.*, 2004). Le p300 ne joue pas le rôle de co-activateur mais de co-répresseur des récepteurs des glucocorticoïdes dans le modèle présenté (Fonte *et al.*, 2005).

I.1.4.2. Action non génomique

Dès 1942, les résultats obtenus par Selye ont montré que l'injection intrapéritonéale de PROG induisait, après quelques minutes, un effet anesthésique rapide. Klein et Henk (1963) ont également montré que l'administration d'aldostérone provoque en 5 minutes des effets cardiovasculaires. Ce court délai d'action des stéroïdes neuroactifs n'est pas compatible avec un mécanisme génomique mais suggère plutôt un effet membranaire. Depuis, de nombreuses études ont démontré que les stéroïdes neuroactifs et neurostéroïdes contrôlent l'activité des cellules nerveuses par l'intermédiaire de récepteurs membranaires tels que le récepteur

GABA_A (Majewska, 1992; Belelli et Lambert, 2005), N-Méthyl-D-Aspartate ou rNMDA (Mellon et Griffin, 2002), sigma (Monnet *et al.*, 1995, 2006; Bergeron *et al.*, 1996; Debonnel *et al.*, 1996; Maurice *et al.*, 2006) et P2X (De Roo *et al.*, 2003). Par ailleurs, le clonage récent d'un récepteur membranaire des progestatifs chez diverses espèces de vertébrés y compris l'Homme suggère que les neurostéroïdes pourraient également agir via des récepteurs propres des stéroïdes couplés aux protéines G (Thomas *et al.*, 2002; Zhu *et al.*, 2003a,b). Des travaux récents ont révélé que la DHEA se fixe sur un site membranaire de liaison spécifique couplé à une protéine G dans les cellules dérivant de la crête neurale et dans les cellules endothéliales aortiques d'origine bovine (Liu et Dillon, 2002, 2004; Charalampopoulos *et al.*, 2006). L'existence d'un récepteur membranaire des œstrogènes a été suggéré par l'utilisation d'anticorps dirigés contre le récepteur nucléaire aux œstrogènes ER α qui a révélé un immunomarquage de protéines membranaires dans des cellules hypophysaires (Pappas *et al.*, 1995). De plus, l'analyse du récepteur membranaire des œstrogènes dans des cellules septales et hippocampiques a révélé que ce récepteur présente une importante homologie de structure avec le récepteur nucléaire ER α (Marin *et al.*, 2006). Les ER membranaires sont impliqués dans la régulation des canaux ioniques et de la voie MAP-Kinase (*Mitogen-Activated Protein Kinase* ou MAPK) (Nakajima *et al.*, 1995; Simoncini *et al.*, 2000, 2004; Guerra *et al.*, 2004).

L'ensemble de ces données démontre l'existence d'un mode d'action membranaire des neurostéroïdes.

II. Neurostéroïdes et douleur

II.1. Définition de la douleur

L'Association Internationale pour l'Etude de la Douleur ou *International Association for the Study of Pain* (IASP) définit la douleur comme «**une expérience sensorielle et émotionnelle désagréable associée ou non à des lésions réelles et potentielles, ou décrites en des termes évoquant de telles lésions**» (IASP, 1994).

La **nociception** est l'ensemble des mécanismes permettant la détection de tout stimulus susceptible d'endommager l'intégrité de l'organisme. La nociception diffère donc de la **douleur**. En effet, la douleur est une interprétation consciente d'un stimulus nociceptif alors que la nociception se limite à la détection et à la transmission du stimulus nociceptif jusqu'au cortex.

D'un point de vue purement **physiologique**, la douleur constitue un signal d'alarme pour l'organisme lorsqu'un stimulus est susceptible d'endommager son intégrité. La douleur représente un processus adaptatif qui permet à l'organisme d'anticiper face à une situation néfaste. Citons l'exemple du contact de la main avec une plaque chauffante: la douleur vive ressentie suite à la brûlure est un signal d'alarme traduisant la dangerosité de la plaque chauffante. Ainsi, lorsque la situation se présente à nouveau, l'empreinte mnésique laissée par cette douleur surgit comme un avertissement qui permettra d'éviter de remettre la main sur la plaque chauffante. L'abolition de la douleur physiologique n'est donc pas bénéfique pour l'organisme. Ainsi, les personnes souffrant d'analgésie congénitale constituent un exemple flagrant du rôle indispensable de la douleur physiologique pour la survie de l'individu. En effet, ces personnes meurent généralement jeunes car l'absence de perception de la douleur ne leur permet pas d'éviter des lésions tissulaires graves.

La fonction protectrice de la douleur devient moins évidente au stade de la **douleur chronique**. Selon l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS), une douleur devient chronique lorsqu'elle dure plus de 6 mois (Vanhalwyn et Cerexhe, 2003). Contrairement à la douleur physiologique, la douleur pathologique perd sa fonction de protection, elle n'a plus aucun objectif biologique; elle devient même néfaste, destructrice et invalidante pour le patient. La douleur chronique est considérée comme une pathologie à part entière souvent associée à des manifestations dépressives (Nicholson et Verma, 2004; Gureje, 2007, 2008).

Parmi les douleurs chroniques, on distingue la douleur **inflammatoire** qui se manifeste par une sensibilisation périphérique ou centrale (potentialisation, désinhibition, plasticité des connexions neuronales...) et les douleurs **neuropathiques** (Julius et Basbaum, 2001; Scholz et Woolf, 2002).

La douleur inflammatoire est provoquée par l'inflammation qui est une réaction de défense immunitaire du corps suite à une agression consistant en une blessure, une infection, une brûlure, une allergie ou un traumatisme. Ce phénomène physiologique se manifeste par quatre signes principaux: rougeur (érythème), chaleur, gonflement (œdème), douleur traduisant la vasodilatation et la perméabilisation des vaisseaux sanguins locaux. Le processus inflammatoire fait intervenir un grand nombre de médiateurs chimiques comme les prostaglandines, l'histamine, les cytokines qui sont libérés par les cellules immunitaires.

Au niveau périphérique, des médiateurs de l'inflammation ou substances algogènes libérés par le tissu lésé (K^+ , H^+ , ATP...), par des cellules immunitaires (bradykinine, prostaglandines, leucotriène...) et par les nocicepteurs eux-mêmes (substance P, *Calcitonine Gene Related Peptide* ou CGRP, glutamate...) facilitent l'activation des nocicepteurs au niveau du site inflammatoire. Au niveau central, le phénomène de sensibilisation semble beaucoup impliquer le rNMDA (Figure 4).

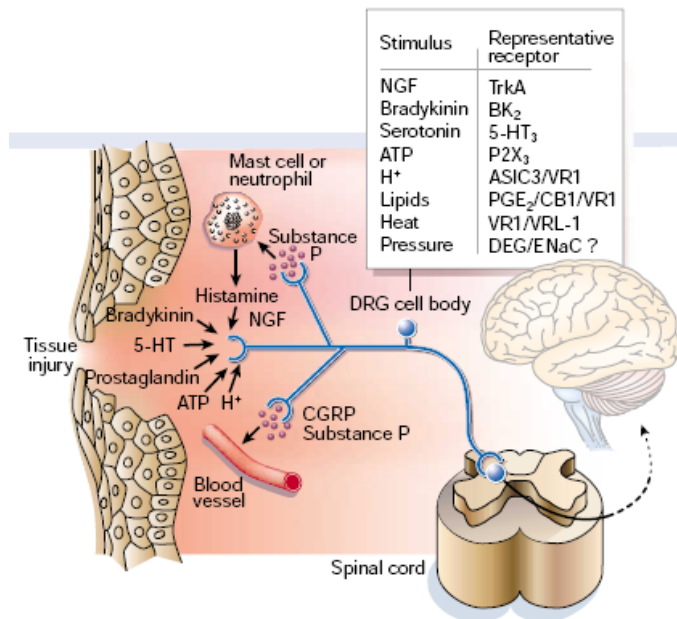


Figure 4: Induction de la douleur inflammatoire au niveau périphérique.

Suite à une lésion tissulaire, les nocicepteurs sont activés par les médiateurs de l'inflammation libérés par les cellules immunitaires comme les mastocytes (prostaglandines, histamine, bradykinine), les cellules lésées (H⁺) ou les nocicepteurs eux-mêmes (substance P).

Julius et Basbaum, 2001.

Anciennement appelées (de manière inappropriée) douleurs par désafférentation, les douleurs neuropathiques sont consécutives à une atteinte (lésion ou section) ou à une perturbation de l'équilibre fonctionnel des systèmes nerveux central et périphérique. Elles surviennent en l'absence de stimulations nocives et sont caractérisées par diverses sensations douloureuses qui sont spontanées ou provoquées:

(1) les **douleurs spontanées continues**, décrites le plus souvent comme des brûlures, sont parfois associées à des douleurs paroxystiques, perçues comme des décharges électriques ou des éclairs douloureux brefs.

(2) Les **douleurs provoquées** correspondent aux phénomènes d'**allodynie** (douleur induite par un stimulus normalement non nocif) et d'**hyperalgie** (exagération de la réponse douloureuse à un stimulus nociceptif) pouvant être déclenchés par des stimulations mécaniques et thermiques chaudes ou froides. La douleur peut irradier et se prolonger au-delà de la durée du stimulus.

Les mécanismes périphériques et centraux à l'origine des douleurs neuropathiques sont caractérisés par leur complexité. Certains travaux ont montré que des lésions du système nerveux périphérique peuvent secondairement entraîner d'importantes modifications au niveau central, particulièrement dans la corne dorsale de la moelle épinière (Bouhassira, 1994; Woolf et Mannion, 1999). Sur la base d'études réalisées chez l'animal, quatre grands types de mécanismes périphériques ont été mis en évidence: (1) l'apparition de décharges anormales (activités ectopiques) dans les fibres lésées, (2) la sensibilisation des nocicepteurs, (3) les phénomènes d'interactions pathologiques entre fibres nerveuses et (4) les phénomènes dépendant du système sympathique (Woolf et Mannion, 1999; Grelik *et al.*, 2005). Les mécanismes périphériques peuvent expliquer à eux seuls certaines caractéristiques cliniques des douleurs neuropathiques mais d'autres arguments expérimentaux impliquent une altération de mécanismes centraux. Trois grands types de mécanismes physiopathologiques, ayant lieu dans la corne dorsale de la moelle épinière, peuvent participer à la genèse de la douleur neuropathique: (1) la sensibilisation centrale (ou hyperexcitabilité) des neurones nociceptifs impliquant le rNMDA, (2) la modification des systèmes de modulation de la transmission du message nociceptif et (3) les phénomènes de plasticité responsables d'une activation pathologique des neurones (Woolf et Mannion, 1999; Bouhassira, 2000; Woolf et Salter, 2000; Woolf, 2004).

Les douleurs neuropathiques constituent un sérieux problème en médecine car elles sont difficiles à traiter. Elles sont dénommées **douleurs rebelles** compte tenu de leur insensibilité aux principaux médicaments analgésiques disponibles actuellement tels que l'acide acétylsalicylique (aspirine), le paracétamol, l'indométhacine, les opiacés (dérivés morphiniques), les benzodiazépines et les anti-inflammatoires non stéroïdiens (Arner et Meyerson, 1988; Cherny *et al.*, 1994; Benedetti *et al.*, 1998). C'est pour résoudre cette question difficile que plusieurs modèles animaux de neuropathie sont proposés de façon à

obtenir des données fondamentales utiles au développement de nouvelles stratégies thérapeutiques.

Plusieurs modèles de lésion physique/mécanique de nerf ont été développés parmi lesquels celui mis au point par Bennett et Xie (1988) qui consiste à faire quatre ligatures lâches autour du nerf sciatique (Figure 5). Ce modèle a l'avantage de produire une hyperalgie et une allodynie provoquées par des stimuli thermique (chaud et froid respectivement) et mécanique. Ces caractéristiques symptomatologiques importantes et pernicieuses de la douleur neuropathique se développent à partir du deuxième jour post-opératoire et sont observées chez tous les animaux après ligature du nerf sciatique. De plus, la présence d'une douleur spontanée au niveau du site de lésion est suggérée par l'observation d'une perte d'appétit et des comportements nociceptifs spontanés (léchage, soulèvement soudain de la patte).

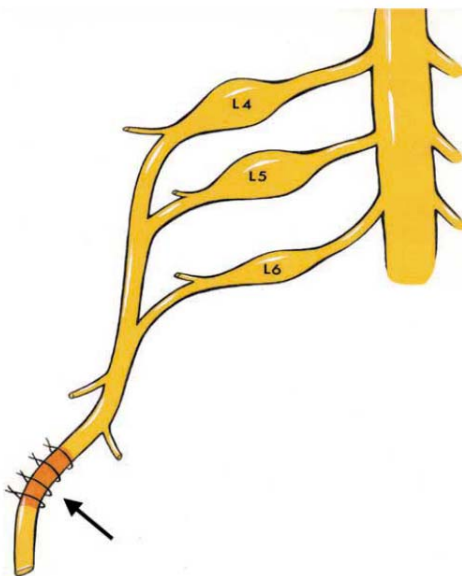


Figure 5: Modèle de lésion par constriction du nerf sciatique (modèle de Bennett et Xie).

Ce modèle d'induction de douleur par mononeuropathie périphérique consiste à réaliser quatre ligatures lâches autour du nerf sciatique (schéma, Hogan, 2002).

En dehors du modèle de Bennett et Xie (1988), d'autres modèles de lésion partielle du nerf sciatique ont été développés. Seltzer et ses collaborateurs ont réalisé une ligature serrée de 1/3-1/2 de l'épaisseur du nerf sciatique conduisant à l'apparition d'une allodynie mécanique et d'une hyperalgie thermique et mécanique qui durent pendant plusieurs mois

après l'opération (Seltzer *et al.*, 1990; Hogan, 2002). La ligature serrée des nerfs spinaux L5 et L6 du côté distal par rapport aux ganglions spinaux produit également une allodynie et une hyperalgie (Kim et Chung, 1992). Enfin, les symptômes de mononeuropathie peuvent également être modélisés par la pose d'un manchon de polyéthylène autour du nerf sciatique (Mosconi et Kruger, 1996) ou la ligature serrée de 2 ou 3 branches issues du nerf sciatique (nerfs tibial et péronéal commun) (Decosterd et Woolf, 2000).

Tous ces modèles de mononeuropathie induite par la lésion physique/mécanique ont servi dans de nombreuses études qui ont contribué à la compréhension de quelques-uns des symptômes caractérisant les douleurs neuropathiques chez l'humain mais l'ensemble des mécanismes impliqués reste encore très peu élucidé.

II.2. Implication des neurostéroïdes dans le contrôle de la douleur

II.2.1. Mise en évidence de la présence et de l'activité des enzymes de la neurostéroïdogénèse dans les centres nerveux nociceptifs

Les neurostéroïdes endogènes contrôlent l'activité du système nerveux par un mode autocrine ou paracrine. Ainsi, l'implication du processus de neurostéroïdogénèse dans la régulation des mécanismes nociceptifs *in vivo* ne peut être prouvée que si la biosynthèse des neurostéroïdes est mise en évidence dans les centres nerveux ou dans les réseaux neuronaux contrôlant la nociception et la douleur. Des travaux récents de notre équipe ont démontré la présence et l'activité des enzymes de synthèse des neurostéroïdes telles que le P450_{scc}, le P450_{c17}, la 5 α -réductase (5 α -R) et la 3 α -hydroxystéroïde oxydo-réductase ou 3 α -HSOR dans le système nociceptif de rat (Patte-Mensah *et al.*, 2003, 2004b; Kibaly *et al.*, 2005). Une forte immunoréactivité de type P450_{scc} a été détectée dans les couches superficielles I et II de

la corne dorsale de la moelle épinière, une structure jouant un rôle crucial dans la transmission des messages nociceptifs et dans la modulation de la douleur (Haines *et al.*, 1997; Millan, 1999, 2002). Des expériences de pulse-chase combinées à l'analyse par chromatographie liquide haute performance (HPLC) et à la détection en flux continu (Flo/One) ont permis de montrer que l'immunoréactivité P450scc présente dans les tissus spinaux et dans le tronc cérébral correspond à une forme active de l'enzyme (Patte-Mensah *et al.*, 2003). Les travaux de Kibaly *et al.* (2005) ayant localisé une forme biologiquement active du P450c17 dans la moelle épinière de rat adulte ont suggéré que la DHEA synthétisée dans le circuit spinal peut intervenir directement dans la régulation de l'activité des neurones nociceptifs. La 5 α -réductase de type 1 (5 α -R1) et de type 2 (5 α -R2) ainsi que la 3 α -HSOR ont également été localisées dans la moelle épinière de rat. Les études d'immunomarquage ont révélé une expression prépondérante de la 5 α -R2 par rapport à l'isoforme 5 α -R1 (Patte-Mensah *et al.*, 2004b) contrairement à ce qui est observé dans l'encéphale (Celotti *et al.*, 1992; Pelletier *et al.*, 1994; Poletti *et al.*, 1998a,b). Enfin, la 3 α -HSOR est fortement exprimée dans toutes les régions de la moelle épinière (Patte-Mensah *et al.*, 2004b).

La démonstration de l'existence de la neurostéroïdogenèse dans le système nociceptif est importante car elle prouve que les neurostéroïdes, qui agissent préférentiellement par un mécanisme autocrine ou paracrine, pourraient effectivement être impliqués dans le contrôle des messages nociceptifs conduisant à l'élaboration des sensations douloureuses.

II.2.2. Relations anatomo-fonctionnelles

La substance P (SP) est l'un des neuropeptides majeurs libérés par les terminaisons des afférences primaires dans les couches superficielles de la moelle épinière au cours d'une situation douloureuse (De Koninck et Henry, 1991; Mantyh *et al.*, 1997; Nichols *et al.*, 1999;

Zubrzycka et Janecka, 2000; Willis, 2001; Mantyh, 2002; Todd *et al.*, 2002). Grâce à une approche de triple immunomarquage combinée à une analyse par microscopie confocale Patte-Mensah *et al.* (2005) ont montré que les afférences primaires libérant la SP projettent sur les neurones de la corne dorsale de la moelle épinière de rat exprimant simultanément les récepteurs à la neurokinine 1 (rNK1) et les enzymes clefs (5 α -R et 3 α -HSOR) convertissant la progestérone en métabolites neuroactifs. Un puissant effet inhibiteur de la SP sur la biosynthèse de 5 α -dihydroprogestérone (5 α -DHP) et d'allopregnanolone ou 3 α ,5 α -tétrahydroprogestérone (3 α ,5 α -THP) a été mis en évidence en associant des expériences de pulse-chase, d'HPLC et de Flo/One. L'effet inhibiteur de la SP sur la conversion de la progestérone en 5 α -DHP et 3 α ,5 α -THP est mimé par le [Sar⁹, Met(O₂)¹¹]-SP (agoniste rNK1) et bloqué par le SR140333 (antagoniste sélectif rNK1) (Patte-Mensah *et al.*, 2005). L'ensemble de ces données suggère l'existence d'interactions fonctionnelles entre les composantes de la neurostéroïdogénèse et les mécanismes nociceptifs spinaux.

II.2.3. Modification de la neurostéroïdogénèse en situation de douleur et action des neurostéroïdes endogènes sur la sensibilité à la douleur

Divers travaux de notre équipe ont montré l'implication des neurostéroïdes endogènes dans la régulation des processus nociceptifs chez des animaux mis en situation de douleur inflammatoire ou neuropathique (pour revue, Mensah-Nyagan *et al.*, 2008). Dans le cas de la douleur inflammatoire induite par injection de carragénine dans la voûte plantaire de rat, la production de stéroïdes 5 α - et 3 α ,5 α -réduits (5 α -dihydrodéoxycorticostérone (5 α -DHDOC), 5 α -DHP, 3 α ,5 α -tétrahydrodéoxycorticostérone (3 α ,5 α -THDOC) et 3 α ,5 α -THP) est fortement stimulée dans la moelle épinière (Poisbeau *et al.*, 2005). La synthèse des neurostéroïdes endogènes est aussi modulée dans les structures nociceptives au cours de la

douleur neuropathique induite par constriction du nerf sciatique. L'expression du gène codant le P450scc de même que son activité biologique sont augmentées dans la corne dorsale de la moelle épinière de rat développant les symptômes d'une douleur chronique provoquée par ligature lâche du nerf sciatique (Patte-Mensah *et al.*, 2004a, 2006; Patte-Mensah et Mensah-Nyagan, 2008). La distribution cellulaire de la protéine P450scc est également modifiée au sein des réseaux neuronaux de la moelle épinière au cours du développement de la douleur neuropathique, ce qui suggère que le P450scc pourrait être impliqué dans le contrôle de la plasticité structurale observée dans le système nerveux central (SNC) lors des situations de douleurs chroniques (Woolf et Salter, 2000; Patte-Mensah *et al.*, 2004a). A l'inverse du P450scc, l'expression et l'activité du P450c17 sont réprimées dans la moelle épinière au cours des douleurs neuropathiques. L'administration aiguë de DHEA (neurostéroïde synthétisé par le P450c17) induit un effet pro-nociceptif rapide suivi d'un effet analgésique tardif. L'inhibition de la synthèse de DHEA dans la moelle épinière par injection intrathécale de kétoconazole (inhibiteur pharmacologique du P450c17) supprime l'effet pro-nociceptif rapide et génère une analgésie chez les animaux neuropathiques (Kibaly *et al.*, 2008). Les résultats obtenus sur le P450c17 et la DHEA suggèrent que la DHEA exerce une action biphasique sur la douleur: dans l'heure qui suit son injection, la DHEA (avant d'être métabolisée) induit un effet pro-nociceptif rapide mais au-delà d'une heure, les androgènes dérivant du métabolisme de la DHEA provoquent un effet analgésique tardif (Kibaly *et al.*, 2008).

Dans le modèle expérimental de neuropathie diabétique engendrée par injection de streptozotocine, l'expression et l'activité de la 3 β -HSD sont fortement stimulées dans la moelle épinière conduisant à une augmentation de la production de progestérone (Saredi *et al.*, 2005).

L'ensemble de ces résultats révèle l'existence d'une régulation sélective de la neurostéroïdogenèse dans les structures nociceptives lorsque les animaux sont mis en

situation de douleur. Cette régulation de la biosynthèse des neurostéroïdes pourrait contribuer aux processus adaptatifs naturels mis en jeu par l'organisme pour faire face aux états physiopathologiques chroniques. Même si ces mécanismes d'adaptation naturelle ne suffisent pas à eux seuls pour enrayer la douleur pathologique, leur identification peut aider au développement d'outils thérapeutiques efficaces.

III. Neurostéroïdes et anxiété

III.1. Définition

L'anxiété est une émotion essentielle qui est hautement conservée durant l'évolution (Gross, 1999). Elle constitue une composante des réponses normales permettant de répondre, par exemple, à des situations dangereuses. D'un point de vue physiologique, l'anxiété est alors considérée comme une réaction adaptative face à une peur ou un danger potentiel (Rosen et Schulkin, 1998). Ainsi, l'anxiété améliore les performances et l'apprentissage pour permettre à un individu d'échapper au danger et d'affronter des situations difficiles. A l'inverse, si les réponses anxiogènes sont inappropriées, la capacité de l'individu à s'adapter aux conditions environnementales sera fortement compromise. Dans l'espèce humaine, l'anxiété pathologique est caractérisée par une angoisse et une inquiétude excessives (une attente appréhensive sur un certain nombre d'événements ou d'activités) se répétant pendant au moins six mois. L'anxiété pathologique peut revêtir de multiples aspects parmi lesquels on a coutume de distinguer schématiquement cinq grands tableaux principaux: l'anxiété généralisée, les phobies, les troubles obsessionnels-compulsifs, les crises de panique avec ou sans agoraphobie et le stress post-traumatique (Marshall *et al.*, 1999; Stein, 2000; Dyck *et al.*, 2001; Ninan, 2001). Ces tableaux cliniques sont assez fréquents puisque 2 à 8% des individus

dans une population présentent l'un de ces symptômes à un moment ou à un autre de leur vie (Encyclopédie médicale, Doctissimo, <http://www.doctissimo.fr/html/sante/encyclopedie>). De fait, l'ouvrage de référence internationale le plus utilisé pour diagnostiquer les troubles psychiatriques (*Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders* ou DSM), édité par l'Association Américaine de Psychiatrie (*American Psychiatric Association* ou APA), consacre un chapitre entier à l'anxiété pathologique et aux tableaux cliniques associés décrits ci-dessus (DSM-IV-TR, 2000).

Les mécanismes moléculaires impliqués dans l'anxiété «normale» et/ou pathologique ne sont pas encore complètement élucidés. Cependant, certaines structures neuroanatomiques telles que l'hippocampe et l'amygdale (appartenant au système limbique) sont réputées jouer un rôle important dans le développement des symptômes liés à l'anxiété (pour revues, Trimble, 1988; Bremner, 2004; Mathew et Ho, 2006; Bishop, 2007; Francati *et al.*, 2007) (Figure 6).

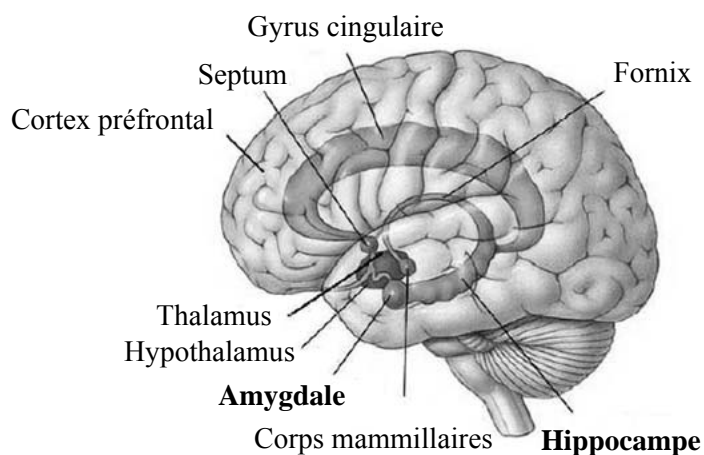


Figure 6: Le système limbique et ses composantes, en particulier l'hippocampe et l'amygdale.

www.grappa.univ-lille3.fr/~torre/Recherche/Encadrement/Riviere2003

III.2. L'hippocampe et l'amygdale, deux structures clefs dans le contrôle de l'anxiété

Depuis les expériences de lésions bilatérales réalisées chez l'Homme, de nombreuses études utilisant des modèles animaux ont permis de démontrer que l'**hippocampe** est impliqué dans le contrôle de la mémoire (pour revues, Scoville et Milner, 1957; Bird et Burgess, 2008). Outre son implication dans la mémoire, l'hippocampe joue également un rôle dans le contrôle de l'anxiété (pour revues, Bremner, 1999; Bannerman *et al.*, 2004). En effet, des expériences de lésions cytotoxiques de l'hippocampe de rat produisent des effets anxiolytiques mis en évidence par des tests comportementaux tels que le labyrinthe en croix surélevé, la boîte claire/obscur, l'analyse des interactions sociales et l'étude de l'hyponéophagie (Richmond *et al.*, 1999; Bannerman *et al.*, 2002, 2003; Kjelstrup *et al.*, 2002). Des lésions sélectives dans différentes régions de l'hippocampe montrent l'existence d'au moins deux territoires fonctionnels distincts par rapport à un axe septotemporal: les régions dorsale et ventrale. La partie dorsale est plus particulièrement impliquée dans l'apprentissage et la mémorisation alors que la partie ventrale joue préférentiellement un rôle dans la régulation des états anxiogènes (pour revues, Bast et Feldon, 2003; Bannerman *et al.*, 2004; Bertoglio *et al.*, 2006; Pentkowski *et al.*, 2006). Cette distinction entre partie dorsale et ventrale de l'hippocampe est également accentuée par la forte connexion entre l'hippocampe ventral et l'**amygdale**, structure également prépondérante dans la régulation de l'anxiété et des troubles obsessionnels (Davis, 1992; Aggleton, 1993, 2000; Rauch *et al.*, 2003). Le rôle fondamental de l'amygdale dans le contrôle de l'anxiété a été mis en évidence grâce aux expériences de peur conditionnée (pour revues, LeDoux, 1998; Sah *et al.*, 2003; Barad *et al.*, 2006; Garakani *et al.*, 2006). En effet, après avoir conditionné l'animal à la peur, une lésion de l'amygdale élimine les réponses viscérales acquises telle que l'augmentation de la pression artérielle moyenne (LeDoux *et al.*, 1988). De même, des lésions du noyau central de

l'amygdale empêchent le conditionnement à la peur (Goosens et Maren, 2001; Nader *et al.*, 2001; Zimmerman *et al.*, 2007). Chez l'Homme, des études de neuroimagerie fonctionnelle ont montré une activation de l'amygdale au cours des expériences de peur conditionnée (pour revues, Buchel et Dolan, 2000; Bishop, 2007). Les rares patients dont seule l'amygdale a été détruite par des tumeurs non progressives indolentes ou des malformations artérioveineuses reconnaissent toutes les expressions émotionnelles du visage sauf celle de la peur (Morris *et al.*, 1996; Skuse *et al.*, 2003; Shaw *et al.*, 2005). Des lésions de l'amygdale obtenues par des injections d'acide iboténique chez le singe Rhésus montrent que cette structure est nécessaire à l'acquisition initiale du réflexe de peur (Antoniadis *et al.*, 2007). La stimulation électrique de l'amygdale provoque un comportement anxiogène et de crainte chez l'animal (pour revue, Depaulis *et al.*, 1997) et chez l'Homme (Lanteaume *et al.*, 2007). Enfin, l'implication de l'amygdale dans la régulation de l'anxiété a été confirmée par des études démontrant que l'efficacité thérapeutique de certains médicaments antidépresseurs et anxiolytiques est liée à leur action sur le complexe amygdalien (File, 2000; Mathiasen *et al.*, 2007; Engin et Treit, 2008).

L'hippocampe et l'amygdale sont donc deux structures cérébrales majeures intervenant de façon différente et complémentaire dans la modulation de l'anxiété (McHugh *et al.*, 2004).

III.3. Action potentielle des neurostéroïdes dans le contrôle de l'anxiété

Comme nous l'avons détaillé dans le chapitre sur les mécanismes d'action des stéroïdes (voir pages 24 à 25), les neurostéroïdes sont capables de moduler le système GABAergique qui joue un rôle crucial dans le contrôle de l'anxiété (pour revue, Lydiard, 2003). De fait, certains neurostéroïdes contrôlant l'activité du récepteur GABA_A tels que la

PREG et son dérivé sulfaté (PREGS), les métabolites $3\alpha,5\alpha$ -réduits de la PROG (comme l'alloprégnanolone ou $3\alpha,5\alpha$ -THP et la $3\alpha,5\alpha$ -THDOC) ainsi que la déhydroépiandrostérone (DHEA) et la DHEAS modulent les niveaux d'anxiété (pour revues, Dubrovsky, 2005; Longone *et al.*, 2008).

Chez les rongeurs, une diminution de la concentration cérébrale de $3\alpha,5\alpha$ -THP et de $3\alpha,5\alpha$ -THDOC est observée dans le cas de comportements anxieux et/ou agressifs; à l'inverse, une augmentation du taux de ces composés dans le cerveau produit des effets anxiolytique, sédatif, anticonvulsivant et/ou anesthésique (pour revue, Barbaccia, 2004). Plusieurs études réalisées chez l'animal indiquent que le mécanisme d'action des substances qui produisent des effets anxiolytiques ou sédatifs (la fluoxétine, l'acide gamma-hydroxybutyrique ou GHB, l'étifoxine, l'éthanol), implique une augmentation de la concentration cérébrale des neurostéroïdes activateurs du système GABAergique (Barbaccia *et al.*, 2002; Sanna *et al.*, 2004; Verleye *et al.*, 2005; Follesa *et al.*, 2006; Pinna *et al.*, 2006). En revanche, les drogues anxiogéniques (par exemple le FG7142) provoquent une diminution de la concentration de $3\alpha,5\alpha$ -THDOC et de $3\alpha,5\alpha$ -THP dans le cortex cérébral (pour revue, Biggio *et al.*, 2007). Des injections de PROG ou de $3\alpha,5\alpha$ -THDOC à des rongeurs anxieux augmentent significativement leur activité exploratoire (Bitran *et al.*, 1995; Patchev *et al.*, 1997; Rodgers et Johnson, 1998; Lofgren *et al.*, 2006). Des études menées chez la souris mettent en évidence l'importance de la concentration locale de DHEA dans le cortex frontal dans l'expression du comportement anxieux. En effet, dans le labyrinthe en croix surélevé, les souris ayant de fortes concentrations cérébrales de DHEA passent plus de temps dans le bras ouvert du labyrinthe suggérant ainsi que des taux élevés de DHEA suppriment les troubles anxieux (Maayan *et al.*, 2006).

Des études cliniques font également apparaître une corrélation entre les troubles anxieux et les niveaux endogènes des stéroïdes neuroactifs chez l'humain (pour revues,

Dubrovsky, 2006; Longone *et al.*, 2008). Les dosages des stéroïdes neuroactifs sont le plus souvent réalisés dans le plasma des patients, ce qui ne permet pas de s'assurer de l'implication des neurostéroïdes produits dans le SNC dans la modulation de l'anxiété chez l'humain. Des évaluations des concentrations de stéroïdes dans le liquide céphalo-rachidien ou dans le cerveau post-mortem aideront sans doute à confirmer ultérieurement la contribution de la neurostéroïdogénèse dans le contrôle de l'anxiété chez l'humain. En attendant que ces données soient disponibles, il est néanmoins raisonnable de suspecter une implication des neurostéroïdes endogènes dans la modulation de l'anxiété chez l'humain au regard des nombreux exemples de corrélation entre symptômes anxieux et taux plasmatiques de divers stéroïdes (PREG, DHEA ou PROG) qui servent de précurseurs pour la neurostéroïdogénèse une fois que ces stéroïdes franchissent la barrière hémato-encéphalique (Sondergaard *et al.*, 2002; Tait *et al.*, 2002; Strous *et al.*, 2003; Pico-Alfonso *et al.*, 2004).

IV. Intérêt particulier de l'alloprégnanolone ou 3 α ,5 α -tétrahydroprogestérone

IV.1. Effets physiologiques de l'alloprégnanolone ou 3 α ,5 α -THP

Le neurostéroïde 3 α ,5 α -THP est considéré comme une molécule potentiellement intéressante sur le plan thérapeutique car il exerce des effets antidépresseurs, anxiolytiques, neuroprotecteurs, analgésiques et anesthésiques en activant les récepteurs GABA_A (Figure 7 A et B) (Uzunova *et al.*, 1998, 2006; Akwa et Baulieu, 1999; Barbaccia *et al.*, 2001; Reddy, 2003; Griffin *et al.*, 2004; Belelli et Lambert, 2005; Brinton et Wang, 2006; Patte-Mensah *et al.*, 2006; Pinna *et al.*, 2006).

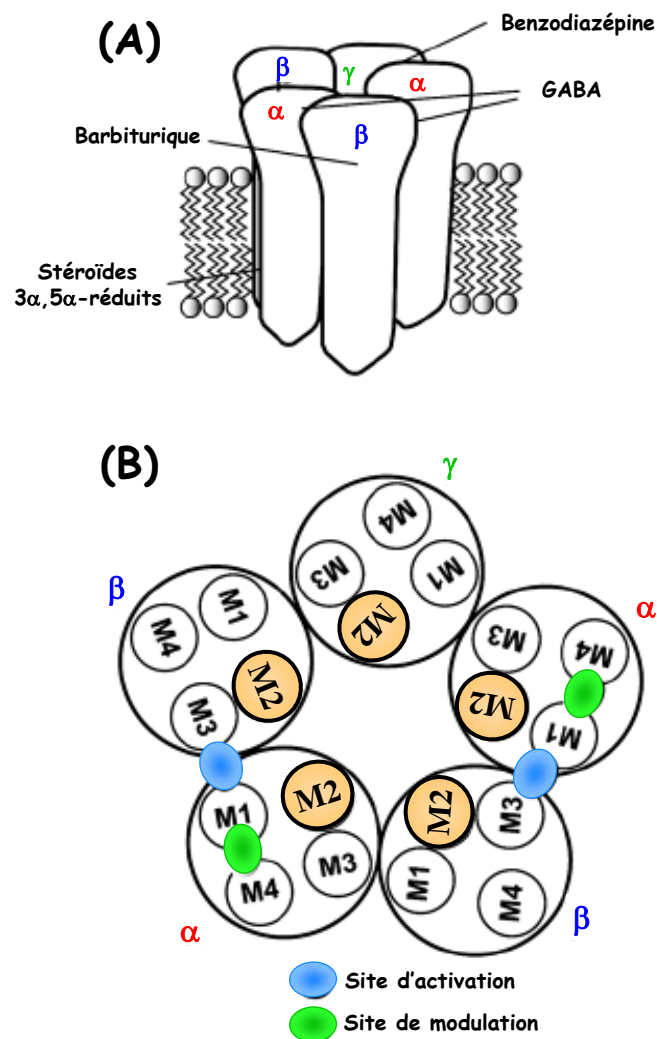


Figure 7: (A) Récepteur GABA_A et ses divers sites de liaison.

Le récepteur GABA_A possède plusieurs sites de liaison pour des substances modulatrices telles que le GABA, les barbituriques, les benzodiazépines et les stéroïdes 3α,5α-réduits.

(B) Sous-unités α, β et γ du récepteur GABA_A.

Les sous-unités α, β et γ sont constituées des domaines transmembranaires M1, M2, M3 et M4.

Le site modulateur des stéroïdes 3α,5α-réduits est localisé entre les domaines M1 et M4 de la sous-unité α du récepteur (●). Le site d'activation directe par les stéroïdes 3α,5α-réduits se situe à l'interface des sous-unités α et β (●).

D'après Akk et al., 2007.

Par ailleurs, des études électrophysiologiques réalisées sur les neurones de la corne dorsale de la moelle épinière montrent que la 3α,5α-THP augmente aussi l'activité du

récepteur glycinergique (Gly-R) correspondant à un canal perméable aux ions chlorures (Jiang *et al.*, 2006). Ainsi, des expériences entreprises chez le rongeur ont montré que l'injection intracérébroventriculaire ou l'administration de $3\alpha,5\alpha$ -THP atténue les comportements anxiogènes lors des tests de conflit de Geller-Seifter ou dans le labyrinthe en croix surélevé (Brot *et al.*, 1997; Finn *et al.*, 2003; Hirani *et al.*, 2005). Chez le rat, une infusion de $3\alpha,5\alpha$ -THP dans le noyau central de l'amygdale induit une amélioration des performances dans le test de labyrinthe en croix surélevé (augmentation du nombre d'entrées et du temps passé dans les bras ouverts), suggérant ainsi que les effets anxiolytiques de la $3\alpha,5\alpha$ -THP sont relayés par le complexe amygdalien (Akwa *et al.*, 1999). De plus, divers travaux indiquent que les propriétés anxiolytiques de la PROG ne dépendraient pas de son interaction directe avec ses récepteurs intracellulaires mais plutôt de sa conversion en $3\alpha,5\alpha$ -THP. En effet, l'action anxiolytique de la PROG peut être bloquée par des inhibiteurs de la 5α -réductase comme le finastéride (Bitran *et al.*, 1995; Frye et Walf, 2002) ou par des antagonistes du récepteur GABA_A (Bitran *et al.*, 1995; Reddy et Kulkarni, 1997). L'effet anxiolytique de la PROG est inexistant chez des souris knock-out pour le gène codant la 5α -réductase (Frye *et al.*, 2004) alors que cet effet est observé chez des souris où l'expression génique pour les récepteurs intracellulaires de la PROG est réprimée (Reddy *et al.*, 2005).

Des modifications du taux cérébral et sanguin de la $3\alpha,5\alpha$ -THP ont été détectées chez des patients atteints de troubles de l'anxiété. Les niveaux de $3\alpha,5\alpha$ -THP diminuent au cours du stress post-traumatique, des crises d'attaque panique et d'anxiété généralisée (Semeniuk *et al.*, 2001; Strohle *et al.*, 2003; Rasmusson *et al.*, 2006).

L'ensemble de ces données permet de penser que les modulations de la production endogène de $3\alpha,5\alpha$ -THP pourraient jouer un rôle clef dans le traitement des troubles neuropsychiatriques.

IV.2. Régulation de la biosynthèse de $3\alpha,5\alpha$ -THP

L'allopregnanolone ou $3\alpha,5\alpha$ -THP est impliquée dans le contrôle de plusieurs processus physiologiques (voir pages 31 à 42), pourtant la régulation de la production endogène de $3\alpha,5\alpha$ -THP est encore peu étudiée. Les travaux de notre équipe ont montré que dans la moelle épinière de rats soumis à une douleur neuropathique (modèle de Bennett et Xie, 1988), la concentration endogène en $3\alpha,5\alpha$ -THP augmente de façon significative par rapport au groupe témoin et atteint un maximum 6 jours après la ligature du nerf sciatique (Patte-Mensah *et al.*, 2004a). Par ailleurs, la substance P (SP), un neuropeptide majeur dans la transmission des messages nociceptifs, inhibe de façon dose-dépendante la production de $3\alpha,5\alpha$ -THP dans la corne dorsale de la moelle épinière de rat (Patte-Mensah *et al.*, 2005), ce qui indique que la biosynthèse du neurostéroïde $3\alpha,5\alpha$ -THP est modulée lors des situations douloureuses.

Il n'existe aucune donnée sur les neurotransmetteurs et/ou neuropeptides qui pourrait contrôler la production de $3\alpha,5\alpha$ -THP au cours des troubles de l'anxiété. Toutefois, certaines molécules connues pour leurs effets anxiolytiques agissent en modulant la libération de $3\alpha,5\alpha$ -THP. Par exemple, les benzodiazépines (diazépam (Valium®), lorazépam (Témesta®)), via la liaison sur le récepteur périphérique (PBR) ou mitochondrial, augmentent la biosynthèse de $3\alpha,5\alpha$ -THP (Casellas *et al.*, 2002; Papadopoulos *et al.*, 2006). De même, l'étilofixine, qui exerce des effets anxiolytiques, stimule la production cérébrale de $3\alpha,5\alpha$ -THP (Servant *et al.*, 1998; Verleye *et al.*, 2005; Nguyen *et al.*, 2006; Ugale *et al.*, 2007).

L'ensemble des données suggère fortement que les substances capables de stimuler la production de $3\alpha,5\alpha$ -THP dans le SNC seraient potentiellement intéressantes pour le traitement de l'anxiété et de la douleur. Toutefois, pour développer une stratégie

thérapeutique efficace, il convient d'identifier des molécules induisant peu ou pas d'effets secondaires à côté de leur action stimulatrice sur la biosynthèse de $3\alpha,5\alpha$ -THP.

Pour éviter les importants effets secondaires (nausées, vomissements, dépendance, détresse respiratoire, etc.) provoqués par de nombreux médicaments antalgiques ou anxiolytiques utilisés en médecine courante ou allopathique, certaines médecines alternatives (notamment l'homéopathie) proposent des traitements supposés être sans effets indésirables. C'est le cas des préparations homéopathiques de *Gelsemium sempervirens* (*G. sempervirens*) proposées par les Laboratoires BOIRON comme ayant une action anti-trac, anxiolytique et antalgique. Or, aucune preuve formelle basée sur des études fondamentales n'a jusqu'alors été fournie pour démontrer les effets thérapeutiques bénéfiques et les mécanismes d'action de *G. sempervirens*.

V. L'Homéopathie

V.1. Historique et définition

Le terme «homéopathie», dérivant de deux mots grecs (hómoios ou similaire et páthos ou souffrance), représente une branche de la thérapeutique médicale décrite pour la première fois par Samuel Hahnemann au XVIII^{ème} siècle. L'homéopathie consiste à administrer au malade une substance médicinale à des doses infinitésimales. Elle est construite sur trois règles: (i) le principe de similitude qui repose sur le fait qu'une personne atteinte de maladie peut être traitée au moyen d'une substance qui peut produire des symptômes semblables à ceux de la pathologie chez un sujet sain, (ii) l'adaptation du traitement au patient quelque soit la pathologie pour rechercher la totalité des symptômes présentés par le patient et (iii) la

dynamisation qui consiste à diluer et secouer plusieurs fois de suite (succussions) la préparation.

Les préparations homéopathiques sont obtenues grâce à une succession de dilutions d'une teinture mère. La méthode de dilutions la plus utilisée est celle issue de la méthode hahnemanienne qui indique que le médicament a été préparé selon le mode de dilution au centième mis au point par le docteur Hahnemann. Pour désigner ce mode de fabrication, la dilution est notée **CH**, signifiant Centésimale Hahnemannienne et se comprend par la formule suivante: n dilutions CH = $100^n = 10^{2n}$ dilutions soit une concentration en produit actif divisée par 10^{2n} (Tableau 1).

DILUTION	ECHELLE (au centième)
1 CH	10^{-2}
2 CH	10^{-4}
3 CH	10^{-6}
4 CH	10^{-8}
5 CH	10^{-10}
9 CH	10^{-18}
15 CH	10^{-30}

Tableau 1: Equivalence entre la nomenclature de la dilution homéopathique et la valeur (au centième) de sa concentration.

V.2. Débats et critiques sur l'homéopathie

Actuellement, les connaissances qui s'appuient sur les études homéopathiques sont très fortement critiquées. Les controverses reposent essentiellement sur deux grandes questions:

1°) L'homéopathie a-t-elle un effet supérieur à celui d'un placebo?

La publication la plus pertinente, parue dans le journal *The Lancet*, est rédigée par un groupe de huit chercheurs de nationalité suisse et britannique qui a effectué une analyse des publications médicales de 19 banques de données électroniques, comparant l'effet placebo à l'homéopathie et l'effet placebo à la médecine conventionnelle. La conclusion de cette étude semble trancher le débat sur l'efficacité des médicaments homéopathiques puisqu'il ressort que: 1°) en moyenne, les études concernant la médecine conventionnelle démontrent une nette supériorité sur le placebo et 2°) à l'inverse, l'analyse ne met en évidence aucune supériorité de l'homéopathie sur l'effet placebo (Shang *et al.*, 2005). Dans des études respectant les critères méthodologiques (essais cliniques réalisés en double aveugle, comparaison de l'effet de la préparation homéopathique à son placebo ou à un médicament existant), les méta-analyses concluent également à l'absence de différence entre les effets placebo et l'homéopathie (Goldacre, 2007). Ces résultats sont confirmés par une autre étude dans laquelle l'homéopathie n'est pas meilleure que le placebo pour réduire la consommation de morphine après une chirurgie (Paris *et al.*, 2008).

Pour contrecarrer ces critiques, un des arguments avancés par les partisans de l'homéopathie est la méthodologie des recherches entreprises au cours des méta-analyses. L'un des paramètres des études randomisées en médecine conventionnelle est la nécessité de répartir les patients en groupes bien définis selon la pathologie explorée. Or, comme mentionné auparavant, un des principes de base spécifique à l'homéopathie est l'adaptation au

patient, ce qui est contraire au fait d'analyser l'efficacité de tel ou tel médicament sur un processus pathologique particulier. Cependant, toutes les recherches consacrées à l'homéopathie souffrent de ce biais convenu en médecine conventionnelle et contribue à alimenter le débat sur l'homéopathie, d'autant que la grande majorité des recherches sont des études cliniques et qu'il existe peu de recherches fondamentales menées pour identifier les mécanismes d'action cellulaire et moléculaire des préparations homéopathiques.

2*) Les préparations homéopathiques, hautement diluées, peuvent-elles présenter un effet biologique alors que la chimie nous apprend qu'à ces dilutions, il n'existe plus aucune molécule de la teinture mère présente en solution?

En effet, comme indiqué dans le Tableau 1, le calcul permet de prouver qu'à partir d'un certain nombre de dilutions, la solution ne contient statistiquement plus de molécules actives. Ainsi, sachant que la quantité de moles dans une solution est déterminée à partir du nombre d'Avogadro précisément $1/N_A$ (c'est-à-dire $1/6,022 \cdot 10^{23} \text{ mol}^{-1}$) soit $1,66 \cdot 10^{-24}$ mole, la préparation 15 CH (10^{-30}) est au-delà du seuil du nombre d'Avogadro et ne contient donc plus aucune molécule de la substance mère. D'ailleurs, ceci constitue l'argument fondamental des opposants à l'homéopathie pour contester la possibilité d'un effet autre que celui du placebo.

Malgré toutes ces critiques, la popularité de l'homéopathie est surtout remarquable en France où 80% du marché des médicaments homéopathiques est réalisé. De plus, l'emploi de cette méthode en tant que médecine est attesté dans 80 pays en Europe, en Amérique du Sud, en Inde, au Bangladesh et au Pakistan. En Grande-Bretagne, 5 hôpitaux sont utilisateurs de traitements homéopathiques et 6 universités organisent un enseignement de cette matière validée par un diplôme («Bachelor of Sciences»).

VI. *Gelsemium sempervirens*

VI.1. Description

Le Jasmin jaune ou *Gelsemium sempervirens* (*G. sempervirens*) est un arbuste grimpant qui pousse à l'état sauvage dans le Sud-Est des Etats-Unis et fut introduit en Europe au XVII^{ème} siècle (Figure 8). Son nom *Gelsemium* lui a été donné par Antoine Laurent de Jussieu, botaniste français qui inventa la méthode de classification des plantes; il provient de «gelsomina», mot italien désignant le jasmin. *G. sempervirens* est utilisé comme plante ornementale pour son feuillage toujours vert (*sempervirens* étant d'ailleurs la traduction latine de couleur toujours verte, persistante) et ses fleurs jaunes décoratives et odorantes.



Figure 8: Photographie de l'arbuste *Gelsemium sempervirens* ou Jasmin jaune.

www.maggiestgarden.com/Plant_Profiles/Plant_This/Carolina_Jasmine

VI.2. Observations des effets cliniques supposés de *Gelsemium sempervirens*

Les connaissances actuelles sur les effets biologiques de *G. sempervirens* sont des informations obtenues soit de manière empirique, soit à partir des observations des traitements homéopathiques que les médecins homéopathes prescrivent à leurs patients. Ainsi, Hahnemann expérimentait sur lui-même les substances dont il souhaitait tirer les actions thérapeutiques. Dans cette approche, Hahnemann observait les effets des plantes réduites en poudre sur l'Homme sain pour en développer les propriétés pharmacologiques des substances diluées un certain nombre de fois, selon le principe de similitude. Ces données issues de l'expérience indiquent qu'avec des doses toxiques et subtoxiques, *G. sempervirens* produit des troubles de la vision et des empoisonnements de type tétanos. D'autres symptômes toxicologiques ont également été décrits par les Docteurs Allen, Hughes et Hering dans des ouvrages tels que «l'Encyclopédie de Matière Médicale Pure», «Clinical HandBook» ou bien encore «Le Guide des Symptômes de notre Matière Médicale». Une synthèse de leurs travaux respectifs est répertoriée dans l'étude réalisée par Desobeau et Rodriguez (1990). D'autres données sont également disponibles dans le livre «Pharmacologie et matière médicale homéopathique» (Jouanny *et al.*, 2003) dans lequel sont décrits des symptômes toxicologiques tels qu'une paralysie ou des raideurs musculaires, des céphalées et vertiges. Dans cet ouvrage, les indications cliniques de *G. sempervirens* dans son usage homéopathique sont également répertoriées comme ayant des effets antinévralgiques (névralgies faciales et dentaires), antispasmodiques, analgésiques et anxiolytiques (anti-trac). Toutefois, les expériences décrites dans ce texte (Jouanny *et al.*, 2003) manquent souvent de précision concernant les concentrations des substances étudiées (toxiques versus thérapeutiques) et ne définissent pas de manière claire des essais pré-cliniques (études pharmacologiques,

pharmacocinétiques ou toxicologiques) et cliniques tels qu'ils sont entrepris pour les médicaments allopathiques classiques.

Les effets physiologiques de *G. sempervirens* décrits précédemment reposent essentiellement sur l'observation. Récemment, deux études réalisées chez des rongeurs ont cherché à vérifier l'authenticité des propriétés de *G. sempervirens*. Dans le premier travail, des préparations homéopathiques de *G. sempervirens* sont injectées (voie intrapéritonéale) à des souris Swiss 30 min avant l'exposition au stress (chocs électriques), puis les réactions des souris sont analysées dans deux tests comportementaux (boîte claire/obscur («Light/Dark»)) et le test de l'escalier («staircase»)). Les résultats indiquent que *G. sempervirens* abolit les effets du stress sur le comportement des animaux (Bousta *et al.*, 2001). L'autre étude a pour objectif de rechercher l'effet d'une concoction de plantes contenant *G. sempervirens* (24 gouttes), *Scutellaria lateriflora* (15 gouttes) et *Datura stramonium* (24 gouttes) chez des rats rendus épileptiques par injection de lithium/pilocarpine. Le traitement est administré par voie orale (dans l'eau de boisson) toutes les 24h pendant 30 jours. Le nombre de convulsions est enregistré pendant 15 min à la même heure tous les jours et pour tous les rats. Les résultats montrent que le cocktail de plantes inhibent totalement les convulsions chez les rats traités par rapport aux rats contrôles. L'arrêt du traitement provoque la reprise des convulsions. Ce remède phytothérapique semble efficace dans le contrôle des convulsions de nature épileptique chez le rat (Peredery et Persinger, 2004).

VI.3. Composition de *Gelsemium sempervirens*

La teinture mère de *G. sempervirens* est préparée à partir de la racine de la plante macérée dans de l'alcool (voir Matériels et Méthodes, page 66). Différentes techniques d'analyse chimique (résonance magnétique nucléaire, RMN ^1H et ^{13}C , et des expériences

INEPT (Insensitive Nuclei Enhanced by Polarization Transfer) et 2D-COSY (corrélation spectroscopique à deux dimensions)) ont été nécessaires pour déterminer sa composition (Schun et Cordell, 1985, 1987). La teinture mère est ainsi constituée de:

- résine
- lipides
- stérols
- alcaloïdes de structure indolique, comme:
 - gelsémine
 - gelsémicine
 - sempervirine
 - gelsédine
- une hydroxycoumarine: le scopolétol

Plus récemment, Kitajima *et al.* (2003) ont déterminé par des techniques de spectroscopie (RMN et spectrométrie de masse, MS) de nouveaux alcaloïdes de structure oxindolique dans les racines sèches et les feuilles de la plante, dénommés Gelsémicine, 19-Oxo-gelsémicine ou bien encore Gelsémoxonine.

Les principes actifs présents dans une plante sont identifiés et caractérisés selon deux méthodes complémentaires: (i) l'identification en classes (comme la classe des alcaloïdes, par exemple) après détermination de leur structure chimique, (ii) le fractionnement bioactif qui consiste à subdiviser en différentes fractions un extrait actif jusqu'à arriver à un groupe présentant le meilleur enrichissement des molécules les plus actives de la plante. L'élimination successive des substances actives conduit progressivement à une perte de l'activité. Par ailleurs, des composés peuvent jouer le rôle de co-facteur, comme les lipides et la résine.

Le premier critère (classe des alcaloïdes) et les études chimiques (extraction par divers solvants) ont permis de caractériser un composé majoritaire d'un point de vue quantitatif. La structure chimique de ce composé a été déterminée. Le nom donné à cet alcaloïde est «gelsémine» en référence à *Gelsemium*.

VII. La Gelsémine

VII.1. Description

La gelsémine est décrite comme le principe actif majoritaire de *G. sempervirens*. Pourtant, en règle générale, un alcaloïde isolé ne va pas constituer le principe actif d'une plante mais tous les alcaloïdes seront décrits comme les principes actifs d'une plante (synergie des différents constituants). La gelsémine n'est certainement pas le seul principe actif de *G. sempervirens* d'où l'ajout du terme «majoritaire» pour bien marquer le fait que dans la composition de *G. sempervirens*, cet alcaloïde est présent en plus grande quantité.

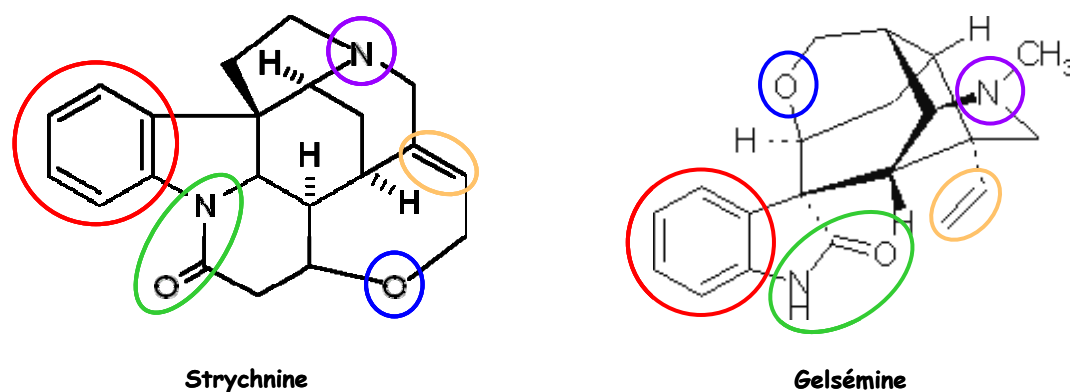
VII.2. Observations des effets cliniques supposés de la Gelsémine

Comme évoqué auparavant pour *G. sempervirens*, les informations disponibles actuellement sur les effets biologiques de la gelsémine ont été obtenues de manière empirique ou à partir d'observations cliniques faites à la suite de soins homéopathiques. Les indications cliniques sur la gelsémine, à l'image de *G. sempervirens*, sont des effets sédatifs, antispasmodiques et bronchodilatateurs ainsi que des effets antinévralgiques et analgésiques (Jouanny *et al.*, 2003). Les effets analgésiques de la gelsémine sont également inventoriés par la Banque de Données Automatisées sur les Médicaments (BIAM) destinée aux médecins et

pharmaciens. En revanche, aucune donnée scientifique rigoureuse basée sur des recherches fondamentales ou cliniques n'est répertoriée sur un moteur de recherche de données bibliographiques internationales, tel que PubMed. De fait, aucune étude pharmacologique n'est actuellement disponible pour expliquer les effets physiologiques de la gelsémine. Toutefois, il existe une étude dans laquelle les auteurs montrent que la liaison de la β -alanine tritiée à des fractions de synaptosomes de moelle épinière de rat peut être inhibée par la gelsémine utilisée à une concentration supérieure à 1 mM (Orensanz *et al.*, 1988). La conclusion de cet article n'avance aucune explication sur les effets biologiques de la gelsémine et encore moins sur ses mécanismes d'action.

VII.3. Analogie structurale avec la Strychnine

Depuis plus de 70 ans, de nombreuses études chimiques ont clairement établi la synthèse et la configuration absolue de la gelsémine (Conroy et Chakrabarti, 1959; Lovell *et al.*, 1959; Madin *et al.*, 1999; Yokoshima *et al.*, 2000; Ng *et al.*, 2002; Ozturk *et al.*, 2005). La gelsémine est un alcaloïde indolique possédant cinq groupements fonctionnels identiques à ceux qui sont dans la structure de la strychnine (Grecian et Aube, 2007), un autre alcaloïde indolique extrait du vomiquier ou *Strychnos nux vomica*. Ces cinq groupements que partagent la gelsémine avec la strychnine sont un noyau aromatique, une liaison amide, une amine tertiaire, une fonction éther et une double liaison ou groupement alcène (Figure 9).



- Groupement aromatique - Liaison amide - Ether cyclique - Groupement alcène - Amine tertiaire

Figure 9: Structure chimique de la Strychnine et de la Gelsémine.

Ces deux molécules ont cinq groupes fonctionnels identiques. La strychnine et la gelsémine divergent par leur conformation tridimensionnelle, de même que par la présence de la double liaison dans l'éther cyclique de la strychnine, mais absente chez la gelsémine.

La strychnine est utilisée pour caractériser les Gly-Rs. Ainsi, compte tenu de l'analogie structurale entre ces alcaloïdes, la gelsémine et la strychnine pourraient être stéréocomplémentaires pour le Gly-R.

VII.4. Strychnine, Glycine et récepteurs glycinergiques

VII.4.1. Strychnine: antagoniste sélectif du récepteur glycinergique

La strychnine est définie comme l'antagoniste spécifique et sélectif des Gly-Rs (Legendre, 2001; Lynch, 2004; Kirsch, 2006). Cette molécule entre en compétition avec la glycine pour le Gly-R dans la poche du site de liaison et bloque ainsi l'effet de la glycine relayé par ce récepteur. Enfin, grâce à sa très haute affinité pour le Gly-R, la strychnine constitue un outil de choix pour déterminer et isoler cette classe de récepteurs.

VII.4.2. Glycine

En plus du système GABAergique, la glycine est une autre composante majeure de la neurotransmission inhibitrice (Legendre, 2001; Lynch, 2004). L'action de la glycine est relayée par le Gly-R et module certains processus physiologiques comme le comportement locomoteur ou bien encore la coordination des réflexes spinaux (Kandel *et al.*, 2000; Vinay et Jean-Xavier, 2008). Dans la moelle épinière, qui est une structure cruciale pour les processus moteurs et sensoriels (Haines *et al.*, 1997), les dérèglements du système glycinergique sont liés à des états pathologiques tels que les douleurs neuropathiques (Zeilhofer, 2005; Pellicer *et al.*, 2007). La glycine peut également se lier au rNMDA où elle joue le rôle de co-agoniste (l'agoniste de ce récepteur étant l'acide aminé glutamate). Mais à l'opposé de son activité inhibitrice via le Gly-R, la glycine intervient dans la neurotransmission excitatrice par sa liaison au rNMDA.

VII.4.3. Récepteurs glycinergiques

VII.4.3.1. Récepteurs glycinergiques sensibles à la strychnine: Gly-R

Le Gly-R sensible à la strychnine appartient à la superfamille des récepteurs canaux dépendants du ligand, tout comme le récepteur nicotinique, le récepteur GABA_A ou bien encore le récepteur sérotoninergique 5-HT₃ (Moss et Smart, 2001) (Figure 10 A). Ce récepteur pentamérique est un canal sélectif des ions anioniques (les ions chlorures) composé de deux types de sous-unités, une protéine de 48 kDa nommée α et une de 58 kDa dénommée β , qui s'assemblent à la membrane plasmique selon un ratio stoechiométrique de trois sous-unités α et deux sous-unités β . Grâce à des approches de clonage moléculaire, quatre gènes

codant la sous-unité α et un seul gène pour la sous-unité β ont pu être mis en évidence chez le rat. Les sites de fixation pour la glycine et son antagoniste strychnine se trouvent sur le domaine N-terminal de la sous-unité α du Gly-R. Ces molécules ne se lient pas avec les mêmes acides aminés mais plutôt sur des sites se chevauchant dans la poche de liaison (Legendre, 2001) (Figure 10 B). L'hétérogénéité des sous-unités du Gly-R peut également augmenter suite aux mécanismes d'épissage alternatif, en particulier pour les sous-unités $\alpha 1$ et $\alpha 2$ (Kuhse *et al.*, 1991; Malosio *et al.*, 1991a). Les synapses glycinergiques ont tout d'abord été principalement localisées dans la moelle épinière et le tronc cérébral de mammifère (Krnjevic, 1981; Becker, 1992). Il est maintenant bien établi que les fibres et les corps cellulaires contenant la glycine, ainsi que les Gly-Rs sont plus largement distribués dans le SNC, comme le cortex cérébral, le cervelet, le thalamus, l'hypothalamus, l'hippocampe et l'amygdale basolatérale (Malosio *et al.*, 1991b; Rampon *et al.*, 1996; McCool et Botting, 2000). Au niveau fonctionnel, le récepteur glycinergique a un rôle bien établi dans la sensibilisation à la douleur inflammatoire par le mécanisme de phosphorylation de la sous-unité $\alpha 3$ du Gly-R induit par la prostaglandine E2 (Harvey *et al.*, 2004). Le Gly-R est également impliqué dans d'autres mécanismes physiopathologiques à cause de certaines mutations intervenant dans la séquence primaire constituant les sous-unités α et/ou β de ce récepteur. Ainsi, parmi ces pathologies, nous pouvons citer l'hyperekplexie, ou maladie des sursauts, qui est une maladie neuronale héréditaire rare caractérisée par une réponse exagérée à des stimuli non conditionnés et causée par des mutations qui vont réduire l'amplitude des courants post-synaptiques inhibiteurs, principalement sur le résidu arginine R271 (Langosch *et al.*, 1994).

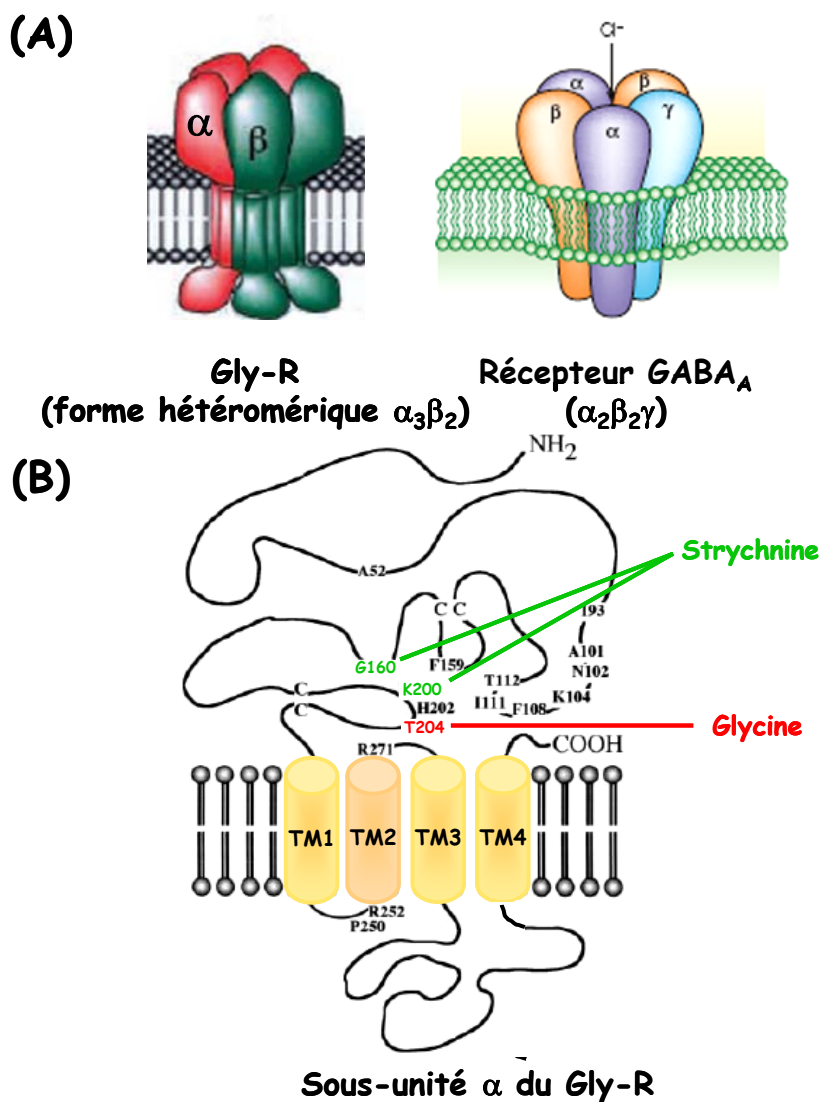


Figure 10: Récepteur glycinergique sensible à la strychnine (Gly-R).

(A) Les récepteurs pentamériques Gly-R et GABA_A. Ces deux récepteurs appartiennent à la superfamille des récepteurs canaux dépendants du ligand et partagent à la fois une analogie structurale dans leur constitution en sous-unités (présence des sous-unités α et β) et une analogie fonctionnelle puisque ces deux récepteurs interviennent dans la neurotransmission inhibitrice.

(B) Sites de liaison de la glycine et de son antagoniste, la strychnine, sur le Gly-R. Ces deux molécules se fixent sur le domaine N-terminal de la sous-unité α (constituée des domaines transmembranaires M1, M2, M3 et M4) du Gly-R mais n'interagissent pas avec les mêmes acides aminés dans la poche de liaison (positions des acides aminés: G160, glycine 160; K200, lysine 200; T204, thréonine 204).

D'après Legendre, 2001 et Belelli et Lambert, 2005.

VII.4.3.2. Récepteurs glycinergiques insensibles à la strychnine: rNMDA

Le récepteur ionotropique du glutamate sensible au NMDA (rNMDA) qui médie la neurotransmission excitatrice dans le SNC est caractérisé par un bouchon magnésium (Mg^{2+}) et une très haute perméabilité aux ions calcium (Ca^{2+}) et sodium (Na^+). Bien que la stoechiométrie exacte des sous-unités constituant ce récepteur reste encore un point de débat, de récentes études indiquent que le rNMDA est en fait un assemblage de quatre sous-unités qui sont des isoformes de deux protéines principales dénommées rNMDA1 (NR1) et rNMDA2 (NR2) (Laube *et al.*, 1998). A l'heure actuelle, un seul gène codant NR1 a été identifié mais pour NR2 quatre gènes ont été clonés et codent respectivement les sous-unités NR2A, NR2B, NR2C et NR2D. Il est généralement admis que les récepteurs fonctionnels NMDA dans le SNC des mammifères sont formés par la combinaison hétéromérique de NR1 et des isoformes de NR2 (Danysz et Parsons, 1998) (Figure 11). La glycine est un co-agoniste de ce récepteur (tout comme la D-sérine et la D-alanine) qui potentialise la réponse du glutamate et qui est aussi impérativement requise pour induire la configuration du rNMDA dans un état ouvert. Par hybridation *in situ*, la distribution de chaque sous-unité a été déterminée. Ainsi, l'ARNm de NR1 est localisé de manière ubiquitaire à travers tout le cerveau de rongeur adulte tandis que les transcrits de NR2 présentent des motifs régionaux distincts, plus particulièrement dans le bulbe olfactif, le cervelet, le cortex cérébral, le thalamus ou l'hippocampe, avec des densités variables selon la sous-unité observée (Ozawa *et al.*, 1998). D'un point de vue fonctionnel, le rNMDA est impliqué dans divers types de processus comme la plasticité synaptique et la mémorisation (Liu et Zhang, 2000; Petrovic *et al.*, 2005). La sur-activation de ce récepteur peut mener à une mort neuronale par une entrée excessive de Ca^{2+} pouvant être atténuée par l'emploi d'antagonistes du rNMDA comme cela a été montré dans un modèle d'hypoxie *in vitro* (Choi et Rothman, 1990). Toutefois,

l'utilisation de ces antagonistes peut induire de sévères effets psychotomimétiques (schizophrénie) et des altérations des processus de mémorisation (Malenka et Nicoll, 1999).

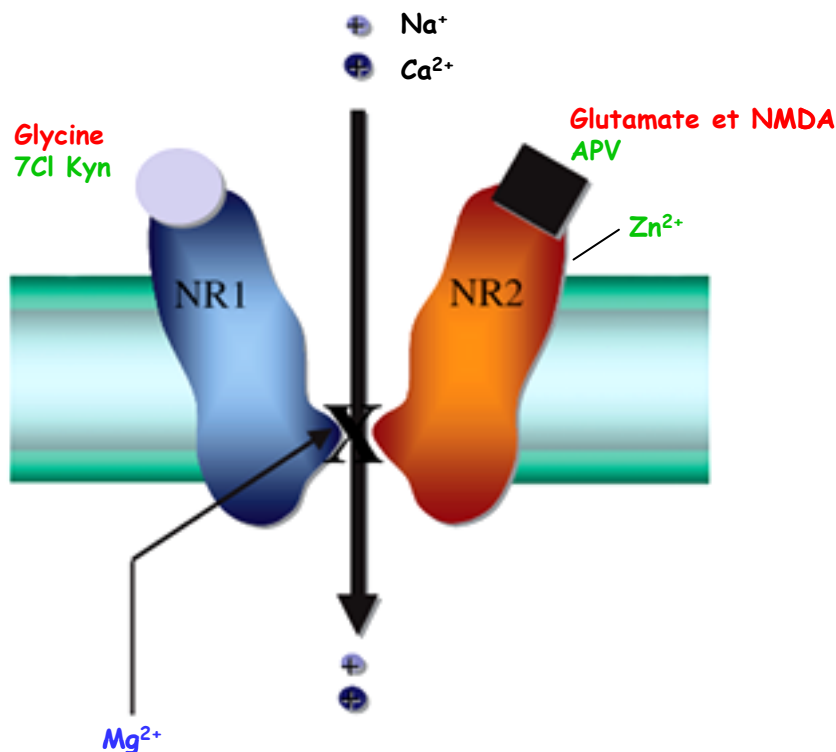


Figure 11: Récepteur NMDA et ses divers sites de liaison pour le glutamate, le NMDA et la glycine.

Le site de fixation du glutamate ou du NMDA se trouve sur la sous-unité 2 du rNMDA (NR2). L'acide 2-amino-5-phosphonovalérique (APV) est un antagoniste compétitif du site de liaison du glutamate et du NMDA. Le co-agoniste glycine se fixe sur la sous-unité 1 du rNMDA (NR1) et est bloqué par son antagoniste compétitif l'acide 7-chlorokynurénique (7Cl Kyn). Les ions magnésium (Mg^{2+}) et zinc (Zn^{2+}) exercent une inhibition voltage-dépendante, le Mg^{2+} en se fixant sur des sites situés dans le canal ionique sélectif aux cations (calcium Ca^{2+} , sodium Na^{+}) et le Zn^{2+} en se liant à la sous-unité NR2.

D'après Chen et Lipton, 2006.

VIII. Descriptif du projet de thèse

Les nombreuses données bibliographiques analysées dans les chapitres I à IV révèlent que les neurostéroïdes, en particulier la $3\alpha,5\alpha$ -THP, jouent un rôle important dans la régulation de divers processus neurophysiologiques tels que la transmission nociceptive, la douleur et l'anxiété. Il ressort de l'analyse bibliographique que les substances capables de stimuler la biosynthèse de $3\alpha,5\alpha$ -THP dans les centres nerveux nociceptifs et/ou les structures limbiques seraient potentiellement intéressantes pour l'élaboration de thérapies contre les douleurs pathologiques et/ou l'anxiété (Bitran *et al.*, 1995; Frye et Walf, 2002; Servant *et al.*, 1998; Semeniuk *et al.*, 2001; Casellas *et al.*, 2002; Strohle *et al.*, 2003; Verleye *et al.*, 2005; Nguyen *et al.*, 2006; Papadopoulos *et al.*, 2006; Rasmusson *et al.*, 2006; Ugale *et al.*, 2007). Toutefois, pour être thérapeutiquement efficaces, ces substances devraient être dénuées d'effets secondaires tels que les nausées, les vomissements, la dépendance ou les troubles respiratoires provoqués par la majorité des antalgiques et anxiolytiques actuellement disponibles (pour revues, Michael Kaplan et DuPont, 2005; O'brien, 2005; Stevens et Pollack, 2006; Ruan, 2007; Ballantyne et Shin, 2008; Benyamin *et al.*, 2008). Les Laboratoires BOIRON commercialisent les préparations homéopathiques de *G. sempervirens* comme des médicaments anxiolytiques (anti-trac) et antalgiques (contre les céphalées) ne présentant pas d'effets indésirables. Or, les propriétés thérapeutiques attribuées à ces médicaments homéopathiques ne s'appuient sur aucune preuve issue d'une recherche fondamentale, en particulier sur les mécanismes d'action de *G. sempervirens*. Tout naturellement, cette situation suscite de violentes critiques auxquelles le groupe BOIRON a décidé de répondre en mettant en place des collaborations avec divers laboratoires de recherche internationalement reconnus pour vérifier, à l'aide de programmes scientifiques rigoureux, l'existence ou non de preuves fondamentales soutenant les effets thérapeutiques supposés des préparations

homéopathiques. C'est dans ce contexte que notre équipe a été contactée par BOIRON pour entreprendre un programme d'étude pluridisciplinaire relatif à l'évaluation des effets de *G. sempervirens* sur la biosynthèse de $3\alpha,5\alpha$ -THP, un neurostéroïde fortement impliqué dans la modulation des sensations douloureuses et de l'anxiété. Pour analyser de façon rigoureuse les effets cellulaires et les mécanismes d'action de *G. sempervirens* qui est un extrait constitué de diverses molécules (voir chapitre VI, pages 50 à 52), il nous a paru indispensable de nous intéresser dans un premier temps au principe actif majoritaire de *G. sempervirens* qui est la gelsémine. Ainsi, nous avons d'abord étudié les effets de la gelsémine synthétique sur la production de $3\alpha,5\alpha$ -THP dans le SNC du rat, ce qui a permis de bien maîtriser l'ensemble des paramètres pharmacologiques, de caractériser le récepteur impliqué dans la médiation de l'effet de la gelsémine et de déterminer le mode d'action de cette substance sur la neurostéroïdogenèse. Ensuite, nous nous sommes appuyés sur les conditions expérimentales rigoureuses établies avec la molécule de synthèse (la gelsémine synthétique) pour comparer les effets des dilutions homéopathiques de gelsémine et de *G. sempervirens* sur la biosynthèse de $3\alpha,5\alpha$ -THP dans le SNC. Cette analyse comparative nous a été utile pour déterminer les mécanismes cellulaires impliqués dans l'induction des effets de *G. sempervirens* dans le SNC.

Pour être en adéquation avec les effets physiologiques supposés de *G. sempervirens* (antalgique et anxiolytique), nos travaux ont été réalisés sur la moelle épinière (structure nerveuse jouant un rôle clef dans la nociception et la douleur) et sur le système limbique, en particulier l'hippocampe et l'amygdale ou H-A (dont l'activité est cruciale dans la modulation de l'anxiété). Ces structures (moelle épinière et système limbique) contiennent toutes les enzymes nécessaires à la biosynthèse de $3\alpha,5\alpha$ -THP qu'elles produisent d'ailleurs activement (Patte-Mensah *et al.*, 2003, 2004a,b, 2005; Agis-Balboa *et al.*, 2006, 2007).

Les approches expérimentales utilisées pour mes travaux de thèse étant essentiellement des techniques *in vitro*, j'ai également participé au cours de ma formation à

un autre projet de l'équipe qui met en œuvre des analyses *in vivo*. Ce projet cherche à mettre directement en relation l'activité de la 3 α -HSOR (enzyme clef de synthèse de 3 α ,5 α -THP) dans la moelle épinière et les variations des seuils de sensibilité à la douleur thermique et mécanique. Ainsi, de manière complémentaire et cohérente, la participation à ce projet supplémentaire m'a permis d'analyser les résultats obtenus sur la régulation de la biosynthèse de 3 α ,5 α -THP dans la moelle épinière *in vitro* à la lumière des données comportementales acquises *in vivo* sur le rôle modulateur de la douleur neuropathique joué par la 3 α -HSOR et la 3 α ,5 α -THP synthétisée au niveau spinal. J'ai donc pu obtenir au cours des 3 années de thèse des résultats permettant de poser les bases pour des travaux ultérieurs qui détermineront directement *in vivo* le lien effectif entre les effets de *G. sempervirens* et son action sur la biosynthèse de 3 α ,5 α -THP dans le SNC.

MATERIELS ET METHODES

I. Animaux

Dans notre étude, des rats mâles adultes Sprague-Dawley pesant 300-450 g ont été utilisés. Ils proviennent de la société commerciale Janvier (Le Genest-St-Isle, France). Ils sont soumis à des conditions standards de photopériode de 12h de jour/12h de nuit avec de l'eau et de la nourriture à volonté. Les opérations chirurgicales ont été réalisées sous anesthésie générale en utilisant un mélange kétamine (75 mg/kg)/xylazine (5 mg/kg). La douleur neuropathique est induite selon le protocole décrit par Bennett et Xie (1988) et toutes les expériences ont été réalisées en adéquation avec les directives éthiques de l'IASP (Zimmermann, 1983). Cette méthode consiste à poser 4 ligatures lâches espacées de 1 mm autour du nerf sciatique du rat provoquant ainsi une constriction du nerf qui induit, chez l'animal, le développement de symptômes tels que l'allodynie mécanique et l'hyperalgie thermique (Figure 12; voir aussi dans l'introduction page 28). Les expériences ont été menées avec des rats non opérés (naïfs), des rats neuropathiques ou des rats pseudo-opérés (exposition du nerf sciatique droit ou gauche sans ligature). Le bon rétablissement des animaux après l'opération est contrôlé tous les jours ainsi que les paramètres indiquant la présence de la douleur neuropathique tels que la locomotion, la posture de la patte affectée et l'état des griffes (Bennett et Xie, 1988). Les animaux sont euthanasiés 12 jours après la ligature du nerf sciatique pour toutes les expériences à l'exception des études comportementales effectuées de 7 à 11 jours après induction de la neuropathie. Afin d'éviter les variations dues aux rythmes circadiens, les tissus sont toujours prélevés entre 9h30 et 11h30 et les études comportementales sont toutes réalisées dans les mêmes créneaux horaires.

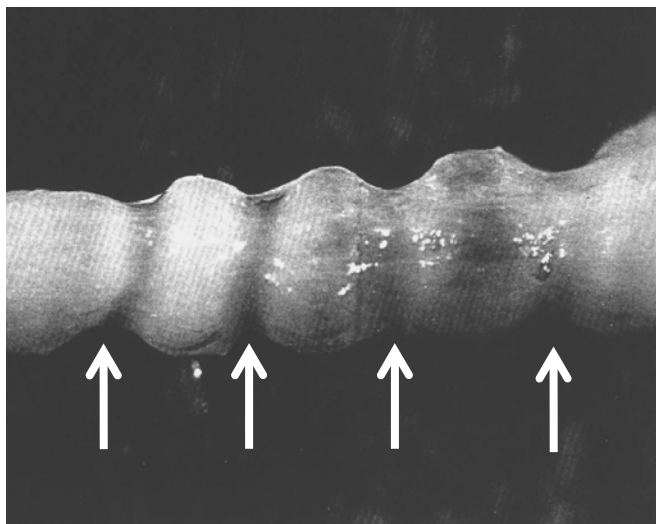


Figure 12: Photographie d'un nerf sciatique 10 jours après la ligature.

Les 4 zones de constriction (flèches) correspondent à l'emplacement des 4 ligatures lâches effectuées sur le nerf.

Bennett et Xie, 1988.

II. Substances pharmacologiques et produits chimiques

Le propylène glycol, la glycine, la strychnine hydrochlorée, la (2-hydroxypropyl)- β -cyclodextrine (CDEX) à 45% dans l'eau distillée ont été fournis par Sigma (St Louis, MO, USA). Le produit de synthèse gelsémine vient d'Extrasynthèse (Genay, France). Le chlorure de sodium (NaCl) provient de chez VWR Prolabo (Fontenay-sous-Bois, France). Le *Dulbecco's modified Eagle medium* (DMEM) a été acheté chez Invitrogen Corporation (Paisley, Royaume-Uni).

Les stéroïdes synthétiques incluant la $3\alpha,5\alpha$ -tétrahydroprogestérone ($3\alpha,5\alpha$ -THP), la 5α -dihydroprogestérone (5α -DHP), la progestérone (PROG) et la Provera ont été fournis par Steraloids (Newport, RI, USA). Le dichlorométhane (DCM) a été acheté chez Acros Organics (Noisy Le Grand, France). L'hexane et l'isopropanol viennent de Fischer Bioblock Scientific (Illkirch, France). Les stéroïdes tritiés tels que la $9,11,12$ - $^3\text{H}(\text{N})$ - $3\alpha,5\alpha$ -tétrahydroprogestérone ($[^3\text{H}]3\alpha,5\alpha$ -THP) et la $1,2,6,7$ - $^3\text{H}(\text{N})$ -progestérone ($[^3\text{H}]$ PROG) proviennent de PerkinElmer (Boston, MA, USA). La 17α -hydroxy- $[1,2,6,7$ - $^3\text{H}]$ -progestérone ($[^3\text{H}]17\text{OH}$ PROG) est fournie par Amersham (Piscataway, NJ, USA). L'anticorps polyclonal contre la 3α -HSOR de rat nous a généreusement été donné par le Docteur T.M. Penning

(Département de Pharmacologie, Université de Pennsylvanie, Ecole de Médecine, Philadelphie, PA, USA). L'anticorps monoclonal développé chez la souris et dirigé contre l' α -tubuline provient de chez Santa Cruz Biotechnology Inc. (Heidelberg, Allemagne). L'anticorps monoclonal dirigé contre la protéine nucléaire neuronale (NeuN) et l'anticorps de chèvre anti-lapin conjugué à la *horseradish peroxidase* (péroxidase de raifort) ont été achetés chez Chemicon (Temecula, CA, USA). L'anticorps de chèvre anti-souris conjugué à la *horseradish peroxidase* est fourni par Jackson ImmunoResearch Laboratories Inc. (West Grove, PA, USA). Le sérum non immun d'âne vient de Sigma (St Louis, MO, USA). Les anticorps d'âne anti-souris couplé à l'Alexa-488 (DAM/Alexa-488) et de chèvre anti-lapin couplé à l'Alexa-555 (GAR/Alexa-555) proviennent d'Interchim Molecular Probes (Eugene, OR, USA).

III. Etude de l'action de *Gelsemium sempervirens* et de Gelsémine sur la biosynthèse de $3\alpha,5\alpha$ -THP

Toutes les préparations homéopathiques de *G. sempervirens* et de Gelsémine ont été réalisées par les Laboratoires BOIRON au siège social et unité de production de Sainte-Foy-lès-Lyon (France).

III.1. Préparations des dilutions homéopathiques de *G. sempervirens*

La teinture mère (TM) de *G. sempervirens* (N° de référence: G0B9.2TMGT1E) est obtenue par une macération de 100 g de racines de la plante dans 100 mL d'éthanol à 70% (70% éthanol/30% eau ultra-pure) pendant 10 jours. Après filtration, la composition chimique de la TM est analysée. Ensuite, la TM est diluée au 1/100^{ème} dans de l'eau ultra-pure. La

solution est agitée à très grande vitesse dans un mouvement vertical (150 allers-retours pendant 7,5 sec). Cette étape est spécifique à la fabrication homéopathique et s'appelle la dynamisation. Ainsi, la première dilution homéopathique équivalente à 1 CH est obtenue. Puis, à partir de la dilution 1 CH, la dilution au 1/100^{ème} et la dynamisation sont répétées pour obtenir la dilution 2 CH. Les dilutions en cascade au 1/100^{ème} et la dynamisation sont reproduites jusqu'à atteindre la préparation homéopathique de 15 CH (Figure 13). La bonne reproductibilité des dilutions est garantie par la standardisation et l'automatisation des processus de fabrication. Enfin, les dilutions homéopathiques sont conditionnées dans des ampoules en verre stériles.

III.2. Identification et quantification des constituants de *G. sempervirens* (Figure 14)

La TM de *G. sempervirens* est un liquide jaune-brun composé d'une grande variété de substances telles que de la résine, des lipides, des stérols, d'une anthraquinol, du scopolétol, de coumarine et d'alcaloïdes indoliques (gelsémine, gelsévirine, gelsémicine, gelsédine et sempervirine).

La gelsémine et la sempervirine représentent les principes actifs majoritaires contenus dans la TM de *G. sempervirens*. Les Laboratoires BOIRON contrôlent les TM de *G. sempervirens* obtenues à partir de lots différents de *G. sempervirens* afin d'assurer une reproductibilité des composants présents dans la TM et donc de garantir une constante dans la fabrication des dilutions homéopathiques de *G. sempervirens*. Il s'agit donc de vérifier la présence de sempervirine et la quantité de gelsémine présente dans la TM.

La sempervirine est identifiée par chromatographie sur couche mince (CCM) sur plaque au gel de silice. La solution témoin comprend du scopolétol et du nitrate de sempervirine. La solution témoin et la TM (50 µL) sont déposées sur la plaque au gel de

silice. La phase mobile est constituée d'acide acétique glacial, d'eau et de butanol (10:10:40 V/V/V). La migration est réalisée sur 10 cm. La détection des bandes est observée en lumière U.V. à 365 nm. Parmi les bandes observées dans la solution de TM, une bande bleue possède le même temps de migration que le scopolétol alors qu'une bande de couleur bleu-violet possède la même distance de migration que la sempervirine. Cette technique permet de déterminer la présence de sempervirine dans la TM mais en aucun cas de quantifier la concentration de sempervirine contenue dans la TM.

La présence de la gelsémine est identifiée par chromatographie liquide avec une colonne de gel de silice octadécylsilylé. La solution standard est constituée de gelsémine synthétique. La TM et la solution standard (20 μ L) sont déposées sur la colonne et éluées avec une solution de butylamine/eau/méthanol (0,1:22:78 V/V/V). La détection est effectuée à 255 nm. La solution standard permet de déterminer le temps de rétention de la gelsémine. Le chromatogramme obtenu avec la TM met en évidence un composé qui possède le même temps de rétention que la gelsémine synthétique. La teneur en gelsémine contenue dans la TM est calculée à l'aide de l'expression: $(A_1 \times m_2)/(A_2 \times m_1 \times 5)$ où A_1 est l'aire correspondant au pic de gelsémine présent dans le chromatogramme de la solution à examiner, A_2 est l'aire correspondant au pic de gelsémine synthétique, m_1 la masse en milligrammes de la prise d'essai de la TM et m_2 la masse en milligrammes de gelsémine synthétique de la solution témoin. **Ce résultat donne une approximation très relative de la quantité de gelsémine contenue dans la TM. Aucun dosage précis n'est réalisé en utilisant des techniques classiques de quantification (RIA, ELISA, par exemple).**

III.3. Préparations de Gelsémine

La solution mère de gelsémine a été obtenue en mélangeant 100 g de gelsémine synthétique à 100 mL d'éthanol 70%. Puis, les dilutions homéopathiques de gelsémine ont été préparées à l'identique de celles de *G. sempervirens*, à savoir des dilutions en cascade au 1/100^{ème} suivies de l'étape de dynamisation 15 fois de suite pour atteindre les préparations homéopathiques 15 CH.

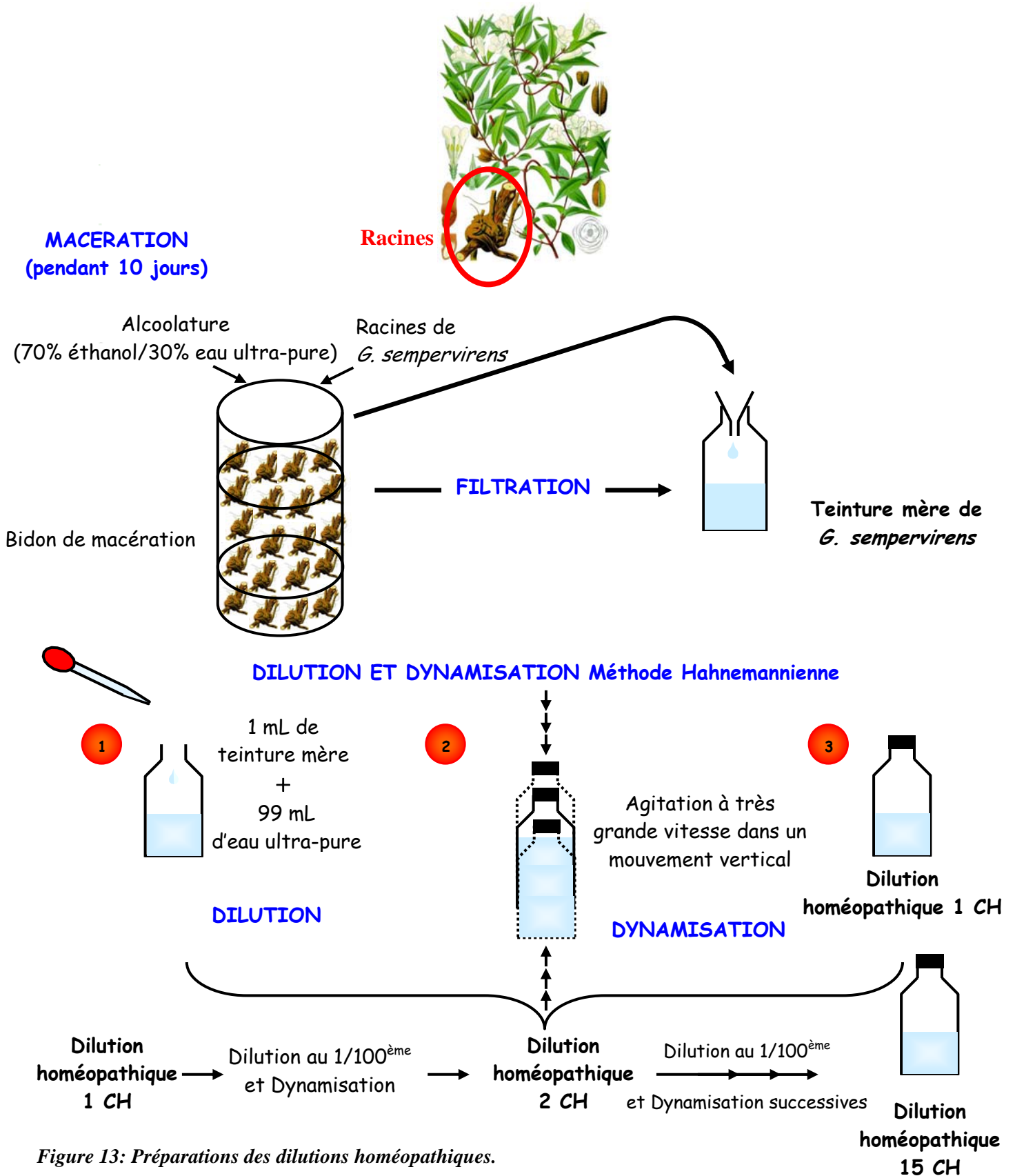


Figure 13: Préparations des dilutions homéopathiques.

La réalisation des préparations homéopathiques est effectuée en suivant les étapes suivantes : après **macération** des racines de la plante *G. sempervirens* et **filtration**, la teinture mère obtenue va subir une série de déconcentrations par des **dilutions** au 1/100^{ème} et un processus de **dynamisation** successifs (méthode hahnemannienne) permettant d'arriver jusqu'à la dilution homéopathique 15 CH.

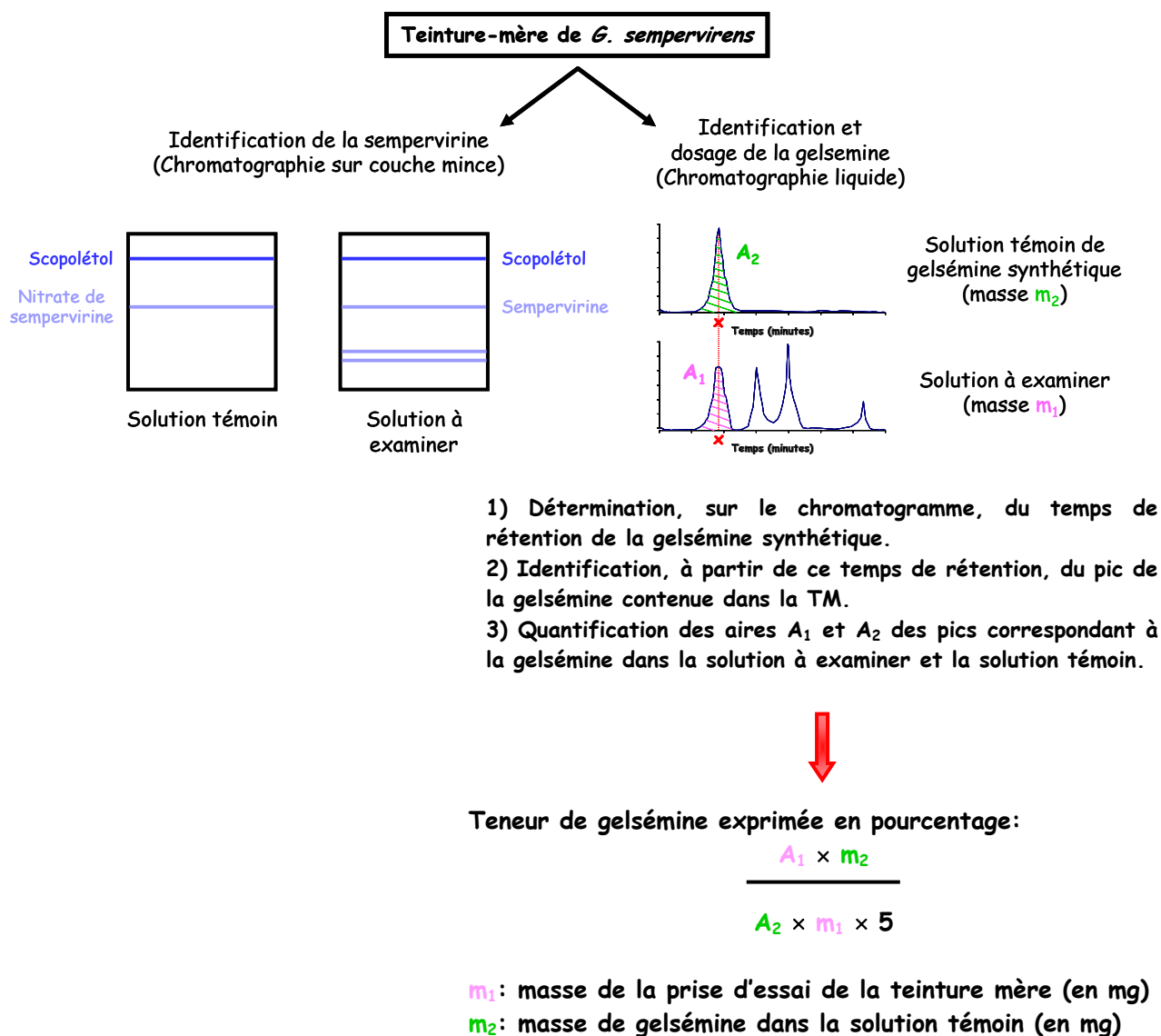


Figure 14: Identification et quantification des composants de la teinture mère de *G. sempervirens*.

Les substances contenues dans la TM de *G. sempervirens* sont identifiées par la technique de chromatographie sur couche mince sur plaque au gel de silice (pour la sempervirine) et quantifiées par chromatographie liquide (pour la gelsémine) en ayant pour référence une solution témoin contenant la molécule à déterminer.

IV. Etude de l'activité biologique des enzymes de synthèse des neurostéroïdes *in vitro*: conversion de la [³H]PROG en [³H]neurostéroïdes

IV.1. Incorporation de la progestérone tritiée dans des tranches de ME et d'H-A de rats (technique de pulse-chase, voir Figure 15)

Pour ces expériences, 200 mg de tranches de ME lombaire (contenant à la fois les cornes dorsales et ventrales ou seulement la moitié dorsale ou ventrale séparément) ou 15 mg de tranches d'H-A sont d'abord rincées pendant 15 min dans 1,5 mL de NaCl 0,9% à 37°C. Les tranches sont ensuite incubées pendant 3h à 37°C dans 1,5 mL de NaCl 0,9% (pH 7,4) contenant 50 nM de [³H]PROG stabilisée par 1% de propylène glycol. L'incubation se fait dans une atmosphère saturée en eau (95% air, 5% CO₂) permettant de maintenir le pH à 7,4. A la fin de la période d'incubation, la réaction est arrêtée en ajoutant 500 µL de NaCl 0,9% froid (4°C) et en transférant les tubes dans un bac à glace (4°C). Le milieu d'incubation est utilisé pour l'extraction des neurostéroïdes sécrétés par les cellules. Les tranches de ME sont rincées et ensuite broyées dans du NaCl 0,9% pour l'extraction des neurostéroïdes néosynthétisés dans le tissu mais non encore excrétés. Le milieu d'incubation et les broyats sont ensuite extraits trois fois par 2 mL de DCM. Les stéroïdes sulfatés très hydrophiles restent dans la phase aqueuse. La phase organique contenant les stéroïdes non conjugués est récupérée et évaporée sous vide dans un évaporateur rotatif (Speed-Vac, Jouan, St Herblain, France). L'extrait sec obtenu est repris par 2 mL d'une solution hexane (50%)/isopropanol (50%). L'échantillon obtenu est ensuite prépurifié sur colonne Sep-pak C₁₈ (Waters Associates, Milford, MA, USA) par 4 mL d'hexane (50%)/isopropanol (50%). L'extrait

prépurifié est à nouveau évaporé au Speed-Vac et conservé à -20°C avant l'analyse en chromatographie liquide haute performance (HPLC).

IV.2. Caractérisation des neurostéroïdes néosynthétisés dans la ME et l'H-A par le couplage HPLC-Flo/One

Les neurostéroïdes néosynthétisés dans les tranches de ME et d'H-A à partir du précurseur [³H]PROG sont caractérisés en analysant les extraits prépurifiés sur colonne Sep-pak avec une méthode préalablement validée (Mensah-Nyagan *et al.*, 1994, 1996a,b, 2001a,b; Patte-Mensah *et al.*, 2003, 2004a, 2005; Kibaly *et al.*, 2005; Saredi *et al.*, 2005; Schaeffer *et al.*, 2006, 2008a,b). Cette méthode combine l'analyse HPLC en phase inverse avec la détection en flux continu des stéroïdes radioactifs en utilisant un détecteur à scintillation liquide (Radiomatic Flo-One/Beta A-500, Packard Instruments, Meriden, CT, USA). Le système HPLC utilisé est un chromatographe liquide Gilson (pompe 322, détecteur UV/VIS 156, Unipoint system, Gilson, Middleton, WI, USA) équipé d'une colonne SymetryShield C₁₈ Waters (4,6 × 250 mm) qui est équilibrée avec de l'hexane pur. Les neurostéroïdes tritiés dérivés de la [³H]PROG sont élués sur la colonne à un débit de 0,5 mL/min en suivant un gradient d'isopropanol allant de 0 à 60% pendant 65 min avec 5 phases isocratiques respectivement à 0%, 1%, 2%, 30% et 60%. Les neurostéroïdes radioactifs néosynthétisés sont directement quantifiés à la sortie de la colonne HPLC par le système Flo/One équipé d'un ordinateur pentium IV (Dell-Computer-France, Lyon, France) permettant l'analyse simultanée des données. Des stéroïdes synthétiques standards utilisés comme référence ont été analysés dans les mêmes conditions que les extraits, et leur temps d'éluion déterminé par le détecteur UV/VIS 156 intégré au système Gilson. Les positions des temps d'éluion des stéroïdes changent sur les colonnes analytiques après la purification d'un certain nombre

d'extraits tissulaires. Par conséquent, afin d'optimiser la caractérisation des neurostéroïdes néosynthétisés, des stéroïdes neuroactifs tritiés synthétiques incluant la [³H]PROG et la [³H]3 α ,5 α -THP ont été utilisés comme des standards de référence, chromatographiés sous les mêmes conditions que les extraits à analyser et identifiés par leur temps d'élution respectif avec le système Flo/One avant et après chaque passage de l'échantillon.

IV.3. Quantification de la biosynthèse des neurostéroïdes et analyse statistique

Les taux de neurostéroïdes radioactifs néoformés à partir de la conversion de la [³H]PROG sont exprimés en pourcentage de la radioactivité totale mesurée par le système HPLC-Flo/One (y compris la radioactivité détectée au niveau du pic correspondant à la [³H]PROG utilisée comme précurseur). Chaque neurostéroïde néosynthétisé est représenté par un pic et c'est l'aire mesurée sous ce pic qui est ensuite rapportée à la radioactivité totale ($\times 100$) pour déterminer le taux du neurostéroïde considéré. Chaque valeur correspond à la moyenne (\pm SEM) de quatre expériences indépendantes. L'évaluation statistique des résultats est réalisée par une ANOVA suivie d'un test de Bonferroni pour les analyses multi-paramétriques.

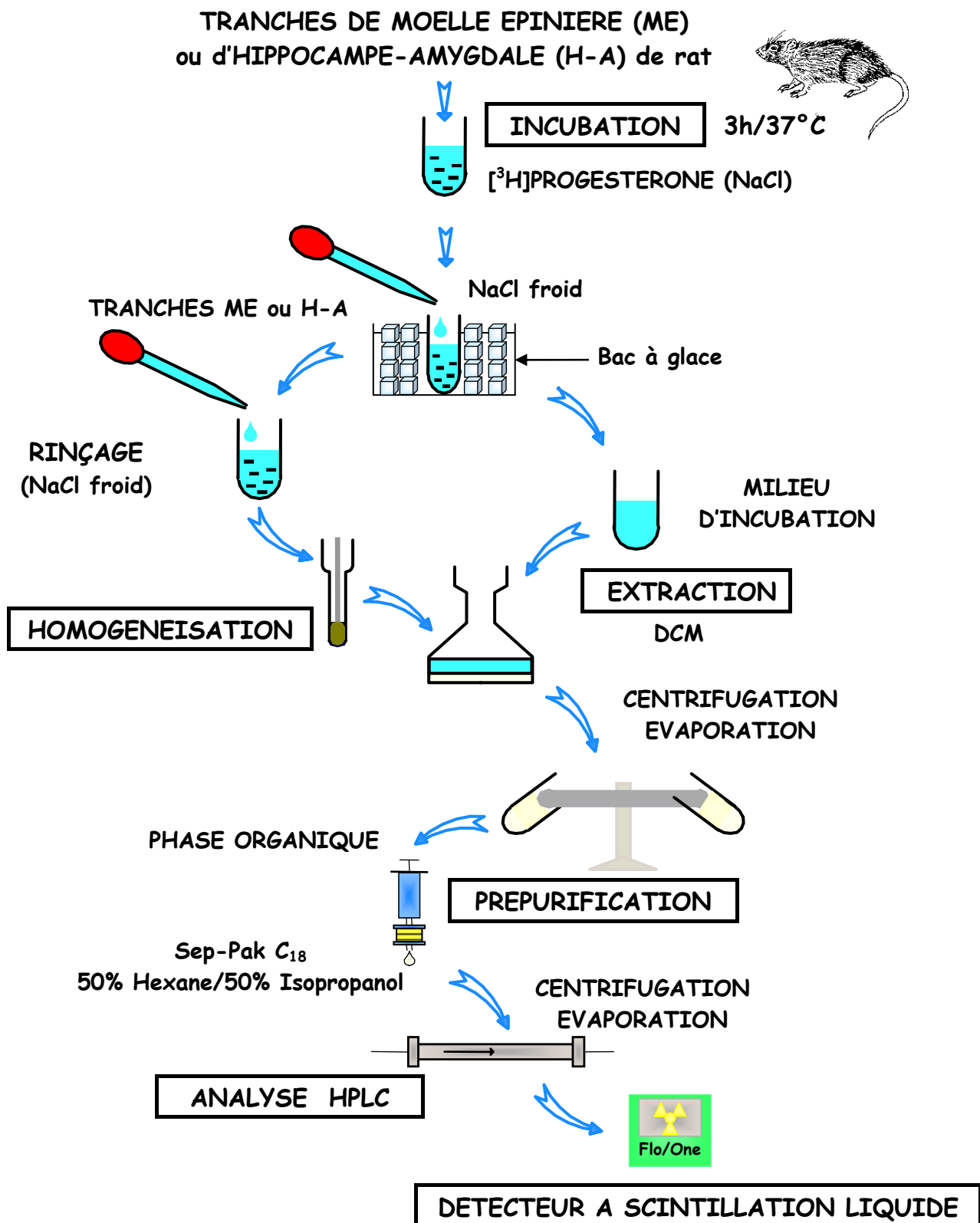


Figure 15: Technique de pulse-chase.

Cette méthode biochimique permettant la mise en évidence de l'activité biologique d'une enzyme consiste en la mesure de métabolites radioactifs produits à partir d'un précurseur radioactif incorporé dans un tissu. Le pulse-chase comprend plusieurs étapes: (1) incorporation du précurseur radioactif, (2) homogénéisation du tissu, (3) extraction des neurostéroïdes et (4) prépurification des extraits de stéroïdes radioactifs.

V. Analyse de l'expression du gène codant la 3 α -HSOR par couplage Reverse Transcription - PCR quantitative en temps réel

V.1. Principe général d'une PCR

La transcription inverse (*reverse transcription* ou RT) consiste à copier *in vitro* des ARN totaux, extraits des tissus étudiés, en ADN complémentaire (ADNc) grâce à l'action de l'enzyme transcriptase inverse. La réaction de polymérisation en chaîne (*Polymerase Chain Reaction* ou PCR) qui met en jeu une ADN polymérase, amplifie les molécules d'ADN obtenues utilisées comme matrice. Un fragment de l'ADNc cible est multiplié en utilisant un couple d'amorces spécifiques correspondant à la séquence d'ADN d'intérêt. Le principe de l'amplification *in vitro* repose sur la répétition de trois processus : (i) la **dénaturation** des deux brins de l'hybride ARN/ADNc, (ii) l'**hybridation** d'oligonucléotides spécifiques (amorces) complémentaires d'une séquence cible d'ADN à une température d'hybridation spécifique, et (iii) la réaction d'**élongation** par une ADN polymérase thermostable (*Taq polymerase*) à partir des oligonucléotides.

Afin de recueillir des données quantitatives avec précision, nous avons utilisé la technique de PCR quantitative en temps réel (rtPCR) qui présente de nombreux avantages par rapport à une PCR conventionnelle.

V.2. Principe de la PCR quantitative en temps réel ou rtPCR

Au cours d'une PCR conventionnelle, il existe une relation entre la quantité de la séquence cible de départ et la quantité de produits amplifiés à n'importe quel cycle. Mais en pratique, il n'est pas rare que les PCR donnent des taux différents d'amplicons. Le développement de la rtPCR quantitative a permis d'éliminer les variabilités traditionnelles associées à la PCR conventionnelle grâce à la quantification du produit de PCR de façon fiable et routinière. Cette technologie est basée sur la détection et la quantification d'un indicateur fluorescent (SYBR Green I) dont l'émission est directement proportionnelle à la quantité d'amplicons générés pendant la réaction de PCR (Figure 16). La rtPCR quantitative fait donc le suivi de la fluorescence émise pendant la réaction avec un indicateur de production des amplicons durant chaque cycle, à l'opposé de la PCR conventionnelle où les amplicons ne sont détectés qu'à la toute fin du processus. Etant donné que la rtPCR utilise des systèmes en tubes fermés et que la quantification ne requiert aucune manipulation postérieure à l'amplification, les problèmes de contamination post-PCR sont significativement réduits.

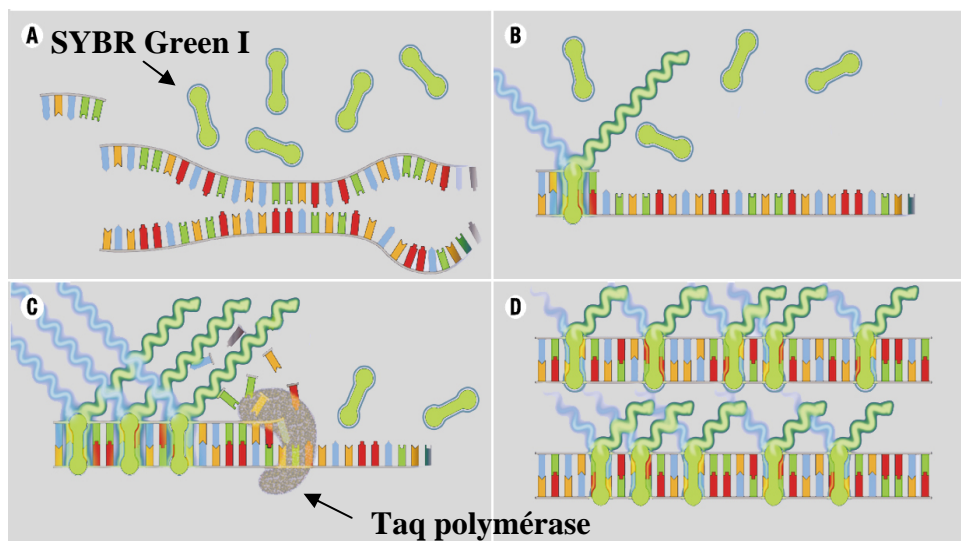


Figure 16: Mode d'action du SYBR Green I.

(A) Durant la **phase de dénaturation**, l'indicateur fluorescent SYBR Green I libre exhibe peu de fluorescence. (B) A la **température d'hybridation**, quelques molécules se lient au double brin d'ADN naissant, résultant en une émission de fluorescence lors de l'excitation. (C) Durant la **phase de polymérisation** effectuée par la Taq polymérase, de plus en plus de molécules de SYBR Green I se lient au double brin naissant et l'accroissement de la fluorescence peut être suivi en temps réel. (D) Le niveau de fluorescence est proportionnel au nombre de copies d'ADN obtenues.

V.3. Protocole

V.3.1. Extraction des ARN et RT

Après euthanasie des animaux, les tissus (la ME lombaire et les testicules) sont rapidement prélevés et les ARN totaux extraits en une étape. Cette extraction est réalisée par homogénéisation des tissus dans le réactif TRIzol en suivant les instructions du fabricant (Invitrogen Corporation, Paisley, UK): 1 mL de TRIzol pour 50 à 200 mg de tissu. Le TRIzol est composé d'isothiocyanate de guanidium (un dénaturant des protéines chaperonnes liées aux ARN) et de phénol (qui précipite les protéines). Cette solution est complétée par un rajout

de chloroforme (0,2 mL/mL de TRIzol) pour séparer parfaitement la phase aqueuse contenant les ARN de la phase organique contenant les protéines et l'ADN. La séparation des différentes phases est améliorée par une centrifugation à 12000g pendant 15 min à 4°C. Les ARN sont prélevés et précipités à l'isopropanol (0,5 mL/mL de TRIzol) pendant 10 min à température ambiante. Après une centrifugation à 12000g pendant 10 min à 4°C, les ARN contenus dans le culot sont dissous dans de l'eau stérile préalablement traitée au diéthylpyrocarbonate 0,1% (DEPC 0,1%) afin d'inactiver les RNases (Figure 17). Deux méthodes différentes ont permis de s'assurer de la qualité des ARN extraits des tissus. Une vérification de la qualité des ARN est faite par des expériences d'électrophorèse sur gel d'agarose en présence de bromure d'éthidium. Cette vérification est complétée par des mesures de densité optique à deux longueurs d'onde d'absorption à savoir 260 nm et 280 nm. Les ARN sont de bonne qualité lorsque le rapport $DO_{260\text{ nm}}/DO_{280\text{ nm}}$ est supérieur à 1,7. L'absorbance à 260 nm permet également de calculer la concentration des ARN contenus dans le culot. Sachant qu'une mesure de DO à 260 nm correspond à 40 ng/ μ L d'ARN totaux, la concentration en ng/ μ L est donnée par la formule: $[\text{ARN}]_{\text{totaux}} = DO_{260\text{ nm}} \times 40$. Les ARN sont stockés à -80°C jusqu'à la réalisation de la transcription inverse.

La synthèse d'ADNc (RT) est réalisée à partir de 10 μ g d'ARN totaux en présence de 0,4 μ g d'amorces non spécifiques [pd(N)6 random primer; Pharmacia, Milan, Italie], de 160 U de l'enzyme transcriptase inverse *Moloney murine leukaemia virus* (M-MLV) (Amersham Biosciences Europe, Freiburg, Allemagne) et de 2 mM d'un mélange de déoxytrinucléotides phosphate (dNTPs: dATP, dGTP, dCTP et dTTP) (Fermentas Inc., Hanover, MD, USA) dans un volume final de 40 μ L de solution tamponnée fournie avec l'enzyme (Tableau 2). Le mélange réactionnel est incubé à 37°C pendant 1h au bain-marie puis les produits de transcription inverse sont stockés à -20°C jusqu'à la réalisation de la rtPCR (Figure 18).

Produits	Concentrations ou quantités finales
▪ ARN totaux	10 µg
▪ Amorces non spécifiques (random primer)	0,4 µg
▪ Solution tamponnée 5×	1×
▪ dNTP	2 mM
▪ Transcriptase inverse (M-MLV)	160 U
▪ Eau stérile	qsp 40 µL

Tableau 2: Tableau récapitulatif des produits nécessaires à la transcription inverse.

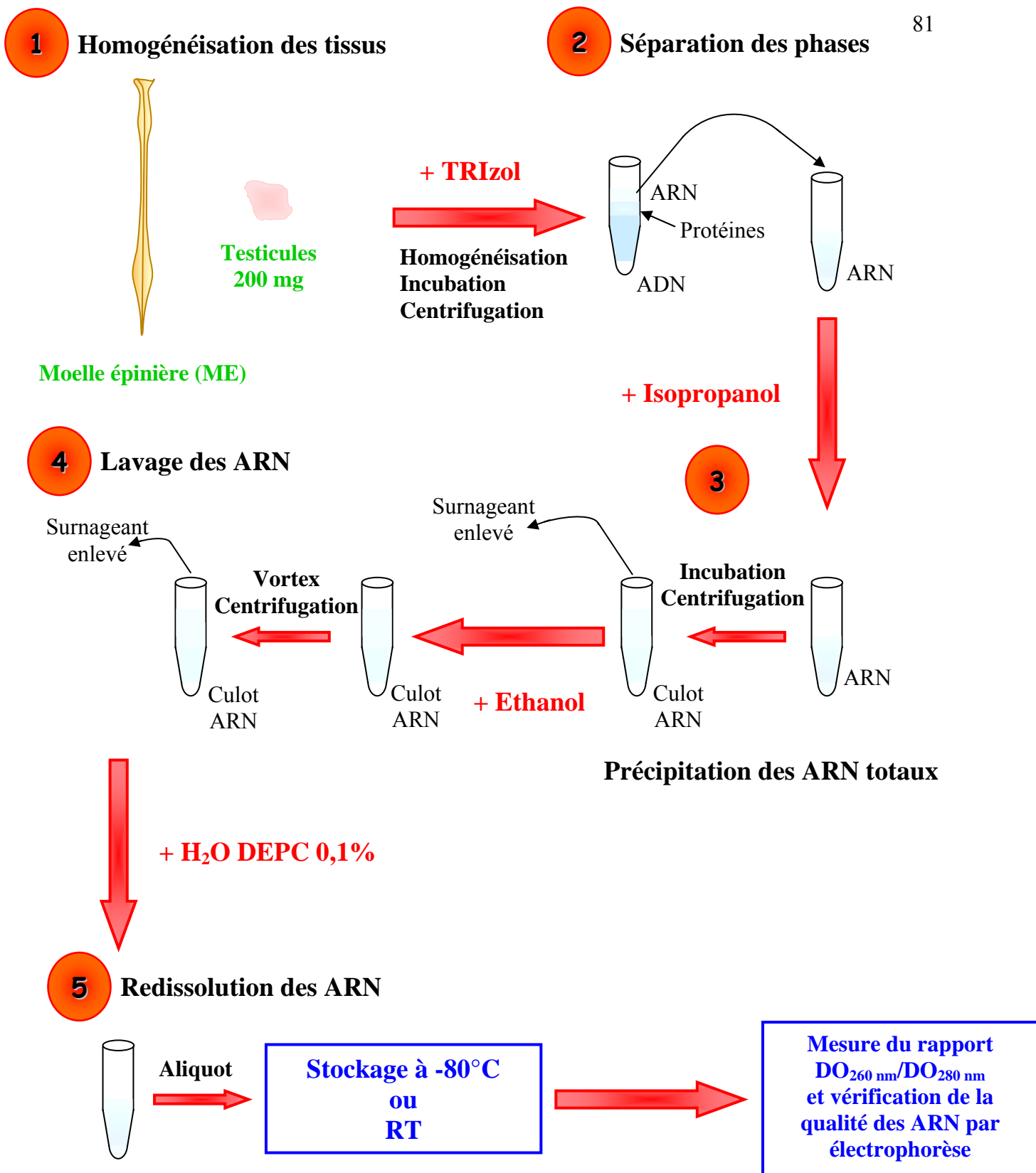


Figure 17: Extraction des ARN totaux de la ME et des testicules.

L'extraction des ARN totaux des tissus étudiés requiert plusieurs étapes dont (1) l'homogénéisation, (2) la séparation des différentes phases d'ARN, de protéines et d'ADN, (3) la précipitation des ARN, (4) le lavage des ARN et (5) la redissolution des ARN totaux.

TRANSCRIPTION INVERSE (RT)

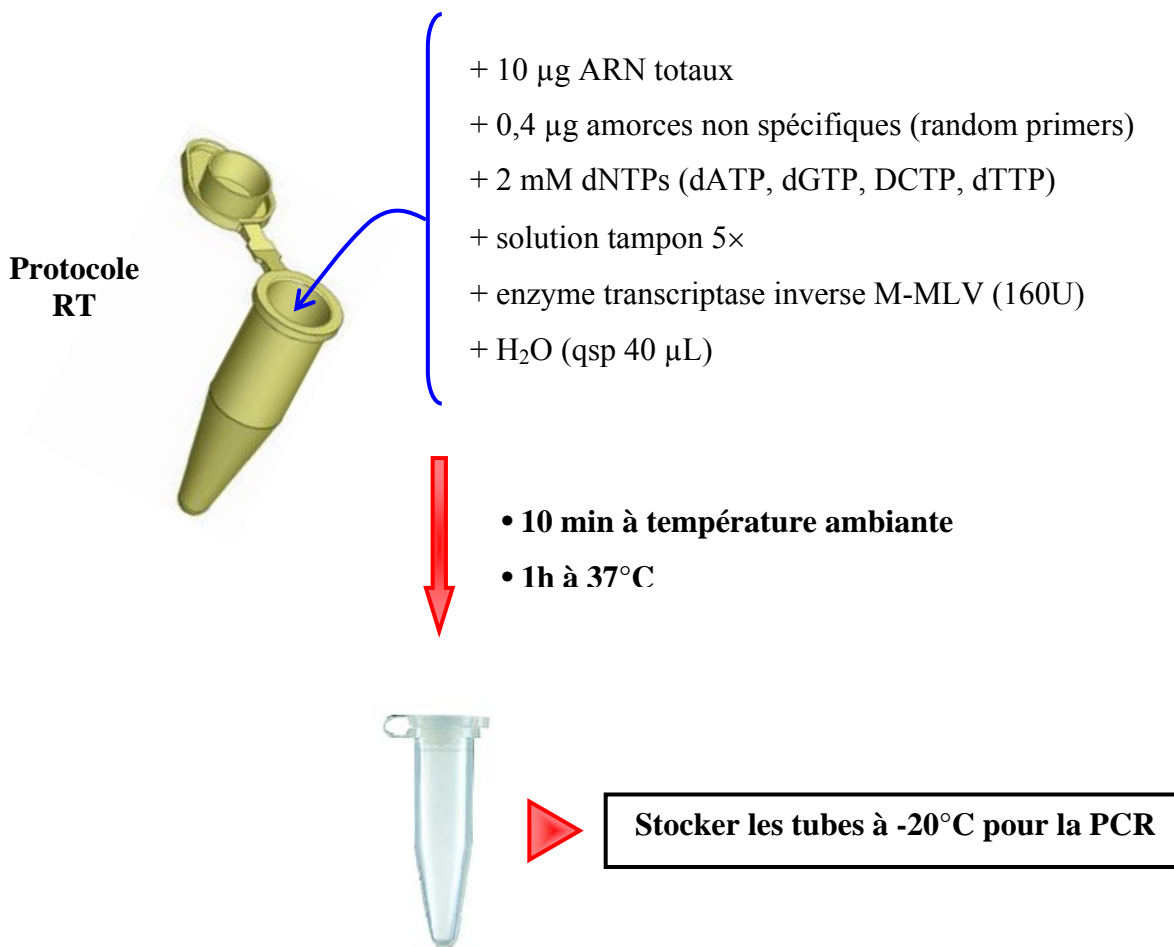


Figure 18: Transcription inverse (RT) des ARN totaux en ADNc.

La RT réalisée à partir de 10 µg d'ARN totaux nécessite la présence d'amorces non spécifiques, de l'enzyme transcriptase inverse M-MLV et des dNTPs, le tout mélangé dans une solution tamponnée.

V.3.2. PCR quantitative en temps réel

La rtPCR quantitative est réalisée à l'aide d'un Light Cycler (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Allemagne) (Figure 19).



Figure 19: Photographie du Light Cycler permettant la réalisation de la PCR quantitative en temps réel ou rtPCR (Roche Diagnostics).

www.labcentral.com

La sonde spécifique utilisée pour la rtPCR de la 3α -HSOR de rat est la suivante:

- sens: 5'-TTC ATT CCT GTA CTG GG-3' (nucléotides 43-59)
- antisens: 5'-AGT AGC CTT GAT AAC TTC AT-3' (nucléotides 114-94) (Lin *et al.*, 1999).

La sonde spécifique du gène domestique, la glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase (GAPDH) est:

- sens: 5'-ACC ACA GTC CAT GCC ATC AC-3' (nucléotides 3069-3088)
- antisens: 5'-TCC ACC ACC CTG TTG CTG TA-3' (nucléotides 3624-3605) (Clontech Inc., Palo Alto, CA, USA).

La rtPCR est effectuée dans un volume final de 20 μL contenant: 0,5 μg d'ADNc, 0,5 μM de sondes spécifiques, du MgCl_2 à la concentration définie pour chaque sonde et 2 μL du kit *LightCycler-DNA Master SYBR Green I* (Roche Diagnostics GmbH) contenant la SYBR Green I, la *Taq polymerase* et les dNTPs. Un contrôle négatif, appelé « eau » (« water » dans les articles), est réalisé en remplaçant, dans le volume réactionnel, la quantité prévue d'ADNc par de l'eau (Tableau 3).

Produits	Concentrations finales
▪ Magnésium (MgCl_2^{2+})	4 mM
▪ Sonde sens	0,5 μM
▪ Sonde antisens	0,5 μM
▪ Kit Roche Diagnostic (SYBR Green I; Taq polymerase; dNTPs)	2 μL
▪ ADNc	0,5 μg (remplacé par de l'eau dans le contrôle «water»)
▪ Eau stérile	qsp 20 μL

Tableau 3: Tableau récapitulatif des produits nécessaires à une réaction de PCR quantitative en temps réel.

La rtPCR, contrairement à la PCR conventionnelle, est une technique qui permet de quantifier avec précision le nombre d'amplicons formés. Pour cela, il est nécessaire de réaliser une gamme standard qui doit suivre plusieurs critères: (i) elle doit être réalisée dans un tissu différent de celui qui est étudié mais qui exprime fortement le gène d'intérêt. Pour cela, nous avons donc choisi les testicules, tissu riche en enzymes de la stéroïdogénèse; (ii) la rtPCR doit

être pratiquée dans les mêmes conditions et en même temps que les échantillons à doser pour que les courbes d'amplification ou de fusion soient obtenues lors du même programme d'amplification. La gamme standard est obtenue par dilutions successives de l'extrait contenant les ADNc synthétisés à partir des testicules. Le programme d'amplification consiste en une étape de dénaturation de 8 min à 95°C, suivie de plusieurs cycles d'amplification comprenant une étape de dénaturation (5 sec à 95°C), une étape d'hybridation dont la température varie avec la sonde utilisée (soit 5 sec à 55°C pour la sonde de la 3 α -HSOR et 62°C pour la sonde de la GAPDH) et une étape d'élongation de 12 sec à 62°C (3 α -HSOR et GAPDH). La spécificité des produits de rtPCR est vérifiée par une analyse des courbes de fusion obtenues à partir des températures de fusion qui caractérisent de manière spécifique chacun des gènes étudiés. Le niveau de transcrits codant la 3 α -HSOR et la GAPDH dans la ME est déterminé à partir des valeurs de la gamme standard des testicules. Lors d'une PCR conventionnelle, les amplicons sont analysés sur gel d'agarose, à la fin de l'amplification, c'est-à-dire à un niveau où il y a peu ou pas de différence quantitative entre les échantillons. Contrairement à cela, la rtPCR quantitative analyse les amplicons au début de l'amplification (point de sortie ou *crossing point*), là où la différence quantitative est la plus importante entre les échantillons. En effet, le point de sortie, défini comme le point d'intersection entre la tangente de la phase ascendante de l'amplification et la tangente de base de la phase initiale, est directement proportionnel au nombre de copies d'ADNc déjà présentes dans l'échantillon avant l'amplification. Plus le nombre de copies est important, plus le point de sortie se fera tôt dans le cycle. La gamme standard permet de définir une droite logarithmique représentant les valeurs des points de sortie de l'amplification du gène de l'enzyme d'intérêt dans les testicules, en fonction du logarithme du nombre de copies de ce même gène détectées au cours de la rtPCR. Les valeurs des points de sortie de nos échantillons d'intérêt sont alors placées sur la droite logarithmique, le nombre de copies de nos gènes d'intérêt peut être alors

déterminé. Le taux d'ARN messagers (ARNm) de la 3 α -HSOR dans la ME est calculé après normalisation des produits de rtPCR 3 α -HSOR par rapport à la GAPDH.

Les résultats sont exprimés en moyenne (\pm SEM) de quatre expériences indépendantes. La significativité des résultats est déterminée en utilisant le test d'analyse de la variance (ANOVA) suivi des comparaisons *post hoc* de Duncan.

VI. Analyse de l'expression de la protéine 3 α -HSOR par la technique de Western blot

VI.1. Principe

Le Western blot est une technique qui permet la détection d'une protéine spécifique en fonction de son poids moléculaire dans un extrait en utilisant un anticorps spécifique contre cette protéine.

VI.2. Extraction des protéines totales

Après euthanasie des animaux, les tissus (la ME lombaire) sont rapidement prélevés. L'extraction des protéines totales est réalisée par homogénéisation des tissus dans le tampon de lyse contenant un mélange d'antiprotéases (1 \times), de 1 mM de phénylméthylsulfonyl fluoride (PMSF), de 1 mM de Tris-HCl (pH 7,4) et de 1% de Triton X-100 dans de l'eau. Le cocktail d'antiprotéases est utilisé en vue d'inhiber les protéases à sérine (trypsine, chymotrypsine, papaïne), cystéine et métalloprotéases dans les extraits tissulaires. En complément des antiprotéases, le PMSF assure également une fonction d'inhibiteur de protéases. Après incubation des tissus avec le tampon de lyse 15 min à 4°C, la centrifugation

à 16000g pendant 15 min à 4°C permet de séparer la phase protéique des autres constituants des tissus. Le dosage de Bradford avec le kit Bio-Rad Assay (Bio-Rad, München, Allemagne) et la BSA (*bovine serum albumine*) comme standard permet de calculer la concentration des protéines totales contenues dans le surnageant.

VI.3. Analyse par Western blot

Cette technique se fait en plusieurs étapes. Les protéines totales (80 µg) de la ME lombaire sont séparées selon leur taille sur un gel d'électrophorèse *sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide* 12% (SDS 12%) pendant 2h30 à 60 mA dans un tampon de migration contenant 15 mM de Tris-HCl, 130 mM de glycine et 0,1% de SDS. Les protéines présentes sur le gel sont transférées sur une membrane de nitrocellulose (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) grâce à un courant de 70 V pendant 2h30 dans un tampon constitué de Tris/glycine, de méthanol et d'eau (qsp). Les membranes sont ensuite saturées pendant 1h à 25°C dans du tampon *phosphate-buffered saline* (PBS) contenant 0,1% de Tween 20 et 5% de régilait. Puis les membranes sont rincées dans du tampon PBS avec 0,1% de Tween 20 (15 min/rinçage) et incubées toute la nuit à 4°C avec l'anticorps polyclonal anti-3 α -HSOR dilué au 1/20000^{ème} et l'anticorps monoclonal anti- α -tubuline dilué au 1/1000^{ème} dans du tampon PBS contenant 0,1% de Tween 20 et 1% de BSA. Les membranes sont ensuite rincées trois fois dans le PBS contenant 0,1% de Tween 20 (15 min/rinçage) avant d'être incubées pendant 1h à 37°C avec les anticorps de chèvre anti-lapin et anti-souris conjugués à la *horseradish peroxidase* (péroxydase de raifort) dilués, respectivement, au 1/5000^{ème} et au 1/15000^{ème} dans du tampon PBS contenant 0,1% de Tween 20 et 5% de régilait. A la fin de l'incubation, les membranes sont rincées trois fois 15 min dans du PBS contenant 0,1% de Tween 20. Les bandes immunoréactives sont détectées en utilisant le système de chémiluminescence grâce au kit

Enhanced Chemoluminescence Analysis (ECL) (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ, USA). Les niveaux d'expression de la 3 α -HSOR et de l' α -tubuline dans chaque échantillon sont mesurés par le système ARG3 Autoradiography Software 3.09 (Alcatel, Paris, France). La quantité de 3 α -HSOR est calculée après normalisation de la bande de 3 α -HSOR à l' α -tubuline. Les résultats sont exprimés en moyenne (\pm SEM) de quatre expériences indépendantes. La significativité des résultats est déterminée en utilisant le test d'analyse de la variance (ANOVA) suivi des comparaisons *post hoc* de Duncan.

VII. Localisation de la 3 α -HSOR dans la ME

VII.1. Technique d'immunofluorescence

VII.1.1. Principe

La technique d'immunofluorescence indirecte est basée sur la reconnaissance spécifique d'un antigène par son anticorps (anticorps primaire) et la révélation de ce complexe antigène-anticorps grâce à la fixation d'immunoglobulines couplées à un fluorochrome (anticorps secondaire).

VII.1.2. Préparation des coupes

Les animaux sont anesthésiés par injection intrapéritonéale d'uréthane 25% (0,5 mL/100 g) et perfusés par voie intracardiaque successivement avec 100 mL de tampon phosphate 0,1 M (PB; pH 7,4) et 450 mL de solution de fixation (4% formaldéhyde et 0,2% d'acide picrique dans du tampon phosphate). La ME lombaire est ensuite prélevée et postfixée

dans la même solution de fixation pendant 24h à 4°C. L'échantillon est ensuite inclus dans 5% d'agar après la période de postfixation et coupé transversalement en sections fines de 20 µm avec un vibratome VT 1000 S (Leica, Wetzlar, Allemagne). Les coupes de ME sont recueillies dans du PB où elles sont conservées jusqu'à leur utilisation dans un délai de 72h au maximum.

VII.1.3. Réaction immunohistochimique

Des expériences de double marquage sont conduites en incubant pendant 48h à 4°C les coupes de ME lombaire avec un mélange contenant l'antisérum dirigé contre la 3α-HSOR dilué au 1/500^{ème} et l'anticorps monoclonal contre le NeuN dilué au 1/1000^{ème} dans du tampon PB contenant 0,3% de Triton X-100. Les coupes sont ensuite rincées trois fois dans le PB (15 min/rinçage) avant d'être incubées pendant 2h à l'obscurité dans un mélange de GAR/Alexa-555 et de DAM/Alexa-488 dilués au 1/300^{ème} dans du tampon PB contenant 0,3% de Triton X-100. A la fin de l'incubation, les coupes subissent trois rinçages de 15 min dans du PB avant d'être montées dans du Vectashield (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) sur des lames prétraitées avec de la gélatine et de l'alun de chrome. Les préparations sont examinées à l'aide d'un microscope à fluorescence DMR équipé d'une caméra digitale assistée par un ordinateur pentium IV PC (Leica, Microsystems, Wetzlan, Allemagne) en utilisant des fenêtres spécifiques pour la détection de DAM/Alexa-488 (couleur verte) et GAR/Alexa-555 (couleur rouge).

Les photomicrographies sont enregistrées dans un format digital avec un microscope DMR Leica équipé avec une caméra digitale Cool Snap (Roper Scientific, Tucson, AZ, USA). Les images digitales sont assemblées sous Photoshop (Adobe Systems, San Jose, CA, USA) en ajustant seulement la clarté, le contraste et la balance des couleurs. Le nombre de cellules

immunoréactives pour la 3 α -HSOR, de cellules contenant le NeuN ou de cellules doublement marquées est déterminé dans un carré de comptage de 100 \times 100 μm^2 dans les cornes dorsales et ventrales de la ME lombaire de rats naïfs, pseudo-opérés et neuropathiques.

La spécificité de l'immunoréactivité est contrôlée par (i) la substitution de l'antisérum 3 α -HSOR par le PB, (ii) le remplacement de l'antisérum 3 α -HSOR par du sérum de lapin non immun et (iii) la préabsorption de l'anticorps 3 α -HSOR par l'enzyme 3 α -HSOR de foie de rat purifiée utilisée pour immuniser les lapins.

VIII. Analyse comportementale des effets de la 3 α ,5 α -THP et de la Provera sur la sensibilité thermique et mécanique chez des rats témoins et neuropathiques

VIII.1. Procédure d'injection intrathécale transcutanée directe

Les injections intrathécales (i.t.) des molécules testées ont été effectuées selon les descriptions de Hylden et Wilcox (1980). Les animaux sont tout d'abord anesthésiés au minimum pendant 2 min avec un mélange de 4% d'halothane dans de l'O₂/N₂O (30:70 v/v). Ensuite, on insère une aiguille de 26G \times 1/2" à une seringue Hamilton de 50 μL qui est introduite perpendiculairement à travers la colonne vertébrale dans l'espace sub-arachnoïdien entre les vertèbres L4 et L5 (Figure 20).

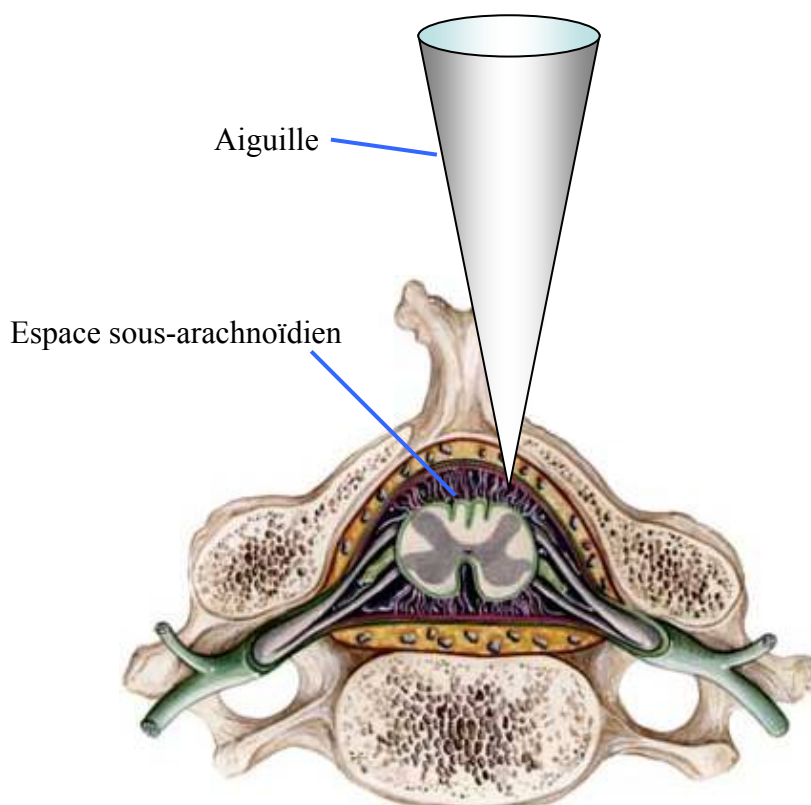


Figure 20: Méthode d'injection intrathécale. Une aiguille connectée à une seringue est introduite perpendiculairement à travers la colonne vertébrale dans l'espace sub-arachnoïdien.

Une insertion correctement effectuée est indiquée par un réflexe prototypique de la queue: lorsque l'aiguille entre dans l'espace sub-arachnoïdien, un mouvement latéral et soudain de la queue est observé (Mestre *et al.*, 1994). La 3 α ,5 α -THP et la Provera sont injectées dans un volume de 20 μ L/250 g dans de la 2-hydroxypropyl- β -cyclodextrine (CDEX 45% dans de l'eau distillée, Sigma). La CDEX 45% est utilisée comme véhicule (VEH).

VIII.2. Le test du PLANTAR

Principe général du test

Le test du Plantar (Ugo Basile, Comerio, Italie) permet d'évaluer l'*hyperalgie thermique*, en mesurant la latence de retrait de la patte des animaux en réponse à une stimulation thermique chaude (Hargreaves *et al.*, 1988). Les rats sont placés individuellement dans des boîtes (23 × 18 × 14 cm) montées sur un support, l'ensemble étant en Plexiglas transparent. Une unité électronique, source du stimulus thermique chaud, est placée par l'expérimentateur sous la surface médiane plantaire de la patte postérieure de l'animal. Un faisceau infra-rouge émettant de la chaleur émane de l'unité électronique et traverse le support et la base de la boîte pour stimuler la patte. La latence de retrait de la patte est calculée de façon automatisée par un microprocesseur (Figure 21): en effet, l'unité électronique est connectée à un chronomètre qui arrête automatiquement l'émission du faisceau infra-rouge lorsque le rat retire sa patte. La latence de retrait de la patte traduit le seuil de sensibilité au stimulus thermique utilisé. Lorsque l'intensité de la stimulation est suffisamment élevée pour être nocive, la latence de retrait de la patte traduit le *seuil de sensibilité à la douleur*. La limite du temps de la stimulation thermique est placée à 20 sec afin de prévenir tout dommage tissulaire en absence de réponse.

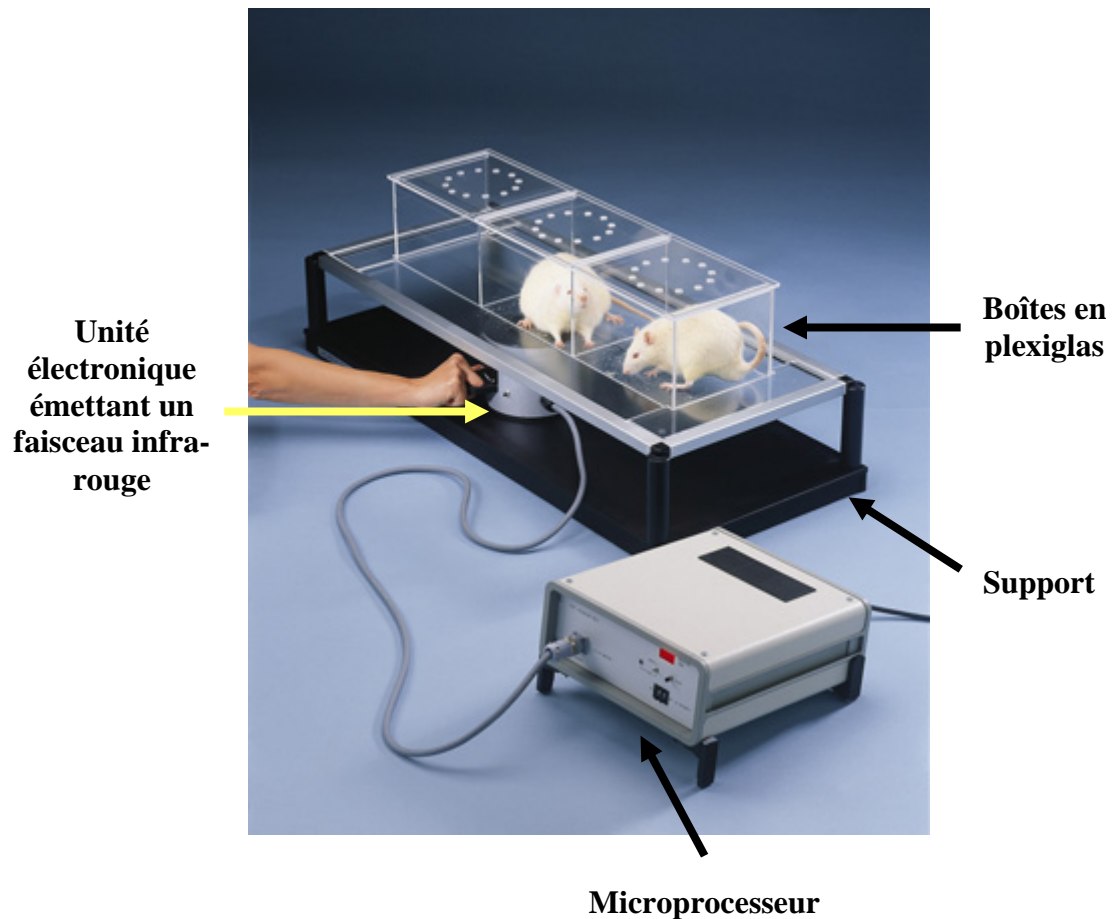


Figure 21: Photographie du dispositif expérimental permettant la mesure du seuil de sensibilité à la douleur thermique (test du Plantar).

Le temps moyen de latence de retrait (en secondes) est déterminé pour chacune des pattes postérieures (ipsilatérale ou controlatérale chez les rats neuropathiques). Ce temps est calculé en faisant la moyenne de 3 mesures répétées sur la patte considérée, et ce à chaque point temporel étudié. La boîte de Plexiglas est rigoureusement nettoyée entre chaque session de test.

VIII.3. Le test des FILAMENTS DE VON FREY

Principe général du test

Le *seuil de sensibilité nociceptive mécanique* est évalué chez des rats placés individuellement dans des boîtes en Plexiglas (30 × 30 × 25 cm) montées sur une grille de métal surélevée permettant ainsi d'accéder à la surface plantaire des pattes postérieures. La présence d'une *allodynie mécanique* est mesurée en utilisant une série de filaments de von Frey calibrés (4, 6, 8, 10, 26, 100, 180 et 300 g; Stoelting, Wood Dale, IL, USA) qui sont appliqués à la surface plantaire de la patte postérieure de l'animal avec une force croissante jusqu'à ce que le filament se torde. Le filament est appliqué pendant une période de 1 à 2 sec et la procédure est répétée 5 fois avec un intervalle de 4 à 5 sec (Figure 22).

Le seuil de retrait de la patte considérée est calculé en faisant la moyenne des 5 stimuli répétés (en g) qui induisent un réflexe de retrait de la patte. Ainsi, à chaque point temporel, 5 mesures ont été obtenues pour chaque patte (un total de 10 mesures par animal).



Figure 22: Photographie du dispositif expérimental permettant la mesure du seuil de sensibilité à la douleur mécanique (test des filaments de von Frey).

VIII.4. Prétests et homogénéisation des groupes

Avant tout traitement ou toute intervention chirurgicale, tous les animaux sont soumis à une période d'habituation à l'expérimentateur et à l'environnement du test, afin d'éviter le stress de la nouveauté. Après cette phase d'habituation, les seuils de sensibilité à la douleur thermique et mécanique sont mesurés chez tous les animaux. La répartition des animaux est ensuite réalisée sur la base de leur seuil initial à la douleur de façon à reproduire exactement la même variabilité interindividuelle au sein de tous les groupes constitués.

VIII.5. Cinétique des effets dose-dépendants des injections intrathécales de 3 α ,5 α -THP ou de Provera sur les seuils nociceptifs thermique et mécanique des rats naïfs

Après le prétest, 42 animaux sont répartis en 3 groupes de 6 rats et 3 groupes de 8 rats qui ont été traités respectivement avec le véhicule (VEH), la 3 α ,5 α -THP à différentes doses 1 (3 α ,5 α -THP 1 mg/kg) et 5 mg/kg (3 α ,5 α -THP 5 mg/kg) et la Provera à différentes doses 10 (Provera 10 mg/kg) et 15 mg/kg (Provera 15 mg/kg). Les seuils de sensibilité à la douleur thermique et mécanique sont ensuite mesurés chez les animaux de chaque groupe et les valeurs obtenues chez les animaux traités aux 2 doses de 3 α ,5 α -THP et aux 2 doses de Provera sont comparées aux valeurs des rats injectés avec le VEH.

VIII.6. Effets des administrations intrathécales de 3 α ,5 α -THP ou de Provera sur les seuils nociceptifs thermique et mécanique des rats neuropathiques

Un total de 36 rats a été utilisé pour cette étude. Après le prétest, les animaux sont répartis en 2 groupes de 18 rats: un groupe est soumis au protocole de pseudo-opération

(groupe Sham-operated) et l'autre au protocole d'induction de la douleur neuropathique (groupe Neuropathic) selon le modèle de Bennett et Xie (voir introduction page 30). Les animaux de chaque groupe sont ensuite re-testés pour déterminer le niveau d'hyperalgie et d'allodynie chez les rats neuropathiques comparés aux rats pseudo-opérés. Une fois l'hyperalgie et l'allodynie bien identifiées chez les rats neuropathiques, un tiers (6 rats) de chaque groupe d'animaux est traité avec la Provera (15 mg/kg), l'autre tiers avec la $3\alpha,5\alpha$ -THP (5 mg/kg) et le dernier tiers avec le VEH. Après les injections, le seuil de sensibilité à la douleur est à nouveau mesuré sur chacune des deux pattes postérieures de tous les animaux (3 mesures 150 min après injection pour le Plantar et 5 mesures 165 min après injection pour le von Frey). Les valeurs obtenues chez les animaux Sham-operated ou Neuropathic traités à la Provera et à la $3\alpha,5\alpha$ -THP sont comparées aux valeurs des rats injectés avec le VEH.

VIII.7. Tests statistiques des études comportementales

Pour déterminer la significativité des variations des seuils de sensibilité thermique et mécanique, des analyses ANOVA à un, deux ou trois facteurs, suivies de tests *post hoc* de Duncan ont été réalisées grâce au logiciel STATISTICA 5.1 (Statsoft, Maisons-Alfort, France). La valeur de l'ANOVA F est présentée sous la forme: $F(\text{degré de liberté du facteur}, \text{degré de liberté de l'erreur})$.

RESULTATS

I. Mise en évidence de l'action de la gelsémine sur la neurostéroïdogénèse: analyse des effets de la glycine, de la strychnine et de la gelsémine sur la biosynthèse d'allopregnanolone dans la moelle épinière de rat

Pour bien situer notre étude sur la gelsémine dans un contexte neurophysiologique significatif, notre démarche a été d'analyser l'action de la gelsémine sur la biosynthèse d'allopregnanolone dans le cadre général des travaux menés dans notre équipe sur la régulation de la neurostéroïdogénèse par les neurotransmetteurs, les neuromodulateurs ou par leurs analogues. En particulier, l'analogie structurale de la gelsémine avec la strychnine, un antagoniste sélectif des récepteurs glycinergiques ou Gly-Rs (Legendre, 2001; Kirsch, 2006), a permis d'intégrer l'identification de l'action de la gelsémine sur la biosynthèse des neurostéroïdes dans le cadre des interactions entre les modulateurs du système glycinergique et la neurostéroïdogénèse. En effet, le neurostéroïde allopregnanolone ($3\alpha,5\alpha$ -THP) et ses analogues sont connus comme des puissants activateurs de l'inhibition centrale en agissant par les récepteurs GABA_A ou Gly-Rs (voir introduction pages 40 à 42). Toutefois, l'action des principaux neurotransmetteurs inhibiteurs, tels que la GABA et la glycine, sur la production de $3\alpha,5\alpha$ -THP est presque totalement inconnue. Quelques rares études antérieures, qui ont évoqué la possibilité d'une action du GABA sur la neurostéroïdogénèse, ne mentionnent aucune donnée sur la biosynthèse de $3\alpha,5\alpha$ -THP (Guarneri *et al.*, 1995; Do-Rego *et al.*, 2000; Mensah-Nyagan *et al.*, 2001b). Plus encore, l'éventualité d'une action de la glycine (deuxième composante majeure de l'inhibition centrale) sur la neurostéroïdogénèse n'a jamais été étudiée. Ainsi, nous avons alors décidé d'utiliser l'approche combinant le pulse-chase, l'HPLC et le Flo/One pour déterminer les effets de la glycine sur la conversion de [³H]PROG en [³H] $3\alpha,5\alpha$ -THP dans des tranches de moelle épinière (ME) de rat. Dans le but de caractériser le récepteur relayant l'action de la glycine, nous avons étudié les effets de

la strychnine sur la formation de $3\alpha,5\alpha$ -THP. Etant donné que les mécanismes d'action de la gelsémine (un alcaloïde possédant les cinq mêmes groupements fonctionnels que la strychnine) sont totalement inconnus, nous avons également recherché l'effet de la gelsémine sur la production de $3\alpha,5\alpha$ -THP, caractérisé le récepteur impliqué dans la médiation de son action et déterminé les effets d'une co-administration de gelsémine et de glycine sur la sécrétion de $3\alpha,5\alpha$ -THP dans la ME de rat.

I.1. Effets de la glycine sur la production de $3\alpha,5\alpha$ -THP dans la ME

Les études analytiques en HPLC-Flo/One couplées aux expériences de pulse-chase ont révélé qu'en 3h d'incubation avec la [3 H]PROG, les tranches de ME convertissent ce précurseur radioactif en divers métabolites tritiés parmi lesquels deux présentent les mêmes temps de rétention que la [3 H]5 α -DHP et la [3 H] $3\alpha,5\alpha$ -THP. La 5 α -DHP est bien connue comme étant un stéroïde intermédiaire sur la voie biochimique transformant la PROG en $3\alpha,5\alpha$ -THP. L'analyse quantitative des effets de différentes concentrations de glycine a montré une action stimulatrice dose-dépendante de la glycine sur la biosynthèse de [3 H]5 α -DHP et [3 H] $3\alpha,5\alpha$ -THP dans la ME. En particulier, la glycine à 1 μ M ou 35 μ M stimule fortement la conversion de [3 H]PROG en [3 H]5 α -DHP (le stéroïde intermédiaire) 3h après le début de l'incubation. A ce moment, l'effet stimulateur de la glycine (1 μ M ou 35 μ M) n'est pas encore visible au niveau du pic correspondant à la [3 H] $3\alpha,5\alpha$ -THP. De façon intéressante, lorsque l'effet stimulateur de la glycine sur la production de [3 H] $3\alpha,5\alpha$ -THP devient visible et optimal à 70 ou 140 μ M, l'augmentation transitoire du niveau de stéroïde intermédiaire ([3 H]5 α -DHP) n'est plus détectable compte tenu de la rapidité de la réaction enzymatique produisant la [3 H] $3\alpha,5\alpha$ -THP.

I.2. Caractérisation pharmacologique du récepteur relayant l'effet de la glycine

Le récepteur impliqué dans la médiation de l'effet de la glycine sur la biosynthèse de [³H]3 α ,5 α -THP a été déterminé en utilisant l'alcaloïde strychnine bien connu comme un antagoniste sélectif des Gly-Rs. A 10⁻⁵ M, la strychnine, qui n'induit d'elle-même aucune modification de la neurostéroïdogénèse, bloque complètement l'effet stimulateur de la glycine (à la dose efficace de 70 μ M) sur la biosynthèse de 3 α ,5 α -THP.

I.3. Effet de la gelsémine sur la production de 3 α ,5 α -THP dans la ME et caractérisation pharmacologique du récepteur impliqué

Notre étude a révélé que la gelsémine stimule de manière dose-dépendante la conversion de [³H]PROG en [³H]5 α -DHP et [³H]3 α ,5 α -THP dans la moelle épinière. Les pourcentages de stimulation de la biosynthèse de [³H]3 α ,5 α -THP sont de 440%, 460% et 300% respectivement pour les concentrations de gelsémine à 10⁻¹⁰, 10⁻⁸ et 10⁻⁶ M.

Compte tenu de l'analogie de structure entre la gelsémine et la strychnine, nous avons recherché l'implication éventuelle des Gly-Rs dans la médiation des effets de la gelsémine sur la production de 3 α ,5 α -THP. Nous avons observé que la strychnine, qui bloque l'action de la glycine, antagonise également l'effet stimulateur de la gelsémine sur la néosynthèse de [³H]3 α ,5 α -THP dans la ME.

I.4. Effet de l'administration concomitante de glycine et de gelsémine sur la biosynthèse de 3 α ,5 α -THP

Pour approfondir nos connaissances sur le mécanisme d'action de la gelsémine et déterminer les éventuelles interactions entre la glycine et la gelsémine dans la régulation de la biosynthèse de 3 α ,5 α -THP, nous avons étudié les effets d'administrations singulières (glycine seule ou gelsémine seule) et concomitantes (mélange de glycine et de gelsémine) sur la production de 3 α ,5 α -THP dans la ME de rat. La co-administration de glycine à 70 μ M et de gelsémine à 10⁻⁸ M induit un effet stimulateur additif, c'est-à-dire une action stimulatrice plus importante que celle produite par la glycine ou la gelsémine seule.

L'ensemble des résultats obtenus sur l'axe de recherche évoqué ci-dessus a fait l'objet d'un article publié dans Neuroscience. Les figures et illustrations relatives aux résultats décrits se trouvent dans l'exemplaire de l'article joint au mémoire qui permet également d'apporter des informations complémentaires et détaillées sur les résultats.

Signalement bibliographique ajouté par :

L'UNIVERSITÉ DE STRASBOURG
Service Commun de la Documentation

**Regulation of neurosteroid allopregnanolone biosynthesis in the rat spinal cord
by glycine and the alkaloidal analogs strychnine and gelsemine**

C. VENARD, N. BOUJEDAINI, P. BELON, A.G. MENSAH-NYAGAN and C. PATTE-
MENSAH

Neuroscience, 2008, Volume 153, Numéro 1, Pages 154-161

Copyright © 2008 IBRO Published by Elsevier Ltd

Résultats § I.4, p. 102-109 :

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://dx.doi.org/10.1016/j.neuroscience.2008.02.009>

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://scd.unistra.fr/services/peb/>

II. Etude comparative des effets pharmacologiques de la gelsémine et de *G. sempervirens* sur la biosynthèse d'alloprégnanolone dans la moelle épinière et le système limbique

Grâce à son fort pouvoir stimulateur de la neurotransmission inhibitrice, le neurostéroïde $3\alpha,5\alpha$ -THP joue un rôle clef dans la régulation de processus importants tels que la douleur et l'anxiété (Akwa *et al.*, 1999; Barbaccia *et al.*, 2001; Beelli et Lambert, 2005; Pathirathna *et al.*, 2005b; Patte-Mensah *et al.*, 2006). Divers travaux ont démontré que la $3\alpha,5\alpha$ -THP synthétisée directement dans le SNC à partir de précurseurs tels que la progestérone ou la dihydroprogestérone est très efficace dans le contrôle des processus nociceptifs et de l'anxiété en agissant par un mode paracrine ou autocrine (Frye et Walf, 2002; Frye *et al.*, 2004; Patte-Mensah *et al.*, 2004a, 2005; Agis-Balboa *et al.*, 2007; Meyer *et al.*, 2008). En conséquence, une hypothèse a fortement émergé dans la littérature suggérant que les substances capables de stimuler la production de $3\alpha,5\alpha$ -THP dans le SNC seraient très intéressantes pour l'élaboration de stratégies efficaces contre l'anxiété et la douleur (Mok *et al.*, 1992; Korneyev et Costa, 1996; Pinna *et al.*, 2003; Sanna *et al.*, 2004; Hirani *et al.*, 2005; Reddy et Apanites, 2005; Verleye *et al.*, 2005, 2008; Ugale *et al.*, 2007). Toutefois, pour être thérapeutiquement efficaces, les substances candidates doivent être dénuées des effets secondaires tels que les nausées, les vomissements, la dépendance ou les troubles respiratoires provoqués par la majorité des antalgiques et anxiolytiques actuellement disponibles (pour revues, Michael Kaplan et DuPont, 2005; O'brien, 2005; Stevens et Pollack, 2006; Ruan, 2007; Ballantyne et Shin, 2008; Benyamin *et al.*, 2008).

Depuis plusieurs années, les Laboratoires BOIRON commercialisent les préparations homéopathiques de *Gelsemium sempervirens* (*G. sempervirens*) comme des médicaments anxiolytiques (anti-trac) et antalgiques (contre les céphalées) n'induisant pas d'effets

indésirables. Or, les propriétés thérapeutiques attribuées à ces médicaments homéopathiques ne s'appuient sur aucune preuve scientifique issue d'une recherche fondamentale, en particulier, il n'existe pas de données sur les effets cellulaires et les mécanismes d'action de *G. sempervirens* dans le SNC. Dans notre tentative de clarifier cette situation ambiguë, nous avons étudié dans la première partie de la thèse (pages 98 à 109) les effets cellulaires de la gelsémine qui est le principe actif majoritaire présent dans la composition de *G. sempervirens*. Nos résultats ont démontré que la gelsémine stimule de façon dose-dépendante la biosynthèse de $3\alpha,5\alpha$ -THP dans la ME en activant les récepteurs glycinergiques sensibles à la strychnine (Gly-R). Pour déterminer de façon précise les mécanismes d'action cellulaires et pharmacologiques du mélange correspondant à *G. sempervirens*, nous avons combiné des expériences de pulse-chase avec l'analyse HPLC et la détection par scintillation en flux continu pour comparer les effets des préparations homéopathiques de *G. sempervirens* et de gelsémine sur la conversion de [3 H]PROG en [3 H] $3\alpha,5\alpha$ -THP dans le système limbique (hippocampe + amygdale) et dans la ME de rat. Notre intérêt s'est porté sur le système limbique et la ME car ces deux structures nerveuses sont bien connues pour leur rôle crucial respectivement dans le contrôle de l'anxiété et de la douleur (Davis, 1992; Haines *et al.*, 1997; Bremner, 1999; Millan, 1999, 2002; Rauch *et al.*, 2003; Bannerman *et al.*, 2004).

Parmi les dilutions homéopathiques testées dans un intervalle de 5 CH (10^{-10} M en utilisant le nombre de moles de gelsémine comme référence) à 15 CH (10^{-30} M), seules deux dilutions de *G. sempervirens* et de gelsémine sont efficaces pour la stimulation de la biosynthèse de $3\alpha,5\alpha$ -THP dans la ME et le système limbique. Il s'agit des dilutions 5 CH (100% de reproductibilité) et 9 CH (75% de reproductibilité) qui correspondent respectivement à 10^{-10} M et 10^{-18} M en se référant au nombre de moles de gelsémine. Nous avons observé que le pourcentage de stimulation de la biosynthèse de $3\alpha,5\alpha$ -THP induit par *G. sempervirens* est plus important que celui provoqué par la gelsémine. Ce résultat indique

que des faibles concentrations (ou hautes dilutions) de *G. sempervirens* restent très actives pour la stimulation de la sécrétion de $3\alpha,5\alpha$ -THP dans le SNC suggérant que les stratégies thérapeutiques basées sur l'utilisation de *G. sempervirens* pourraient en effet être dénuées d'effets indésirables. Par ailleurs, l'observation d'une capacité stimulatrice de la biosynthèse de $3\alpha,5\alpha$ -THP plus élevée pour *G. sempervirens* (comparée à la gelsémine) témoigne de l'existence d'une synergie positive entre la gelsémine et les autres constituants présents dans la composition de *G. sempervirens* tels que la sempervirine, la gelsémicine ou la gelsénicine (voir composition de *G. sempervirens* présentée dans l'introduction, pages 50 à 52). L'effet stimulateur de *G. sempervirens* ou de la gelsémine à 5 CH est également bloqué par la strychnine, ce qui démontre que les Gly-Rs restent impliqués dans les mécanismes d'action de ces substances même lorsque les dilutions sont réalisées par le mode homéopathique.

L'ensemble des résultats décrits dans ce chapitre constitue des données originales qui démontrent pour la première fois les effets cellulaires et pharmacologiques des préparations homéopathiques de *G. sempervirens*.

Les résultats font l'objet d'un article qui sera bientôt soumis pour publication. Les figures et illustrations relatives aux résultats décrits se trouvent dans l'exemplaire de l'article joint au mémoire qui permet également d'apporter des informations complémentaires et détaillées sur les résultats.

Comparative analysis of the effects of gelsemine and *Gelsemium sempervirens* on neurosteroid allopregnanolone formation in the spinal cord and limbic system

Christine Venard ^a, Naoual Boujedaini ^b, Ayikoe Guy Mensah-Nyagan ^{a,*}, Christine Patten-Mensah ^a

^a *Equipe “Stéroïdes et Pathologies Neurodégénératives”, INSERM U575, Physiopathologie du Système Nerveux, Université Louis Pasteur, Strasbourg, France*

^b *Laboratoires BOIRON, Sainte-Foy-lès-Lyon, France*

* Corresponding author. Equipe “Stéroïdes et Pathologies Neurodégénératives”, INSERM U575, Physiopathologie du Système Nerveux, Université Louis Pasteur, 21 rue René Descartes, F-67084 Strasbourg Cedex, France. Tel: +33 390 241438; fax: +33 388 613347

E-mail address: gmensah@neurochem.u-strasbg.fr (A.G. Mensah-Nyagan)

Abstract

Preparations from *Gelsemium sempervirens* (*G. sempervirens*) are advertised as capable of exerting anxiolytic and analgesic effects. However, basic results supporting this assertion are rare. To clarify the point, we performed, in a first step, pharmacological analyses which showed that gelsemine, the major constituent of *G. sempervirens*, stimulates allopregnanolone (3 α ,5 α -THP) biosynthesis in the rat spinal cord (SC) through activation of glycine receptor (Gly-R). Neurosteroid 3 α ,5 α -THP plays a key role in the control of anxiety and pain. To gain insights into cellular mechanisms of action of *G. sempervirens* itself, we have now compared the effects of *G. sempervirens* and gelsemine on 3 α ,5 α -THP production in the rat limbic system (hippocampus and amygdala or H-A) and SC, two pivotal structures controlling anxiety and pain, respectively. *G. sempervirens* and gelsemine were tested within a dilution range from 5 to 15 CH (10^{-10} – 10^{-30} M in terms of quantity of gelsemine). Two dilutions of *G. sempervirens* or gelsemine, 5 CH (10^{-10} M) and 9 CH (10^{-18} M), were capable of stimulating [3 H]progesterone conversion into [3 H]3 α ,5 α -THP by H-A and SC slices. The stimulatory effect of *G. sempervirens* was higher than that of gelsemine, suggesting a synergism between gelsemine and other constituents of *G. sempervirens*. Strychnine, the selective antagonist of Gly-R, completely blocked *G. sempervirens* and gelsemine effects on 3 α ,5 α -THP production. Altogether, these results constitute the first basic demonstration of cellular and pharmacological effects of *G. sempervirens*. Perspectives are opened for improvement of current therapeutical uses of *G. sempervirens* which are based only on empirical evidence.

Keywords: Allopregnanolone; anxiety; *Gelsemium sempervirens*; glycine receptor; pain; regulation of neurosteroid biosynthesis.

1. Introduction

Neurons and glial cells are capable of synthesizing various bioactive steroids also called neurosteroids which can regulate the nervous system activity via autocrine or paracrine mechanisms (Baulieu et al., 1999; Mellon and Griffin, 2002; Mensah-Nyagan et al., 1999; Patte-Mensah and Mensah-Nyagan, 2008). Pharmacological and behavioral studies have suggested that neurosteroids are involved in the regulation of important neurobiological processes (Baulieu et al., 1999; Dubrovsky, 2006; Majewska, 1992; Schumacher et al., 1996). In particular, the neurosteroid $3\alpha,5\alpha$ -tetrahydroprogesterone ($3\alpha,5\alpha$ -THP), also named allopregnanolone, plays a key role in the modulation of important functions such as neuroprotection, depression, analgesia and anxiety (Akwa et al., 1999; Barbaccia et al., 2001; Belelli and Lambert, 2005; Brinton and Wang, 2006; Griffin et al., 2004; Pathirathna et al., 2005; Patte-Mensah et al., 2006; Pinna et al., 2006; Uzunova et al., 1998, 2006). $3\alpha,5\alpha$ -THP is a potent activator of the central inhibitory transmission which acts through allosteric sites located on γ -amino butyric acid type A ($GABA_A$) receptor (Belelli and Lambert, 2005; Hosie et al., 2006) or on strychnine-sensitive glycine receptor (Gly-R) (Jiang et al., 2006; Maksay et al., 2001). Because $3\alpha,5\alpha$ -THP endogenously synthesized in the central nervous system significantly modulates anxiety or nociceptive mechanisms through paracrine and autocrine modes (Agis-Balboa et al., 2007; Frye and Walf, 2002; Frye et al., 2004; Meyer et al., 2008; Patte-Mensah et al., 2004a, 2005), substances which are capable of stimulating $3\alpha,5\alpha$ -THP formation in neural networks appear as potentially interesting for the development of effective anxiolytic or analgesic therapies (Hirani et al., 2005; Korneyev and Costa, 1996; Mok et al., 1992; Pinna et al., 2003; Reddy and Apanites, 2005; Sanna et al., 2004; Ugale et al., 2007; Verleye et al., 2005, 2008). However, to be therapeutically effective, the candidate substances must be devoid of side effects such as nausea, vomiting, tolerance, dependence or breathing

failure induced by most of the currently available anxiolytic and analgesic drugs (Ballantyne and Shin, 2008; Benyamin et al., 2008; Michael Kaplan and DuPont, 2005; O'brien, 2005; Ruan, 2007; Stevens and Pollack, 2006).

For several years, preparations from the yellow jasmine or *Gelsemium sempervirens* (*G. sempervirens*) are advertised as anxiolytic and analgesic medicines but, surprisingly, scientific results from basic research supporting this assertion are extremely rare. Indeed, except two studies which showed that *G. sempervirens* preparations may prevent stress or development of spontaneous seizures *in vivo* (Bousta et al., 2001; Peredery and Persinger, 2004), there are no fundamental evidence demonstrating that *G. sempervirens* may control neurophysiological processes such anxiety and pain. In particular, the cellular and pharmacological mechanisms of action of *G. sempervirens* are completely unknown. In our endeavor to clarify this ambiguous situation, we have recently investigated the cellular effects of gelsemine, the major active principle in *G. sempervirens* composition, and we observed that gelsemine stimulated dose-dependently $3\alpha,5\alpha$ -THP secretion in the rat spinal cord (SC) through activation of Gly-R (Venard et al., 2008). To gain more insights into the cellular and pharmacological mechanisms of action of *G. sempervirens* itself, we have now combined pulse-chase experiments, high-performance liquid chromatography (HPLC) and flow scintillation detection (Kibaly et al., 2005, 2008; Patte-Mensah et al., 2003, 2004a, 2005; Schaeffer et al., 2006, 2008a,b) to perform a comparative analysis of the effects of *G. sempervirens* and gelsemine preparations on [3 H]progesterone conversion into [3 H] $3\alpha,5\alpha$ -THP in the rat limbic system (hippocampus and amygdala or H-A) and SC. Indeed, the limbic system and SC are well-known for their crucial roles in the modulation of anxiety and pain, respectively (Bannerman et al., 2004; Bremner, 1999; Davis, 1992; Haines et al., 1997; Millan, 1999, 2002; Rauch et al., 2003). We have also characterized pharmacologically the

main receptor involved in the mediation of *G. sempervirens* cellular effects in the limbic system and SC.

2. Materials and methods

2.1. Animals

Adult male Sprague-Dawley rats weighing 300-350 g were used in this study. Animal care and manipulations were performed according to the European Community Council Directives (86/609/EC) and under the supervision of authorized investigators. All experiments were performed minimizing the number of animals used and their suffering in accordance with the Alsace Department of Veterinary Public Health Guide for the Care and Use of Laboratory Animals (Agreement number: 67-186). The animals were obtained from a commercial source (Janvier, Le Genest-Saint-Isle, France) and housed under standard laboratory conditions in a 12 h light/dark cycle with food and water *ad libitum*.

2.2. Chemicals and reagents

Dichloromethane (DCM), propylene glycol and strychnine hydrochloride were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). Hexane and isopropanol were obtained from Fischer Bioblock Scientific (Illkirch, France). The synthesis product gelsemine came from Extrasynthese (Genay, France). Sodium chloride (NaCl) was purchased from VWR Prolabo (Fontenay-sous-Bois, France). Synthetic steroids including PROG, 5 α -dihydroprogesterone (5 α -DHP) and 3 α ,5 α -THP were obtained from Steraloids (Newport, RI, USA). Tritiated steroids such as 1,2,6,7-³H(N)-progesterone ([³H]PROG) and 9,11,12-³H(N)-

3 α ,5 α -tetrahydroprogesterone ($[^3\text{H}]3\alpha,5\alpha\text{-THP}$) were supplied by PerkinElmer (Boston, MA, USA).

2.3. Preparation of gelsemine and *G. sempervirens* dilutions

All gelsemine and *G. sempervirens* dilutions were prepared by BOIRON Laboratories (Sainte-Foy-lès-Lyon, France) from stock solutions of gelsemine and *G. sempervirens* which were diluted with deionized water by using a dilution ratio 1/100 also termed *centesimal hahnemann* or CH dilutions. Therefore, from a stock solution of synthetic gelsemine at 1 M, the first step of dilution or 1 CH leads to a gelsemine solution at 10^{-2} M. Thus, 2 CH corresponds to 10^{-4} M, 5 CH to 10^{-10} M and 15 CH to 10^{-30} M. *G. sempervirens* preparations were also obtained using the same dilution cascade (CH) from a stock solution. The correspondence between CH dilutions of *G. sempervirens* with concentrations in molarity (M) was established by considering the quantity of gelsemine in each preparation. Indeed, gelsemine quantity in *G. sempervirens* stock solution was determined by using a quantitative HPLC method (Fiot et al., 2005; Suchomelová et al., 2007). Briefly, 20 μL of the stock solution of *G. sempervirens* was purified and eluted on the HPLC column using a butylamine/water/methanol (0.1:22:78 V/V/V) gradient. Synthetic gelsemine (20 μL) used as reference standard was chromatographed under the same conditions and its elution position as well as the retention time of gelsemine present in *G. sempervirens* solution were determined by ultra-violet absorption at 255 nm. The amount of gelsemine contained in *G. sempervirens* was calculated considering areas of the peaks corresponding to synthetic gelsemine and endogenous gelsemine eluted from *G. sempervirens* solution.

After each dilution step, all gelsemine or *G. sempervirens* solutions were agitated at high speed. Control solutions were prepared according to the same procedure described above

using only deionized water. All gelsemine and *G. sempervirens* preparations as well as control solutions were kept at 4 °C before use.

2.4. Pulse-chase experiments

For each experiment, 200 mg SC (lumbar segment) or 15 mg H-A slices were preincubated for 15 min in 1.5 mL of 0.9% NaCl at 37 °C. The slices were incubated at 37 °C for 3 h with 1.5 mL of 0.9% NaCl (pH 7.4) containing 50 nM [³H]PROG supplemented with 1% propylene glycol in the presence of tested compounds. The incubation was carried out in a water-saturated atmosphere (95% air, 5% CO₂) which made it possible to maintain the pH at 7.4. At the end of the incubation period, the reaction was stopped by adding 500 µL of ice-cold 0.9% NaCl and transferring the incubation medium in tubes into a cold water bath (0 °C). Newly-synthesized neurosteroids released in the incubation medium were extracted three times with 2 mL of DCM and the organic phase was evaporated on ice under a stream of nitrogen. The dry extracts were redissolved in 2 mL of hexane and prepurified on Sep-Pak C₁₈ cartridges (Waters Associates, Milford, MA, USA). Steroids were eluted with a solution made of 50% isopropanol and 50% hexane. The solvent was evaporated in a RC-10-10 Speed Vac Concentrator and the dry extracts were kept at -20 °C until HPLC analysis. The extraction efficiency was 89 ± 7%.

2.5. HPLC-Flow/One characterization of steroids

The newly-synthesized steroids extracted from the incubation medium already purified on Sep-Pak cartridges were characterized using a previously validated method which combines HPLC analysis and flow scintillation detection (Kibaly et al., 2005, 2008; Patte-

Mensah et al., 2003, 2004a, 2005; Schaeffer et al., 2006, 2008a,b). Briefly, the prepurified extracts were analyzed by reversed-phase HPLC on a liquid chromatograph (322 pump, UV/VIS 156 detector, Unipoint system; Gilson, Middleton, WI, USA) equipped with a 4.6 × 250 mm SymetryShield C₁₈ column (Waters Associates) equilibrated with 100% hexane. The radioactive steroids were eluted at a flow rate of 0.5 mL/min using a gradient of isopropanol (0-60% over 65 min) including five isocratic steps at 0% (0-10 min), 1% (30-35 min), 2% (40-45 min), 30% (50-55 min) and 60% (60-65 min). The tritiated steroids eluted from the HPLC column were directly quantified with a flow scintillation analyzer (Radiomatic Flo/One-Beta A 500; Packard Instruments, Meriden, CT, USA) equipped with a Pentium IV PC computer (Dell-Computer-France, Lyon, France) for measurement of the percentage of total radioactivity contained in each peak. Synthetic steroids used as reference standards were chromatographed under the same conditions as the extracts obtained from the incubation media and their elution positions were determined by ultraviolet absorption using a UV/VIS 156 detector (Gilson).

The elution positions of steroids change on analytic columns after the purification of a certain number of tissue extracts. Therefore, to optimize the characterization of newly-synthesized neurosteroids, synthetic tritiated neuroactive steroids including [³H]PROG and [³H]3 α ,5 α -THP were also used as reference standards, chromatographed under the same conditions as the extracts and identified by their elution times with the Flo/One computer system before and after each extract analytic run.

2.6. Quantification of 3 α ,5 α -THP released by the SC and H-A slices and statistical analysis

The amount of [³H]3 α ,5 α -THP newly-synthesized from [³H]PROG and released by H-A or SC slices in the incubation medium was expressed as a percentage of the total

radioactivity contained in all peaks resolved by the HPLC-Flo/One system (after analysis of the incubation medium extracts), including [³H]PROG itself. Each value presented is the mean (\pm S.E.M.) of four independent experiments. Statistical analysis was performed with the 3.05 version of GraphPad InStat (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA). The statistical significance of differences between two groups was assessed with Student's *t*-test. Analysis of variance (ANOVA) followed by Bonferroni's test was applied for multi-parameter analyses. A *P*-value of less than 0.05 was considered significant.

3. Results

3.1. Effects of gelsemine and *G. sempervirens* preparations on 3 α ,5 α -THP production in the SC and H-A

A 3 h incubation of lumbar SC slices with [³H]PROG yielded the formation of various radioactive metabolites (Fig. 1A-C). Reversed-phase HPLC analysis coupled with flow scintillation detection made it possible to resolve two major radioactive metabolites coeluting with [³H]5 α -dihydroprogesterone ([³H]5 α -DHP) and [³H]3 α ,5 α -THP (Fig. 1A-C). The conversion of [³H]PROG into [³H]5 α -DHP and [³H]3 α ,5 α -THP was also observed in H-A (limbic system) slices with the same chromatographic profile as that shown in Fig. 1. Investigations of the effects of gelsemine and *G. sempervirens* on [³H]3 α ,5 α -THP neosynthesis in SC and H-A slices were performed by testing a dilution range from 5 to 15 CH which corresponds to 10⁻¹⁰ M (5 CH) – 10⁻³⁰ M (15 CH) in terms of quantity of endogenous gelsemine effectively detected in each preparation (see Materials and methods). Only two dilutions 5 CH (10⁻¹⁰ M) and 9 CH (10⁻¹⁸ M) of gelsemine and *G. sempervirens* preparations were able to affect [³H]progesterone conversion into [³H]3 α ,5 α -THP in SC (Fig.

2) and H-A (Fig. 3) slices with 100% and 75% reproducibility rates, respectively. No significant effect was detected when gelsemine and *G. sempervirens* preparations were applied at dilutions higher than 9 CH. In the SC, *G. sempervirens* at 5 CH or 9 CH induced a 547% or 673% increase of [³H]3 α ,5 α -THP neosynthesis from [³H]progesterone while gelsemine at 5 CH or 9 CH caused 193% or 72% increase of [³H]3 α ,5 α -THP production, respectively (Fig. 2A, B). In the limbic system or H-A, *G. sempervirens* at 5 CH or 9 CH generated a 178% or 148% enhancement whereas gelsemine at 5 CH or 9 CH evoked 94% or 81% increase of [³H]3 α ,5 α -THP formation (Fig. 3A, B).

3.2. Comparative analysis of the stimulatory capacity of gelsemine and *G. sempervirens* on 3 α ,5 α -THP biosynthesis

In the SC, *G. sempervirens* preparations produced a stronger stimulation of 3 α ,5 α -THP formation than gelsemine. Indeed, the levels of [³H]3 α ,5 α -THP newly synthesized in the presence of *G. sempervirens* at 5 or 9 CH were respectively 1.7 or 1.8 fold higher than in the presence of gelsemine at 5 or 9 CH (Fig. 4).

In the limbic system or H-A slices, *G. sempervirens* at 5 CH increased 3 α ,5 α -THP production 1.5 fold than gelsemine at 5 CH. In contrast, at 9 CH, no significant difference was detected between the increase rates induced by gelsemine (81 \pm 23%) and *G. sempervirens* (148 \pm 9%) on [³H]progesterone conversion into [³H]3 α ,5 α -THP by H-A slices (Fig. 5).

3.3. Pharmacological characterization of the receptor mediating the effects of gelsemine and *G. sempervirens* preparations on 3 α ,5 α -THP biosynthesis in the SC and H-A

Based on our previous observations about synthetic gelsemine at 10^{-8} M (Venard et al., 2008), we investigated whether or not strychnine-sensitive Gly-R may be involved in the mediation of the effects of *G. sempervirens* and gelsemine preparations obtained by CH dilution procedure (Fig. 6 and 7). In a first step, we performed pulse-chase/HPLC-Flo/One experiments in the presence of various concentrations of strychnine, the well-known selective antagonist of Gly-R; we observed that strychnine at 10^{-5} M or 10^{-6} M was completely devoid of action on the formation of [3 H]3 α ,5 α -THP in the SC or H-A, respectively (Fig. 6 and 7). In addition, we found that the stimulatory effect exerted by gelsemine (5 CH) or *G. sempervirens* (5 CH) on [3 H]3 α ,5 α -THP biosynthesis in the SC was completely antagonized by strychnine at 10^{-5} M (Fig. 6A, B). Similarly, in the limbic system or H-A slices, increase of [3 H]3 α ,5 α -THP neosynthesis induced by gelsemine (5 CH) or *G. sempervirens* (5 CH) was completely blocked by strychnine (10^{-6} M) (Fig. 7A, B).

4. Discussion

The present paper provides the first basic evidence supporting the existence of cellular effects of *G. sempervirens* preparations in the limbic system and SC. In addition, the work made possible the identification of pharmacological mechanisms involved in the mediation of *G. sempervirens* and gelsemine action in H-A and SC slices. Thanks to a well-validated approach combining pulse-chase experiments with HPLC analysis and continuous flow scintillation detection (Kibaly et al., 2005, 2008; Patte-Mensah et al., 2003, 2004a, 2005; Schaeffer et al., 2006, 2008a,b), we observed that gelsemine and *G. sempervirens* at 5 CH or

9 CH significantly stimulated [^3H]progesterone conversion into [^3H]3 α ,5 α -THP in H-A (limbic system) and SC slices. Neurosteroid 3 α ,5 α -THP possesses an important therapeutical potential owing to its key role in the regulation of cellular mechanisms involved in anxiety, pain, depression and neurodegeneration (Barbaccia et al., 2001; Belelli and Lambert, 2005; Brinton and Wang, 2006; Patte-Mensah and Mensah-Nyagan, 2008; Patte-Mensah et al., 2006; Pinna et al., 2006; Uzunova et al., 2006). In particular, it has clearly been shown that the endogenous conversion of progesterone into 3 α ,5 α -THP in the limbic system is crucial for the expression of anxiolytic effect of progesterone (Barbaccia et al., 2001; Bitran et al., 1995; Frye and Walf, 2002; Frye et al., 2004). Moreover, we have recently demonstrated that 3 α ,5 α -THP endogenously synthesized in SC exerts a key analgesic action in animals subjected to sciatic nerve injury-induced neuropathic pain (Meyer et al., 2008; Patte-Mensah et al., 2004a). Therefore, it appears that the stimulatory effect exerted by *G. sempervirens* or gelsemine preparations on 3 α ,5 α -THP production in H-A or SC may reflect cellular mechanisms activated by these preparations to induce anxiolytic or analgesic effects. In support of this hypothesis, the presence and activity of 3 α -hydroxysteroid dehydrogenase or 3 α -HSOR (the key enzyme synthesizing 3 α ,5 α -THP) has been evidenced in the limbic system and spinal circuit, suggesting that *G. sempervirens* and gelsemine may increase 3 α ,5 α -THP formation through stimulation of 3 α -HSOR enzymatic activity in H-A and SC neural networks (Agis-Balboa et al., 2006; Krieger and Scott, 1989; Meyer et al., 2008; Patte-Mensah et al., 2004b). Furthermore, it has been demonstrated that the limbic and spinal systems, two pivotal structures modulating respectively anxiety and pain sensation, contain several populations of nerve cells expressing Gly-R (Bannermann et al., 2004; Bremner, 1999; Dudeck et al., 2003; Haines et al., 1997; Kirsch, 2006; Legendre, 2001; Lynch, 2004; Millan, 1999, 2002). Consistently, our pharmacological analyses revealed that strychnine, the selective antagonist of Gly-R (Kirsch, 2006; Legendre, 2001), completely blocked the

stimulatory effect of gelsemine and *G. sempervirens* on $3\alpha,5\alpha$ -THP biosynthesis in H-A and SC slices. Taken together, these results show that gelsemine and *G. sempervirens* preparations, acting through Gly-R located on H-A and SC nerve cells, stimulate 3α -HSOR enzymatic activity which in turn leads to increased production of $3\alpha,5\alpha$ -THP in the limbic system and spinal circuit.

Our comparative analyses also revealed that the stimulatory capacity of *G. sempervirens* on $3\alpha,5\alpha$ -THP biosynthesis in H-A and SC slices is higher than that of gelsemine. This observation indicates that low concentrations of *G. sempervirens* still very effective for the stimulation of $3\alpha,5\alpha$ -THP production in the nervous system and thus it is reasonable to expect only a few or no side effects from *G. sempervirens*-based therapeutical strategies. The highest stimulatory capacity of *G. sempervirens* (compared to gelsemine) on $3\alpha,5\alpha$ -THP formation also suggests the existence of a positive synergism between gelsemine and other constituents present in *G. sempervirens* composition such as sempervirine, gelsemicine and gelsenicine (Kitajima et al., 2003; Schun and Cordell, 1985, 1987). Whether other constituents (different from gelsemine) of *G. sempervirens* modulate also Gly-R in H-A and SC remains a matter of speculation and deserves further investigations even though our pharmacological analyses described herein revealed that the stimulatory action of *G. sempervirens* preparations was totally (not partially) blocked by strychnine.

In conclusion, our results may constitute key basic knowledge on cellular and pharmacological effects of *G. sempervirens* and gelsemine preparations. The data also open new possibilities for the improvement of current therapeutical utilization of *G. sempervirens* which refers only to empirical knowledge but not to fundamental evidence supplied by basic research.

References

- Agis-Balboa, R.C., 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.
- Agis-Balboa, R.C., Pinna, G., Pibiri, F., Kadriu, B., Costa, E., Guidotti, A., 2007. Down regulation of neurosteroid biosynthesis in corticolimbic circuits mediates social isolation-induced behavior in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 104, 18736-18741.
- Akwa, Y., Purdy, R.H., Koob, G.F., Britton, K.T., 1999. The amygdala mediates the anxiolytic-like effect of the neurosteroid allopregnanolone in rat. *Behav. Brain Res.* 106, 119-125.
- Ballantyne, J.C., Shin, N.S., 2008. Efficacy of opioids for chronic pain: a review of the evidence. *Clin. J. Pain* 24, 469-478.
- Bannerman, D.M., Rawlins, J.N., McHugh, S.B., Deacon, R.M., Yee, B.K., Bast, T., Zhang, W.N., Pothuizen, H.H., Feldon, J., 2004. Regional dissociations within the hippocampus--memory and anxiety. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 28, 273-283.
- Barbaccia, M.L., Serra, M., Purdy, R.H., Biggio, G., 2001. Stress and neuroactive steroids. *Int. Rev. Neurobiol.* 46, 243-272.
- Baulieu, E.E., Robel, P., Schumacher, M., 1999. Neurosteroids : a new regulatory function in the nervous system. In: Baulieu, E.E., Robel, P., Schumacher, M. (Eds.), *Contemporary Endocrinology*. Humana Press, Totowa, NJ, pp. 1-377.
- Belelli, D., Lambert, J.J., 2005. Neurosteroids: endogenous regulators of the GABA(A) receptor. *Nat. Rev. Neurosci.* 6, 565-575.

- Benyamin, R., Trescot, A.M., Dattas, S., Buenaventura, R., Aldaka, R., Sehgal, N., Glaser, S.E., Vallejo, R., 2008. Opioids complications and side effects. *Pain Physician* 11, S105-S120.
- Bitran, D., Shiekh, M., McLeod, M., 1995. Anxiolytic effect of progesterone is mediated by the neurosteroid allopregnanolone at brain GABAA receptors. *J Neuroendocrinol* 7, 171-177.
- Bousta, D., Soulimani, R., Jarmouni, I., Belon, P., Falla, J., Froment, N., Younos, C., 2001. Neurotropic, immunological and gastric effects of low doses of *Atropa belladonna* L., *Gelsemium sempervirens* L. and Poumon histamine in stressed mice. *J. Ethnopharmacol.* 74, 205-215.
- Bremner, J.D., 1999. Alterations in brain structure and function associated with post-traumatic stress disorder. *Semin. Clin. Neuropsychiatry* 4, 249-255.
- Brinton, R.D., Wang, J.M., 2006. Therapeutic potential of neurogenesis for prevention and recovery from Alzheimer's disease: allopregnanolone as a proof of concept neurogenic agent. *Curr. Alzheimer Res.* 3, 185-190.
- Davis, M., 1992. The role of the amygdala in fear and anxiety. *Annu. Rev. Neurosci.* 15, 353-375.
- Dubrovsky, B., 2006. Neurosteroids, neuroactive steroids, and symptoms of affective disorders. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 84, 644-655.
- Dudeck, O., Lubben, S., Eipper, S., Knorle, R., Kirsch, M., Honegger, J., Zentner J., Feuerstein, T.J., 2003. Evidence for strychnine-sensitive glycine receptors in human amygdala. *Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol.* 368, 181-187.
- Fiot, J., Baghdikian, B., Boyer, L., Mahiou, V., Azas, N., Gasquet, M., Timon-David, P., Balansard, G., Ollivier, E., 2005. HPLC quantification of Uncarine D and the anti-

- plasmodial activity of alkaloids from leaves of *Mitragyna inermis* (Willd.) O. Kuntze. *Phytochem. Anal.*, 16, 30-33.
- Frye, C.A., Walf, A.A., 2002. Changes in progesterone metabolites in the hippocampus can modulate open field and forced swim test behavior of proestrous rats. *Horm. Behav.* 41, 306-315.
- Frye, C.A., Walf, A.A., Rhodes, M.E., Harney, J.P., 2004. Progesterone enhances motor, anxiolytic, analgesic, and antidepressive behavior of wild-type mice, but not those deficient in type 1 5 alpha-reductase. *Brain Res.* 1004, 116-124.
- Griffin, L.D., Gong, W., Verot, L., Mellon, S.H., 2004. Niemann-Pick type C disease involves disrupted neurosteroidogenesis and responds to allopregnanolone. *Nat. Med.* 10, 704-711.
- Haines, D.E., Mihailoff, G.A., Yezierski, R.P., 1997. The Spinal Cord. In: Haines D.E. (Ed.), *Fundamental Neuroscience*. Churchill Livingstone Inc., New York, NY, pp. 129-141.
- Hirani, K., Sharma, A.N., Jain, N.S., Ugale, R.R., Chopde, C.T., 2005. Evaluation of GABAergic neuroactive steroid 3alpha-hydroxy-5alpha-pregnane-20-one as a neurobiological substrate for the anti-anxiety effect of ethanol in rats. *Psychopharmacology (Berl)*. 180, 267-278.
- Hosie, A.M., Wilkins, M.E., da Silva, H.M., Smart, T.G., 2006. Endogenous neurosteroids regulate GABAA receptors through two discrete transmembrane sites. *Nature* 444, 486-489.
- Jiang, P., Yang, C.X., Wang, Y.T., Xu, T.L., 2006. Mechanisms of modulation of pregnanolone on glycinergic response in cultured spinal dorsal horn neurons of rat. *Neuroscience* 141, 2041-2050.

- Kibaly, C., Patte-Mensah, C., Mensah-Nyagan, A.G., 2005. Molecular and neurochemical evidence for the biosynthesis of dehydroepiandrosterone in the adult rat spinal cord. *J. Neurochem.* 93, 1220-1230.
- Kibaly, C., Meyer, L., Patte-Mensah, C., Mensah-Nyagan, A.G., 2008. Biochemical and functional evidence for the control of pain mechanisms by dehydroepiandrosterone endogenously synthesized in the spinal cord. *Faseb J.* 22, 93-104.
- Kirsch, J., 2006. Glycinergic transmission. *Cell Tissue Res.* 326, 535-540.
- Kitajima, M., Urano, A., Kogure, N., Takayama, H., Aimi, N., 2003. New oxindole alkaloids and iridoid from Carolina jasmine (*Gelsemium sempervirens* Ait. f.). *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)* 51, 1211-1214.
- Korneyev, A., Costa, E., 1996. Allopregnanolone (THP) mediates anesthetic effects of progesterone in rat brain. *Horm. Behav.* 30, 37-43.
- Krieger, N.R., Scott, R.G., 1989. Nonneuronal localization for steroid converting enzyme: 3 alpha-hydroxysteroid oxidoreductase in olfactory tubercle of rat brain. *J. Neurochem.* 52, 1866-1870.
- Legendre, P., 2001. The glycinergic inhibitory synapse. *Cell. Mol. Life Sci.* 58, 760-793.
- Lynch, J.W., 2004. Molecular structure and function of the glycine receptor chloride channel. *Physiol. Rev.* 84, 1051-1095.
- Majewska, M.D., 1992. Neurosteroids: endogenous bimodal modulators of the GABAA receptor. Mechanism of action and physiological significance. *Prog. Neurobiol.* 38, 379-395.
- Maksay, G., Laube, B., Betz, H., 2001. Subunit-specific modulation of glycine receptors by neurosteroids. *Neuropharmacology* 41, 369-376.
- Mellon, S.H., Griffin, L.D., 2002. Neurosteroids: biochemistry and clinical significance. *Trends Endocrinol. Metab.* 13, 35-43.

- Mensah-Nyagan, A.G., Do-Rego, J.L., Beaujean, D., Luu-The, V., Pelletier, G., Vaudry, H., 1999. Neurosteroids: expression of steroidogenic enzymes and regulation of steroid biosynthesis in the central nervous system. *Pharmacol. Rev.* 51, 63-81.
- Meyer, L., Venard, C., Schaeffer, V., Patte-Mensah, C., Mensah-Nyagan, A.G., 2008. The biological activity of 3 α -hydroxysteroid oxido-reductase in the spinal cord regulates thermal and mechanical pain thresholds after sciatic nerve injury. *Neurobiol. Dis.* 30, 30-41.
- Michael Kaplan, E., DuPont, R.L., 2005. Benzodiazepines and anxiety disorders: a review for the practicing physician. *Curr. Med. Res. Opin.* 21, 941-950.
- 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.
- Mok, W.M., Herschkowitz, S., Krieger, N.R., 1992. Evidence that 3 α -hydroxy-5 α -pregnan-20-one is the metabolite responsible for anesthesia induced by 5 α -pregnanedione in the mouse. *Neurosci. Lett.* 135, 145-148.
- O'Brien, C.P., 2005. Benzodiazepine use, abuse, and dependence. *J. Clin. Psychiatry Suppl.* 2, 28-33.
- Pathirathna, S., Todorovic, S.M., Covey, D.F., Jevtovic-Todorovic, V., 2005. 5 α -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., Mensah-Nyagan, A.G., 2003. Cellular distribution and bioactivity of the key steroidogenic enzyme, cytochrome P450 side chain cleavage, in sensory neural pathways. *J. Neurochem.* 86, 1233-1246.

- Patte-Mensah, C., Li, S., 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., 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.
- Patte-Mensah, C., Kibaly, C., Mensah-Nyagan, A.G., 2005. Substance P inhibits progesterone conversion to neuroactive metabolites in spinal sensory circuit: a potential component of nociception. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 102, 9044-9049.
- Patte-Mensah, C., Kibaly, C., Boudard, D., Schaeffer, V., Begle, A., Saredi, S., Meyer, L., Mensah-Nyagan, A.G., 2006. Neurogenic pain and steroid synthesis in the spinal cord. *J. Mol. Neurosci.* 28, 17-31.
- Patte-Mensah, C., Mensah-Nyagan, A.G., 2008. Peripheral neuropathy and neurosteroid formation in the central nervous system. *Brain Res. Rev.* 57, 454-459.
- Peredery, O., Persinger, M.A., 2004. Herbal treatment following post-seizure induction in rat by lithium pilocarpine: *Scutellaria lateriflora* (Skullcap), *Gelsemium sempervirens* (Gelsemium) and *Datura stramonium* (Jimson Weed) may prevent development of spontaneous seizures. *Phytother. Res.* 18, 700-705.
- Pinna, G., Dong, E., Matsumoto, K., Costa, E., Guidotti, A., 2003. In socially isolated mice, the reversal of brain allopregnanolone down-regulation mediates the anti-aggressive action of fluoxetine. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 100, 2035-2040.
- Pinna, G., Costa, E., Guidotti, A., 2006. Fluoxetine and norfluoxetine stereospecifically and selectively increase brain neurosteroid content at doses that are inactive on 5-HT reuptake. *Psychopharmacology (Berl)*. 186, 362-372.

- Rauch, S.L., Shin, L.M., Wright, C.I., 2003. Neuroimaging studies of amygdala function in anxiety disorders. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 985, 389-410.
- Reddy, D.S., Apanites, L.A., 2005. Anesthetic effects of progesterone are undiminished in progesterone receptor knockout mice. *Brain Res.* 1033, 96-101.
- Ruan, X., 2007. Drug-related side effects of long-term intrathecal morphine therapy. *Pain Physician* 10, 357-366.
- Sanna, E., Talani, G., Busonero, F., Pisu, M.G., Purdy, R.H., Serra, M., Biggio, G., 2004. Brain steroidogenesis mediates ethanol modulation of GABA_A receptor activity in rat hippocampus. *J. Neurosci.* 24, 6521-6530.
- Schaeffer, V., Patte-Mensah, C., Eckert, A., Mensah-Nyagan, A.G., 2006. Modulation of neurosteroid production in human neuroblastoma cells by Alzheimer's disease key proteins. *J. Neurobiol.* 66, 868-881.
- Schaeffer, V., Meyer, L., Patte-Mensah, C., Eckert, A., Mensah-Nyagan, A.G., 2008a. Dose-dependent and sequence-sensitive effects of amyloid-beta peptide on neurosteroidogenesis in human neuroblastoma cells. *Neurochem. Int.* 52, 948-955.
- Schaeffer, V., Patte-Mensah, C., Eckert, A., Mensah-Nyagan, A.G., 2008b. Selective regulation of neurosteroid biosynthesis in human neuroblastoma cells under hydrogen peroxide-induced oxidative stress condition. *Neuroscience* 151, 758-770.
- Schumacher, M., Robel, P., Baulieu, E.E., 1996. Development and regeneration of the nervous system: a role for neurosteroids. *Dev. Neurosci.* 18, 6-21.
- Schun, Y., Cordell, G.A., 1985. 14 beta-Hydroxygelsedine, a new oxindole alkaloid from *Gelsemium sempervirens*. *J. Nat. Prod.* 48, 788-791.
- Schun, Y., Cordell, G.A., 1987. Cytotoxic steroids of *Gelsemium sempervirens*. *J. Nat. Prod.* 50, 195-198.

- Stevens, J.C., Pollack, M.H., 2006. Benzodiazepines in clinical practice: consideration of their long-term use and alternative agents. *J. Clin. Psychiatry* 66, 21-27.
- Suchomelová, J., Bochořáková, H., Paulová, H., Musil, P., Táborská, E., 2007. HPLC quantification of seven quaternary benzo[c]phenanthridine alkaloids in six species of the family *Papaveraceae*. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 44, 283-287.
- Ugale, R.R., Sharma, A.N., Kokare, D.M., Hirani, K., Subhedar, N.K., Chopde, C.T., 2007. Neurosteroid allopregnanolone mediates anxiolytic effect of etifoxine in rats. *Brain Res.* 1184, 193-201.
- Uzunova, V., Sheline, Y., Davis, J.M., Rasmusson, A., Uzunov, D.P., Costa, E., Guidotti, A., 1998. Increase in the cerebrospinal fluid content of neurosteroids in patients with unipolar major depression who are receiving fluoxetine or fluvoxamine. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 95, 3239-3244.
- Uzunova, V., Sampson, L., Uzunov, D.P., 2006. Relevance of endogenous 3 α -reduced neurosteroids to depression and antidepressant action. *Psychopharmacology (Berl)*. 186, 351-361.
- Venard, C., Boujedaini, N., Belon, P., Mensah-Nyagan, A.G., Patte-Mensah, C., 2008. Regulation of neurosteroid allopregnanolone biosynthesis in the rat spinal cord by glycine and the alkaloidal analogs strychnine and gelsemine. *Neuroscience* 153, 154-161.
- Verleye, M., Akwa, Y., Liere, P., Ladurelle, N., Pianos, A., Eychenne, B., Schumacher, M., Gillardin, J.M., 2005. The anxiolytic etifoxine activates the peripheral benzodiazepine receptor and increases the neurosteroid levels in rat brain. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 82, 712-720.

Verleye, M., Heulard, I., Gillardin, J.M., 2008. Investigation of the anticonvulsive effect of acute immobilization stress in anxious Balb/cByJ mice using GABA A-related mechanistic probes. *Psychopharmacology (Berl)*. 197, 523-534.

Acknowledgments

This work was supported by Laboratories BOIRON, Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS) and Université Louis Pasteur. CV was the recipient of a fellowship provided by the Contrat CIFRE (No. 659/2005, CNRS-BOIRON). We thank Dr Philippe Belon, the former Director of BOIRON Research Division, for the useful discussion at the beginning of the project. We also want to thank Adrien Lacaud for his technical assistance.

Figure Legends

Fig. 1. Characterization of [³H]-neurosteroids released in the incubation medium by lumbar SC slices after a 3 h incubation with [³H]PROG in the absence (A) or presence of gelsemine 5 CH (B) or *Gelsemium sempervirens* 5 CH (C). Analyses were performed using a hexane/isopropanol gradient and a reverse-HPLC system coupled to a flow scintillation detector. The ordinate indicates the radioactivity measured in the HPLC eluent. The dashed line represents the gradient of secondary solvent (% isopropanol). The arrows indicate elution positions of standard steroids.

Fig. 2. Effects of gelsemine (A) and *G. sempervirens* (B) at 9 or 5 CH on 3 α ,5 α -THP production by SC slices. Each value was calculated as the relative amount of [³H]3 α ,5 α -THP compared with the total [³H]-labeled compounds resolved by HPLC-Flo/One characterization

($\times 100$). The values were obtained from experiments similar to those presented in Fig. 1. Results were then expressed as percentages of the amount of [^3H]3 α ,5 α -THP formed in absence of gelsemine or *G. sempervirens* (control). Each value is the mean (\pm S.E.M.) of four independent experiments. ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ control versus gelsemine or *G. sempervirens* (Student's *t*-test).

Fig. 3. Effects of gelsemine (A) and *G. sempervirens* (B) at 9 or 5 CH on 3 α ,5 α -THP production by H-A slices. The values were obtained from experiments similar to those presented in Fig. 1. Results were then expressed as percentages of the amount of [^3H]3 α ,5 α -THP formed in the control group. Each value is the mean (\pm S.E.M.) of four independent experiments. * $P < 0.05$, *** $P < 0.001$ control versus gelsemine or *G. sempervirens* (Student's *t*-test).

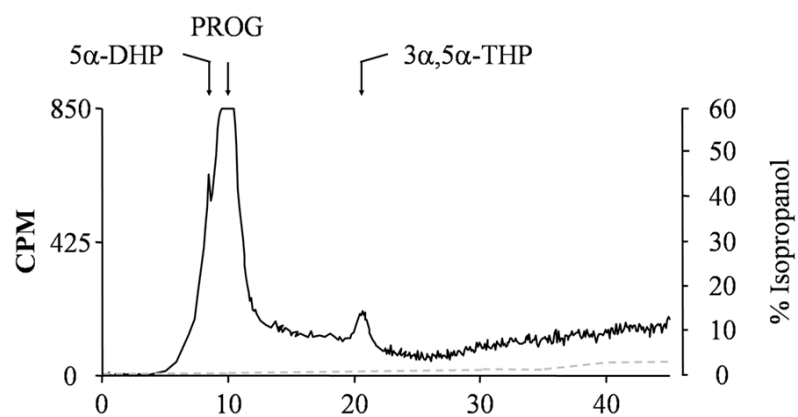
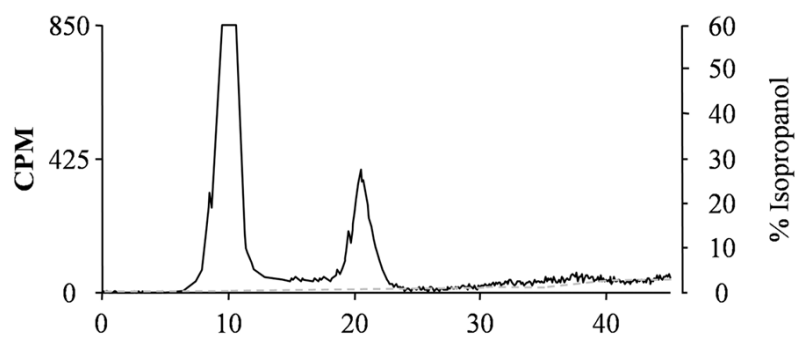
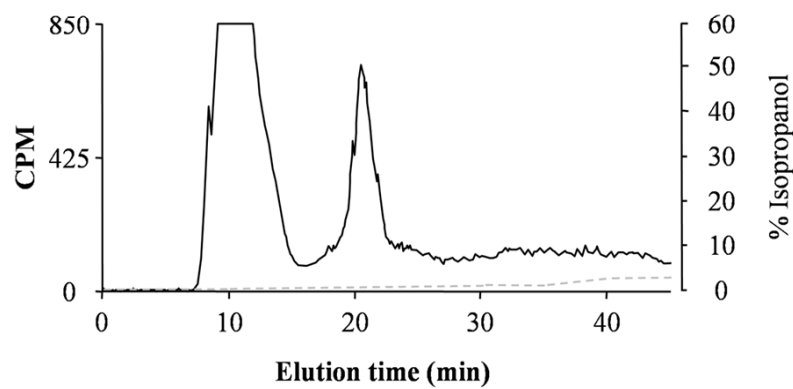
Fig. 4. Comparative analysis of the effects of gelsemine and *G. sempervirens* at 9 or 5 CH on [^3H]PROG conversion into [^3H]3 α ,5 α -THP by SC slices. The values were obtained from experiments similar to those presented in Fig. 1. Results were then expressed as percentages of the amount of [^3H]3 α ,5 α -THP formed in the control group. Each value is the mean (\pm S.E.M.) of four independent experiments. * $P < 0.05$, *** $P < 0.001$ control versus gelsemine or *G. sempervirens*; # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$ gelsemine versus *G. sempervirens* (ANOVA followed by Bonferroni's test).

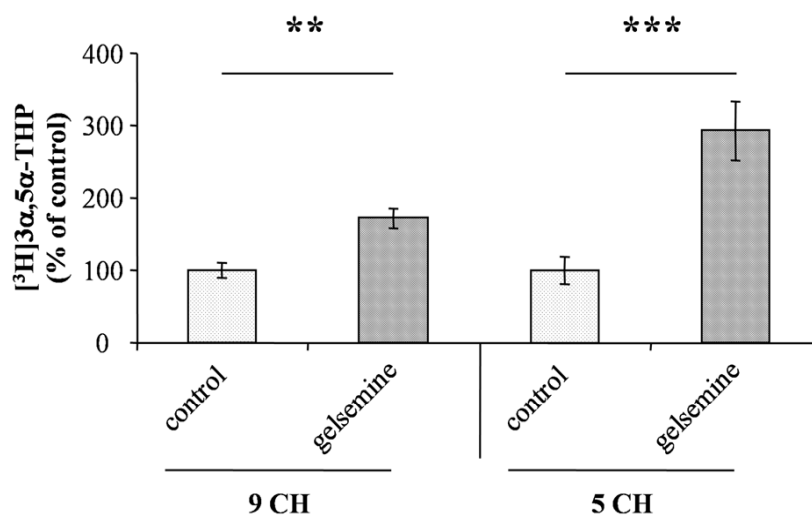
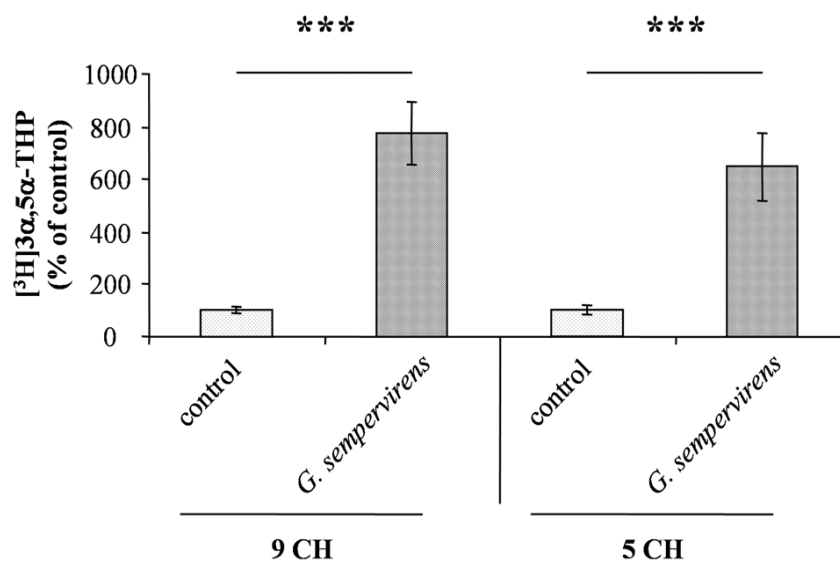
Fig. 5. Comparative analysis of the effects of gelsemine and *G. sempervirens* at 9 or 5 CH on [^3H]PROG conversion into [^3H]3 α ,5 α -THP by H-A slices. The values were obtained from experiments similar to those presented in Fig. 1. Results were then expressed as percentages of the amount of [^3H]3 α ,5 α -THP formed in absence of gelsemine and *G. sempervirens*

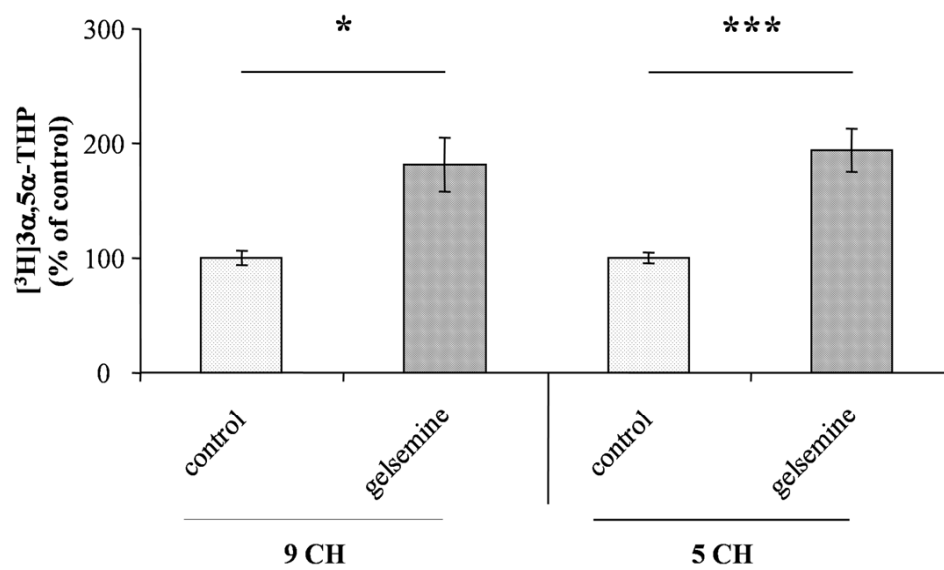
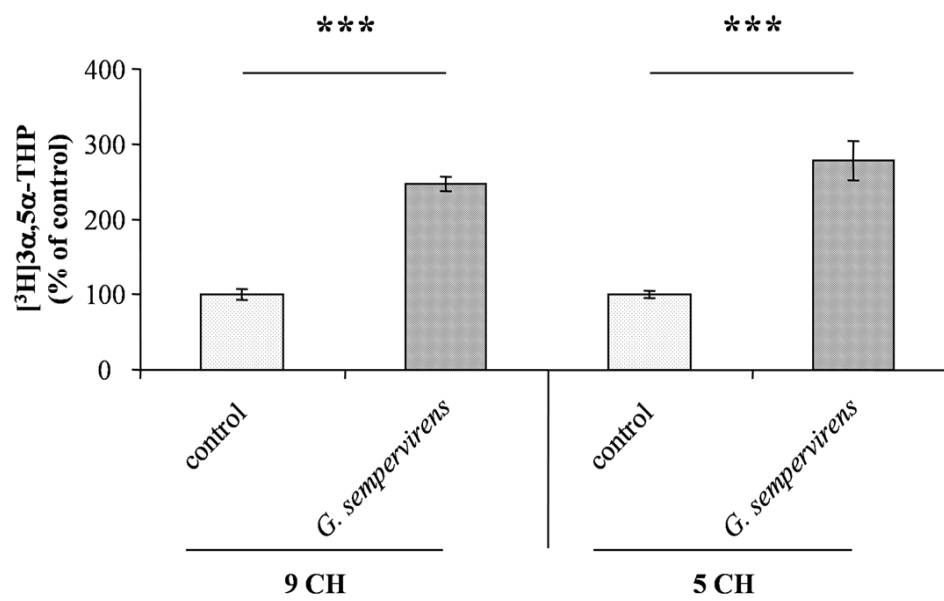
(control). Each value is the mean (\pm S.E.M.) of four independent experiments. * P <0.05, *** P <0.001 control versus gelsemine or *G. sempervirens*; # P <0.01 gelsemine versus *G. sempervirens* (ANOVA followed by Bonferroni's test).

Fig. 6. Effects of gelsemine (A) or *G. sempervirens* (B) at 5 CH on [3 H]3 α ,5 α -THP production by SC slices in the absence or presence of strychnine (10^{-5} M), the specific glycine receptor antagonist. The values were obtained from experiments similar to those presented in Fig. 1. Results were then expressed as percentages of the amount of [3 H]3 α ,5 α -THP formed in the control group. Each value is the mean (\pm S.E.M.) of four independent experiments. *** P <0.001 gelsemine versus control, strychnine or gelsemine + strychnine; # P <0.01, # # P <0.001 *G. sempervirens* versus control, strychnine or *G. sempervirens* + strychnine (ANOVA followed by Bonferroni's test). NS, not statistically different.

Fig. 7. Effects of gelsemine (A) or *G. sempervirens* (B) at 5 CH on 3 α ,5 α -THP production by H-A slices in the absence or presence of strychnine (10^{-6} M). The values were obtained from experiments similar to those presented in Fig. 1. Results were then expressed as percentages of the amount of [3 H]3 α ,5 α -THP formed in the control group. Each value is the mean (\pm S.E.M.) of four independent experiments. *** P <0.001 gelsemine versus control, strychnine or gelsemine + strychnine; # P <0.01, # # P <0.001 *G. sempervirens* versus control, strychnine or *G. sempervirens* + strychnine (ANOVA followed by Bonferroni's test). NS, not statistically different.

A Control**B** Gelsemine 5 CH**C** *Gelsemium sempervirens* 5 CH**Fig. 1**

A**B****Fig. 2**

A**B****Fig. 3**

Comparative analysis in the Spinal Cord

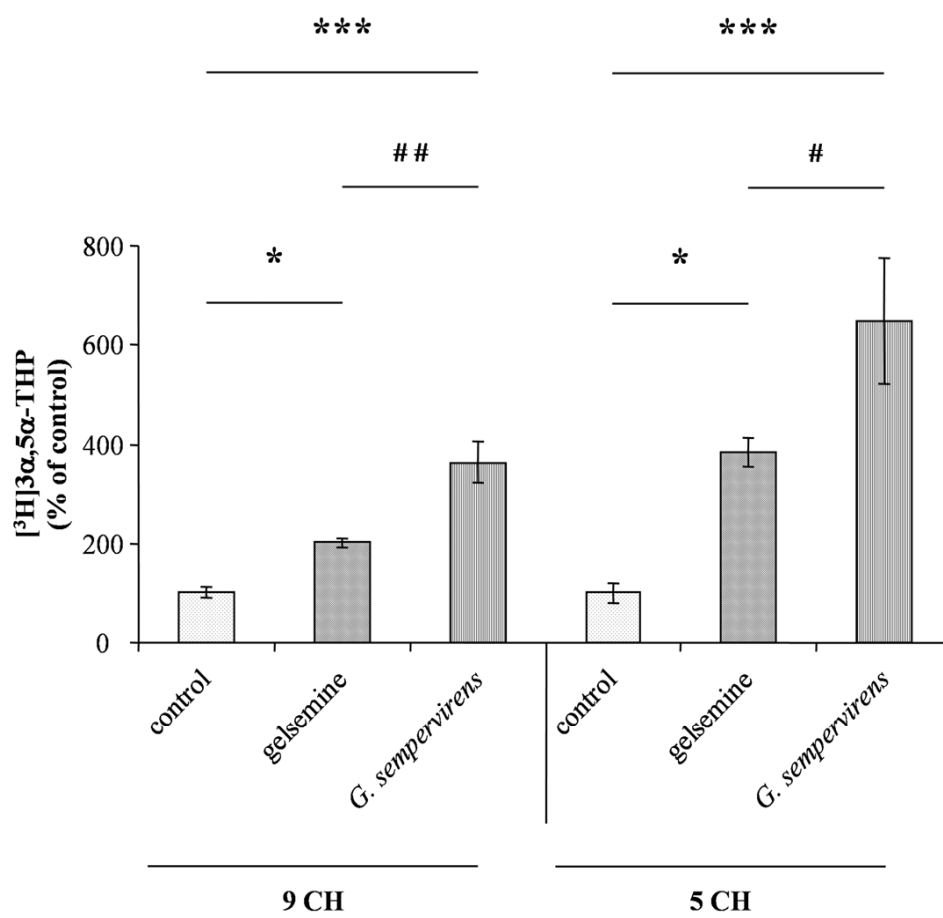


Fig. 4

Comparative analysis in the Limbic System

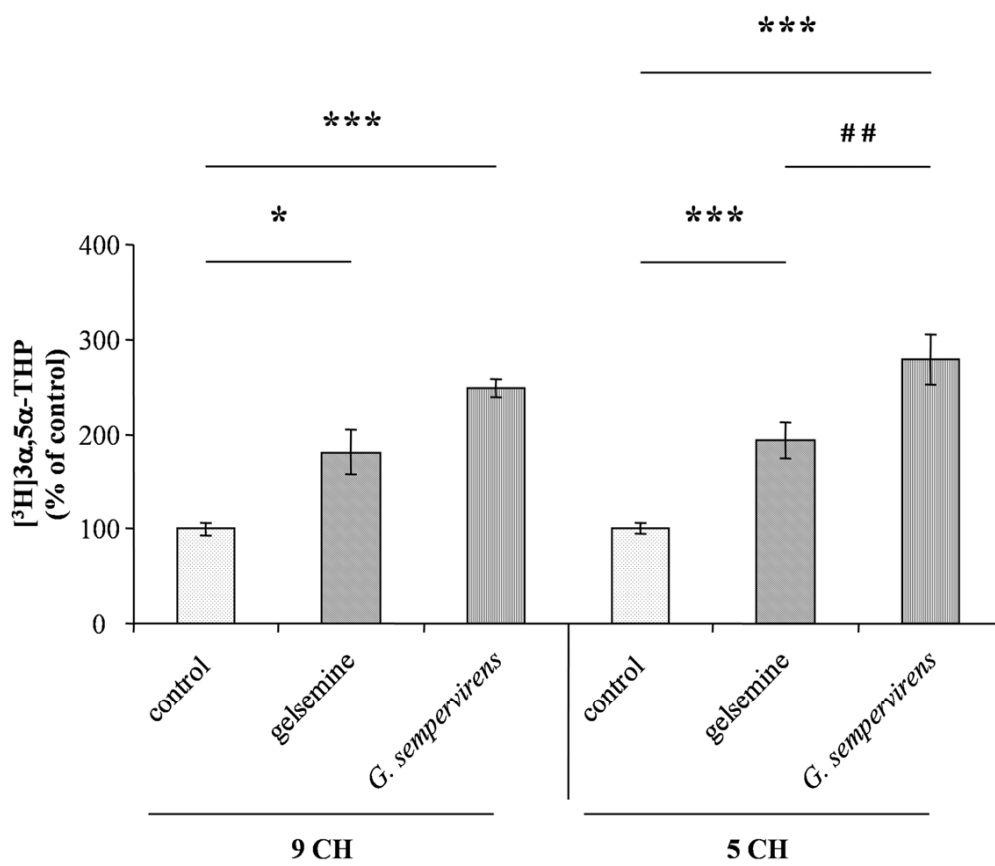


Fig. 5

Characterization of the receptor involved in *G. sempervirens* and gelsemine effects in the Spinal Cord

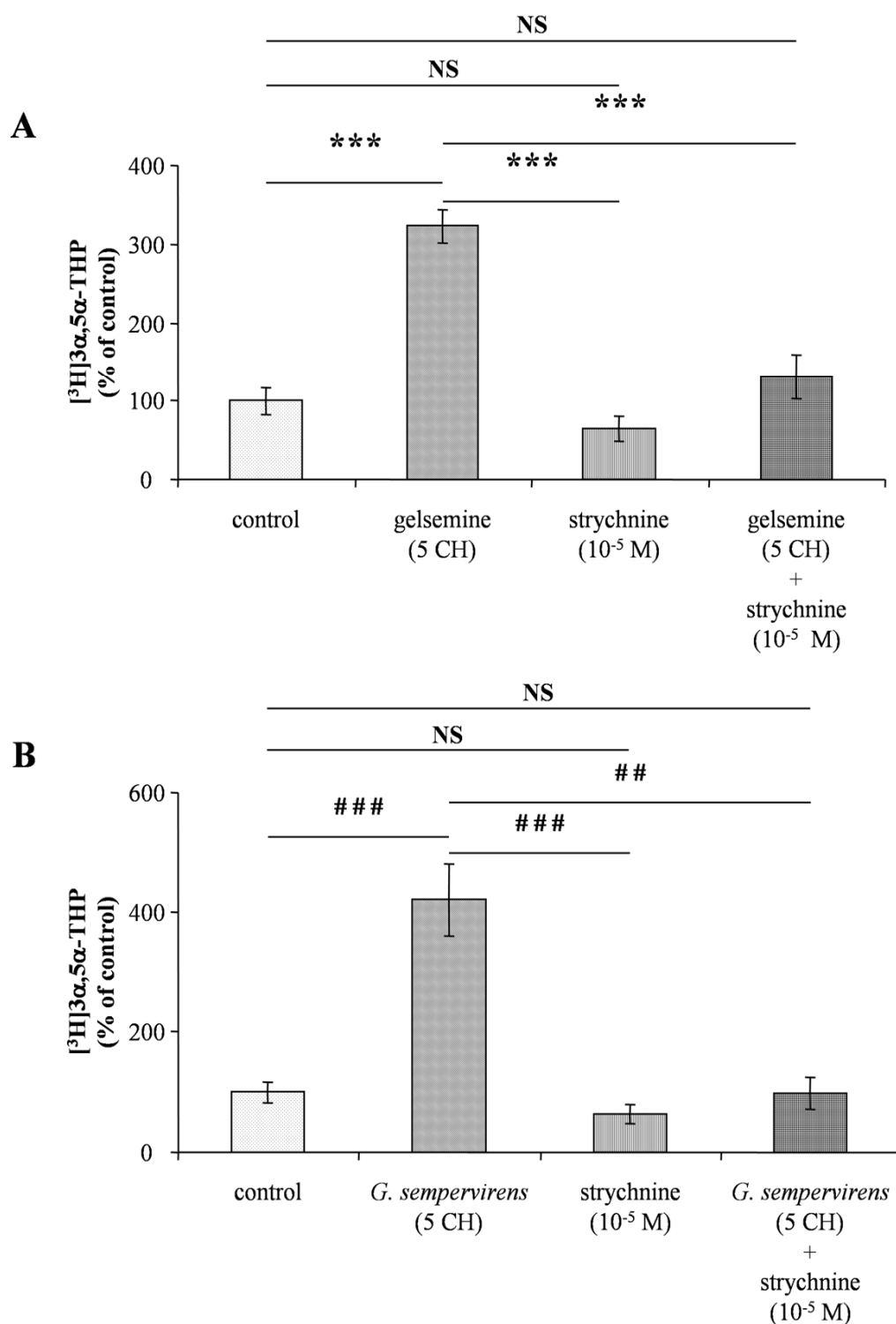


Fig. 6

Characterization of the receptor involved in *G. sempervirens* and gelsemine effects in the Limbic System

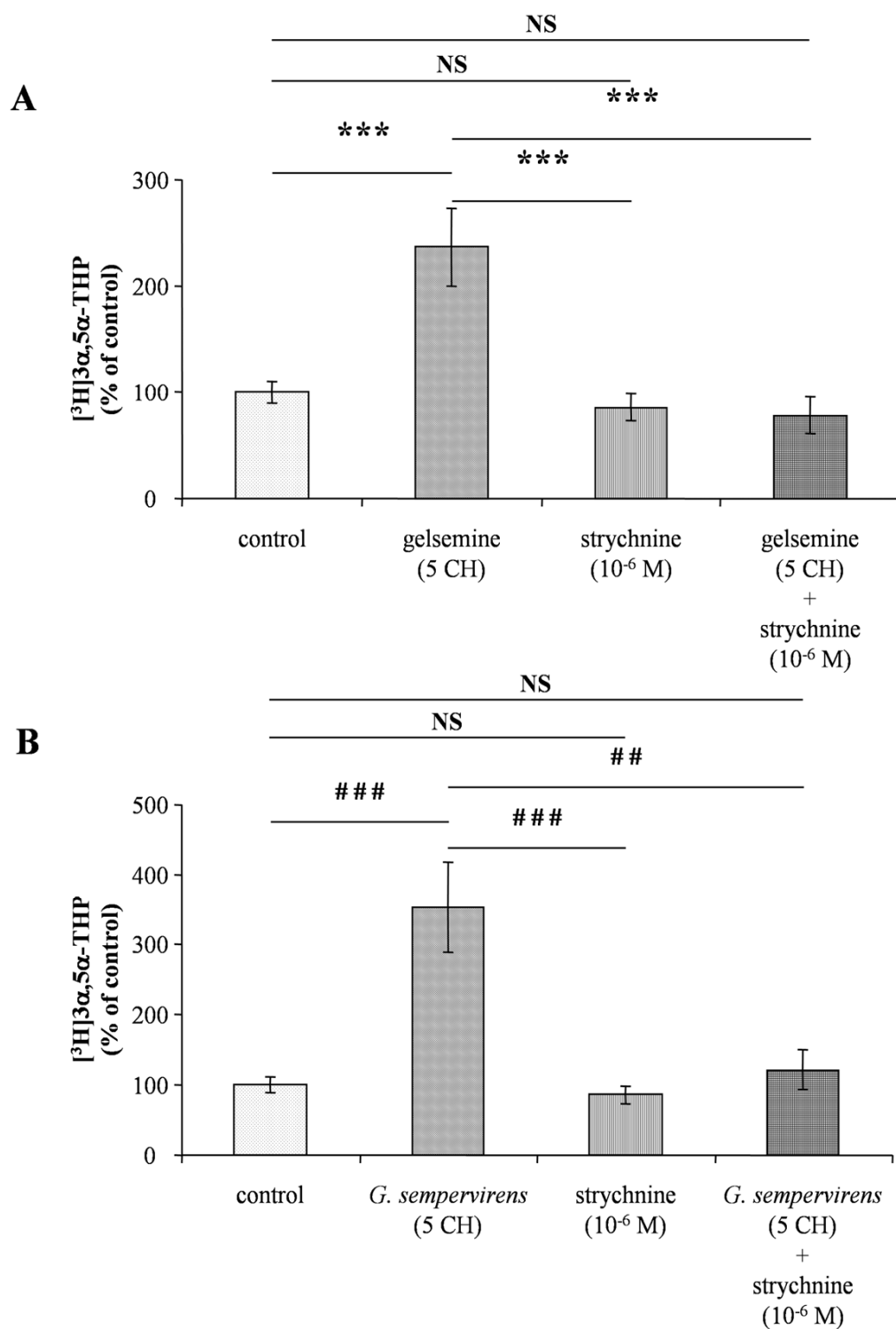


Fig. 7

III. Interactions entre sensibilité à la douleur et activité 3 α -hydroxystéroïde oxydo-réductase synthétisant l'alloprégnanolone dans la moelle épinière: analyses *in vitro* et *in vivo*

La première et la deuxième parties du programme de thèse ont permis de montrer que la biosynthèse de 3 α ,5 α -THP est régulée dans la moelle épinière et/ou le système limbique par des facteurs endogènes (glycine) et exogènes (gelsémine, *G. sempervirens*). L'objectif de cette troisième partie est de vérifier s'il existe effectivement une relation entre les variations de la concentration endogène de 3 α ,5 α -THP dans le SNC *in vivo* et des modifications des processus neurophysiologiques importants tels que la sensibilité à la douleur et l'anxiété. En effet, il nous a paru indispensable de nous assurer que les variations de l'activité de la 3 α -hydroxystéroïde oxydo-réductase ou 3 α -HSOR (enzyme clef de synthèse de 3 α ,5 α -THP) dans le SNC ont des implications fonctionnelles avant de proposer des travaux ultérieurs qui rechercheront si les substances régulatrices de la 3 α -HSOR telles que la gelsémine et *G. sempervirens* pourraient exercer des effets neurophysiologiques grâce à une augmentation *in vivo* de la concentration cérébrale ou spinale de 3 α ,5 α -THP. Ce très vaste programme ne pouvait être complètement abordé au cours de la dernière année de thèse étant donné que les deux premières années ont été consacrées aux travaux présentés respectivement dans les chapitres I et II de la section «Résultats». Ainsi, nous avons choisi de commencer dans un premier temps par des études *in vitro* et *in vivo* des relations entre l'activité 3 α -HSOR dans la moelle épinière (ME) et la sensibilité à la douleur.

III.1. Effets de la douleur neuropathique sur l'expression génique et protéique de la 3 α -HSOR dans la ME

Le couplage de la transcription inverse à la *polymerase chain reaction* en temps réel (rt-RT-PCR) a révélé que les taux d'ARNm codant la 3 α -HSOR dans la ME lombaire de rats en situation de douleur neuropathique sont similaires à ceux des animaux contrôles (naïfs et pseudo-opérés).

Pour s'assurer que les ARNm détectés dans la ME sont effectivement traduits en protéine enzymatique, nous avons réalisé des expériences de Western blot avec un anticorps polyclonal spécifiquement dirigé contre la 3 α -HSOR.

Une bande immunoréactive spécifique migrant au même poids moléculaire (33 kDa) que la 3 α -HSOR a été détectée dans la ME lombaire de rats naïfs, pseudo-opérés et neuropathiques. Après normalisation de la bande 3 α -HSOR à la protéine α -tubuline, aucune variation du taux de la protéine 3 α -HSOR n'a été détectée entre les groupes de rats naïfs, pseudo-opérés et soumis à la douleur neuropathique. Il convient de signaler que la 3 α -HSOR est une enzyme abondamment exprimée dans la ME en situation normale ou basale (Pattensah *et al.*, 2004b). Des variations de l'expression du gène codant la 3 α -HSOR dans la ME ne sont donc pas forcément nécessaires pour que la 3 α -HSOR intervienne de façon déterminante dans la régulation de processus pathophysiologiques ou dans l'adaptation de l'organisme à des situations différentes. Pour cette intervention, il faudrait que l'activité enzymatique 3 α -HSOR catalysant la biosynthèse de 3 α ,5 α -THP change significativement dans le SNC en réponse aux modifications pathophysiologiques. Nous avons donc vérifié cette hypothèse en recherchant l'impact de la douleur neuropathique sur l'activité 3 α -HSOR convertissant la [³H]PROG en [³H]3 α ,5 α -THP dans la ME.

III.2. Variation de l'activité enzymatique 3 α -HSOR dans la ME des rats neuropathiques

Les expériences de pulse-chase combinées à l'analyse HPLC et à la détection par scintillation en flux continu ont tout d'abord montré qu'après 3h d'incubation, les tranches de ME lombaire de rat sont capables de convertir la [3 H]PROG en divers métabolites radioactifs dont la [3 H]5 α -DHP et la [3 H]3 α ,5 α -THP.

Notre étude révèle que le taux de [3 H]5 α -DHP nouvellement synthétisée ne varie pas dans la ME des rats neuropathiques par rapport aux animaux naïfs et pseudo-opérés. En revanche, la quantité de [3 H]3 α ,5 α -THP néosynthétisée dans la ME des rats neuropathiques est largement supérieure à celle mesurée dans la ME des animaux pseudo-opérés et naïfs. L'activité enzymatique 3 α -HSOR dans le tissu spinal des rats neuropathiques est augmentée de 81% et 192% respectivement par rapport aux rats pseudo-opérés et naïfs.

III.3. Analyse comportementale des effets d'injections intrathécales de 3 α ,5 α -THP et de

Provera sur la sensibilité à la douleur

L'évaluation *in vivo* du seuil de sensibilité thermique des animaux est réalisée en utilisant le test du Plantar (ou *Hargreaves behavioral method*) et le seuil de sensibilité mécanique est déterminé à l'aide du test des filaments de von Frey.

Dans un premier temps, nous avons observé les effets d'une injection intrathécale de Provera (10 et 15 mg/kg) ou de 3 α ,5 α -THP (1 et 5 mg/kg) sur la sensibilité nociceptive des rats naïfs. La Provera est un composé inhibiteur de l'activité enzymatique 3 α -HSOR (Jarrell, 1984; Penning *et al.*, 1985). L'injection intrathécale de Provera nous permettait donc d'inhiber *in vivo* la biosynthèse de 3 α ,5 α -THP dans la ME. Nous avons alors observé que la Provera diminue significativement et de façon dose-dépendante les seuils de sensibilité thermique et

mécanique des animaux naïfs. En revanche, lorsque nous augmentons la concentration endogène de la $3\alpha,5\alpha$ -THP dans la ME des rats naïfs par une injection intrathécale de $3\alpha,5\alpha$ -THP, nous constatons une nette augmentation (également dose-dépendante) des seuils de sensibilité thermique et mécanique.

Chez les rats neuropathiques, l'injection intrathécale de $3\alpha,5\alpha$ -THP à 5 mg/kg supprime l'hyperalgie thermique et l'allodynie mécanique caractérisant la douleur neuropathique en augmentant de façon significative les seuils de sensibilité thermique et mécanique. Au contraire, la Provera aggrave l'état pathologique des rats neuropathiques en potentialisant l'hyperalgie thermique et l'allodynie mécanique.

L'ensemble des résultats obtenus sur l'axe de recherche évoqué ci-dessus a fait l'objet d'un article publié dans *Neurobiology of Disease*. Les figures et illustrations relatives aux résultats décrits se trouvent dans l'exemplaire de l'article joint au mémoire qui permet également d'apporter des informations complémentaires et détaillées sur les résultats.

Signalement bibliographique ajouté par :

l'UNIVERSITÉ DE STRASBOURG
Service Commun de la Documentation

The biological activity of 3 α -hydroxysteroid oxido-reductase in the spinal cord regulates thermal and mechanical pain thresholds after sciatic nerve injury

Laurence MEYER, Christine VENARD, Véronique SCHAEFFER, Christine PATTE-MENSAH and Ayikoe G. MENSAH-NYAGAN

Neurobiology of Disease, 2008, Volume 30, Numéro 1, pages 30-41

Copyright © 2007 Elsevier Inc.

Résultats § III.3, p. 148-159 :

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://dx.doi.org/10.1016/j.nbd.2007.12.001>

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://scd.unistra.fr/services/peb/>

DISCUSSION

I. Mise en évidence de l'action de la gelsémine sur la neurostéroïdogénèse: analyse des effets de la gelsémine et des modulateurs du système glycinergique sur la biosynthèse de $3\alpha,5\alpha$ -THP dans la ME de rat

Nous avons évoqué, dans le chapitre I de la section «Résultats» (pages 98 à 109), les raisons justifiant le choix de situer notre étude concernant l'action de la gelsémine sur la biosynthèse de $3\alpha,5\alpha$ -THP dans le cadre général des recherches sur la régulation de la neurostéroïdogénèse par les modulateurs du système glycinergique. En particulier, nous étions intrigués par l'analogie structurale importante entre la gelsémine et la strychnine qui est un puissant antagoniste sélectif des Gly-Rs (Legendre, 2001; Kirsch, 2006) et nous voulions savoir si la gelsémine pouvait induire des effets cellulaires en interagissant avec les Gly-Rs. Par ailleurs, nous voulions aussi déterminer si le ligand naturel des Gly-Rs, la glycine, intervient dans la régulation de la biosynthèse des neurostéroïdes, en particulier dans la production de $3\alpha,5\alpha$ -THP qui est une molécule présentant un intérêt thérapeutique majeur compte tenu de son implication dans le contrôle de l'anxiété, de la douleur, de la neurodégénérescence et de la dépression (Griffin *et al.*, 2004; Belelli et Lambert, 2005; Brinton et Wang, 2006; Patte-Mensah *et al.*, 2006; Pinna *et al.*, 2006; Uzunova *et al.*, 2006; Patte-Mensah et Mensah-Nyagan, 2008). En effet, diverses études ont clairement établi que les propriétés neuroactives de la $3\alpha,5\alpha$ -THP sont dues à son interaction avec les systèmes inhibiteurs GABAergique et glycinergique (Belelli et Lambert, 2005; Hosie *et al.*, 2006; Jiang *et al.*, 2006) mais le rétrocontrôle exercé par le GABA ou la glycine sur la production de $3\alpha,5\alpha$ -THP n'a jamais été démontré. Des travaux, qui n'étaient pas directement focalisés sur la $3\alpha,5\alpha$ -THP, ont suggéré que le GABA pourrait réguler la biosynthèse de progestérone dans le cerveau de grenouille et dans la rétine de rat (Guarneri *et al.*, 1995; Do-Rego *et al.*, 2000;

Mensah-Nyagan *et al.*, 2001b). En ce qui concerne la glycine, aucune étude n'a été entreprise jusqu'à présent pour déterminer son action sur la biosynthèse des neurostéroïdes, en particulier sur la sécrétion de $3\alpha,5\alpha$ -THP dans le système nerveux. Par conséquent, nos résultats (voir pages 98 à 109) constituent la première démonstration indiquant que la glycine, agissant par l'intermédiaire des Gly-Rs, stimule la production de $3\alpha,5\alpha$ -THP dans la ME de rat. Des applications croissantes de glycine dans des gammes de concentrations de l'ordre du micromolaire, généralement impliquées dans la neurotransmission glycinergique (Legendre, 2001; Kirsch, 2006), provoquent une augmentation dose-dépendante de la biosynthèse de $3\alpha,5\alpha$ -THP dans la ME de rat. Nos travaux révèlent aussi que la gelsémine (analogue structural de la strychnine) est un régulateur positif de la formation de $3\alpha,5\alpha$ -THP dans la ME.

Nos analyses pharmacologiques ont montré que l'action stimulatrice induite par la glycine sur la synthèse de $3\alpha,5\alpha$ -THP est totalement bloquée par la strychnine, l'antagoniste sélectif des Gly-Rs (Legendre, 2001; Kirsch, 2006). Cette observation démontre que la glycine agit par l'intermédiaire des Gly-Rs sensibles à la strychnine pour stimuler la production de $3\alpha,5\alpha$ -THP. La strychnine constitue un outil unique pour distinguer les Gly-Rs des sites de liaison de la glycine sur les récepteurs NMDA (Betz et Laube, 2006). Ainsi, il est raisonnable de penser que la régulation de la biosynthèse de $3\alpha,5\alpha$ -THP dans la ME est surtout un processus dépendant du Gly-R plutôt qu'un mécanisme associé au récepteur NMDA. En effet, une forte densité de Gly-Rs a été mise en évidence dans la ME (Zeilhofer, 2005) et des travaux effectués sur des neurones sensoriels spinaux démontrent que le stéroïde prégnanolone inhibe de manière réversible l'amplitude des courants induits par la glycine via les Gly-Rs natifs (Jiang *et al.*, 2006). Les auteurs de ces études ont également observé que la $3\alpha,5\alpha$ -THP, agissant par les Gly-Rs, stimule légèrement le courant glycinergique (Jiang *et al.*, 2006). L'ensemble de ces données suggère l'existence d'une boucle de régulation qui mettrait en jeu

dans la ME les cellules productrices de $3\alpha,5\alpha$ -THP, les Gly-Rs et les terminaisons nerveuses libérant la glycine pour le contrôle de la concentration spinale de $3\alpha,5\alpha$ -THP. En particulier, le rétrocontrôle positif exercé par la glycine sur la synthèse de $3\alpha,5\alpha$ -THP dans la ME peut contribuer à la sur-activation du tonus neuroinhibiteur au cours des situations pathologiques associées à une plasticité neuronale dépendante du GABA ou de la glycine (Kontinen *et al.*, 2001; Carrasco *et al.*, 2007; Fossat *et al.*, 2007).

La strychnine et la gelsémine sont deux alcaloïdes extraits, respectivement, des plantes *Strychnos nux vomica* et *Gelsemium sempervirens* (Jasmin jaune). Une accumulation de nombreuses données chimiques sur plus de 70 ans a permis de démontrer que la gelsémine et la strychnine contiennent cinq groupements fonctionnels identiques (Madin *et al.*, 1999; Yokoshima *et al.*, 2000; Ng *et al.*, 2002; Ozturk *et al.*, 2005; Grecian et Aube, 2007). La strychnine a été utilisée dans plusieurs études biologiques et pharmacologiques qui l'ont formellement identifiée comme étant la molécule la plus efficace et la plus sélective pour caractériser les Gly-Rs (Legendre, 2001; Kirsch, 2006). En revanche, exceptée une publication qui montre que la gelsémine nécessite une concentration supérieure à 1 mM pour inhiber la liaison de la β -alanine tritiée ($[^3\text{H}]\beta$ -alanine) à des synaptosomes spinaux (Orensanz *et al.*, 1988), il n'existait dans la littérature aucune donnée sur les mécanismes d'action biologique et cellulaire de la gelsémine. Par conséquent, notre étude (voir pages 98 à 109) constitue un travail pionnier montrant que la gelsémine est capable de stimuler de manière dose-dépendante la production du neurostéroïde $3\alpha,5\alpha$ -THP dans la ME de rat. La strychnine, qui ne modifie pas d'elle-même la formation des neurostéroïdes dans la ME, exerce son rôle classique d'antagoniste en bloquant l'action stimulatrice induite par la glycine sur la formation de $3\alpha,5\alpha$ -THP. De plus, la strychnine abolit aussi l'effet stimulateur de la gelsémine sur la synthèse de $3\alpha,5\alpha$ -THP. L'ensemble de ces résultats indique que la glycine et la gelsémine stimulent la production de $3\alpha,5\alpha$ -THP dans la ME en activant le Gly-R. En faveur de cette

suggestion, l'administration concomitante de glycine et de gelsémine exerce sur la biosynthèse de $3\alpha,5\alpha$ -THP un effet stimulateur additif plus important que l'effet résultant de l'application séparée de gelsémine ou de glycine. Par ailleurs, nos données révèlent que la gelsémine à 10^{-10} ou 10^{-8} M est capable d'augmenter à la fois les quantités de 5α -DHP et de $3\alpha,5\alpha$ -THP tandis que la glycine, qui accroît seulement les taux de 5α -DHP à 10^{-6} ou 35.10^{-6} M, stimule aussi la biosynthèse de $3\alpha,5\alpha$ -THP à 7.10^{-5} et 14.10^{-5} M. Ces résultats indiquent que, même si la gelsémine et la glycine sont deux composés activateurs de la conversion de progestérone en métabolites $3\alpha,5\alpha$ -réduits, leurs cinétiques d'actions et leur efficacité sont différentes. La gelsémine semble être plus active que la glycine dans la stimulation de la conversion de progestérone en $3\alpha,5\alpha$ -THP.

En dehors de leurs similarités structurales, la strychnine et la gelsémine présentent des différences telles que leur conformation tridimensionnelle et une double liaison qui existe dans le cycle éther de la strychnine mais n'apparaît pas dans la molécule de gelsémine. Les cinq groupements fonctionnels identiques entre la strychnine et la gelsémine peuvent expliquer leur affinité pour un même récepteur comme le Gly-R. En revanche, leurs disparités suggèrent l'existence de modes d'action différents sur le Gly-R. En effet, alors que la strychnine ne modifie pas d'elle-même la biosynthèse de $3\alpha,5\alpha$ -THP dans la ME, la gelsémine en activant le Gly-R augmente fortement la production de $3\alpha,5\alpha$ -THP. L'ensemble de ces données révèle l'existence d'une relation structure-activité des analogues alcaloïdes (strychnine et gelsémine) sur la neurostéroïdogenèse dans la ME de rat. En accord avec cette démonstration, des études biochimiques et pharmacologiques ont établi que l'efficacité d'un ligand à moduler les Gly-Rs dépend non seulement de son aptitude à se lier à ces récepteurs mais surtout de sa capacité à interagir avec un acide aminé spécifique localisé dans la zone interne de la poche de liaison (Schmieden *et al.*, 1999; Legendre, 2001). Ainsi, les similarités chimiques dans les structures de la gelsémine et de la strychnine peuvent leur permettre de se

lier aux Gly-Rs mais leurs groupements divergents pourraient faciliter des interactions avec différents acides aminés dans la poche de liaison menant ainsi à un effet antagoniste pour la strychnine et à une action agoniste pour la gelsémine.

L'action inhibitrice exercée par la glycine sur les neurones résulte d'une augmentation de la conductance aux ions chlorures induite par stimulation du Gly-R qui est un membre de la famille des récepteurs canaux ioniques activés par les ligands (Lynch, 2004). Des études supplémentaires seront nécessaires pour l'identification complète des cascades intracellulaires conduisant à l'augmentation de la sécrétion de $3\alpha,5\alpha$ -THP après l'activation du Gly-R par la glycine ou la gelsémine. Toutefois, il est raisonnable de penser que les voies de signalisation intracellulaires activées par la gelsémine ou la glycine via le Gly-R pourraient induire un changement environnemental (par exemple le pH intracellulaire) permettant l'activation de la 5α -réductase et/ou la 3α -hydroxystéroïde oxydo-réductase (3α -HSOR) qui sont les deux enzymes clés convertissant la progestérone en $3\alpha,5\alpha$ -THP (Patte-Mensah *et al.*, 2006). En effet, la 5α -réductase et la 3α -HSOR dont les activités enzymatiques sont très sensibles au pH intracellulaire, ont été localisées dans de nombreux neurones et cellules gliales de la ME de rat (Penning *et al.*, 1984; Normington et Russell, 1992; Patte-Mensah *et al.*, 2004b, 2005). Ainsi, l'influx d'ions chlorures induit par la glycine ou la gelsémine via l'activation du Gly-R pourrait indirectement provoquer une modification du pH intracellulaire permettant la stimulation de l'activité de la 5α -réductase et/ou de la 3α -HSOR dans les cellules nerveuses spinales. Cette hypothèse est renforcée par nos résultats montrant qu'à certaines concentrations (1 μ M et 35 μ M), la glycine stimule fortement l'activité de la 5α -réductase, ce qui génère des quantités accrues de [3 H] 5α -DHP. Les autres concentrations en glycine (70 μ M et 140 μ M) accélèrent principalement l'activité de la 3α -HSOR. Ainsi, la vitesse élevée de la réaction enzymatique 3α -HSOR produit très rapidement des quantités importantes de [3 H] $3\alpha,5\alpha$ -THP, ce qui ne laisse pas le temps de mettre en évidence le pic transitoire du

stéroïde intermédiaire ($[^3\text{H}]5\alpha\text{-DHP}$) 3h après l'incorporation de progestérone tritiée dans les tranches de ME.

La glycine et le neurostéroïde $3\alpha,5\alpha\text{-THP}$ sont connus pour réguler plusieurs processus neurophysiologiques importants tels que la douleur et l'anxiété (Akwa *et al.*, 1999; Patte-Mensah *et al.*, 2004a, 2005, 2006; Zeilhofer, 2005; McCool et Chappell, 2007; Pellicer *et al.*, 2007). Le stéroïde neuroactif $5\alpha\text{-DHP}$ présente également des propriétés neuroprotectrices dans de nombreux modèles expérimentaux (pour revue, Roglio *et al.*, 2007). Ainsi, même si des études supplémentaires sont nécessaires pour spécifier les effets de la gelsémine *in vivo*, le fait qu'elle exerce une puissante action stimulatrice sur la biosynthèse de $5\alpha\text{-DHP}$ et de $3\alpha,5\alpha\text{-THP}$ suggère que la gelsémine et les médicaments produits à partir de *G. sempervirens* pourraient être des composés intéressants à étudier pour l'élaboration de stratégies efficaces contre les neuropathologies provoquées par des perturbations de la transmission inhibitrice centrale.

II. Analyse comparative des effets des dilutions homéopathiques de gelsémine et de *G. sempervirens* sur la biosynthèse du neurostéroïde 3 α ,5 α -THP dans la moelle épinière et le système limbique de rat

Les résultats décrits dans le deuxième chapitre (voir pages 110 à 143) constituent les premières données fondamentales (obtenues grâce à une recherche expérimentale) qui mettent en évidence des effets cellulaires des préparations homéopathiques de *G. sempervirens* dans le système limbique (H-A) et la ME. Notre travail a également permis l'identification des mécanismes pharmacologiques impliqués dans la médiation de l'effet de *G. sempervirens* et de la gelsémine sur les cellules du système limbique et de la ME.

Grâce à l'approche bien validée permettant de combiner des expériences de pulse-chase avec l'analyse HPLC et la détection par scintillation en flux continu (Patte-Mensah *et al.*, 2003, 2004a, 2005; Kibaly *et al.*, 2005, 2008; Schaeffer *et al.*, 2006, 2008a,b), nous avons observé que la gelsémine et *G. sempervirens* à 5 CH ou 9 CH stimulent significativement la conversion de [³H]PROG en [³H]3 α ,5 α -THP dans des tranches de H-A (système limbique) et de ME. Le neurostéroïde 3 α ,5 α -THP possède un fort potentiel thérapeutique parce qu'il joue un rôle clef dans la régulation des mécanismes cellulaires impliqués dans l'anxiété, la douleur, la dépression et la neurodégénérescence (Barbaccia *et al.*, 2001; Belelli et Lambert, 2005; Brinton et Wang, 2006; Patte-Mensah *et al.*, 2006; Pinna *et al.*, 2006; Patte-Mensah et Mensah-Nyagan, 2008). En particulier, il a clairement été montré que l'effet anxiolytique de la progestérone dépend de sa conversion en 3 α ,5 α -THP dans le système limbique (Bitran *et al.*, 1995; Barbaccia *et al.*, 2001; Frye et Walf, 2002; Frye *et al.*, 2004). Par ailleurs, nous avons récemment démontré que la 3 α ,5 α -THP synthétisée dans la ME exerce une action analgésique chez des animaux soumis à une douleur neuropathique induite par ligature lâche du nerf sciatique (Patte-Mensah *et al.*, 2004a; Meyer *et al.*, 2008). Par conséquent, il est

probable que l'effet stimulateur exercé par les préparations de *G. sempervirens* ou de gelsémine sur la production de $3\alpha,5\alpha$ -THP dans l'H-A ou la ME reflètent les mécanismes cellulaires activés par ces préparations pour induire des effets anxiolytiques ou analgésiques. A l'appui de cette hypothèse, la présence et l'activité enzymatique de la 3α -hydroxystéroïde déshydrogénase ou 3α -HSOR (enzyme clef synthétisant la $3\alpha,5\alpha$ -THP) ont été mises en évidence dans le système limbique et le circuit spinal, suggérant que la gelsémine et *G. sempervirens* pourraient augmenter la formation de $3\alpha,5\alpha$ -THP en stimulant l'activité enzymatique 3α -HSOR dans les réseaux neuronaux limbiques et spinaux (Krieger et Scott, 1989; Patte-Mensah *et al.*, 2004b; Agis-Balboa *et al.*, 2006; Meyer *et al.*, 2008). De plus, il a été démontré que le système limbique et la ME, qui sont deux structures cruciales contrôlant respectivement l'anxiété et la douleur, contiennent plusieurs cellules exprimant les Gly-Rs (Haines *et al.*, 1997; Bremner, 1999; Millan, 1999, 2002; Legendre, 2001; Dudeck *et al.*, 2003; Bannerman *et al.*, 2004; Lynch, 2004; Kirsch, 2006). En accord avec ces données, nos analyses pharmacologiques ont révélé que la strychnine, un antagoniste sélectif des Gly-Rs (Legendre, 2001; Kirsch, 2006), bloque complètement l'effet stimulateur de la gelsémine et de *G. sempervirens* sur la biosynthèse de $3\alpha,5\alpha$ -THP dans les tranches d'H-A et de ME. L'ensemble de ces résultats montre que les préparations de gelsémine et de *G. sempervirens*, en agissant via les Gly-Rs localisés sur les cellules nerveuses de l'H-A et de la ME, stimulent l'activité enzymatique 3α -HSOR qui, à son tour, génère une hyperproduction de $3\alpha,5\alpha$ -THP dans le système limbique et le circuit spinal.

Nos analyses comparatives ont aussi révélé que la capacité stimulatrice de *G. sempervirens* sur la biosynthèse de $3\alpha,5\alpha$ -THP dans l'H-A et la ME est plus importante que celle de la gelsémine. Ce résultat indique que de faibles concentrations ou de hautes dilutions de *G. sempervirens* restent très actives pour la stimulation de la sécrétion de $3\alpha,5\alpha$ -THP dans le système limbique et la ME, suggérant que les stratégies antalgiques ou anxiolytiques basées

sur l'utilisation de *G. sempervirens* pourraient effectivement être dénuées d'effets secondaires. Le fort pouvoir stimulateur de *G. sempervirens* sur la production de 3 α ,5 α -THP témoigne également de l'existence d'une synergie positive entre la gelsémine et les autres constituants présents dans la composition de *G. sempervirens* tels que la sempervirine, la gelsémicine et la gelsénicine (Schun et Cordell, 1985, 1987; Kitajima *et al.*, 2003). Toutefois, des travaux complémentaires seront nécessaires pour préciser si ces autres constituants de *G. sempervirens* interagissent effectivement avec les Gly-Rs, même si nos données actuelles montrent déjà que l'action stimulatrice des préparations de *G. sempervirens* est totalement (et non partiellement) bloquée par la strychnine.

III. Interactions entre sensibilité à la douleur et activité 3 α -hydroxystéroïde oxydo-réductase synthétisant la 3 α ,5 α -THP dans la ME

Notre préoccupation majeure dans la dernière année de thèse a été de réfléchir à des stratégies expérimentales permettant de vérifier si l'effet stimulateur de la biosynthèse de 3 α ,5 α -THP exercé par la gelsémine ou *G. sempervirens in vitro* pourrait se reproduire *in vivo* et conduire effectivement à des régulations neurophysiologiques telles que des actions analgésiques et anxiolytiques. Bien évidemment, nous étions conscients que la mise en œuvre de telles stratégies nécessiterait plusieurs années de travaux avant d'obtenir des résultats exploitables. Néanmoins, il nous a paru indispensable de compléter, dès à présent, les résultats des expériences *in vitro* (voir section «Résultats», chapitres I et II, pages 98 à 143) par des analyses *in vivo* permettant de s'assurer que les variations de l'activité enzymatique 3 α -HSOR (enzyme synthétisant la 3 α ,5 α -THP) dans la ME pourraient avoir des répercussions sur la sensibilité à la douleur. Nos résultats (voir pages 144 à 159) démontrent que l'activité basale 3 α -HSOR de même que les modifications intervenant dans la fonction enzymatique 3 α -HSOR déterminent de façon significative la sensibilité à la douleur dans les conditions physiologiques et physiopathologiques. En effet, l'inhibition de l'activité biologique de la 3 α -HSOR dans la ME *in vivo* par injection intrathécale de Provera (Jarrell, 1984; Penning *et al.*, 1985) diminue les seuils de sensibilité thermique et mécanique chez les rats naïfs (effet pronociceptif) alors que l'administration de 3 α ,5 α -THP (neurostéroïde synthétisé grâce à l'activité réductrice de la 3 α -HSOR) augmente ces seuils (effet anti-nociceptif). Il apparaît donc que la Provera, en inhibant la 3 α -HSOR au niveau spinal, révèle un effet opposé à celui exercé par la 3 α ,5 α -THP endogène sur la nociception. De nombreuses études ont montré que la 3 α ,5 α -THP est un puissant modulateur des récepteurs GABA_A qui sont cruciaux pour la

neurotransmission inhibitrice considérée comme un facteur déterminant dans la perception de la douleur (Majewska, 1992; Kontinen *et al.*, 2001; Millan, 1999, 2002; Bennett et Simpson, 2004; Belelli et Lambert, 2005; Pathirathna *et al.*, 2005a). L'activité tonique ou basale de la 3 α -HSOR dans la ME *in vivo* s'avère donc être essentielle pour produire des concentrations endogènes de 3 α ,5 α -THP requises pour contribuer au maintien des seuils de sensibilité à des valeurs normales ou physiologiques.

Ayant observé que l'inhibition pharmacologique de la 3 α -HSOR dans la ME par la Provera entraînait une diminution des seuils de sensibilité nociceptive chez les animaux sains ou naïfs, nous avons voulu savoir si la 3 α -HSOR est un effecteur important de la plasticité structurale et fonctionnelle survenant dans les réseaux spinaux au cours des douleurs pathologiques (Woolf et Salter, 2000). Nous avons donc réalisé des analyses moléculaires et biochimiques pour déterminer les effets d'une douleur neuropathique induite par ligature lâche du nerf sciatique (Bennett et Xie, 1988) sur l'expression du gène et l'activité enzymatique de la 3 α -HSOR dans la ME. Nous avons constaté une hyperactivation de la fonction enzymatique de la 3 α -HSOR qui entraîne une sur-production de 3 α ,5 α -THP dans la ME des rats neuropathiques bien que les niveaux d'ARNm codant la 3 α -HSOR et les concentrations spinales en protéine 3 α -HSOR ne soient pas modifiés. Ces résultats démontrent l'existence d'une régulation positive de l'activité enzymatique 3 α -HSOR dans la ME au cours du développement de la douleur neuropathique chronique. De façon intéressante, nous n'avons pas observé de changement de la concentration de [³H]5 α -DHP néosynthétisée à partir de la [³H]PROG dans la ME des rats neuropathiques, ce qui suggère que l'activité 5 α -réductase (convertissant la PROG en 5 α -DHP) n'est pas le facteur clef dans la modulation de la douleur par les neurostéroïdes endogènes 3 α ,5 α -réduits. En revanche, la fonction enzymatique de la 3 α -HSOR qui détermine les concentrations spinales en 3 α ,5 α -THP semble jouer un rôle clef

dans la modulation des sensations douloureuses. En accord avec cette hypothèse, nous avons montré précédemment que l'inhibition de l'activité 5 α -réductase par le finastéride n'affecte pas la nociception dans des conditions basales mais uniquement au cours de la douleur inflammatoire et, en plus, seule la sensibilité thermique est affectée (Poisbeau *et al.*, 2005). Au contraire, la Provera, qui bloque significativement l'activité de la 3 α -HSOR et la formation de 3 α ,5 α -THP dans la ME, exerce un effet pro-nociceptif chez les rats contrôles et potentialise les symptômes de la douleur chez les animaux neuropathiques. L'ensemble de ces données indique que la 3 α -HSOR régule la transmission nociceptive dans les conditions physiologiques et neuropathologiques.

L'importance de l'activité biologique de la 3 α -HSOR dans le contrôle des fonctions spinales est aussi suggérée par l'expression abondante du gène codant la 3 α -HSOR dans la ME. En effet, la concentration en ARNm-3 α -HSOR détectée dans la ME n'est pas beaucoup plus faible que celle mesurée dans les testicules (un tissu stéroïdogénique classique exprimant des quantités importantes de plusieurs enzymes synthétisant les stéroïdes) alors que les taux d'ARNm codant les cytochromes P450scc et P450c17 dans la ME sont respectivement 1000 et 100 fois plus faibles que ceux déterminés dans les organes génitaux (Patte-Mensah *et al.*, 2004a; Kibaly *et al.*, 2005). Dans les voies neuronales spinales, la concentration en ARNm-3 α -HSOR est respectivement 50 ou 5 fois plus élevée que celles des ARNm-P450scc et ARNm-P450c17. Des travaux antérieurs de notre équipe ont mis en évidence une plasticité structurale (changements dans l'expression génique et dans la distribution cellulaire) et fonctionnelle (changements de l'activité enzymatique) du P450scc et du P450c17 dans la ME au cours de la douleur neuropathique (Patte-Mensah *et al.*, 2004a; Kibaly *et al.*, 2008). Nos données actuelles révèlent que la 3 α -HSOR n'exhibe qu'une plasticité fonctionnelle (une activité catalytique accrue) sans aucune modification structurale dans les cornes dorsale et ventrale de la ME des rats neuropathiques. Cette différence dans la réaction de la 3 α -HSOR

par rapport au P450scc et au P450c17 peut s'expliquer par l'expression de la 3α -HSOR qui (contrairement à l'expression modérée du P450scc et du P450c17) est déjà abondante et ubiquitaire dans la ME en situation normale, ce qui fait que le mécanisme régulateur enclenché au cours de la douleur chronique ne nécessite pas un changement structural dans la distribution de la 3α -HSOR mais simplement une adaptation fonctionnelle permettant d'accroître la quantité de $3\alpha,5\alpha$ -THP dans le circuit spinal des rats neuropathiques (Patte-Mensah *et al.*, 2004a,b, 2005). En effet, la régulation positive de la production de $3\alpha,5\alpha$ -THP dans la ME après ligature du nerf sciatique peut stimuler la neuroinhibition GABAergique et glycinergique permettant ainsi aux rats neuropathiques de s'accomoder (tant que possible) à l'état de douleur chronique (Kontinen *et al.*, 2001; Bennett et Simpson, 2004; Patte-Mensah *et al.*, 2004a). Cette hypothèse est aussi soutenue par des résultats précédents de notre équipe montrant que les taux endogènes de prégnènone et de $3\alpha,5\alpha$ -THP, qui augmentent de façon marquée dans la ME des rats neuropathiques deux jours après ligature du nerf sciatique, culminent au sixième jour avant de décliner légèrement au dixième jour tout en restant toujours plus élevés que les taux détectés chez les animaux témoins (Patte-Mensah *et al.*, 2004a).

En reproduisant expérimentalement une augmentation locale de l'activité réductrice de la 3α -HSOR dans les réseaux sensoriels spinaux par injection intrathécale de $3\alpha,5\alpha$ -THP dans la ME *in vivo*, nous avons observé un effet analgésique significatif chez les rats neuropathiques. En revanche, le blocage de l'activité de la 3α -HSOR dans la ME par injection intrathécale de Provera (qui est pro-nociceptif chez les rats naïfs) exacerbe l'état pathologique des animaux neuropathiques en aggravant les symptômes caractéristiques de la douleur (potentialisation de l'hyperalgie thermique et de l'allodynie mécanique, accentuation de la démarche et de la posture douloureuses ainsi que du repliement des pattes). Par ailleurs, les expériences de pulse-chase combinées à l'analyse HPLC et à la détection par scintillation en

flux continu ont montré que l'activité enzymatique 3α -HSOR est hyperactivée à la fois dans les cornes dorsale et ventrale de la ME de rats neuropathiques. L'ensemble de ces résultats suggère que la plasticité fonctionnelle de la 3α -HSOR dans la ME au cours de la douleur neuropathique peut être corrélée à la modulation des composantes sensorielles (seuils de sensibilité, allodynie, hyperalgie) et des paramètres moteurs (démarche, posture, position recroquevillée des pattes) affectés par la ligature lâche du nerf sciatique (Bennett et Xie, 1988).

Comme la Provera, l'indométhacine, médicament anti-inflammatoire non stéroïdien, est également capable d'inhiber l'activité de la 3α -HSOR (Penning *et al.*, 1985; Smithgall et Penning, 1985). L'indométhacine exerce des effets anti-inflammatoires en bloquant la production des eicosanoïdes via l'inhibition de l'activité des lipoxigénases (suppression de la formation des leucotriènes) ou par la stimulation de la réincorporation de l'acide arachidonique en triglycérides (réduction indirecte de la production de prostaglandines) (Siegel *et al.*, 1979; O'Neill et Lewis, 1989). Grâce à son action anti-inflammatoire, l'indométhacine induit des effets analgésiques périphériques permettant l'exploitation de ce médicament dans le traitement de la douleur inflammatoire aiguë (Ferreira *et al.*, 1978; Catania *et al.*, 1991). Toutefois, l'indométhacine est inefficace dans le traitement de la douleur chronique et présente également de nombreux effets secondaires tels que des effets déprimeurs et anxiogènes suite à une administration à long terme (Ananth et Ghadirian, 1980; Bishop *et al.*, 1987; Arner et Meyerson, 1988; Kingery, 1997). La démonstration d'un rôle majeur de la 3α -HSOR dans la modulation de la douleur fournie par notre travail suggère que la faible efficacité de l'indométhacine dans le traitement de la douleur chronique et ses effets psychotiques à long terme peuvent dépendre de l'inhibition exercée par l'indométhacine sur l'activité réductrice de la 3α -HSOR et donc sur la biosynthèse de $3\alpha,5\alpha$ -THP dans le SNC. Le rôle important joué par la $3\alpha,5\alpha$ -THP endogène dans le contrôle de la douleur (confère

notre étude), de l'anxiété et de la dépression illustre bien cette hypothèse (Majewska, 1992; Uzunov *et al.*, 1996; Brot *et al.*, 1997; Baulieu *et al.*, 1999; Goodchild *et al.*, 2000; Guidotti *et al.*, 2001; Bennett et Simpson, 2004; Belelli et Lambert, 2005).

Enfin, le fait que l'activité réductrice de la 3α -HSOR soit inhibée de manière dose-dépendante dans la ME par la substance P, un neurotransmetteur majeur de la transmission nociceptive, vient également renforcer l'idée que la 3α -HSOR est un effecteur cellulaire clef intervenant dans la modulation de la sensibilité à la douleur (Patte-Mensah *et al.*, 2005). Les substances capables de stimuler fortement l'activité 3α -HSOR (telles que la gelsémine et *G. sempervirens*) présentent donc un potentiel intéressant pour l'élaboration de stratégies contre les douleurs pathologiques.

CONCLUSION GENERALE

L'objectif du travail de thèse (voir descriptif détaillé dans l'introduction pages 60 à 62) était de rechercher les effets de *G. sempervirens* sur la biosynthèse de $3\alpha,5\alpha$ -THP qui est un neurostéroïde fortement impliqué dans la modulation de l'anxiété et des sensations douloureuses. Pour cela, nous avons étudié les effets cellulaires et les mécanismes d'action de *G. sempervirens* et de son principe actif, la gelsémine, sur la production de $3\alpha,5\alpha$ -THP dans la ME et le système limbique (en particulier l'H-A) de rat qui sont des structures nerveuses respectivement impliquées dans le contrôle de la douleur et de l'anxiété. Par ailleurs, l'analogie structurale de la gelsémine avec la strychnine, un antagoniste spécifique des Gly-Rs, nous a conduits à rechercher les interactions entre les modulateurs du système glycinergique et la neurostéroïdogénèse.

Nos résultats constituent les premières données démontrant que la biosynthèse de $3\alpha,5\alpha$ -THP est stimulée dans la ME par la glycine et la gelsémine qui agissent via les Gly-Rs. En effet, l'augmentation de la production endogène de $3\alpha,5\alpha$ -THP induite par la glycine ou la gelsémine est complètement bloquée par la strychnine, l'antagoniste sélectif des Gly-Rs. De plus, nous avons observé que l'administration concomitante de glycine et de gelsémine exerce un effet stimulateur additif plus important que celui produit par la glycine ou la gelsémine seule.

Une fois que nous avons fixé des conditions expérimentales rigoureuses en étudiant l'action de la gelsémine synthétique sur la production de $3\alpha,5\alpha$ -THP, nous nous sommes appuyés sur ces conditions pour comparer les effets des dilutions homéopathiques de gelsémine et de *G. sempervirens* sur la biosynthèse de $3\alpha,5\alpha$ -THP dans la ME et l'H-A de rat. Nos résultats montrent que, parmi les dilutions homéopathiques testées, seules les préparations 5 CH et 9 CH de gelsémine et de *G. sempervirens* stimulent efficacement la formation de $3\alpha,5\alpha$ -THP dans la ME et l'H-A. Le pourcentage de stimulation de la biosynthèse de $3\alpha,5\alpha$ -THP en présence de *G. sempervirens* est plus important que celui

obtenu avec la gelsémine. Par ailleurs, l'action stimulatrice de *G. sempervirens* ou de gelsémine à 5 CH est bloquée par la strychnine, démontrant que les Gly-Rs sont également impliqués dans les mécanismes d'action des préparations homéopathiques. Ces résultats originaux fournissent deux informations majeures:

- (i) les résultats démontrent pour la première fois les effets cellulaires et pharmacologiques des préparations homéopathiques de *G. sempervirens*,
- (ii) nos données indiquent également que de faibles concentrations de *G. sempervirens* restent très actives pour la stimulation de la sécrétion de $3\alpha,5\alpha$ -THP dans le SNC suggérant que l'utilisation thérapeutique de *G. sempervirens* pourrait effectivement être dénuée d'effets indésirables.

Dans la dernière partie du travail de thèse, nous avons complété les résultats des expériences *in vitro* par des études *in vivo* qui nous ont permis de nous assurer que les modifications de l'activité de la 3α -HSOR (enzyme clef synthétisant la $3\alpha,5\alpha$ -THP) dans la ME se répercutent effectivement sur la sensibilité à la douleur. Les données que nous avons obtenues permettent de poser les bases pour des travaux ultérieurs (voir perspectives, pages 182 à 185) qui établiront le lien direct entre la stimulation que *G. sempervirens* ou la gelsémine pourrait exercer sur la production de $3\alpha,5\alpha$ -THP dans le SNC *in vivo* et les conséquences fonctionnelles ou neurophysiologiques. Pour l'instant, nous observons de façon très intéressante que le blocage de la biosynthèse de $3\alpha,5\alpha$ -THP dans la ME *in vivo* par injection intrathécale de Provera (un inhibiteur de l'activité 3α -HSOR) induit un effet pronociceptif chez les animaux sains (ou naïfs) et aggrave les symptômes de la douleur chez les rats neuropathiques. En revanche, l'augmentation de la concentration endogène de $3\alpha,5\alpha$ -THP dans la ME *in vivo* par administration intrathécale de $3\alpha,5\alpha$ -THP provoque un effet anti-nociceptif chez les rats naïfs et exerce une action analgésique chez les animaux neuropathiques en supprimant l'hyperalgie thermique ainsi que l'allodynie mécanique.

Dans le but de fournir aux lecteurs une vue synthétique des travaux réalisés et des résultats obtenus dans le cadre de la thèse, nous avons élaboré un schéma hypothétique et non exhaustif qui récapitule les données essentielles de notre travail (Figure 23).

L'ensemble des résultats exposés dans la thèse ouvre des perspectives intéressantes pour des recherches visant à développer, contre la douleur et l'anxiété, des stratégies basées sur l'utilisation de hautes dilutions de *G. sempervirens* ou de gelsémine qui seront dénuées d'effets indésirables mais conserveront des propriétés pharmacologiques précises, notamment un nombre de moles du principe actif identifiable, un mécanisme d'action cellulaire évoquant les Gly-Rs et une capacité stimulatrice élevée de la biosynthèse de $3\alpha,5\alpha$ -THP dans le SNC.

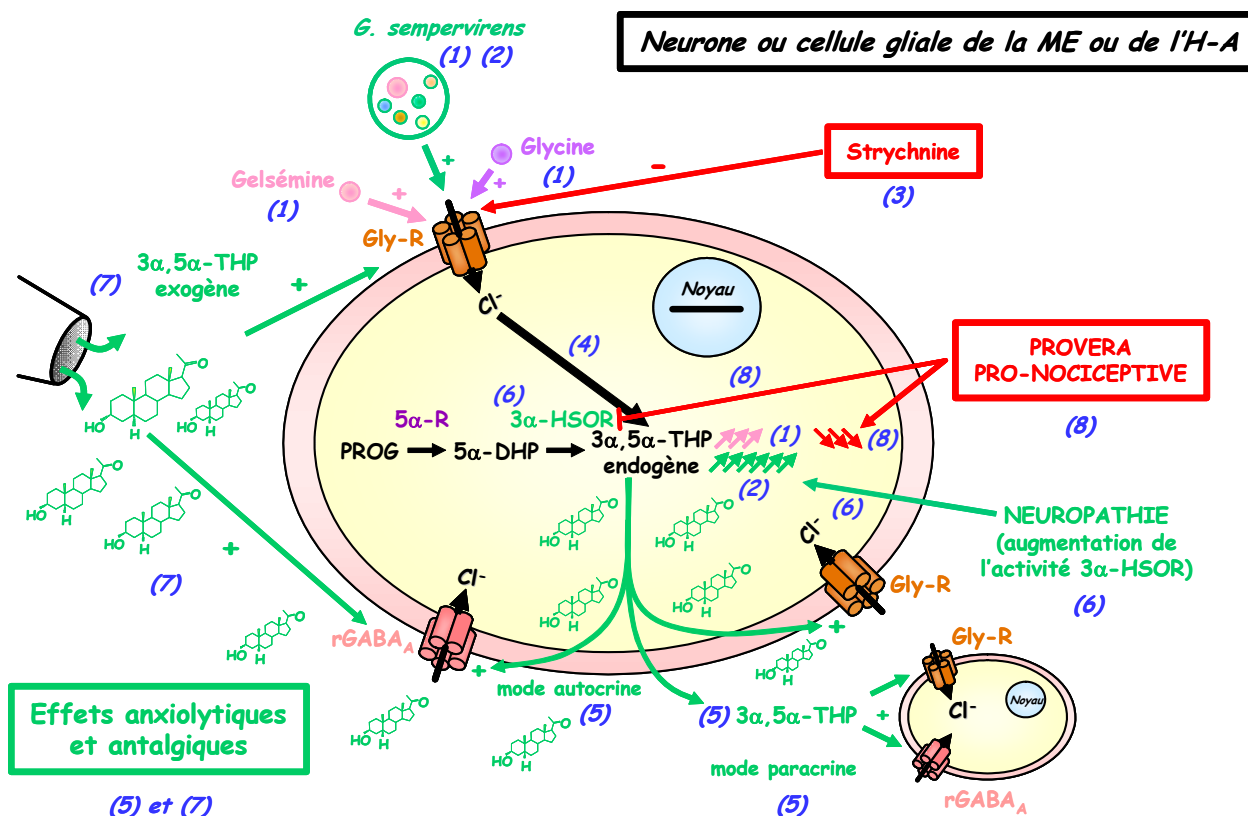


Figure 23: Schéma hypothétique du mode d'action de la glycine, de la gelsémine et de G. sempervirens dans le contrôle de la douleur et de l'anxiété.

(1) La glycine, la gelsémine et G. sempervirens augmentent la production endogène de 3 α ,5 α -THP. (2) L'action stimulatrice de G. sempervirens est plus importante que celle de la gelsémine, suggérant une synergie positive entre la gelsémine et les autres constituants présents dans la composition de G. sempervirens. (3) La strychnine, antagoniste sélectif des Gly-Rs, bloque complètement l'effet stimulateur de la glycine, de la gelsémine et de G. sempervirens, montrant ainsi que les Gly-Rs sont impliqués dans la médiation des effets de ces composés sur la neurostéroïdogénèse. (4) Toutefois, il nous reste à identifier les mécanismes intracellulaires conduisant de l'influx d'ions Cl⁻ (déclenché à partir des Gly-Rs par la glycine, la gelsémine ou G. sempervirens) à la stimulation de la 3 α -HSOR (enzyme de synthèse de la 3 α ,5 α -THP). (5) La 3 α ,5 α -THP néosynthétisée, sécrétée par le neurone ou la cellule gliale (ME ou H-A), peut agir de façon autocrine et/ou paracrine sur des récepteurs membranaires tels que les récepteurs GABA_A ou les Gly-Rs. L'activation des ces deux types de récepteurs, intervenant dans la neurotransmission inhibitrice, pourrait expliquer les effets anxiolytiques et antalgiques de G. sempervirens. (6) Au cours de la douleur neuropathique, la biosynthèse de 3 α ,5 α -THP est augmentée dans la ME suite à l'activation de la 3 α -HSOR. (7) L'injection intrathécale de 3 α ,5 α -THP induit un effet antalgique chez les animaux neuropathiques alors que la Provera (8), en bloquant la synthèse de 3 α ,5 α -THP, exerce une action pro-nociceptive.

PERSPECTIVES

1°) Identification des mécanismes de signalisation intracellulaire déclenchés par la gelsémine et *G. sempervirens*

Nous avons montré qu'aussi bien la gelsémine synthétique que les préparations homéopathiques de gelsémine et de *G. sempervirens* stimulent la production de $3\alpha,5\alpha$ -THP en agissant via le Gly-R dans la ME et l'H-A (voir Résultats du chapitre I, pages 98 à 109, et du chapitre II, pages 110 à 143). Toutefois, les cascades de signalisation intracellulaire déclenchées à partir des Gly-Rs pour la modulation de la biosynthèse de $3\alpha,5\alpha$ -THP sont encore totalement inconnues. La stimulation du Gly-R conduit à une augmentation de l'influx d'ions chlorures qui pourrait modifier localement le pH intracellulaire. En effet, le pH est l'un des facteurs de régulation des activités enzymatiques 5α -R et 3α -HSOR (voir introduction, pages 20 à 21). Pour confirmer l'hypothèse de l'implication du pH, nous réaliserons, sur des tranches de ME et d'H-A, deux séries d'expériences. D'abord, nous utiliserons la technique de microfluorimétrie (avec des sondes à protons comme le 2',7'-bis(carboxyéthyle)-5(6)-carboxyfluoréscéine ou BCECF) pour déterminer les variations de pH (les changements de la concentration intracellulaire de protons) provoquées par la gelsémine, *G. sempervirens* et la glycine via les Gly-Rs. Ensuite, les effets des variations de pH déterminées seront évalués sur la conversion de [3 H]PROG en [3 H] $3\alpha,5\alpha$ -THP dans la ME et l'H-A grâce à la combinaison des expériences de pulse-chase avec l'HPLC et la détection en flux continu (Flo/One).

2°) Effets cellulaires et mécanismes d'action des autres constituants de *G. sempervirens*

Nos travaux démontrent que l'effet stimulateur induit par les préparations homéopathiques de *G. sempervirens* est plus important que celui exercé par l'alcaloïde gelsémine qui est le principe actif majoritaire dans la composition de *G. sempervirens*. Ce résultat suggère l'existence d'une synergie positive entre la gelsémine et les autres constituants présents dans *G. sempervirens* tels que les alcaloïdes sempervirine, gelsémicine, gelsédine et gelsénicine. Afin de vérifier cette hypothèse, nous rechercherons les effets cellulaires et les mécanismes d'action de chacune de ces molécules sur la biosynthèse du neurostéroïde $3\alpha,5\alpha$ -THP dans la ME et le système limbique (H-A). Comme c'était le cas pour la gelsémine avant le début de nos travaux, aucune donnée fondamentale n'est actuellement disponible sur les mécanismes d'action biologiques et cellulaires des autres alcaloïdes contenus dans *G. sempervirens*. Différentes séries de tests seront alors effectuées en utilisant la technique de pulse-chase/HPLC-Flo/One pour déterminer respectivement l'action de la sempervirine, de la gelsémicine, de la gelsédine et de la gelsénicine sur la production de $3\alpha,5\alpha$ -THP dans la ME et l'H-A. Si certaines de ces substances exercent un effet sur la biosynthèse de $3\alpha,5\alpha$ -THP, le récepteur impliqué dans la médiation de cet effet sera caractérisé pharmacologiquement. En particulier, nous vérifierons si l'effet est également antagonisé par la strychnine, ce qui permettra de savoir si les Gly-Rs sont concernés. Nous testerons également les effets de l'administration concomitante de ces substances sur la formation de $3\alpha,5\alpha$ -THP dans la ME et l'H-A en les comparant aux effets exercés par chacune d'elles de manière singulière.

3°) Etudes *in vivo* des effets de la gelsémine et de *G. sempervirens* sur les concentrations endogènes de 3 α ,5 α -THP dans le SNC

Cette phase du travail permettra d'établir le lien direct entre les traitements *in vivo* des animaux avec la gelsémine ou *G. sempervirens* et les concentrations endogènes de 3 α ,5 α -THP présentes dans les structures clés du SNC contrôlant l'anxiété (système limbique) et la douleur (ME). Pour cela, nous doserons les quantités de 3 α ,5 α -THP grâce à un ensemble de techniques combinant l'extraction tissulaire des stéroïdes, la purification des extraits sur colonne Sep-pak C₁₈, la séparation par HPLC et le dosage radioimmunologique ou RIA (Mensah-Nyagan *et al.*, 1996a,b, 2000; Patte-Mensah *et al.*, 2004a; Kibaly *et al.*, 2008). Les concentrations de 3 α ,5 α -THP seront mesurées dans la ME et l'H-A de différents groupes de rats (neuropathiques, anxieux, témoins) traités avec le placebo ou les préparations de *G. sempervirens* ou de gelsémine.

4°) Analyses *in vivo* des effets anxiolytique et antalgique des préparations homéopathiques de gelsémine et de *G. sempervirens*

Grâce à des expériences *in vitro*, nous avons démontré que la gelsémine et *G. sempervirens* stimulent la production du neurostéroïde 3 α ,5 α -THP qui joue un rôle crucial dans la régulation de l'anxiété et de la douleur. De façon complémentaire, nous avons réalisé des analyses *in vivo* qui confirment de façon intéressante que l'augmentation de la concentration endogène de 3 α ,5 α -THP dans la ME avec des injections intrathécales induit un effet antalgique chez les rats neuropathiques et une action anti-nociceptive chez les animaux sains. Nous continuerons ces investigations avec des analyses comportementales des effets

anxiolytique et antalgique des préparations homéopathiques de gelsémine et de *G. sempervirens*. Les analyses seront effectuées avec des tests comportementaux automatisés permettant de mesurer les niveaux d'anxiété chez le rat. Nous utiliserons le test du labyrinthe en croix surélevé ou Elevated Plus-Maze et le test d'émergence dans un open field. Les méthodes comportementales du Plantar et des filaments de von Frey seront utilisées pour évaluer respectivement la sensibilité nociceptive thermique ou mécanique. Les concentrations endogènes de $3\alpha,5\alpha$ -THP seront mesurées dans la ME ou le système limbique des animaux chez lesquels l'étude comportementale révélera un effet antalgique ou anxiolytique significatif après traitement *in vivo* avec les préparations de gelsémine ou de *G. sempervirens*. De plus, des tests comportementaux seront réalisés pour vérifier si les éventuelles actions antalgiques et anxiolytiques de *G. sempervirens* et de la gelsémine se maintiennent ou non en présence de Provera (inhibiteur de la 3α -HSOR qui bloque la biosynthèse de $3\alpha,5\alpha$ -THP) et de strychnine (antagoniste des Gly-Rs). L'ensemble des résultats escomptés permettra de s'assurer si la gelsémine et *G. sempervirens* induisent bien leurs effets *in vivo* en stimulant la production endogène de $3\alpha,5\alpha$ -THP dans le SNC, et ce grâce à une activation des Gly-Rs.

Des progrès importants restent à faire dans le domaine du traitement de la douleur chronique et de l'anxiété. Nous espérons donc qu'à terme, nos travaux fourniront des résultats intéressants qui pourraient être exploités pour l'élaboration de stratégies efficaces contre ces neuropathologies.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Agarwal AK, Auchus RJ (2005) Minireview: cellular redox state regulates hydroxysteroid dehydrogenase activity and intracellular hormone potency. *Endocrinology* 146:2531-2538.
- Aggleton JP (1993) The contribution of the amygdala to normal and abnormal emotional states. *Trends Neurosci* 16:328-333.
- Aggleton JP (2000) *The amygdala (second edition): a functional analysis*. Oxford University Press, Oxford.
- 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 USA* 103:14602-14607.
- Agis-Balboa RC, Pinna G, Pibiri F, Kadriu B, Costa E, Guidotti A (2007) Down-regulation of neurosteroid biosynthesis in corticolimbic circuits mediates social isolation-induced behavior in mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 104:18736-18741.
- Akk G, Covey DF, Evers AS, Steinbach JH, Zorumski CF, Mennerick S (2007) Mechanisms of neurosteroid interactions with GABA(A) receptors. *Pharmacol Ther* 116:35-57.
- Akwa Y, Baulieu EE (1999) Neurosteroids: behavioral aspects and physiological implications. *J Soc Biol* 193:293-298.
- Akwa Y, Purdy RH, Koob GF, Britton KT (1999) The amygdala mediates the anxiolytic-like effect of the neurosteroid allopregnanolone in rat. *Behav Brain Res* 106:119-125.
- Ananth J, Ghadirian AM (1980) Drug-induced mood disorders. *Int Pharmacopsychiatry* 15:59-73.
- Antoniadis EA, Winslow JT, Davis M, Amaral DG (2007) Role of the primate amygdala in fear-potentiated startle: effects of chronic lesions in the rhesus monkey. *J Neurosci* 27:7386-7396.
- Aranda A, Pascual A (2001) Nuclear hormone receptors and gene expression. *Physiol Rev* 81:1269-1304.
- Arner S, Meyerson BA (1988) Lack of analgesic effect of opioids on neuropathic and idiopathic forms of pain. *Pain* 33:11-23.
- Ballantyne JC, Shin NS (2008) Efficacy of opioids for chronic pain: a review of the evidence. *Clin J Pain* 24:469-478.
- Bannerman DM, Deacon RM, Offen S, Friswell J, Grubb M, Rawlins JN (2002) Double dissociation of function within the hippocampus: spatial memory and hyponeophagia. *Behav Neurosci* 116:884-901.

- Bannerman DM, Grubb M, Deacon RM, Yee BK, Feldon J, Rawlins JN (2003) Ventral hippocampal lesions affect anxiety but not spatial learning. *Behav Brain Res* 139:197-213.
- Bannerman DM, Rawlins JN, McHugh SB, Deacon RM, Yee BK, Bast T, Zhang WN, Pothuizen HH, Feldon J (2004) Regional dissociations within the hippocampus--memory and anxiety. *Neurosci Biobehav Rev* 28:273-283.
- Bannister AJ, Kouzarides T (1996) The CBP co-activator is a histone acetyltransferase. *Nature* 384:641-643.
- Barad M, Gean PW, Lutz B (2006) The role of the amygdala in the extinction of conditioned fear. *Biol Psychiatry* 60:322-328.
- Barbaccia ML, Roscetti G, Trabucchi M, Purdy RH, Mostallino MC, Perra C, Concas A, Biggio G (1996) Isoniazid-induced inhibition of GABAergic transmission enhances neurosteroid content in the rat brain. *Neuropharmacology* 35:1299-1305.
- Barbaccia ML, Serra M, Purdy RH, Biggio G (2001) Stress and neuroactive steroids. *Int Rev Neurobiol* 46:243-272.
- Barbaccia ML, Colombo G, Affricano D, Carai MA, Vacca G, Melis S, Purdy RH, Gessa GL (2002) GABA(B) receptor-mediated increase of neurosteroids by gamma-hydroxybutyric acid. *Neuropharmacology* 42:782-791.
- Barbaccia ML (2004) Neurosteroidogenesis: relevance to neurosteroid actions in brain and modulation by psychotropic drugs. *Crit Rev Neurobiol* 16:67-74.
- Bast T, Feldon J (2003) Hippocampal modulation of sensorimotor processes. *Prog Neurobiol* 70:319-345.
- Baulieu EE, Robel P, Schumacher M (1999) *Contemporary Endocrinology*. Totowa, NJ: Humana Press.
- Beato M, Chavez S, Truss M (1996) Transcriptional regulation by steroid hormones. *Steroids* 61:240-251.
- Beato M, Klug J (2000) Steroid hormone receptors: an update. *Hum Reprod Update* 6:225-236.
- Becker CM (1992) Selective neurotoxicity: convulsants acting at the inhibitory glycine receptors. In *Handbook of Experimental pharmacology* (Herken HF, Hucho F, eds), pp 539-575. Springer, Heidelberg.
- Belelli D, Lambert JJ (2005) Neurosteroids: endogenous regulators of the GABA(A) receptor. *Nat Rev Neurosci* 6:565-575.

- Benedetti F, Vighetti S, Amanzio M, Casadio C, Oliaro A, Bergamasco B, Maggi G (1998) Dose-response relationship of opioids in nociceptive and neuropathic postoperative pain. *Pain* 74:205-211.
- Bennett GJ, Xie YK (1988) A peripheral mononeuropathy in rat that produces disorders of pain sensation like those seen in man. *Pain* 33:87-107.
- Bennett MI, Simpson KH (2004) Gabapentin in the treatment of neuropathic pain. *Palliat Med* 18:5-11.
- Benyamin R, Trescot AM, Datta S, Buenaventura R, Aldaka R, Sehgal N, Glaser SE, Vallejo R (2008) Opioid complications and side effects. *Pain Physician* 11:S105-S120.
- Bergeron R, de Montigny C, Debonnel G (1996) Potentiation of neuronal NMDA response induced by dehydroepiandrosterone and its suppression by progesterone: effects mediated via sigma receptors. *J Neurosci* 16:1193-1202.
- Bertoglio LJ, Joca SR, Guimaraes FS (2006) Further evidence that anxiety and memory are regionally dissociated within the hippocampus. *Behav Brain Res* 175:183-188.
- Betz H, Laube B (2006) Glycine receptors: recent insights into their structural organization and functional diversity. *J Neurochem* 97:1600-1610.
- Biggio G, Concas A, Follesa P, Sanna E, Serra M (2007) Stress, ethanol, and neuroactive steroids. *Pharmacol Ther* 116:140-171.
- Bird CM, Burgess N (2008) The hippocampus and memory: insights from spatial processing. *Nat Rev Neurosci* 9:182-194.
- Bishop LC, Bisset AD, Benson JI (1987) Mania and indomethacin. *J Clin Psychopharmacol* 7:203-204.
- Bishop SJ (2007) Neurocognitive mechanisms of anxiety: an integrative account. *Trends Cogn Sci* 11:307-316.
- Bitran D, Shiekh M, McLeod M (1995) Anxiolytic effect of progesterone is mediated by the neurosteroid allopregnanolone at brain GABAA receptors. *J Neuroendocrinol* 7:171-177.
- Blanchard Y, Seenundun S, Robaire B (2007) The promoter of the rat 5alpha-reductase type 1 gene is bidirectional and Sp1-dependent. *Mol Cell Endocrinol* 264:171-183.
- Blanco JC, Minucci S, Lu J, Yang XJ, Walker KK, Chen H, Evans RM, Nakatani Y, Ozato K (1998) The histone acetylase PCAF is a nuclear receptor coactivator. *Genes Dev* 12:1638-1651.
- Bouhassira D (1994) Changes in spinal dorsal horn induced by peripheral nerve involvement. *Cah Anesthesiol* 42:689-697.

- Bouhassira D (2000) Les douleurs neuropathiques. Paris. Institut UPSA de la douleur.
- Bousta D, Soulimani R, Jarmouni I, Belon P, Falla J, Froment N, Younos C (2001) Neurotropic, immunological and gastric effects of low doses of *Atropa belladonna* L., *Gelsemium sempervirens* L. and Poumon histamine in stressed mice. *J Ethnopharmacol* 74:205-215.
- Bremner JD (1999) Alterations in brain structure and function associated with post-traumatic stress disorder. *Semin Clin Neuropsychiatry* 4:249-255.
- Bremner JD (2004) Brain imaging in anxiety disorders. *Expert Rev Neurother* 4:275-284.
- Brinton RD, Wang JM (2006) Therapeutic potential of neurogenesis for prevention and recovery from Alzheimer's disease: allopregnanolone as a proof of concept neurogenic agent. *Curr Alzheimer Res* 3:185-190.
- Brot MD, Akwa Y, Purdy RH, Koob GF, Britton KT (1997) The anxiolytic-like effects of the neurosteroid allopregnanolone: interactions with GABA(A) receptors. *Eur J Pharmacol* 325:1-7.
- Buchel C, Dolan RJ (2000) Classical fear conditioning in functional neuroimaging. *Curr Opin Neurobiol* 10:219-223.
- Carrasco MA, Castro PA, Sepulveda FJ, Cuevas M, Tapia JC, Izaurieta P, van Zundert B, Aguayo LG (2007) Anti-homeostatic synaptic plasticity of glycine receptor function after chronic strychnine in developing cultured mouse spinal neurons. *J Neurochem* 100:1143-1154.
- Casellas P, Galiegue S, Basile AS (2002) Peripheral benzodiazepine receptors and mitochondrial function. *Neurochem Int* 40:475-486.
- Catania A, Arnold J, Macaluso A, Hiltz ME, Lipton JM (1991) Inhibition of acute inflammation in the periphery by central action of salicylates. *Proc Natl Acad Sci USA* 88:8544-8547.
- Celotti F, Melcangi RC, Martini L (1992) The 5 alpha-reductase in the brain: molecular aspects and relation to brain function. *Front Neuroendocrinol* 13:163-215.
- Charalampopoulos I, Alexaki VI, Lazaridis I, Dermitzaki E, Avlonitis N, Tsatsanis C, Calogeropoulou T, Margioris AN, Castanas E, Gravanis A (2006) G protein-associated, specific membrane binding sites mediate the neuroprotective effect of dehydroepiandrosterone. *Faseb J* 20:577-579.
- Chen HS, Lipton SA (2006) The chemical biology of clinically tolerated NMDA receptor antagonists. *J Neurochem* 97:1611-1626.

- Cherny NI, Thaler HT, Friedlander-Klar H, Lapin J, Foley KM, Houde R, Portenoy RK (1994) Opioid responsiveness of cancer pain syndromes caused by neuropathic or nociceptive mechanisms: a combined analysis of controlled, single-dose studies. *Neurology* 44:857-861.
- Choi DW, Rothman SM (1990) The role of glutamate neurotoxicity in hypoxic-ischemic neuronal death. *Annu Rev Neurosci* 13:171-182.
- Compagnone NA, Mellon SH (2000) Neurosteroids: biosynthesis and function of these novel neuromodulators. *Front Neuroendocrinol* 21:1-56.
- Conroy H, Chakrabarti JK (1959) NMR spectra of gelsemine derivatives. The structure and biogenesis of the alkaloid gelsemine. *Tetrahedron Lett* 1:6-13.
- Corpechot C, Robel P, Axelson M, Sjoval J, Baulieu EE (1981) Characterization and measurement of dehydroepiandrosterone sulfate in rat brain. *Proc Natl Acad Sci USA* 78:4704-4707.
- Corpechot C, Synguelakis M, Talha S, Axelson M, Sjoval J, Vihko R, Baulieu EE, Robel P (1983) Pregnenolone and its sulfate ester in the rat brain. *Brain Res* 270:119-125.
- Danysz W, Parsons CG (1998) Glycine and N-methyl-D-aspartate receptors: physiological significance and possible therapeutic applications. *Pharmacol Rev* 50:597-664.
- Davis M (1992) The role of the amygdala in fear and anxiety. *Annu Rev Neurosci* 15:353-375.
- De Koninck Y, Henry JL (1991) Substance P-mediated slow excitatory postsynaptic potential elicited in dorsal horn neurons in vivo by noxious stimulation. *Proc Natl Acad Sci USA* 88:11344-11348.
- De Roo M, Rodeau JL, Schlichter R (2003) Dehydroepiandrosterone potentiates native ionotropic ATP receptors containing the P2X2 subunit in rat sensory neurones. *J Physiol* 552:59-71.
- Debonnel G, Bergeron R, de Montigny C (1996) Potentiation by dehydroepiandrosterone of the neuronal response to N-methyl-D-aspartate in the CA3 region of the rat dorsal hippocampus: an effect mediated via sigma receptors. *J Endocrinol* 150 Suppl:S33-S42.
- Decosterd I, Woolf CJ (2000) Spared nerve injury: an animal model of persistent peripheral neuropathic pain. *Pain* 87:149-158.
- Depaulis A, Helfer V, Deransart C, Marescaux C (1997) Anxiogenic-like consequences in animal models of complex partial seizures. *Neurosci Biobehav Rev* 21:767-774.

- Desobeau P, Rodriguez R (1990) *Gelsemium sempervirens*. *Encycl. Méd. Chir. (Paris, France), Homéopathie*, 38595 A¹⁰, 2^{nde} édition, 6 p.
- Do-Rego JL, Mensah-Nyagan AG, Beaujean D, Vaudry D, Sieghart W, Luu-The V, Pelletier G, Vaudry H (2000) gamma-Aminobutyric acid, acting through gamma -aminobutyric acid type A receptors, inhibits the biosynthesis of neurosteroids in the frog hypothalamus. *Proc Natl Acad Sci USA* 97:13925-13930.
- Do-Rego JL, Mensah-Nyagan AG, Beaujean D, Leprince J, Tonon MC, Luu-The V, Pelletier G, Vaudry H (2001) The octadecaneuropeptide ODN stimulates neurosteroid biosynthesis through activation of central-type benzodiazepine receptors. *J Neurochem* 76:128-138.
- Dubrovsky BO (2005) Steroids, neuroactive steroids and neurosteroids in psychopathology. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 29:169-192.
- Dubrovsky B (2006) Neurosteroids, neuroactive steroids, and symptoms of affective disorders. *Pharmacol Biochem Behav* 84:644-655.
- Dudeck O, Lubben S, Eipper S, Knorle R, Kirsch M, Honegger J, Zentner J, Feuerstein TJ (2003) Evidence for strychnine-sensitive glycine receptors in human amygdala. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 368:181-187.
- Dyck IR, Phillips KA, Warshaw MG, Dolan RT, Shea MT, Stout RL, Massion AO, Zlotnick C, Keller MB (2001) Patterns of personality pathology in patients with generalized anxiety disorder, panic disorder with and without agoraphobia, and social phobia. *J Personal Disord* 15:60-71.
- Engin E, Treit D (2008) The effects of intra-cerebral drug infusions on animals' unconditioned fear reactions: A systematic review. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 32:1399-1419.
- Ferreira SH, Lorenzetti BB, Correa FM (1978) Central and peripheral antialgesic action of aspirin-like drugs. *Eur J Pharmacol* 53:39-48.
- File SE (2000) The amygdala: anxiety and benzodiazepines, in *The amygdala (second edition): a functional analysis* (Aggleton JP, ed), pp 195-212. Oxford University Press, Oxford.
- Finn DA, Roberts AJ, Long S, Tanchuck M, Phillips TJ (2003) Neurosteroid consumption has anxiolytic effects in mice. *Pharmacol Biochem Behav* 76:451-462.
- Follesa P, Biggio F, Talani G, Murru L, Serra M, Sanna E, Biggio G (2006) Neurosteroids, GABAA receptors, and ethanol dependence. *Psychopharmacology (Berl)* 186:267-280.

- Fonte C, Grenier J, Trousson A, Chauchereau A, Lahuna O, Baulieu EE, Schumacher M, Massaad C (2005) Involvement of beta-catenin and unusual behavior of CBP and p300 in glucocorticosteroid signaling in Schwann cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 102:14260-14265.
- Fossat P, Sibon I, Le Masson G, Landry M, Nagy F (2007) L-type calcium channels and NMDA receptors: a determinant duo for short-term nociceptive plasticity. *Eur J Neurosci* 25:127-135.
- Francati V, Vermetten E, Bremner JD (2007) Functional neuroimaging studies in posttraumatic stress disorder: review of current methods and findings. *Depress Anxiety* 24:202-218.
- Frye CA, Walf AA (2002) Changes in progesterone metabolites in the hippocampus can modulate open field and forced swim test behavior of proestrous rats. *Horm Behav* 41:306-315.
- Frye CA, Walf AA, Rhodes ME, Harney JP (2004) Progesterone enhances motor, anxiolytic, analgesic, and antidepressive behavior of wild-type mice, but not those deficient in type 1 5 alpha-reductase. *Brain Res* 1004:116-124.
- Garakani A, Mathew SJ, Charney DS (2006) Neurobiology of anxiety disorders and implications for treatment. *Mt Sinai J Med* 73:941-949.
- Goldacre B (2007) Benefits and risks of homoeopathy. *Lancet* 370:1672-1673.
- Goodchild CS, Guo Z, Nadeson R (2000) Antinociceptive properties of neurosteroids I. Spinally-mediated antinociceptive effects of water-soluble aminosteroids. *Pain* 88:23-29.
- Goosens KA, Maren S (2001) Contextual and auditory fear conditioning are mediated by the lateral, basal, and central amygdaloid nuclei in rats. *Learn Mem* 8:148-155.
- Grecian S, Aube J (2007) Double conjugate addition of a nitropropionate ester to a quinone monoketal: synthesis of an advanced intermediate to (+/-)-gelsemine. *Org Lett* 9:3153-3156.
- Grelik C, Bennett GJ, Ribeiro-da-Silva A (2005) Autonomic fibre sprouting and changes in nociceptive sensory innervation in the rat lower lip skin following chronic constriction injury. *Eur J Neurosci* 21:2475-2487.
- Griffin LD, Gong W, Verot L, Mellon SH (2004) Niemann-Pick type C disease involves disrupted neurosteroidogenesis and responds to allopregnanolone. *Nat Med* 10:704-711.
- Gross JJ (1999) Emotion regulation: past, present, future. *Cognition and Emotion* 13:551-573.

- Guarneri P, Guarneri R, Cascio C, Piccoli F, Papadopoulos V (1995) gamma-Aminobutyric acid type A/benzodiazepine receptors regulate rat retina neurosteroidogenesis. *Brain Res* 683:65-72.
- Guerra B, Diaz M, Alonso R, Marin R (2004) Plasma membrane oestrogen receptor mediates neuroprotection against beta-amyloid toxicity through activation of Raf-1/MEK/ERK cascade in septal-derived cholinergic SN56 cells. *J Neurochem* 91:99-109.
- Guidotti A, Dong E, Matsumoto K, Pinna G, Rasmusson AM, Costa E (2001) The socially-isolated mouse: a model to study the putative role of allopregnanolone and 5alpha-dihydroprogesterone in psychiatric disorders. *Brain Res Brain Res Rev* 37:110-115.
- Gureje O (2007) Psychiatric aspects of pain. *Curr Opin Psychiatry* 20:42-46.
- Gureje O (2008) Treating chronic pain in the context of comorbid depression. *Pain* 134:3-4.
- Haines DE, Mihailoff GA, Yeziarski RP (1997) The Spinal Cord, in *Fundamental Neuroscience* (Haines DE, ed), pp. 129-141. Churchill Livingstone, New York .
- Hammer F, Compagnone NA, Vigne JL, Bair SR, Mellon SH (2004) Transcriptional regulation of P450scc gene expression in the embryonic rodent nervous system. *Endocrinology* 145:901-912.
- Hargreaves K, Dubner R, Brown F, Flores C, Joris J (1988) A new and sensitive method for measuring thermal nociception in cutaneous hyperalgesia. *Pain* 32:77-88.
- Harvey RJ, Depner UB, Wassle H, Ahmadi S, Heindl C, Reinold H, Smart TG, Harvey K, Schutz B, Abo-Salem OM, Zimmer A, Poisbeau P, Welzl H, Wolfer DP, Betz H, Zeilhofer HU, Muller U (2004) GlyR alpha3: an essential target for spinal PGE2-mediated inflammatory pain sensitization. *Science* 304:884-887.
- Hirani K, Sharma AN, Jain NS, Ugale RR, Chopde CT (2005) Evaluation of GABAergic neuroactive steroid 3alpha-hydroxy-5alpha-pregnane-20-one as a neurobiological substrate for the anti-anxiety effect of ethanol in rats. *Psychopharmacology (Berl)* 180:267-278.
- Hogan Q (2002) Animal pain models. *Reg Anesth Pain Med* 27:385-401.
- Hosie AM, Wilkins ME, da Silva HM, Smart TG (2006) Endogenous neurosteroids regulate GABAA receptors through two discrete transmembrane sites. *Nature* 444:486-489.
- Hylden JL, Wilcox GL (1980) Intrathecal morphine in mice: a new technique. *Eur J Pharmacol* 67:313-316.
- Jarrell J (1984) Studies on the developmental pattern of rat ovarian 3 alpha-hydroxysteroid dehydrogenase: inhibition of the postpubertal activity with medroxyprogesterone acetate in vivo. *J Steroid Biochem* 21:151-156.

- Jiang P, Yang CX, Wang YT, Xu TL (2006) Mechanisms of modulation of pregnanolone on glycinergic response in cultured spinal dorsal horn neurons of rat. *Neuroscience* 141:2041-2050.
- Jouanny J, Poitevin B, Saint-Jean Y, Masson JL (2003) *Gelsemium sempervirens*, dans *Pharmacologie et Matière Médicale Homéopathique*, pp 377-383.
- Julius D, Basbaum AI (2001) Molecular mechanisms of nociception. *Nature* 413:203-210.
- Kandel ER, Schwartz JH, Jessell TM (2000) Spinal reflex, in *Principles of Neuronal Science* (Kandel ER, Schwartz JH, Jessell TM, eds), pp 713-736. McGraw-Hill, New York.
- Kibaly C, Patte-Mensah C, Mensah-Nyagan AG (2005) Molecular and neurochemical evidence for the biosynthesis of dehydroepiandrosterone in the adult rat spinal cord. *J Neurochem* 93:1220-1230.
- Kibaly C, Meyer L, Patte-Mensah C, Mensah-Nyagan AG (2008) Biochemical and functional evidence for the control of pain mechanisms by dehydroepiandrosterone endogenously synthesized in the spinal cord. *Faseb J* 22:93-104.
- Kim SH, Chung JM (1992) An experimental model for peripheral neuropathy produced by segmental spinal nerve ligation in the rat. *Pain* 50:355-363.
- Kingery WS (1997) A critical review of controlled clinical trials for peripheral neuropathic pain and complex regional pain syndromes. *Pain* 73:123-139.
- Kirsch J (2006) Glycinergic transmission. *Cell Tissue Res* 326:535-540.
- Kitajima M, Urano A, Kogure N, Takayama H, Aimi N (2003) New oxindole alkaloids and iridoid from Carolina jasmine (*Gelsemium sempervirens* Ait. f.). *Chem Pharm Bull* 51:1211-1214.
- Kjelstrup KG, Tuvnes FA, Steffenach HA, Murison R, Moser EI, Moser MB (2002) Reduced fear expression after lesions of the ventral hippocampus. *Proc Natl Acad Sci USA* 99:10825-10830.
- Klein K, Henk W (1963) Clinical experimental studies on the influence of aldosterone on hemodynamics and blood coagulation. *Z Kreislaufforsch* 52:40-53.
- Kontinen VK, Stanfa LC, Basu A, Dickenson AH (2001) Electrophysiologic evidence for increased endogenous gabaergic but not glycinergic inhibitory tone in the rat spinal nerve ligation model of neuropathy. *Anesthesiology* 94:333-339.
- Korneyev A, Costa E (1996) Allopregnanolone (THP) mediates anesthetic effects of progesterone in rat brain. *Horm Behav* 30:37-43.

- Kouzmenko AP, Takeyama K, Ito S, Furutani T, Sawatsubashi S, Maki A, Suzuki E, Kawasaki Y, Akiyama T, Tabata T, Kato S (2004) Wnt/beta-catenin and estrogen signaling converge in vivo. *J Biol Chem* 279:40255-40258.
- Krieger NR, Scott RG (1989) Nonneuronal localization for steroid converting enzyme: 3 alpha-hydroxysteroid oxidoreductase in olfactory tubercle of rat brain. *J Neurochem* 52:1866-1870.
- Krnjevic K (1981) Transmitter in motor systems, in *Handbook of Physiology* (Geiger SR, ed), pp 107-154. Am. Soc. Physiol., Baltimore.
- Kuhse J, Kuryatov A, Maulet Y, Malosio ML, Schmieden V, Betz H (1991) Alternative splicing generates two isoforms of the alpha 2 subunit of the inhibitory glycine receptor. *Febs Lett* 283:73-77.
- Langosch D, Laube B, Rundstrom N, Schmieden V, Bormann J, Betz H (1994) Decreased agonist affinity and chloride conductance of mutant glycine receptors associated with human hereditary hyperekplexia. *Embo J* 13:4223-4228.
- Lanteaume L, Khalifa S, Regis J, Marquis P, Chauvel P, Bartolomei F (2007) Emotion induction after direct intracerebral stimulations of human amygdala. *Cereb Cortex* 17:1307-1313.
- Laube B, Kuhse J, Betz H (1998) Evidence for a tetrameric structure of recombinant NMDA receptors. *J Neurosci* 18:2954-2961.
- LeDoux JE, Iwata J, Cicchetti P, Reis DJ (1988) Different projections of the central amygdaloid nucleus mediate autonomic and behavioral correlates of conditioned fear. *J Neurosci* 8:2517-2529.
- LeDoux J (1998) Fear and the brain: where have we been, and where are we going? *Biol Psychiatry* 44:1229-1238.
- Legendre P (2001) The glycinergic inhibitory synapse. *Cell Mol Life Sci* 58:760-793.
- Lin HK, Hung CF, Moore M, Penning TM (1999) Genomic structure of rat 3alpha-hydroxysteroid/dihydrodiol dehydrogenase (3alpha-HSD/DD, AKR1C9). *J Steroid Biochem Mol Biol* 71:29-39.
- Liu D, Dillon JS (2002) Dehydroepiandrosterone activates endothelial cell nitric-oxide synthase by a specific plasma membrane receptor coupled to Galpha(i2,3). *J Biol Chem* 277:21379-21388.
- Liu D, Dillon JS (2004) Dehydroepiandrosterone stimulates nitric oxide release in vascular endothelial cells: evidence for a cell surface receptor. *Steroids* 69:279-289.
- Liu Y, Zhang J (2000) Recent development in NMDA receptors. *Chin Med J* 113:948-956.

- Lofgren M, Johansson IM, Meyerson B, Lundgren P, Backstrom T (2006) Progesterone withdrawal effects in the open field test can be predicted by elevated plus maze performance. *Horm Behav* 50:208-215.
- Longone P, Rupprecht R, Manieri GA, Bernardi G, Romeo E, Pasini A (2008) The complex roles of neurosteroids in depression and anxiety disorders. *Neurochem Int* 52:596-601.
- Lovell FM, Pepinsky R, Wilson AJC (1959) X-ray analysis of the structure of gelsemine hydrohalides. *Tetrahedron Lett* 1:1-5.
- Lydiard RB (2003) The role of GABA in anxiety disorders. *J Clin Psychiatry* 64 Suppl 3:21-27.
- Lynch JW (2004) Molecular structure and function of the glycine receptor chloride channel. *Physiol Rev* 84:1051-1095.
- Maayan R, Touati-Werner D, Ram E, Strous R, Keren O, Weizman A (2006) The protective effect of frontal cortex dehydroepiandrosterone in anxiety and depressive models in mice. *Pharmacol Biochem Behav* 85:415-421.
- Madin A, O'Donnell CJ, Oh T, Old DW, Overman LE, Sharp MJ (1999) Total Synthesis of (+/-)-Gelsemine. *Angew Chem Int Ed Engl* 38:2934-2936.
- Majewska MD (1992) Neurosteroids: endogenous bimodal modulators of the GABA_A receptor. Mechanism of action and physiological significance. *Prog Neurobiol* 38:379-395.
- Malenka RC, Nicoll RA (1999) Long-term potentiation--a decade of progress? *Science* 285:1870-1874.
- Malosio ML, Grenningloh G, Kuhse J, Schmieden V, Schmitt B, Prior P, Betz H (1991a) Alternative splicing generates two variants of the alpha 1 subunit of the inhibitory glycine receptor. *J Biol Chem* 266:2048-2053.
- Malosio ML, Marqueze-Pouey B, Kuhse J, Betz H (1991b) Widespread expression of glycine receptor subunit mRNAs in the adult and developing rat brain. *Embo J* 10:2401-2409.
- Mantyh PW, Rogers SD, Honore P, Allen BJ, Ghilardi JR, Li J, Daughters RS, Lappi DA, Wiley RG, Simone DA (1997) Inhibition of hyperalgesia by ablation of lamina I spinal neurons expressing the substance P receptor. *Science* 278:275-279.
- Mantyh PW (2002) Neurobiology of substance P and the NK1 receptor. *J Clin Psychiatry* 63 Suppl 11:6-10.
- Marin R, Ramirez CM, Gonzalez M, Alonso R, Diaz M (2006) Alternative estrogen receptors homologous to classical receptor alpha in murine neural tissues. *Neurosci Lett* 395:7-11.

- Marshall RD, Spitzer R, Liebowitz MR (1999) Review and critique of the new DSM-IV diagnosis of acute stress disorder. *Am J Psychiatry* 156:1677-1685.
- Mathew SJ, Ho S (2006) Etiology and neurobiology of social anxiety disorder. *J Clin Psychiatry* 67 Suppl 12:9-13.
- Mathiasen LS, Rodgers RJ, Mirza NR (2007) Comparative effects of nonselective and subtype-selective gamma-aminobutyric acidA receptor positive modulators in the rat-conditioned emotional response test. *Behav Pharmacol* 18:191-203.
- Maurice T, Gregoire C, Espallergues J (2006) Neuro(active)steroids actions at the neuromodulatory sigma1 (sigma1) receptor: biochemical and physiological evidences, consequences in neuroprotection. *Pharmacol Biochem Behav* 84:581-597.
- McCool BA, Botting SK (2000) Characterization of strychnine-sensitive glycine receptors in acutely isolated adult rat basolateral amygdala neurons. *Brain Res* 859:341-351.
- McCool BA, Chappell A (2007) Strychnine and taurine modulation of amygdala-associated anxiety-like behavior is 'state' dependent. *Behav Brain Res* 178:70-81.
- McHugh SB, Deacon RM, Rawlins JN, Bannerman DM (2004) Amygdala and ventral hippocampus contribute differentially to mechanisms of fear and anxiety. *Behav Neurosci* 118:63-78.
- Mellon SH, Griffin LD, Compagnone NA (2001) Biosynthesis and action of neurosteroids. *Brain Res Brain Res Rev* 37:3-12.
- Mellon SH, Griffin LD (2002) Neurosteroids: biochemistry and clinical significance. *Trends Endocrinol Metab* 13:35-43.
- Mensah-Nyagan AG, Feuilloley M, Dupont E, Do-Rego JL, Leboulenger F, Pelletier G, Vaudry H (1994) Immunocytochemical localization and biological activity of 3 beta-hydroxysteroid dehydrogenase in the central nervous system of the frog. *J Neurosci* 14:7306-7318.
- Mensah-Nyagan AG, Do-Rego JL, Feuilloley M, Marcual A, Lange C, Pelletier G, Vaudry H (1996a) In vivo and in vitro evidence for the biosynthesis of testosterone in the telencephalon of the female frog. *J Neurochem* 67:413-422.
- Mensah-Nyagan AG, Feuilloley M, Do-Rego JL, Marcual A, Lange C, Tonon MC, Pelletier G, Vaudry H (1996b) Localization of 17beta-hydroxysteroid dehydrogenase and characterization of testosterone in the brain of the male frog. *Proc Natl Acad Sci USA* 93:1423-1428.

- Mensah-Nyagan AG, Do-Rego JL, Beaujean D, Luu-The V, Pelletier G, Vaudry H (1999) Neurosteroids: expression of steroidogenic enzymes and regulation of steroid biosynthesis in the central nervous system. *Pharmacol Rev* 51:63-81.
- Mensah-Nyagan AG, Beaujean D, Do-Rego JL, Mathieu M, Vallarino M, Luu-The V, Pelletier G, Vaudry H (2000) In vivo evidence for the production of sulfated steroids in the frog brain. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol* 126:213-219.
- Mensah-Nyagan AG, Beaujean D, Luu-The V, Pelletier G, Vaudry H (2001a) Anatomical and biochemical evidence for the synthesis of unconjugated and sulfated neurosteroids in amphibians. *Brain Res Brain Res Rev* 37:13-24.
- Mensah-Nyagan AG, Do-Rego JL, Beaujean D, Luu-The V, Pelletier G, Vaudry H (2001b) Regulation of neurosteroid biosynthesis in the frog diencephalon by GABA and endozepines. *Horm Behav* 40:218-225.
- Mensah-Nyagan AG, Kibaly C, Schaeffer V, Venard C, Meyer L, Patte-Mensah C (2008) Endogenous steroid production in the spinal cord and potential involvement in neuropathic pain modulation. *J Steroid Biochem Mol Biol* 109:286-293.
- Mestre C, Pelissier T, Fialip J, Wilcox G, Eschalier A (1994) A method to perform direct transcutaneous intrathecal injection in rats. *J Pharmacol Toxicol Methods* 32:197-200.
- Meyer L, Venard C, Schaeffer V, Patte-Mensah C, Mensah-Nyagan AG (2008) The biological activity of 3 α -hydroxysteroid oxido-reductase in the spinal cord regulates thermal and mechanical pain thresholds after sciatic nerve injury. *Neurobiol Dis* 30:30-41.
- Michael Kaplan E, DuPont RL (2005) Benzodiazepines and anxiety disorders: a review for the practicing physician. *Curr Med Res Opin* 21:941-950.
- Millan MJ (1999) The induction of pain: an integrative review. *Prog Neurobiol* 57:1-164.
- Millan MJ (2002) Descending control of pain. *Prog Neurobiol* 66:355-474.
- Mok WM, Herschkowitz S, Krieger NR (1992) Evidence that 3 α -hydroxy-5 α -pregnan-20-one is the metabolite responsible for anesthesia induced by 5 α -pregnanedione in the mouse. *Neurosci Lett* 135:145-148.
- Monnet FP, Mahe V, Robel P, Baulieu EE (1995) Neurosteroids, via sigma receptors, modulate the [3H]norepinephrine release evoked by N-methyl-D-aspartate in the rat hippocampus. *Proc Natl Acad Sci USA* 92:3774-3778.
- Monnet FP, Maurice T (2006) The sigma1 protein as a target for the non-genomic effects of neuro(active)steroids: molecular, physiological, and behavioral aspects. *J Pharmacol Sci* 100:93-118.

- Morita K, Arimochi H, Itoh H, Her S (2006) Possible involvement of 5 α -reduced neurosteroids in adrenergic and serotonergic stimulation of GFAP gene expression in rat C6 glioma cells. *Brain Res* 1085:49-56.
- Morris JS, Frith CD, Perrett DI, Rowland D, Young AW, Calder AJ, Dolan RJ (1996) A differential neural response in the human amygdala to fearful and happy facial expressions. *Nature* 383:812-815.
- Mosconi T, Kruger L (1996) Fixed-diameter polyethylene cuffs applied to the rat sciatic nerve induce a painful neuropathy: ultrastructural morphometric analysis of axonal alterations. *Pain* 64:37-57.
- Moss SJ, Smart TG (2001) Constructing inhibitory synapses. *Nat Rev Neurosci* 2:240-250.
- Nader K, Majidishad P, Amorapanth P, LeDoux JE (2001) Damage to the lateral and central, but not other, amygdaloid nuclei prevents the acquisition of auditory fear conditioning. *Learn Mem* 8:156-163.
- Nakajima T, Kitazawa T, Hamada E, Hazama H, Omata M, Kurachi Y (1995) 17 β -Estradiol inhibits the voltage-dependent L-type Ca²⁺ currents in aortic smooth muscle cells. *Eur J Pharmacol* 294:625-635.
- Ng FW, Lin H, Chiu P, Danishefsky SJ (2002) Explorations in organic chemistry leading to the total synthesis of (+/-)-gelsemine. *J Am Chem Soc* 124:9812-9824.
- Nguyen N, Fakra E, Pradel V, Jouve E, Alquier C, Le Guern ME, Micallef J, Blin O (2006) Efficacy of etifoxine compared to lorazepam monotherapy in the treatment of patients with adjustment disorders with anxiety: a double-blind controlled study in general practice. *Hum Psychopharmacol* 21:139-149.
- Nichols ML, Allen BJ, Rogers SD, Ghilardi JR, Honore P, Luger NM, Finke MP, Li J, Lappi DA, Simone DA, Mantyh PW (1999) Transmission of chronic nociception by spinal neurons expressing the substance P receptor. *Science* 286:1558-1561.
- Nicholson B, Verma S (2004) Comorbidities in chronic neuropathic pain. *Pain Med* 5 Suppl 1:S9-S27.
- Ninan PT (2001) Recent perspectives on the diagnosis and treatment of generalized anxiety disorder. *Am J Manag Care* 7:S367-S376.
- Normington K, Russell DW (1992) Tissue distribution and kinetic characteristics of rat steroid 5 α -reductase isozymes. Evidence for distinct physiological functions. *J Biol Chem* 267:19548-19554.
- O'Brien CP (2005) Benzodiazepine use, abuse, and dependence. *J Clin Psychiatry Suppl* 2:28-33.

- Ogryzko VV, Schiltz RL, Russanova V, Howard BH, Nakatani Y (1996) The transcriptional coactivators p300 and CBP are histone acetyltransferases. *Cell* 87:953-959.
- Onate SA, Tsai SY, Tsai MJ, O'Malley BW (1995) Sequence and characterization of a coactivator for the steroid hormone receptor superfamily. *Science* 270:1354-1357.
- O'Neill LA, Lewis GP (1989) Inhibitory effects of diclofenac and indomethacin on interleukin-1-induced changes in PGE₂ release. A novel effect on free arachidonic acid levels in human synovial cells. *Biochem Pharmacol* 38:3707-3711.
- Orensanz LM, Ambrosio E, Fernandez I, Montero MT (1988) A re-examination of the Na⁺-independent binding of [3H]beta-alanine to rat brain stem-spinal cord. *Neurochem Res* 13:1133-1138.
- Ozawa S, Kamiya H, Tsuzuki K (1998) Glutamate receptors in the mammalian central nervous system. *Prog Neurobiol* 54:581-618.
- Ozturk C, Aviyente V, Houk KN (2005) Modeling the stereoselectivity of the Johnson-Claisen rearrangements in the Danishefsky synthesis of gelsemine. *J Org Chem* 70:7028-7034.
- Papadopoulos V, Berkovich A, Krueger KE, Costa E, Guidotti A (1991) Diazepam binding inhibitor and its processing products stimulate mitochondrial steroid biosynthesis via an interaction with mitochondrial benzodiazepine receptors. *Endocrinology* 129:1481-1488.
- Papadopoulos V, Lecanu L, Brown RC, Han Z, Yao ZX (2006) Peripheral-type benzodiazepine receptor in neurosteroid biosynthesis, neuropathology and neurological disorders. *Neuroscience* 138:749-756.
- Pappas TC, Gametchu B, Watson CS (1995) Membrane estrogen receptors identified by multiple antibody labeling and impeded-ligand binding. *Faseb J* 9:404-410.
- Paris A, Gonnet N, Chaussard C, Belon P, Rocourt F, Saragaglia D, Cracowski JL (2008) Effect of homeopathy on analgesic intake following knee ligament reconstruction: a phase III monocentre randomized placebo controlled study. *Br J Clin Pharmacol* 65:180-187.
- Patchev VK, Montkowski A, Rouskova D, Koranyi L, Holsboer F, Almeida OF (1997) Neonatal treatment of rats with the neuroactive steroid tetrahydrodeoxycorticosterone (THDOC) abolishes the behavioral and neuroendocrine consequences of adverse early life events. *J Clin Invest* 99:962-966.
- Pathirathna S, Brimelow BC, Jagodic MM, Krishnan K, Jiang X, Zorumski CF, Mennerick S, Covey DF, Todorovic SM, Jevtovic-Todorovic V (2005a) New evidence that both T-

- type calcium channels and GABAA channels are responsible for the potent peripheral analgesic effects of 5 α -reduced neuroactive steroids. *Pain* 114:429-443.
- Pathirathna S, Todorovic SM, Covey DF, Jevtovic-Todorovic V (2005b) 5 α -reduced neuroactive steroids alleviate thermal and mechanical hyperalgesia in rats with neuropathic pain. *Pain* 117:326-339.
- Patte-Mensah C, Kappes V, Freund-Mercier MJ, Tsutsui K, Mensah-Nyagan AG (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, Mensah-Nyagan AG (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 TM, Mensah-Nyagan AG (2004b) Anatomical and cellular localization of neuroactive 5 α /3 α -reduced steroid-synthesizing enzymes in the spinal cord. *J Comp Neurol* 477:286-299.
- Patte-Mensah C, Kibaly C, Mensah-Nyagan AG (2005) Substance P inhibits progesterone conversion to neuroactive metabolites in spinal sensory circuit: a potential component of nociception. *Proc Natl Acad Sci USA* 102:9044-9049.
- Patte-Mensah C, Kibaly C, Boudard D, Schaeffer V, Begle A, Saredi S, Meyer L, Mensah-Nyagan AG (2006) Neurogenic pain and steroid synthesis in the spinal cord. *J Mol Neurosci* 28:17-31.
- Patte-Mensah C, Mensah-Nyagan AG (2008) Peripheral neuropathy and neurosteroid formation in the central nervous system. *Brain Res Rev* 57:454-459.
- Pelletier G, Luu-The V, Labrie F (1994) Immunocytochemical localization of 5 α -reductase in rat brain. *Mol Cell Neurosci* 5:394-399.
- Pellicer F, Lopez-Avila A, Coffeen U, Manuel Ortega-Legaspi U, Angel RD (2007) Taurine in the anterior cingulate cortex diminishes neuropathic nociception: a possible interaction with the glycine(A) receptor. *Eur J Pain* 11:444-451.
- Penning TM, Mukharji I, Barrows S, Talalay P (1984) Purification and properties of a 3 α -hydroxysteroid dehydrogenase of rat liver cytosol and its inhibition by anti-inflammatory drugs. *Biochem J* 222:601-611.
- Penning TM, Sharp RB, Krieger NR (1985) Purification and properties of 3 α -hydroxysteroid dehydrogenase from rat brain cytosol. Inhibition by nonsteroidal anti-inflammatory drugs and progestins. *J Biol Chem* 260:15266-15272.

- Penning TM, Drury JE (2007) Human aldo-keto reductases: Function, gene regulation, and single nucleotide polymorphisms. *Arch Biochem Biophys* 464:241-250.
- Pentkowski NS, Blanchard DC, Lever C, Litvin Y, Blanchard RJ (2006) Effects of lesions to the dorsal and ventral hippocampus on defensive behaviors in rats. *Eur J Neurosci* 23:2185-2196.
- Peredery O, Persinger MA (2004) Herbal treatment following post-seizure induction in rat by lithium pilocarpine: *Scutellaria lateriflora* (Skullcap), *Gelsemium sempervirens* (Gelsemium) and *Datura stramonium* (Jimson Weed) may prevent development of spontaneous seizures. *Phytother Res* 18:700-705.
- Petrovic M, Horak M, Sedlacek M, Vyklicky Jr. L (2005) Physiology and pathology of NMDA receptors. *Prague Med Rep* 106:113-136.
- Pico-Alfonso MA, Garcia-Linares MI, Celda-Navarro N, Herbert J, Martinez M (2004) Changes in cortisol and dehydroepiandrosterone in women victims of physical and psychological intimate partner violence. *Biol Psychiatry* 56:233-240.
- Pinna G, Dong E, Matsumoto K, Costa E, Guidotti A (2003) In socially isolated mice, the reversal of brain allopregnanolone down-regulation mediates the anti-aggressive action of fluoxetine. *Proc Natl Acad Sci USA* 100:2035-2040.
- Pinna G, Costa E, Guidotti A (2006) Fluoxetine and norfluoxetine stereospecifically and selectively increase brain neurosteroid content at doses that are inactive on 5-HT reuptake. *Psychopharmacology (Berl)* 186:362-372.
- 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.
- Poletti A, Coscarella A, Negri-Cesi P, Colciago A, Celotti F, Martini L (1998a) 5 alpha-reductase isozymes in the central nervous system. *Steroids* 63:246-251.
- Poletti A, Negri-Cesi P, Rabuffetti M, Colciago A, Celotti F, Martini L (1998b) Transient expression of the 5alpha-reductase type 2 isozyme in the rat brain in late fetal and early postnatal life. *Endocrinology* 139:2171-2178.
- Rampon C, Luppi PH, Fort P, Peyron C, Jouvet M (1996) Distribution of glycine-immunoreactive cell bodies and fibers in the rat brain. *Neuroscience* 75:737-755.
- Rasmusson AM, Pinna G, Paliwal P, Weisman D, Gottschalk C, Charney D, Krystal J, Guidotti A (2006) Decreased cerebrospinal fluid allopregnanolone levels in women with posttraumatic stress disorder. *Biol Psychiatry* 60:704-713.

- Rauch SL, Shin LM, Wright CI (2003) Neuroimaging studies of amygdala function in anxiety disorders. *Ann NY Acad Sci* 985:389-410.
- Reddy DS, Kulkarni SK (1997) Differential anxiolytic effects of neurosteroids in the mirrored chamber behavior test in mice. *Brain Res* 752:61-71.
- Reddy DS (2003) Pharmacology of endogenous neuroactive steroids. *Crit Rev Neurobiol* 15:197-234.
- Reddy DS, Apanites LA (2005) Anesthetic effects of progesterone are undiminished in progesterone receptor knockout mice. *Brain Res* 1033:96-101.
- Reddy DS, O'Malley BW, Rogawski MA (2005) Anxiolytic activity of progesterone in progesterone receptor knockout mice. *Neuropharmacology* 48:14-24.
- Richmond MA, Yee BK, Pouzet B, Veenman L, Rawlins JN, Feldon J, Bannerman DM (1999) Dissociating context and space within the hippocampus: effects of complete, dorsal, and ventral excitotoxic hippocampal lesions on conditioned freezing and spatial learning. *Behav Neurosci* 113:1189-1203.
- Rodgers RJ, Johnson NJ (1998) Behaviorally selective effects of neuroactive steroids on plus-maze anxiety in mice. *Pharmacol Biochem Behav* 59:221-232.
- Roglio I, Giatti S, Pesaresi M, Bianchi R, Cavaletti G, Lauria G, Garcia-Segura LM, Melcangi RC (2007) Neuroactive steroids and peripheral neuropathy. *Brain Res Rev* 57:460-469.
- Rosen JB, Schulkin J (1998) From normal fear to pathological anxiety. *Psychological Rev* 105:325-350.
- Ruan X (2007) Drug-related side effects of long-term intrathecal morphine therapy. *Pain Physician* 10:357-366.
- Russell DW, Wilson JD (1994) Steroid 5 alpha-reductase: two genes/two enzymes. *Annu Rev Biochem* 63:25-61.
- Sah P, Faber ES, Lopez De Armentia M, Power J (2003) The amygdaloid complex: anatomy and physiology. *Physiol Rev* 83:803-834.
- 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.
- Saredi S, Patte-Mensah C, Melcangi RC, Mensah-Nyagan AG (2005) Effect of streptozotocin-induced diabetes on the gene expression and biological activity of 3beta-hydroxysteroid dehydrogenase in the rat spinal cord. *Neuroscience* 135:869-877.

- Schaeffer V, Patte-Mensah C, Eckert A, Mensah-Nyagan AG (2006) Modulation of neurosteroid production in human neuroblastoma cells by Alzheimer's disease key proteins. *J Neurobiol* 66:868-881.
- Schaeffer V, Meyer L, Patte-Mensah C, Eckert A, Mensah-Nyagan AG (2008a) Dose-dependent and sequence-sensitive effects of amyloid-beta peptide on neurosteroidogenesis in human neuroblastoma cells. *Neurochem Int* 52:948-955.
- Schaeffer V, Patte-Mensah C, Eckert A, Mensah-Nyagan AG (2008b) Selective regulation of neurosteroid biosynthesis in human neuroblastoma cells under hydrogen peroxide-induced oxidative stress condition. *Neuroscience* 151:758-770.
- Schmieden V, Kuhse J, Betz H (1999) A novel domain of the inhibitory glycine receptor determining antagonist efficacies: further evidence for partial agonism resulting from self-inhibition. *Mol Pharmacol* 56:464-472.
- Scholz J, Woolf CJ (2002) Can we conquer pain? *Nat Neurosci* 5 Suppl:1062-1067.
- Schun Y, Cordell GA (1985) 14 beta-Hydroxygelsedine, a new oxindole alkaloid from *Gelsemium sempervirens*. *J Nat Prod* 48:788-791.
- Schun Y, Cordell GA (1987) Cytotoxic steroids of *Gelsemium sempervirens*. *J Nat Prod* 50:195-198.
- Scoville WB, Milner B (1957) Loss of recent memory after bilateral hippocampal lesions. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 20:11-21.
- Seltzer Z, Dubner R, Shir Y (1990) A novel behavioral model of neuropathic pain disorders produced in rats by partial sciatic nerve injury. *Pain* 43:205-218.
- Semeniuk T, Jhangri GS, Le Melleo JM (2001) Neuroactive steroid levels in patients with generalized anxiety disorder. *J Neuropsychiatry Clin Neurosci* 13:396-398.
- Servant D, Graziani PL, Moyses D, Parquet PJ (1998) Treatment of adjustment disorder with anxiety: efficacy and tolerance of etifoxine in a double-blind controlled study. *Encephale* 24:569-574.
- Shang A, Huwiler-Muntener K, Nartey L, Juni P, Dorig S, Sterne JA, Pewsner D, Egger M (2005) Are the clinical effects of homoeopathy placebo effects? Comparative study of placebo-controlled trials of homoeopathy and allopathy. *Lancet* 366:726-732.
- Shaw P, Bramham J, Lawrence EJ, Morris R, Baron-Cohen S, David AS (2005) Differential effects of lesions of the amygdala and prefrontal cortex on recognizing facial expressions of complex emotions. *J Cogn Neurosci* 17:1410-1419.
- Sherbet DP, Papari-Zareei M, Khan N, Sharma KK, Brandmaier A, Rambally S, Chattopadhyay A, Andersson S, Agarwal AK, Auchus RJ (2007) Cofactors, redox

- state, and directional preferences of hydroxysteroid dehydrogenases. *Mol Cell Endocrinol* 265-266:83-88.
- Siegel MI, McConnell RT, Cuatrecasas P (1979) Aspirin-like drugs interfere with arachidonate metabolism by inhibition of the 12-hydroperoxy-5,8,10,14-eicosatetraenoic acid peroxidase activity of the lipoxygenase pathway. *Proc Natl Acad Sci USA* 76:3774-3778.
- Simoncini T, Hafezi-Moghadam A, Brazil DP, Ley K, Chin WW, Liao JK (2000) Interaction of oestrogen receptor with the regulatory subunit of phosphatidylinositol-3-OH kinase. *Nature* 407:538-541.
- Simoncini T, Mannella P, Fornari L, Caruso A, Varone G, Genazzani AR (2004) Genomic and non-genomic effects of estrogens on endothelial cells. *Steroids* 69:537-542.
- Skuse D, Morris J, Lawrence K (2003) The amygdala and development of the social brain. *Ann NY Acad Sci* 1008:91-101.
- Smithgall TE, Penning TM (1985) Indomethacin-sensitive 3 alpha-hydroxysteroid dehydrogenase in rat tissues. *Biochem Pharmacol* 34:831-835.
- Smithgall TE, Penning TM (1988) Electrophoretic and immunochemical characterization of 3 alpha-hydroxysteroid/dihydrodiol dehydrogenases of rat tissues. *Biochem J* 254:715-721.
- Sondergaard HP, Hansson LO, Theorell T (2002) Elevated blood levels of dehydroepiandrosterone sulphate vary with symptom load in posttraumatic stress disorder: findings from a longitudinal study of refugees in Sweden. *Psychother Psychosom* 71:298-303.
- Spencer TE, Jenster G, Burcin MM, Allis CD, Zhou J, Mizzen CA, McKenna NJ, Onate SA, Tsai SY, Tsai MJ, O'Malley BW (1997) Steroid receptor coactivator-1 is a histone acetyltransferase. *Nature* 389:194-198.
- Stein DJ (2000) Advances in the neurobiology of obsessive-compulsive disorder. Implications for conceptualizing putative obsessive-compulsive and spectrum disorders. *Psychiatr Clin North Am* 23:545-562.
- Stevens JC, Pollack MH (2006) Benzodiazepines in clinical practice: consideration of their long-term use and alternative agents. *J Clin Psychiatry* 66:21-27.
- Strohle A, Romeo E, di Michele F, Pasini A, Hermann B, Gajewsky G, Holsboer F, Rupprecht R (2003) Induced panic attacks shift gamma-aminobutyric acid type A receptor modulatory neuroactive steroid composition in patients with panic disorder: preliminary results. *Arch Gen Psychiatry* 60:161-168.

- Strous RD, Maayan R, Lapidus R, Stryjer R, Lustig M, Kotler M, Weizman A (2003) Dehydroepiandrosterone augmentation in the management of negative, depressive, and anxiety symptoms in schizophrenia. *Arch Gen Psychiatry* 60:133-141.
- Tait GR, McManus K, Bellavance F, Lara N, Chrapko W, Le Melleo JM (2002) Neuroactive steroid changes in response to challenge with the panicogenic agent pentagastrin. *Psychoneuroendocrinology* 27:417-429.
- Tetel MJ (2000) Nuclear receptor coactivators in neuroendocrine function. *J Neuroendocrinol* 12:927-932.
- Thomas P, Zhu Y, Pace M (2002) Progesterone membrane receptors involved in the meiotic maturation of teleost oocytes: a review with some new findings. *Steroids* 67:511-517.
- Todd AJ, Puskar Z, Spike RC, Hughes C, Watt C, Forrest L (2002) Projection neurons in lamina I of rat spinal cord with the neurokinin 1 receptor are selectively innervated by substance p-containing afferents and respond to noxious stimulation. *J Neurosci* 22:4103-4113.
- Trimble MR (1988) The neurology of anxiety. *Postgrad Med J* 64 Suppl 2:22-26.
- Truss M, Chalepakis G, Beato M (1990) Contacts between steroid hormone receptors and thymines in DNA: an interference method. *Proc Natl Acad Sci USA* 87:7180-7184.
- Truss M, Chalepakis G, Slater EP, Mader S, Beato M (1991) Functional interaction of hybrid response elements with wild-type and mutant steroid hormone receptors. *Mol Cell Biol* 11:3247-3258.
- Ugale RR, Sharma AN, Kokare DM, Hirani K, Subhedar NK, Chopde CT (2007) Neurosteroid allopregnanolone mediates anxiolytic effect of etifoxine in rats. *Brain Res* 1184:193-201.
- Uzunov DP, Cooper TB, Costa E, Guidotti A (1996) Fluoxetine-elicited changes in brain neurosteroid content measured by negative ion mass fragmentography. *Proc Natl Acad Sci USA* 93:12599-12604.
- Uzunova V, Sheline Y, Davis JM, Rasmusson A, Uzunov DP, Costa E, Guidotti A (1998) Increase in the cerebrospinal fluid content of neurosteroids in patients with unipolar major depression who are receiving fluoxetine or fluvoxamine. *Proc Natl Acad Sci USA* 95:3239-3244.
- Uzunova V, Sampson L, Uzunov DP (2006) Relevance of endogenous 3 α -reduced neurosteroids to depression and antidepressant action. *Psychopharmacology (Berl)* 186:351-361.

- Val P, Lefrancois-Martinez AM, Veyssiere G, Martinez A (2003) SF-1 a key player in the development and differentiation of steroidogenic tissues. *Nucl Recept* 1:8.
- Vanhalewyn M, Cerexhe F (2003) Recommandations de bonne pratique face à la douleur chronique. *Louvain Med* 122:435-443.
- Verleye M, Akwa Y, Liere P, Ladurelle N, Pianos A, Eychenne B, Schumacher M, Gillardin JM (2005) The anxiolytic etifoxine activates the peripheral benzodiazepine receptor and increases the neurosteroid levels in rat brain. *Pharmacol Biochem Behav* 82:712-720.
- Verleye M, Heulard I, Gillardin JM (2008) Investigation of the anticonvulsive effect of acute immobilization stress in anxious Balb/cByJ mice using GABA A-related mechanistic probes. *Psychopharmacology (Berl)* 197:523-534.
- Vinay L, Jean-Xavier C (2008) Plasticity of spinal cord locomotor networks and contribution of cation-chloride cotransporters. *Brain Res Rev* 57:103-110.
- Willis WD (2001) Role of neurotransmitters in sensitization of pain responses. *Ann NY Acad Sci* 933:142-156.
- Woolf CJ, Mannion RJ (1999) Neuropathic pain: aetiology, symptoms, mechanisms, and management. *Lancet* 353:1959-1964.
- Woolf CJ, Salter MW (2000) Neuronal plasticity: increasing the gain in pain. *Science* 288:1765-1769.
- Woolf CJ (2004) Pain: moving from symptom control toward mechanism-specific pharmacologic management. *Ann Intern Med* 140:441-451.
- Yokoshima S, Tokuyama H, Fukuyama T (2000) Enantioselective Total Synthesis of (+)-Gelsemine: Determination of Its Absolute Configuration. *Angew Chem Int Ed Engl* 39:4073-4075.
- Zeilhofer HU (2005) The glycinergic control of spinal pain processing. *Cell Mol Life Sci* 62:2027-2035.
- Zhang P, Compagnone NA, Fiore C, Vigne JL, Culp P, Musci TJ, Mellon SH (2001) Developmental gonadal expression of the transcription factor SET and its target gene, P450c17 (17 α -hydroxylase/c17,20 lyase). *DNA Cell Biol* 20:613-624.
- Zhu Y, Bond J, Thomas P (2003a) Identification, classification, and partial characterization of genes in humans and other vertebrates homologous to a fish membrane progesterin receptor. *Proc Natl Acad Sci USA* 100:2237-2242.

- Zhu Y, Rice CD, Pang Y, Pace M, Thomas P (2003b) Cloning, expression, and characterization of a membrane progestin receptor and evidence it is an intermediary in meiotic maturation of fish oocytes. *Proc Natl Acad Sci USA* 100:2231-2236.
- Zimmerman JM, Rabinak CA, McLachlan IG, Maren S (2007) The central nucleus of the amygdala is essential for acquiring and expressing conditional fear after overtraining. *Learn Mem* 14:634-644.
- Zimmermann M (1983) Ethical guidelines for investigations of experimental pain in conscious animals. *Pain* 16:109-110.
- Zubrzycka M, Janecka A (2000) Substance P: transmitter of nociception (Minireview). *Endocr Regul* 34:195-201.