UNIVERSITÉ DE STRASBOURG
École Doctorale des Sciences de la Vie et de la Santé

THÈSE présentée par :

Nisrine KAMOUN

Soutenue le
26/04/2016

Pour obtenir le grade de : **Docteur de l'Université de Strasbourg**
Spécialité : Neurosciences

Bénéfice thérapeutique d'un traitement par l'étifoxine (stresam™) dans les neuropathies accompagnées de comorbidités anxiodépressives: Etude préclinique chez la souris.

THÈSE dirigée par :

M. Pierrick POISBEAU	Professeur & Directeur de thèse, Université de Strasbourg

RAPPORTEURS :

Mme. Sara Morley-Fletcher	Maitre de conférences UMR 8576 CNRS, Université de Lille
M. Anton Fernand	Professeur, Université de Luxembourg

EXAMINATEURS :

M. Pierre VEINANTE	Professeur, Université de Strasbourg

MEMBRE INVITÉ :

Mme Ipek Yalcin-Christmann	Chargée de recherche CNRS, UPR 3212 CNRS, Strasbourg

1 REMERCIEMENTS

A Madame Sara Morley-Fletcher et Monsieur Anton Fernand
Pour avoir accepté d'être rapporteur de ce mémoire et me faire l'honneur d'évaluer ce travail.

A Monsieur le Professeur Pierre VEINANTE,
Pour avoir accepté d'être membre du jury de ce travail

A Monsieur le Professeur Pierrick POISBEAU,
Pour avoir dirigé ces travaux.
Veuillez trouver l'expression de ma reconnaissance.

A l'équipe du laboratoire de
Sans qui ce travail n'aurait pu voir le jour.
Messieurs les Docteurs Yannick GOUMON, Pascale DRABON Vincent, LELIÈVRE et Alexandre CHARLET.
Pour votre expertise et votre dynamisme quotidiens.

A Madame le Docteur Ipek YALCIN,
Pour la structure, et la collaboration,
Dans l'humanité et l'énergie communicative qui sont tiennes. Trouve ici l'expression de mon amitié.

A l'équipe de l'animalerie, Pour votre précieuse aide.

Aux amis,
D'hier, d'aujourd'hui,
Du jour, de la nuit,
D'ailleurs, du Strasbourg
……

A la famille,
Mes parents, mes sœurs (Ilham & Laura) : mes 4 points cardinaux
Merci à toi mon ange de m'avoir encouragé

2 PUBLICATIONS & COMMUNICATIONS

Articles dans des revues Internationales à comité de lecture (directement issues du travail de thèse):

(**Déjà publiés**)

1. Analgesic strategies aimed at stimulating the endogenous production of allopregnanolone.
   Poisbeau P, Keller AF, Aouad M, **Kamoun N**, Groyer G, Schumacher M.
   Front Cell Neurosci. 2014 Jun 17;8:174. DOI: 10.3389/fncel.2014.00174.

2. Favoring inhibitory synaptic drive mediated by GABAA receptors in the basolateral nucleus of the amygdala efficiently reduces pain symptoms in neuropathic mice.
   Zeitler A*, **Kamoun N***, Poisbeau P, Darbon P.
   Submitted to European Journal of Neuroscience. **contribution égale des auteurs*

(En préparation)

3. Etifoxine effects on pain symptoms, reactive anxiety and depressive-like behaviors in neuropathic mice.
   Kamoun N, Goumon Y, Yalcin I, Poisbeau P.

4. The effects of etifoxine on mechanical and thermal hyperalgesia evoked by carageenan injection in the rat paw.
   Kamoun N, Poisbeau P.

Articles dans des revues Internationales à comité de lecture (en collaboration):

(En préparation)

Lithium dissociates high affinity morphine-creatine kinase complex Abbreviated title: creatine kinase-morphine complexes.
Mouheiche J, Laux-Biehlmann A, Delalande F, **Kamoun N**, Poisbeau P, Van Dorsselaer A, Goumon Y.

Communications affichées:

Etifoxine effects on pain symptoms, reactive anxiety and depressive-like behaviors in neuropathic mice.
Kamoun N, Yalcin I, Goumon Y, Poisbeau P.
5th International Congress on Neuropathic Pain, Nice, France, Mai 2015

Communication orale:

Favoring inhibitory synaptic drive mediated by GABAA receptors in the basolateral nucleus of the amygdala efficiently reduces pain symptoms in neuropathic mice.
Zeitler A*, **Kamoun N***, Poisbeau P, Darbon P.
1er congrès de Physiologie & Biologie Intégrative, du 4 au 5 Mai 2015 Strasbourg.

The effects of etifoxine on mechanical and thermal hyperalgesia evoked by carageenan injection in the rat paw: limits central inflammatory processes.
Kamoun N, Poisbeau P. **1er congrès de Physiologie & Biologie Intégrative, du 4 au 5 Mai 2015 Strasbourg.**

Nisrine KAMOUN

Bénéfice thérapeutique d'un traitement par l'étifoxine (stresam™) dans les neuropathies accompagnées de comorbidités anxiodépressives: Etude préclinique chez la souris

3 Résumé

La douleur neuropathique est un syndrome secondaire à une maladie ou à une lésion affectant le système nerveux somatosensoriel. Environ 30% des patients souffrant de douleurs neuropathiques présentent également des troubles de l'humeur. Les causes biologiques de ces comorbidités ne sont pas clairement établies. En utilisant un modèle murin de douleur neuropathique, nous avons cherché à amplifier l'inhibition nerveuse médiée par les récepteurs GABAA afin de tenter de réduire les symptômes douloureux neuropathiques et les troubles émotionnels associés. Pour cela nous avons utilisé l'étifoxine, un **anxiolytique non benzodiazépinique** qui possède une action originale sur les récepteurs GABAA mais, surtout, semble avoir des effets secondaires limités comparativement à d'autres molécules comme les benzodiazépines par exemple. Son effet passe par la potentialisation directe du récepteur GABAA (site modulateur situé sur les sous-unités β2 et β3) mais aussi par une action indirecte : la stimulation de la production de **neurostéroïdes** 3α-réduits capables de potentialiser la fonction des récepteurs GABAA. Quelques rares études ont montré que les neurostéroïdes endogènes, surtout ceux réduits en position 3α comme l'allopregnanolone **(allotétrahydroprogestérone)** ou **le THDOC (tétrahydrodéoxycorticostérone)**, pouvaient réduire les symptômes douloureux. Les effets obtenus dans ces études sont similaires à ceux issus d'injections exogènes des mêmes composés.

Au cours du temps, des tests mesurant, non plus uniquement des réponses réflexes, mais aussi des comportements motivés mettant en œuvre des processus corticaux plus complexes sont apparus. Ils ont permis la mise en évidence chez le rongeur de la composante aversive/motivationnelle de la douleur. Chez les patients neuropathiques, la présence de douleurs spontanées est particulièrement handicapante. L'étude de cette composante a longtemps été impossible à évaluer (donc ignorée) chez les rongeurs du fait d'obstacles expérimentaux. La douleur spontanée semble mesurable indirectement aujourd'hui avec des protocoles de préférence de place.

En utilisant le modèle de neuropathie par compression chronique du nerf sciatique et sa bonne caractérisation sur le plan des co-morbidités anxieuses et dépressives, nous avons cherché à

- **Mettre en évidence l'intérêt thérapeutique potentiel d'un traitement à l'étifoxine pour les symptômes sensoriels et émotionnels des douleurs neuropathiques.**

- **Proposer l'amygdale comme une cible privilégiée de l'action de l'étifoxine dans son action analgésique et anxiolytique.**

4 Table des matières

1 REMERCIEMENTS 2

2 PUBLICATIONS & COMMUNICATIONS 3

3 RESUME 4

4 TABLE DES MATIERES 6

5 TABLE DES ILLUSTRATIONS 9

6 LISTE DES PRINCIPALES ABREVIATIONS 11

A. INTRODUCTION 14

1 PARTIE I : NOCICEPTION ET DOULEURS 15

1.1 INTRODUCTION GENERALE 15

1.2 LA DETECTION ET LE CODAGE DES STIMULATIONS NOCIVES PERIPHERIQUES 18

1.3 L'INTEGRATION MEDULLAIRE 21

1.4 ROLE DES STRUCTURES SUPRAMEDULLAIRES 30

1.5 L'AMYGDALE AU SEIN DE LA MATRICE DOULOUREUSE 33

2 PARTIE II : LES DOULEURS NEUROPATHIQUES 46

2.1 DONNEES DE CLINIQUE HUMAINE 46

2.2 IDENTIFIER ET ETUDIER LA DOULEUR CHEZ L'ANIMAL 54

3 PARTIE III : LES TROUBLES ANXIO-DEPRESSIFS 72

3.1 INTRODUCTION 72

3.2 TROUBLES ANXIO-DEPRESSIFS 74

3.3 LES REGIONS CEREBRALES IMPLIQUEES DANS LES TROUBLES ANXIO-DEPRESSIFS 77

3.4 ROLE DES NOYAUX SEROTONINERGIQUE DANS LES TROUBLES ANXIO-DEPRESSIFS 81

3.5 TRAITEMENTS 92

4 OBJECTIFS DU TRAVAIL DE THESE 103

4.1 CONTEXTE SCIENTIFIQUE 103

4.2 OBJECTIFS DU TRAVAIL 106

B. MATERIELS ET METHODES 107

1 ÉVALUATION ETHIQUE DES PROCEDURES EXPERIMENTALES 108

1.1 ANIMAUX 109

2 MODELES DE DOULEUR 109

2.2 MESURE DE LA NOCICEPTION 112
2.3 EVALUATION DE L'ANXIETE & DE LA DEPRESSION 117
2.4 PRINCIPE DE LA CHROMATOGRAPHIE LIQUIDE COUPLE A LA SPECTROMETRIE DE MASSE (LC-MS/MS) . 121
2.5 INJECTIONS INTRA-AMYGDALIENNES 127
2.6 IMMUNOHISTOCHIMIE DU TSPO 130
2.7 STATISTIQUES 131

C. RESULTATS 132
A. PARTIE I 133
ARTICLE I ETIFOXINE EFFECTS ON PAIN SYMPTOMS, REACTIVE ANXIETY AND DEPRESSIVE-LIKE BEHAVIORS IN NEUROPATHIC MICE 136

B. PARTIE II 159
ARTICLE II FAVORING INHIBITORY SYNAPTIC DRIVE MEDIATED BY GABAA RECEPTORS IN THE BASOLATERAL NUCLEUS OF THEAMYGDALA EFFICIENTLY REDUCES PAIN SYMPTOMS IN NEUROPATHIC MICE 161

C. DISCUSSION GENERALE 183
1 DOULEUR ET TROUBLES ANXIODEPRESSIFS 184
2 DISCUSSION SUR LE MODELE « CUFF » 186
2.1 COMPARATIF SUR LES SYMPTOMES DOULOUREUX 186
2.2 COMPARATIF SUR LES SYMPTOMES ANXIODEPRESSIFS 187
2.3 IMPLICATION DE L'AXE CORTICOTROPE 188
3 DISCUSSION SUR LA MESURE DE LA DOULEUR SPONTANEE MESUREE PAR LE TEST DU CPP 189
4 IMPLICATION DES VOIES MONOAMINERGIQUES DANS LA SENSIBILITE NOCICEPTIVE 191
5 CONTRIBUTION DES STEROÏDES 195
6 CONSIDERATIONS PHARMACOLOGIQUES : BIODISPONIBILITE DE L'ETIFOXINE DANS LES TISSUS 196
7 EFFET NEURO PROTECTEUR /NEURO REGENERATEUR SUR LES NERFS PERIPHERIQUES LESES 198

D. ANNEXE 201
1 ETIFOXINE & INFLAMMATION 202
1.1 INFLAMMATION ET DOULEUR 202
1.2 ETUDE EXPERIMENTALE DE LA DOULEUR INFLAMMATOIRE : LE MODELE CARRAGENINE 204

2 REVUE ANALGESIC STRATEGIES AIMED AT STIMULATING THE ENDOGENOUS PRODUCTION OF ALLOPREGNANOLONE....208

E. GLOSSAIRE 218

F. REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES 221

5 Table des illustrations

FIGURE 1 : SCHEMA CARACTERISANT LA COMPLEXITE MULTIDIMENSIONNELLE ET PLURIFACTORIELLE DE LA DOULEUR. 16
FIGURE 2 : FIBRES AFFERENTES SENSORIELLES ET DOULEUR. 19
FIGURE 3 : RECEPTEURS ET CANAUX IONIQUES SENSIBLES AUX STIMULI THERMIQUES, CHIMIQUES ET MECANIQUES. 20
FIGURE 4 : ORGANISATION ANATOMIQUE ET LAMINAIRE DE LA MOELLE EPINIERE. 22
FIGURE 5 : PRINCIPAUX SITES DE PROJECTION DES FIBRES AFFERENTES NOCICEPTIVES (Aδ, C) ET NON NOCICEPTIVES (Aβ) DANS LA CORNE DORSALE DE LA MOELLE EPINIERE. 24
FIGURE 6 : ENREGISTREMENT ELECTROPHYSIOLOGIQUE D'UN NEURONE NOCICEPTIF SPECIFIQUE. 25
FIGURE 7 : ENREGISTREMENT ELECTROPHYSIOLOGIQUE D'UN NEURONE NOCICEPTIF NON SPECIFIQUE. 26
FIGURE 8 : REPRESENTATION SCHEMATIQUE DES PRINCIPAUX ELEMENTS CONSTITUANT LE RESEAU NEURONAL NOCICEPTIF DANS LA CORNE DORSALE DE LA MOELLE EPINIERE. 29
FIGURE 9 : REPRESENTATION SCHEMATIQUE DES PRINCIPALES VOIES ASCENDANTES NOCICEPTIVES ET DES REGIONS CEREBRALES IMPLIQUEES DANS LE TRAITEMENT DE LA DOULEUR. 32
FIGURE 10 : ORGANISATION ANATOMIQUE DE L'AMYGDALE. 36
FIGURE 11 : REPRESENTATION SCHEMATIQUE DE DIFERRENTES AFFERENCES ET EFFERENCES DE L'AMYGDALE ET D'AUTRES STRUCTURES. 41
FIGURE 12 : REPRESENTATION SCHEMATIQUE DE CINQ MODELES LESIONNELS DE DOULEUR NEUROPATHIQUE PERIPHERIQUE. 61
FIGURE 13 : PRINCIPAUX MECANISMES DES DOULEURS NEUROPATHIQUESPERIPHERIQUES. 71
FIGURE 14 : CIRCUIT DU SYSTEME LIMBIQUE-PREFRONTAL IMPORTANT DANS LES TROUBLES DE L'HUMEUR. 81
FIGURE 15 : METABOLISME DE LA SEROTONINE. 82
FIGURE 16 : REPRESENTATION SCHEMATIQUE DE L'INNERVATION SEROTONINERGIQUE DU SYSTEME NERVEUX CENTRAL CHEZ L'HOMME. 84
FIGURE 17 : LOCALISATION DES DIFFERENTS TYPES DE RECEPTEURS CENTRAUX DE LA 5-HT PAR RAPPORT AUX NEURONES SEROTONINERGIQUES. 86
FIGURE 18 : CHRONOLOGIE DE LA DECOUVERTE DES PRINCIPAUX TRAITEMENTS ANTIDEPRESSEURS, LEUR MECANISME D'ACTION ET LEURS INCONVENIENTS. 93
FIGURE 19 : MECANISME D'ACTION PRE-SYNAPTIQUE DES ISRS. VOIR TEXTE POUR LES DETAILS. 95
FIGURE 20 : 6-CHLORO-N-ETHYL-4-METHYL-4-PHENYL-4H-BENZO[D][1,3]OXAZIN-2-AMINE 100
FIGURE 21 : MODE D'ACTION DE L'ETIFOXINE. 102
FIGURE 22 : VOIES DE BIOSYNTHESE DES NEUROSTEROÏDES. 105
FIGURE 23 : METHODE D'INJECTION INTRATHECALE. 120
FIGURE 24 : SCHEMA SIMPLIFIE D'UN SPECTROMETRE DE MASSE TRIPLE QUADRIPOLE 122
FIGURE 25 : PHOTOGRAPHIE DU SYSTEME DE LA « CHROMATOGRAPHIE LIQUIDE COUPLE A LA SPECTROMETRIE DE MASSE EN TANDEM (LC-MS/MS)». 123
FIGURE 26 : EXEPMLE D'UN SPECTRE HPLC « ACCQ-TAG-SEROTONINE » 126
FIGURE 27 : LA SURFACE DORSALE DE L'OS CRANIEN DE LA SOURIS, MONTRANTLES POINTS DE REFERENCES : BREGMA ET LAMBDA. 128

FIGURE 28 : MESURE DE L'ALLODYNIE CHEZ LE GROUPE CUFF TRAITES A L'ETIFOXINE OU VEHICULE. 157
FIGURE 29 : EFFET DE L'ETIFOXINE SUR LES SIGNES ANXIODEPRESSIFS OBSERVES CHEZ LES CUFF. 158
FIGURE 30 : DIFFERENTES HYPOTHESES ILLUSTRANT LES DIFFERENTS MECANISMES PAR LESQUELS L'ETIFOXINE PEUT AUGMENTER LES NIVEAUX DES MONOAMINES AU NIVEAU DU TRONC CEREBRALE. 192
FIGURE 31 : EFFETS NON GENOMIQUES ET GENOMIQUES DES PRINCIPAUX COMPOSES STEROÏDES. 193

6 LISTE DES PRINCIPALES ABREVIATIONS

ADP	Accès douloureux paroxystiques
AINS	Anti-inflammatoires non stéroïdiens
AMPA	Acide α-amino-3-hydroxy-5-méthyl-4- isoxazolépropionique ATP
ASIC	Amiloride-sensitive cation channel
ATF	Activating transcription factor
ATP	Adénosine triphosphate
AVC	Accident vasculaire cérébral
BDNF	Brain derived neurotrophic factor
BHE	Barrière hémotoencéphalique
BLA	Complexe basolatéral de l'amygdale
BL	Noyau basal de l'amygdale
BMP	Bone morphogenetic protein
BSA	Bovine serum albumin
CCK	Cholécystokinines
CCI	Chronic constriction injury
CD	Cluster of differentiation
CeA	Noyau central de l'amygdale
CeA	Noyau central de l'amygdale
CGRP	Calcitonin gene-related peptide
CPSE	Courant post-synaptique excitateur
CPSI	Courant post-synaptique inhibiteur
CRF	Facteur libérateur de corticotrophine
CRH	Cortisol releasing hormone
CV	Coefficient de variation
COX-1 et 2	Isoenzymes cyclo-oxygénases 1 et 2
CR	Récepteurs du complément
CX3CL1	Fractalkine
DA	Dopamine
DAT	Transporteur de la dopamine
DRG	Ganglions de la racine dorsale
DMSO	Diméthylsulfoxyde
DRG	Ganglion de la racine dorsale
DWB	Dynamic weight bearing
DZP	Diazepam
EFX	étifoxine
EGF	Facteur de croissance épidermique
FITC	Fluorescéine isothiocyanate
EP2	Récepteur aux prostaglandines E2
FGF	Fibroblast growth factor
GABA	Acide gamma-amino butyrique GAD
GAD	Acide glutamique décarboxylase GDNF
GAPD	Glyceraldehyde 3-phosphate deshydrogenase
GDNF	Glial-derived neurotrophic factor
GFAP	Glial fibrillary acidic protein
GluR1 et GluR2	Sous-unités du récepteur AMPA
GlyR	Récepteur ionotropique de la glycine
$GlyR_{\alpha1, \alpha2 \text{ et } \alpha3}$	Sous-unités du récepteur glycinergique
GlyT1 et GlyT2	Transporteur de la glycine 1 et 2
GnRH	Gonadotrophin-releasing hormone

IASP	International association for the study of pain
iba-1	Ionized calcium binding adaptator molecule 1
ICAM	Ntracellular adhesion molecule
IL	Interleukine
i.m.	Intra musculaire
i.p.	Intra péritonéale
IP3	Inositol triphosphate
IRD	Inhibiteur de la recapture de dopamine
IRN	Inhibiteur de la recapture de noradrénaline
ISRN	Inhibiteur de la recapture de sérotonine et de noradrénaline
ISRS	Inhibiteur sélectif de la recapture de sérotonine
KCC2	Potassium-chloride exporté
LTP	Potentialisation à long terme
mGluR	Récepteur métabotropique du glutamate
MOR	Récepteur opioïde Mu
NA	Noradrénaline
NET	Transporteur de la noradrénaline
NFS	Novelty suppressed feeding (test de faim supprimée par le nouveauté)
NGF	Nerve growth factor
NMDA – NMDAR	N-méthyl D-aspartate et récepteur
NO	monoxyde d'azote
NR1, NR2 et NR3	Sous-unités du récepteur NMDA
NS	Neurones nociceptifs spécifiques
OMS	Organisation mondiale de la santé
OPG	Ostéoprotégérine
PAG	Substance grise périaqueducale
PB	Aire parabrachiale
PBR	peripheral benzodiazepine receptor
PBS	Phosphate buffered saline
PGE2	Prostaglandine E2
PI3K	Phosphoinositide 3 kinase
PKA	Protéine kinase A
PLC	Phospholipase C
PSNL	Partial sciatic nerve ligation
RANK	Receptor activator of nuclear factor kappa
RCPG	Récepteurs couplés aux protéines G
RTK	Récepteurs à activité tyrosine kinase
RVM	Bulbe rostro-ventro-médian
S.c.	Sous cutanés
SEM	Erreur standard à la moyenne
SERT	Transporteur de la sérotonine
SNC	Système nerveux central
SNI	Spared nerve ligation
SNL	Spinal nerve ligation
SNP	Système nerveux périphérique
SP	Substance P
TBS	Tris buffered saline
TCA	Antidépresseur tricyclique
THDOC	3α-5α- tétrahydrodéoxycorticostérone TPMPA
TREK	Potassium channel subfamily K
TRI	Triple inhibiteur de recapture

Trk	Récepteur tyrosine kinase
TRPA	Transient receptor potential cation channel subfamily A
TRPM	Transient receptor potential cation channel subfamily M
TRPV	Transient receptor potential vanilloid
TSPO	Translocator protein
VEGF	Vascular endothelial growth factor
VGLUT	Transporteurs vésiculaires du glutamate
VIP	Vasoactive intestinal peptide
WDR	Wide dynamic range, neurones à convergence

A. INTRODUCTION

1 Partie I : Nociception et douleur

1.1 Introduction générale

La douleur est une sensation désagréable connue de tous. Elle est subjective et donc difficile à évaluer de manière claire, mais elle forge notre personnalité et nous permet une adaptation essentielle à la survie. En effet, des cas rares d'insensibilité congénitale à la douleur mettent en avant son rôle protecteur de l'intégrité de l'organisme.

C'est finalement très récemment, à la fin du XXème siècle, que la prise en charge de la douleur chez le patient devient un véritable enjeu de santé publique. Il faudra attendre 1979 pour que le Comité de Taxonomie de l'IASP (The International Association for the Study of Pain) donne la définition suivante : on appelle douleur « **une expérience sensorielle et émotionnelle désagréable liée à des lésions tissulaires réelles ou potentielles ou décrites en des termes évoquant de telles lésions** » (Merskey and Bogduk (Eds) 1994) .

Quatre composantes fondamentales de la douleur ont pu être identifiées : (1) la **composante sensori-discriminative** correspond aux mécanismes neurophysiologiques permettant l'encodage et l'analyse de la qualité, de l'intensité, de la durée et de la localisation des stimulations nocives ; (2) la **composante affective et émotionnelle** attribue à la douleur son caractère désagréable, pénible et parfois insupportable ; (3) la **composante cognitive** fait référence à l'ensemble des facteurs capables de moduler la perception de la douleur, tels que l'attention (focaliser son attention sur un processus dont l'affect est neutre pour faire diversion), l'anticipation (prévoir une réaction comportementale en fonction de l'apprentissage qui permettra d'éviter ou de minimiser la douleur), l'interprétation (selon la culture, la religion et le milieu social) ; (4) la **composante comportementale** fait référence aux manifestations verbales (plaintes, gémissements) et non verbales (postures antalgiques, mimiques du visage) observées chez les patients en condition de douleur (Calvino 2006). La douleur est par conséquent un phénomène subjectif extrêmement complexe, multidimensionnel (sensoriel, émotionnel et affectif, cognitif, comportemental) et plurifactoriel (facteurs internes relatifs à l'individu lui-même tels que sa physiologie, son vécu, ses apprentissages, mais aussi facteurs externes relatifs aux facteurs environnementaux tels que le contexte socio-économique, culturel et ethnique, religieux) (**Figure 1**).

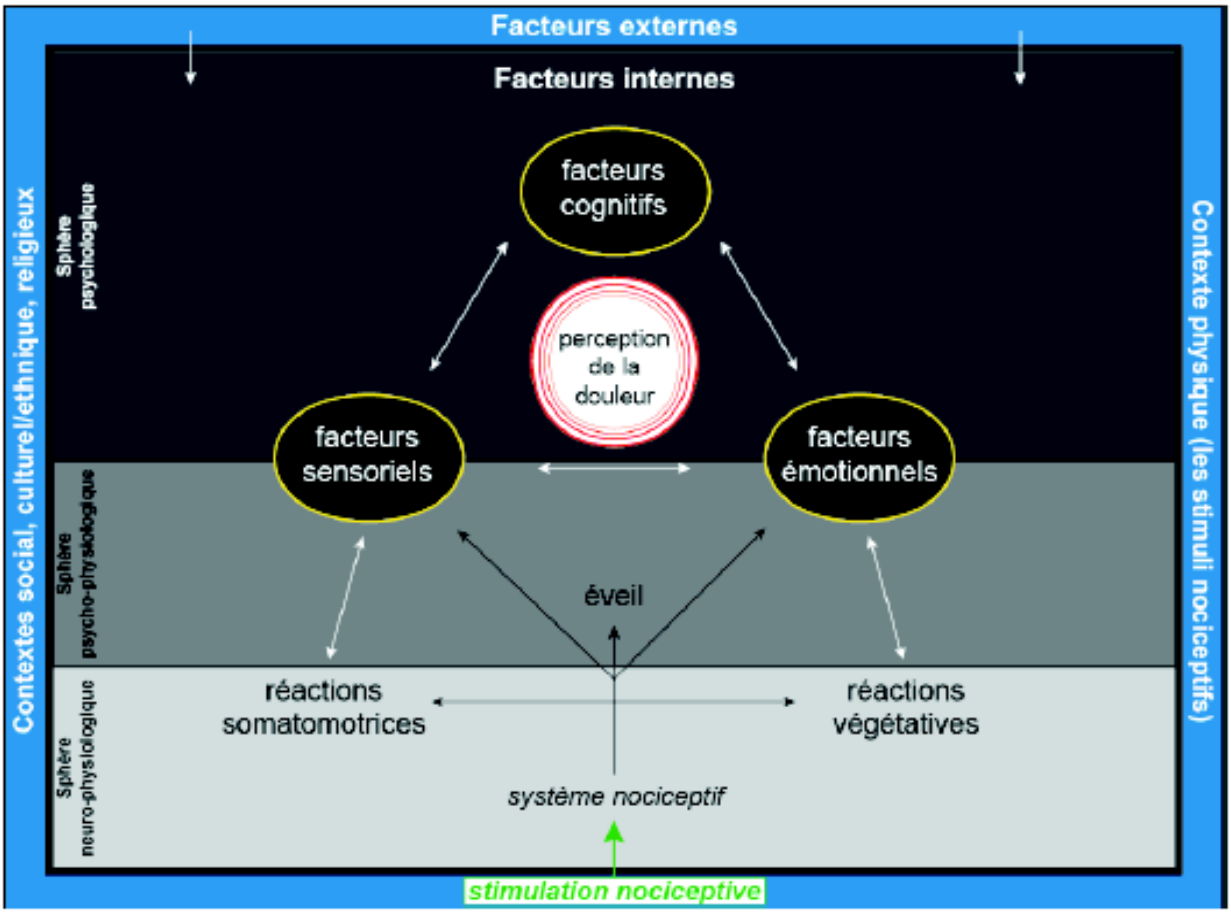


Figure 1 : Schéma caractérisant la complexité multidimensionnelle et plurifactorielle de la douleur. (Modifiée d'apres Calvino 2006).

On distingue chez l'homme trois grandes catégories de douleurs :

- Les **douleurs par excès de nociception** sont provoquées par la mise en jeu des voies neurophysiologiques de la douleur. Elles correspondent à la mise en jeu des mécanismes les plus fréquents : c'est-à-dire lorsqu'un processus pathologique active au niveau périphérique le système physiologique de genèse et de transmission des messages nociceptifs. L'information est générée par les récepteurs périphériques des tissus concernés, les noci-récepteurs, suite à un traumatisme, une infection, une inflammation, etc. Elle est ensuite transmise vers la moelle épinière par les neurones sensoriels (dont les nocicepteurs) puis vers les structures supraspinales.

- Les **douleurs neuropathiques** résultent d'une lésion du système nerveux. Ce type de lésion provoque des douleurs spontanées pouvant être ressenties comme des décharges électriques, des élancements, des brûlures et des picotements dans le territoire des nerfs atteints. C'est aussi la douleur que ressentent les malades amputés appelée également douleur du membre fantôme.

- Les **douleurs idiopathiques** regroupent toutes les douleurs que l'on ne sait pas classer dans une des deux catégories précédentes. Ce sont des douleurs sans lésions apparentes, malgré un bilan médical approfondi. Certaines sont particulièrement amplifiées par un délabrement psychologique qui fait exprimer au patient des troubles anxieux et dépressifs.

Deux types de douleur peuvent être décrits sur le plan clinique en fonction de leur durée:

- La **douleur aiguë** est une sensation déclenchée par le système nerveux pour alerter l'ensemble de l'organisme et évoluant depuis moins de trois mois. La douleur aigüe est considérée comme un signal d'alarme et permet d'assurer le maintien de l'intégrité physique.

- La **douleur chronique** est une douleur persistante et parfois rebelle aux traitements usuels qui perdure au delà de trois à trois mois. Ne possèdant aucune fonction physiologique utile, on parle alors de « douleur-maladie » qui « ne protège pas l'homme, mais le diminue » comme disait le grand chirurgien et physiologiste français René Leriche (Leriche, 1936)

La cascade d'évènements physiologiques conduisant à l'intégration du message douloureux met en jeu de nombreux acteurs. Il y a tout d'abord l'activation de neurones sensoriels spécifiques, nommés **nocicepteurs**, et exprimant des noci-récepteurs spécifiques (comme les canaux TRP par exemple) impliqués dans la détection des stimuli potentiellement dangereux pour l'organisme. Le message nociceptif est codé sous la forme de potentiels d'action permettant la libération synaptique de glutamate au niveau de la corne dorsale de la **moelle épinière**, sur des neurones médullaires qui constituent le premier relais central d'intégration des informations nociceptives. Si certains de ces neurones sont des interneurones locaux, d'autres envoient leurs axones vers les centres supramédullaires constituant les **voies ascendantes médullaires**. Au niveau de l'encéphale, de nombreux relais sont impliqués dans l'intégration des informations douloureuses, notamment le thalamusqui joue un rôle clé avant le transfert d'information vers le cortex somato-sensoriel, insulaire ou encore cingulaire. Ces différentes étapes sont détaillées dans les paragraphes suivants.

1.2 La détection et le codage des stimulations nocives périphériques

Les stimulations mécaniques, thermiques ou chimiques de forte intensité sont détectées par les nocicepteurs (Olausson et al. 2008).

L'activation des nocicepteurs ne peut se produire que lorsque l'intensité du stimulus nociceptif atteint un certain seuil, ce qui confirme que ces fibres afférentes sensorielles possèdent des propriétés biophysiques et moléculaires qui leur permettent de détecter sélectivement des stimuli potentiellement dangereux. Sur ce principe, deux grandes classes de nocicepteurs ont pu être identifiées. Une sous-population de **fibres Aδ** composent la première classe (voir **figure 2** ci-dessous). Ce sont des fibres peu myélinisées, de diamètre moyen, responsables d'une transmission "rapide" du message nociceptif permettant sa localisation précise. Ces fibres Aδ doivent être distinguées des fibres Aβ, de plus gros diamètre et également myélinisées répondent à des stimulations mécaniques non nociceptives. La seconde classe de nocicepteurs fait référence à la grande majorité des **fibres afférentes de type C**, non myélinisées et de petits diamètres, responsables d'une transmission lente du message nociceptif et rendant compte de douleurs moins bien localisées (**Figure 2**). Il faut noter que toutes les fibres C ne sont pas des nocicepteurs. Une sous population de ces fibres, insensibles aux stimuli chimiques et à la chaleur, est activée par des stimulations mécaniques très légères au niveau de la peau et semble transmettre un message nerveux associé au toucher « agréable » (Olausson et al. 2008). Les fibres nociceptives C peuvent être dissociées en deux catégories en fonction de leur signature neurochimique: d'une part les fibres C peptidergiques, qui libèrent en plus du glutamate, des neuropeptides (principalement substance P et CGRP : Calcitonin-gene related peptide) et expriment le récepteur TrkA (Récepteur tyrosine kinase A, activé par le NGF : Nerve growth factor) et d'autre part les fibres C non peptidergiques, qui expriment le récepteur c- Ret (récepteur de type tyrosine kinase, activé principalement par le GDNF : glial-derived neurotrophic factor) (Snider and McMahon 1998).

A

Fibre Aβ	Fibre Aδ	Fibre C
gros diamètre : 6 à 12 µm	moyen diamètre : 1 à 5 µm	petit diamètre : 0,2 à 1,5 µm
vitesse de conduction : 35 à 75 m/s	vitesse de conduction : 5 à 30 m/s	vitesse de conduction : 0,5 à 2 m/s
myélinisée	faiblement myélinisée	non myélinisée
sensibilité tactile non nociceptive	sensibilité (mécanique, thermique, chimique) nociceptive	sensibilité (mécanique, thermique, chimique) nociceptive, thermique non nociceptive, démangeaisons

B

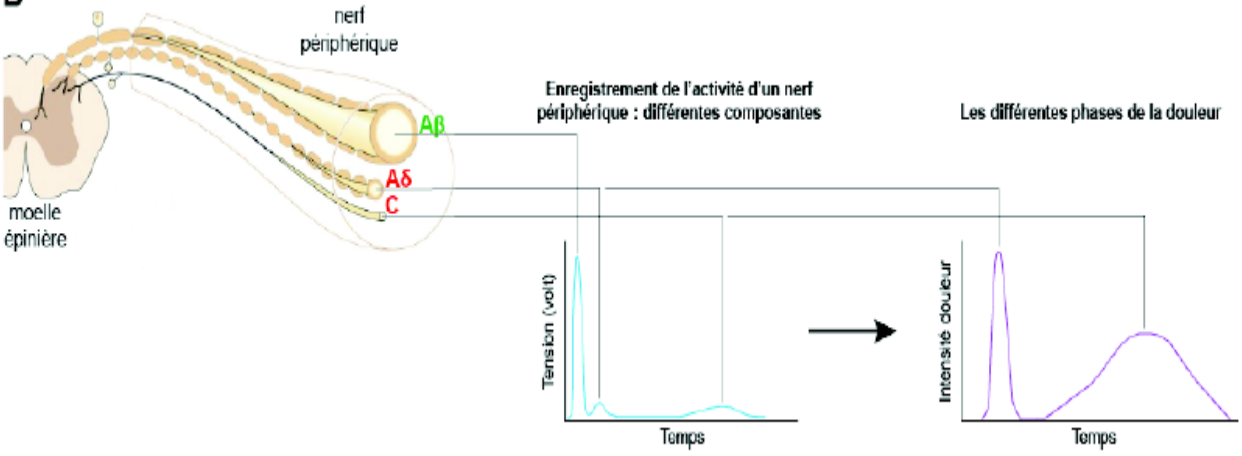


Figure 2 : Fibres afférentes sensorielles et douleur. A. Caractéristiques des différents types de fibres sensorielles nociceptives et non nociceptives constituant les nerfs périphériques. B. Les propriétés de ces fibres (diamètre et myélinisation) influencent la vitesse de conduction de l'influx nerveux. Cette vitesse de conduction différente pour les deux types de fibres afférentes nociceptives Aβ, δ et C, est à l'origine des différentes phases de la douleur ressentie : d'abord une douleur intense de courte durée et localisée (fibres Aβ), suivie d'une douleur moins intense de durée plus longue et diffuse (fibres C). (Modifiée d'après Julius 2001).

A côté de cette classification anatomique et neurochimique, les nocicepteurs peuvent être caractérisés par leur modalité sensorielle associée à l'expression de détecteurs moléculaires spécifiques de la nociception au chaud (e.g. TRPV1-3 pourTransient receptor potential vanilloid), au froid (TRPM8 pour Transient receptor potential cation channel subfamily M8), par acidification (ASIC1/3 pour Acid-sensing ion channel) ou encore mécanique (comme par exemple ASIC2/3, TREK1, TRPA1 et TRPV4). ((Julius 2001; P. Mantyh 2013) (**Figure 3**).

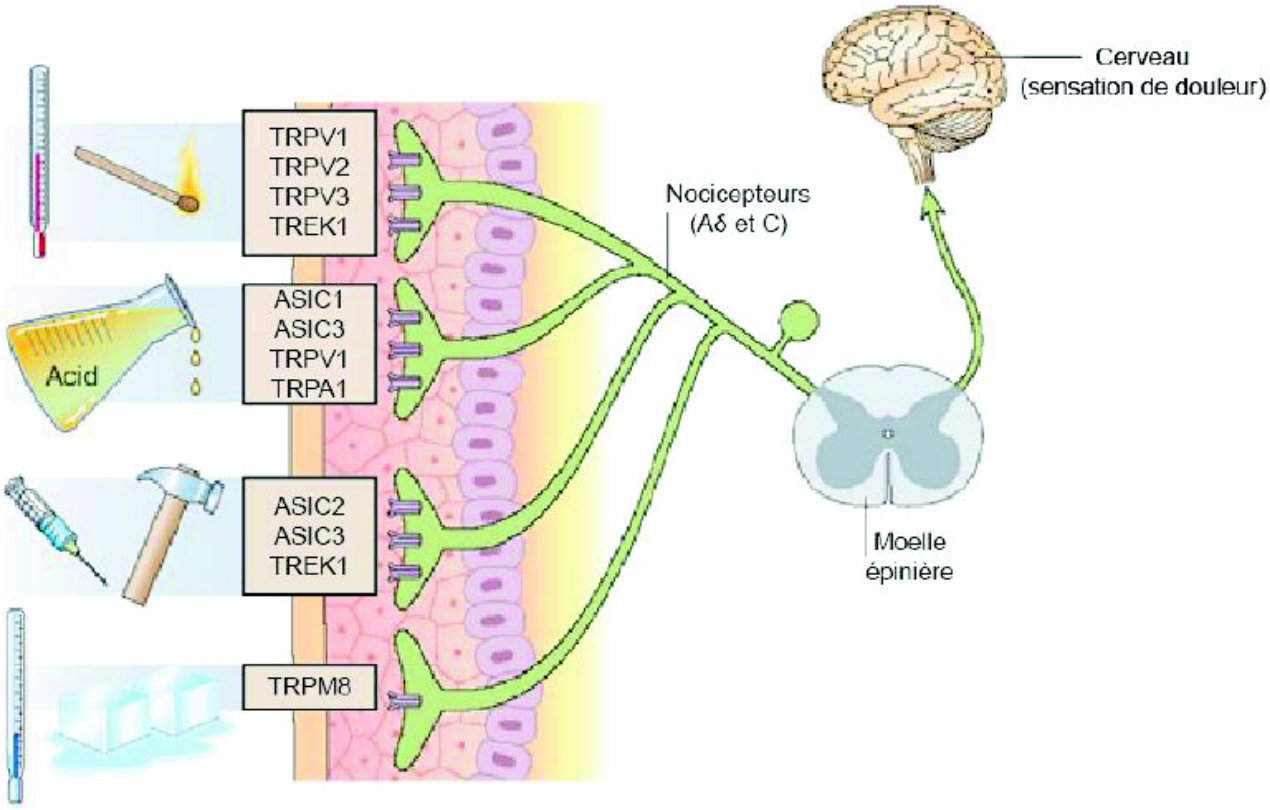


Figure 3 : Récepteurs et canaux ioniques sensibles aux stimuli thermiques, chimiques et mécaniques exprimés par les nocicepteurs Aδ et C. Abréviations : TRPV, Transient receptor potential vanilloid ; TREK, Potassium channel subfamily K ; ASIC, Acid-sensing ion channel ; TRPA, Transient receptor potential cation channel member A ; TRPM, Transient receptor potential cation channel subfamily M. (Modifiée d'après Scholz and Woolf 2002).

Des études électrophysiologiques ont permis de distinguer deux sous populations au sein des fibres Aδ: (1) les fibres afférentes Aδ de type 1 activées à la fois par des stimuli mécaniques, chimiques et thermiques, caractérisées par des seuils nociceptifs mécanique et thermique au chaud élevés, (2) les fibres afférentes Aδ de type 2 activées par des stimuli mécaniques de forte intensité et thermiques au chaud de faible intensité (Basbaum et al. 2009). Tout comme les fibres Aδ, la plupart des fibres C sont polymodales, c'est-à-dire capables de détecter à la fois des stimuli mécaniques, chimiques et thermiques (Perl 2007). Il existe une hétérogénéité ainsi qu'une plasticité au sein de ces fibres non myélinisées, qui peuvent par exemple être sensibles à la chaleur et insensibles aux stimuli mécaniques, et dans certaines conditions développer de nouvelles sensibilités, c'est le cas des nocicepteurs dits silencieux, normalement insensibles aux stimuli mécaniques mais qui le deviennent après application d'une substance irritante (Schmidt et al. 1995).

Cette grande diversité au sein des nocicepteurs, qui s'explique notamment par une hétérogénéité cellulaire (fibres de différents diamètres, myélinisées ou non), moléculaire

(signature moléculaire unique, par exemple entre les fibres C peptidergiques et non peptidergiques), fonctionnelle (expression de canaux ioniques spécifiques conférant une sélectivité nociceptive), permet une détection et une transmission appropriée des différents stimuli nociceptifs, afin de rendre le système nociceptif le plus efficace possible.

1.3 L'intégration médullaire

1.3.1 Rappel anatomique et fonctionnel

La moelle épinière correspond à la partie du système nerveux central qui se trouve en dessous du tronc cérébral. Elle se divise en quatre régions anatomiques : cervicale, thoracique, lombaire et sacrée. Chacune de ces régions est constituée de plusieurs segments médullaires (31 segments au total chez l'homme). Ces derniers reçoivent le message nerveux sensoriel provenant de la périphérie via les nerfs spinaux. Si l'on observe une coupe transversale de l'un de ces segments, deux structures médullaires peuvent être différenciées : la substance blanche, localisée en périphérie, qui contient l'ensemble des faisceaux d'axones ascendants et/ou descendants, et la substance grise, en forme de papillon au centre du segment, qui contient les corps cellulaires des neurones et des cellules gliales. C'est grâce aux travaux neuroanatomiques de Bror Rexed, célèbre neuroscientifique suédois, qu'une organisation laminaire en dix couches (Rexed laminae) de la substance grise a pu être établie (**Figure 4**). La corne dorsale de la moelle épinière correspond à la région de la substance grise s'étendant de la couche I superficielle à la couche VI profonde, tandis que la corne ventrale (ou antérieure) de la moelle épinière correspond à la région de la substance grise s'étendant de la couche Vll à la couche IX. Notons que la couche II est généralement divisée en couche II externe (IIo) et II interne (IIi), et que la couche X entoure le canal central. De façon caricaturale, nous pouvons dire que la corne ventrale, contenant essentiellement des neurones moteurs, est impliquée dans la mise en jeu des réponses efférentes motrices, alors que la corne dorsale qui reçoit les afférences centrales des neurones sensorielsprojections des fibres afférentes nociceptives (et non nociceptives, voir ci-après) est impliquée dans permettant le traitement et l'intégration des informations nociceptives.

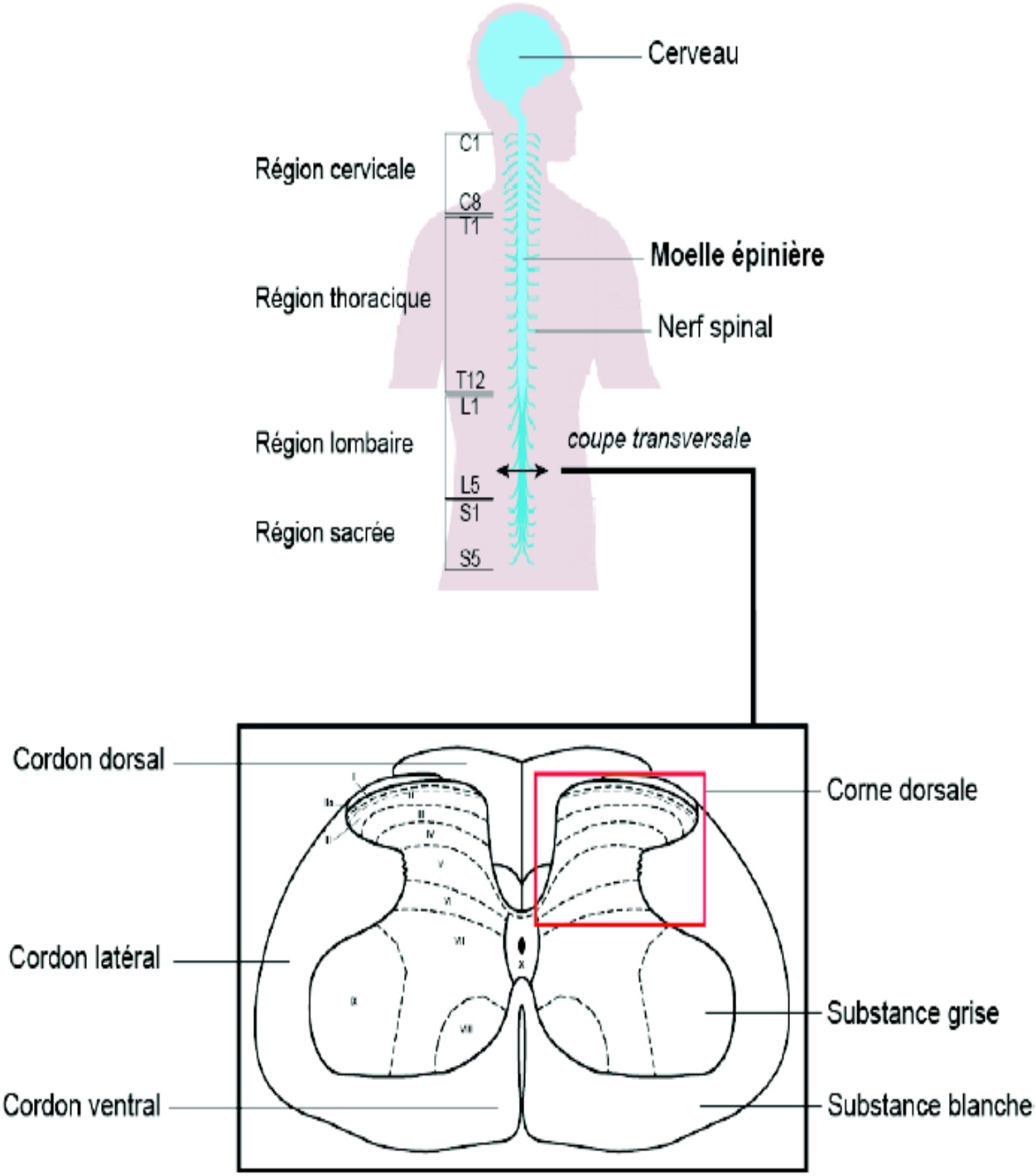


Figure 4 : Organisation anatomique et laminaire de la moelle épinière. Représentation des régions cervicale, thoracique, lombaire et sacrée de la moelle épinière (en haut). La délimitation des couches de la substance grise de la moelle épinière (en bas) est schématisée par des pointillés. La corne dorsale (encadrée en rouge) superficielle et profonde englobe respectivement les couches I-II et III-VI. (Modifiée d'après Basbaum et al. 2009).

Les fibres afférentes nociceptives projettent dans la corne dorsale de la moelle épinière, qui possède comme nous venons de le voir une organisation laminaire très précise, afin d'établir d'établir des contacts synaptiques avec différents neurones

médullaires localisés dans les différentes couches de la corne dorsale. Des études anatomiques et électrophysiologiques ont permis de réaliser une cartographie des zones de projection laminaire, en fonction du type de fibre (Aδ, C peptidergique et non peptidergique) ou non nociceptive (Aβ). Schématiquement, les couches superficielles I et IIo reçoivent essentiellement des informations nociceptives via les fibres Aδ et C, les couches III et IV reçoivent principalement des informations non nociceptives via les fibres Aβ. Pour finir, la couche profonde V est considérée comme une zone de convergence et d'intégration des informations à la fois nociceptives et non nociceptives relayées par les fibres Aδ et Aβ (contacts monosynaptiques directs) et par les fibres C (contacts polysynaptiques indirects). En effet, les fibres nociceptives Aδ projettent leurs axones sur les neurones des couches I, IIo ainsi que des couches profondes V. Les fibres C peptidergiques envoient leur axone principalement sur les neurones des couches superficielles I et IIo, alors que les fibres C non peptidergiques ciblent préférentiellement les couches IIi dorsale (la couche IIi peut être subdivisée en couche IIi dorsale et couche IIi ventrale). De plus, les fibres afférentes Aβ myélinisées, responsables de la conduction rapide d'informations non nociceptives (sensibilité tactile et proprioceptive), projettent leurs axones de la couche IIi ventrale à la couche V (Basbaum et al. 2009)(**Figure 5**).

C'est donc dans la corne dorsale de la moelle épinière, au niveau de ces zones de projection spécifique, que le premier contact synaptique est établi entre, d'une part les terminaisons des différentes fibres afférentes du système nociceptif et d'autre part, les différents neurones spinaux qui caractérisent la moelle épinière. Cela constitue ainsi le premier niveau d'intégration centrale de l'information nociceptive périphérique.

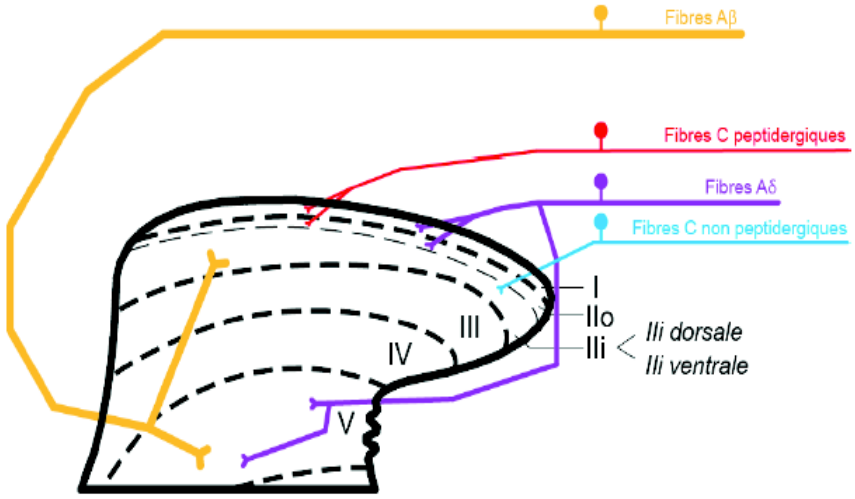


Figure 5 : Principaux sites de projection des fibres afférentes nociceptives (Aδ, C) et non nociceptives (Aβ) dans la corne dorsale de la moelle épinière. Les fibres myélinisées Aδ (en violet) et non myélinisées C peptidergiques (en rouge) projettent principalement dans les couches superficielles I et IIo ainsi que dans la couche profonde V pour Aδ, les fibres non myélinisées C non peptidergiques (en bleu) projettent dans la couche IIi, enfin les fibres proprioceptives myélinisées Aβ (en jaune) projettent dans les couches IIi ventrale et V (Modifiée d'après Basbaum et al. 2009).

1.3.2 Les neurones de la corne dorsale

Deux catégories de neurones spinaux, localisés dans la corne dorsale de la moelle épinière et impliqués dans la nociception (**Figure 6**), ont été identifiées sur la base de leur réponse sélective aux différentes stimulations sensorielles : les **neurones nociceptifs spécifiques**, activés uniquement par des stimulations nociceptives et les **neurones nociceptifs non spécifiques**, qui répondent préférentiellement mais non exclusivement aux stimuli nociceptifs. Notons par ailleurs qu'il existe dans la corne dorsale de la moelle épinière, des neurones dits non nociceptifs spécifiques, qui ne répondent qu'à des stimulations non nociceptives, et qui sont impliqués dans la transmission et l'intégration d'informations sensorielles non douloureuses médiées par les fibres Aβ (tact léger).

Les neurones nociceptifs spécifiques (**NS**) sont principalement localisés dans la couche I superficielle de la corne dorsale de la moelle épinière, et sont contactés exclusivement par les fibres nociceptives Aδ et C, au travers d'un contact synaptique direct entre le neurone NS (corps cellulaire, dendrites) et la fibre afférente (terminaisons centrales). Certains de ces neurones NS peuvent être spécifiques d'une modalité sensorielle nociceptive (par exemple thermique ou mécanique). Cependant, quelle que soit leur sélectivité envers les modalités sensorielles, les neurones NS ne répondent qu'à des stimulations nociceptives de haute intensité. Ainsi, lorsqu'un

stimulus nociceptif est détecté en périphérie par les nocicepteurs Aδ et C, les neurones NS répondent par l'émission de potentiels d'action pouvant coder, dans une certaine mesure, l'intensité de la stimulation (**Figure 6**).

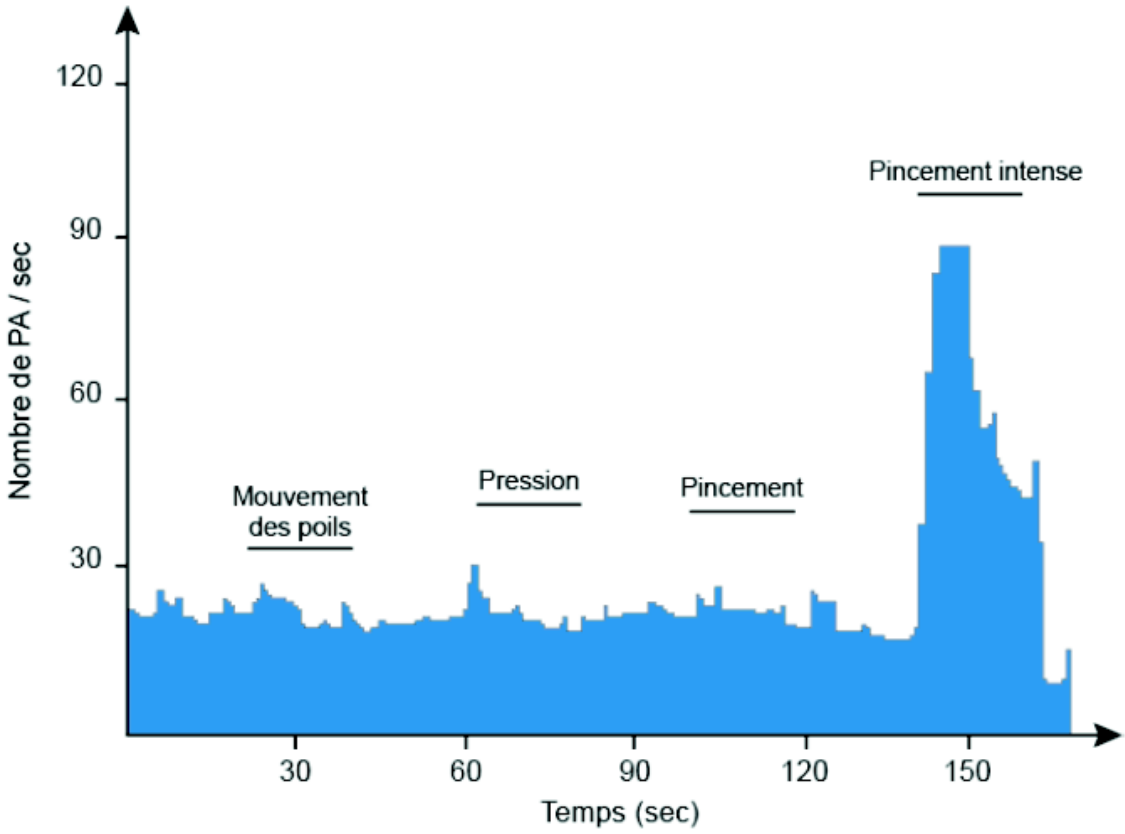


Figure 6 : Enregistrement électrophysiologique d'un neurone nociceptif spécifique. Réponse uniquement à un stimulus nociceptif tel qu'un pincement intense. Abréviation : PA, Potentiel d'action. (D'après (Basbaum et al. 2009).

Les neurones sensoriels sont également caractérisés par leur champ récepteur, défini comme le territoire au sein duquel l'application d'un stimulus approprié déclenche ou modifie la réponse de ce neurone sensoriel. Pour les neurones NS, les champs récepteurs sont localisés sur un petit territoire.

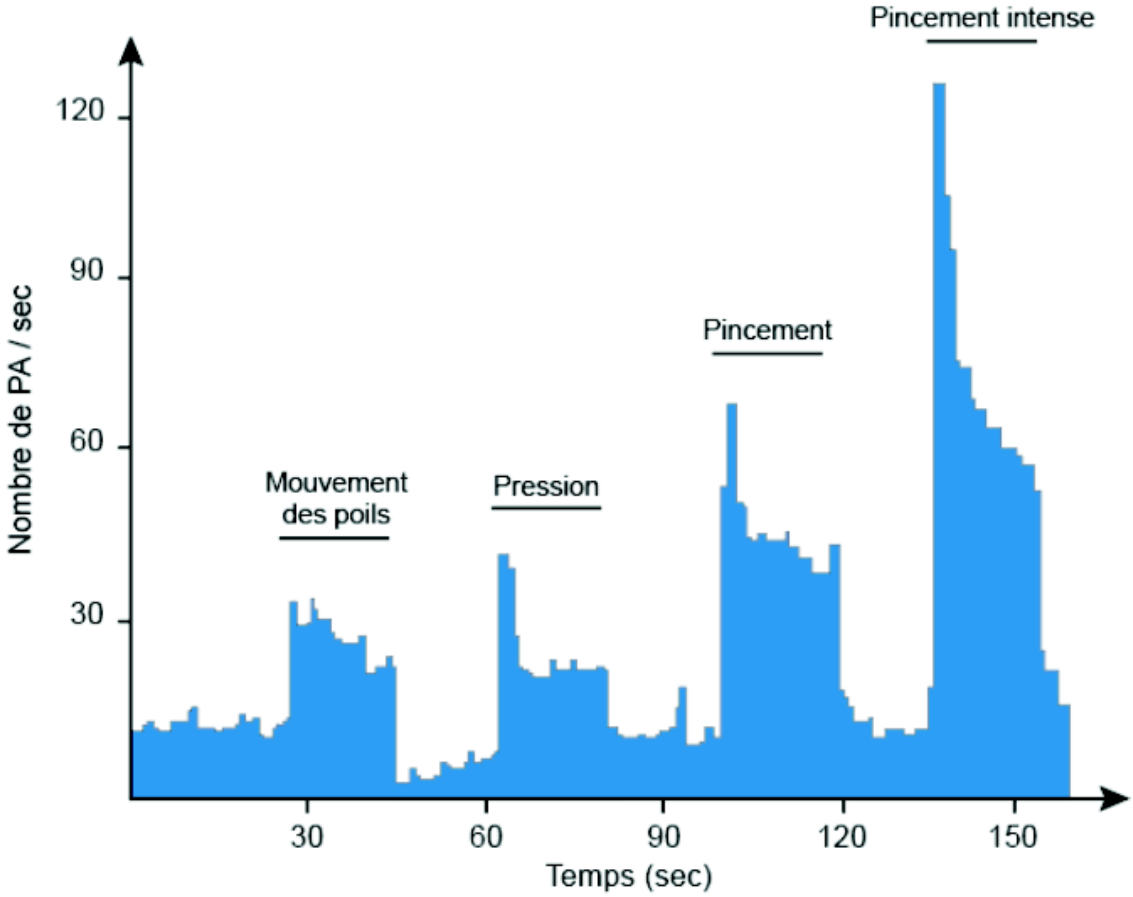


Figure 7 : Enregistrement électrophysiologique d'un neurone nociceptif non spécifique. Réponse à différents types de stimulation. Abréviation : PA, Potentiel d'action. (D'après Basbaum et al. 2009).

Les neurones nociceptifs non spécifiques présentent plusieurs caractéristiques fonctionnelles qui leur ont conféré différentes appellations: neurones à convergence, neurones polymodaux ou neurones à large gamme dynamique (wide dynamic range, WDR). En effet, ces neurones ont la particularité de recevoir des informations à la fois des fibres afférentes nociceptives Aδ et C et des fibres non nociceptives Aβ, et par conséquent de répondre non seulement à une large gamme de modalités sensorielles (mécaniques, thermiques et chimiques), mais également à un large spectre d'intensité de stimulation (pouvant aller par exemple du toucher léger au pincement nociceptif). Ces neurones codent l'intensité de la stimulation puisque celle-ci module directement la fréquence de décharge du neurone. Ceci permet également de coder indirectement la distinction entre une stimulation nociceptive et non nociceptive, avec des stimuli nociceptifs qui induisent une fréquence de décharge plus élevée et activent une plus grande population de neurones comparativement aux stimuli non nociceptifs (**Figure 7**). Des études électrophysiologiques

ont permis d'identifier ces neurones en moins grand nombre dans les couches superficielles I et II. Ils représentent environ le cinquième des neurones nociceptifs enregistrés alors que dans les couches profondes IV à VI de la corne dorsale de la moelle épinière, ils représentent la majorité des neurones nociceptifs. Les champs récepteurs de ces neurones peuvent couvrir des territoires réduits ou plus étendus. Ils possèdent une organisation particulière car toute la surface du champ récepteur n'est pas équivalente en termes de sensibilité de détection. Ainsi, plus la stimulation (d'intensité donnée) est localisée au centre du champ récepteur, plus l'activité résultante du neurone nociceptif non spécifique associé est maximale (Donald D Price, Greenspan, and Dubner 2003).

Parallèlement à cette classification, dépendante de la sensibilité de ces cellules aux informations sensorielles afférentes, les neurones de la corne dorsale de la moelle épinière impliqués dans la nociception peuvent également être classés en fonction de leurs cibles (intramédullaire vs extramédullaire): les interneurones et les neurones de projection respectivement.

En ce qui concerne les neurones de projection, leurs axones sont organisés en faisceaux ascendants et permettent de relayer le message douloureux vers les centres supra spinaux. Une population importante de ces neurones de projection a été identifiée dans la couche I superficielle de la corne dorsale. La grande majorité de ces neurones (environ 80%) expriment le récepteur de la substance P (NK1, Neurokinin 1 receptor) (Todd 2002) neuropeptide libéré par les fibres afférentes nociceptives. Ces neurones répondent donc à des stimulations nociceptives et peuvent par conséquent être identifiés comme des neurones nociceptifs spécifiques et/ou non spécifiques (P. W. Mantyh et al. 1997). Il a été montré que ces neurones de projection NK1 positifs localisés dans la couche I projettent dans différentes régions cérébrales telles que le thalamus, la substance grise périaqueducale (PAG) et l'aire parabrachiale (PB) (Todd 2002). Un grand nombre de neurones de projection a également été identifié dans les couches profondes III à VI de la corne dorsale de la moelle épinière. Ces neurones projettent leurs axones principalement vers le thalamus, via le faisceau spinothalamique, véhiculant essentiellement la composante sensori-discriminative de l'information nociceptive.

A l'opposé de ces neurones de projection, dont le rôle est de transmettre l'information nociceptive aux centres supra spinaux, les interneurones peuvent également être activés par des stimulations nociceptives provenant des fibres afférentes (Basbaum et al. 2009). Ces interneurones, en particulier ceux localisés dans la couche II (IIo, IIi dorsale, IIi ventrale), sont impliqués dans le transfert inter- et intralaminaire, l'intégration et la modulation des informations nociceptives. Dans la corne dorsale, deux types

d'interneurones peuvent être identifiés sur la base de leurs actions post-synaptiques: excitatrice ou inhibitrice. Les interneurones excitateurs sont non seulement impliqués dans l'activation indirecte (polysynaptique) des neurones de projection des couches superficielles et profondes, mais ils peuvent également exercer une action excitatrice sur les terminaisons des fibres afférentes nociceptives par rétrocontrôle. On parle d'amplification du signal. Les transmetteurs permettant de médier l'action de ces interneurones excitateurs sont principalement le glutamate (Landry et al. 2004), des neuropeptides (tels que la substance P, la neurotensine et le VIP : Vasoactive intestinal peptide) (Coggeshall and Carlton 1997) et/ou des cholécystokinines (CCK) (Coggeshall and Carlton 1997). Certains de ces interneurones excitateurs, comme ceux localisés dans la couche IIi ventrale de la corne dorsale de la moelle épinière, se caractérisent par l'expression de la protéine PKCγ (Protéine kinase Cγ) (Basbaum et al. 2009). Ces interneurones PKCγ peuvent recevoir des entrées synaptiques en provenance des fibres non nociceptives Aβ (Neumann et al. 2008). Ainsi, les interneurones excitateurs et les neurones de projection forment un réseau activé par les fibres Aδ et C (voir Aβ), responsable du transfert de l'information nociceptive des fibres afférentes aux neurones de projection et, dans un second temps, aux centres supra spinaux. Par opposition, les interneurones inhibiteurs sont considérés comme des régulateurs importants, limitant la transmission des informations nociceptives. Pour ce faire, ils contactent directement les neurones de projection et/ou les terminaisons des fibres afférentes nociceptives. Plusieurs classes neurochimiques d'interneurones inhibiteurs ont été identifiées : (1) cholinergiques, exprimant l'acétylcholine qui agit via les récepteurs muscariniques et nicotiniques (Coggeshall and Carlton 1997) (2) GABAergiques et glycinergiques, exprimant le GABA (Acid γ-aminobutyrique) et/ou la glycine qui agissent respectivement via les récepteurs du GABA (GABAA et B) et de la glycine (GlyR) (M J Millan 1999). Les interneurones GABAergiques (non glycinergiques) peuvent également exprimer plusieurs neuropeptides, permettant de différentier les interneurones GABAergiques exprimant la galanine et le neuropeptide Y, de ceux exprimant la galanine et l'enképhaline (Munglani, Hudspith, and Hunt 1996). Ces interneurones inhibiteurs sont eux aussi contactés par les fibres afférentes nociceptives Aδ et C (M Yoshimura and Nishi 1995). Par conséquent, la douleur induite lors de la stimulation directe des neurones de projection (neurones nociceptifs spécifiques et non spécifiques) par les fibres Aδ et C, peut être régulée par l'activation simultanée des interneurones inhibiteurs par ces mêmes fibres afférentes (**Figure 8**).

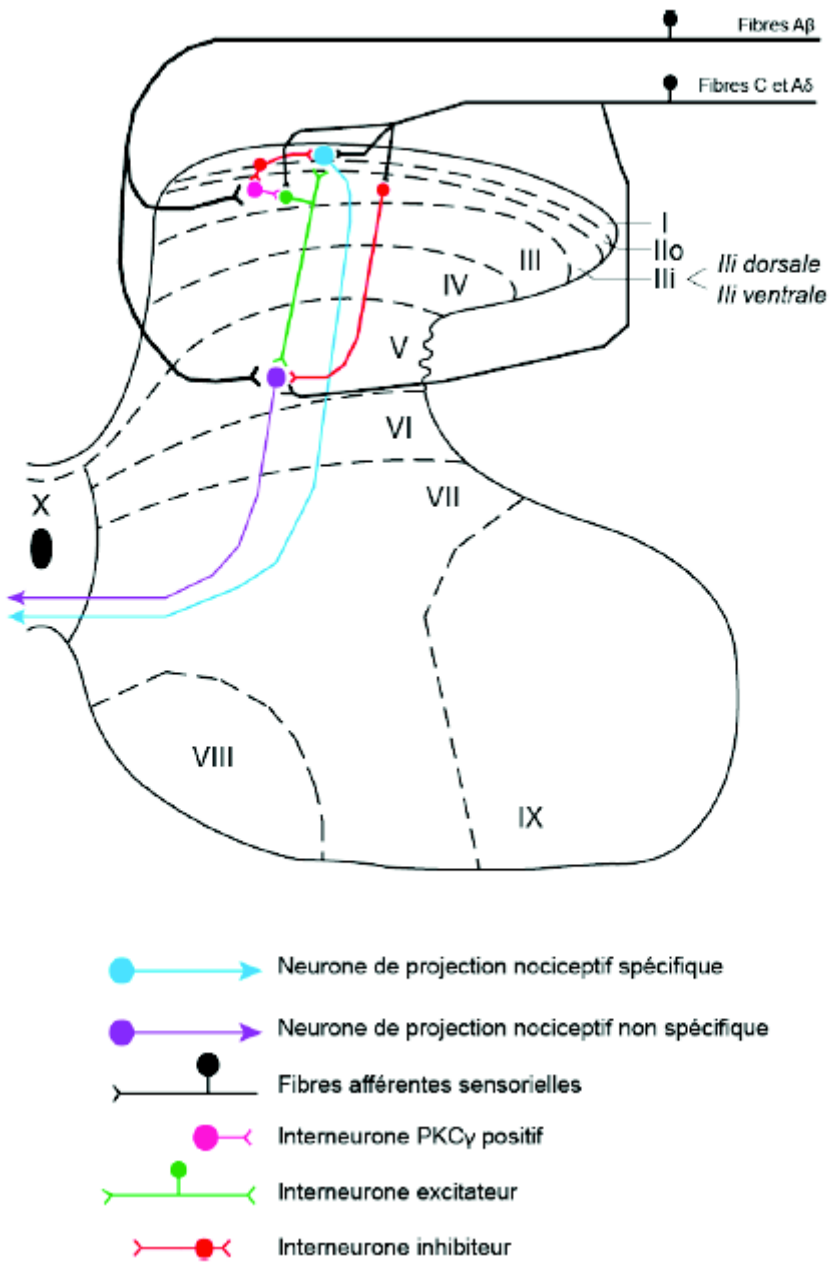


Figure 8 : Représentation schématique des principaux éléments constituant le réseau neuronal nociceptif dans la corne dorsale de la moelle épinière. Il existe deux principaux types de neurones de projection dans la corne dorsale de la moelle épinière : les neurones nociceptifs spécifiques (NS) dans les couches superficielles (en bleu) et les non spécifiques (WDR) dans les couches plus profondes (en violet). Ces neurones de projection sont contactés par les fibres afférentes nociceptives Aδ et C et non nociceptives Aδ ainsi que par des interneurones inhibiteurs (en rouge) et/ou excitateurs (en vert ou rose pour les interneurones PKCγ) (D'après (Berger et al. 2011)

1.4 Rôle des structures supramédullaires

1.4.1 Les voies ascendantes nociceptives

Après intégration dans la corne dorsale de la moelle épinière, l'information nociceptive est transmise aux centres supra spinaux (thalamus, hypothalamus, mésencéphale, tronc cérébral) via les neurones de projection. Les axones de ces neurones organisés en faisceaux, sont à l'origine de multiples voies de projection ascendantes nociceptives : les voies spino-thalamique (de loin la plus importante), spino- mésencéphalique, spino-parabrachiale, spino-hypothalamique, spino-réticulaire, spino- cervicale mais aussi la voie des colonnes dorsales. Ces différentes voies sont indiquées dans le **Tableau 1** ci-dessous. Après le thalamus, l'information nociceptive est finalement transmise via un ultime contact synaptique aux structures corticales : le cortex sensoriel primaire et secondaire (S1, S2), cingulaire antérieur, insulaire et préfrontal (**Figure 9**).

Les nombreuses régions cérébrales impliquées dans le traitement de l'information nociceptive, ainsi que la grande diversité des voies ascendantes mises en jeu, traduisent la complexité de ce phénomène qu'est la douleur. L'expérience de la douleur est par conséquent associée à l'activation de différentes structures cérébrales constituant une "matrice" sous-tendant les réponses sensori-discriminatives, émotionnelles, motrices somatiques et autonomes (dont cardiovasculaires et viscérales), et cognitives de la douleur (Basbaum et al. 2009)

Tableau 1 : Principales voies ascendantes (M J Millan 1999)

Faisceaux	Origine tissulaire	Origine médullaire	Type cellulaire	Axones	Voies ascendantes	Principales cibles sous-corticales	Possibles rôles
Spino-thalamique	Peau Viscères Articulations/muscles	I II (peu) IV V/VI VII/VIII LSN	**NS** **WDR** Non-N (peu)	Non myélinisés Myélinisés (petit et gros diamètres)	**VLF** DLF (couche I, LSN) Principalement controlatéral	Thalamus : VLF → VPL/VPM DLF → VMPo/VPI/MDvc PAG → structures réticulaires	Sensori-discriminatif (VLF) Motivationnel-affectif (DLF)
Spino-réticulaire	Peau Viscères Muscles	I V/VI VII/VIII X (peu)	**NS** WDR Non-N (peu)	Myélinisés (petit et gros diamètres)	**VLF** Principalement controlatéral mais ipsilatéral (I-V)	RF → LRN (NPGC/NGC), thalamus médian et DRN (peu)	Motivationnel-affectif ? Inhibition descendante
Spino-mésencéphalique	Peau Viscères Articulations/muscles	I-II IV/V VII X LSN	NS (I) WDR Non-N	Non myélinisés Myélinisés (petit et gros diamètres)	**VLF** DLF (couche I, LSN) Principalement controlatéral	Mésencéphale et PAG SCL, NCF et PBN Thalamus (peu)	Motivationnel-affectif Fonctions motrices et autonomes
Spinoparabrachio-amygdaloïde	Peau Viscères Articulations/muscles	I II (peu)	NS	Non myélinisés Myélinisés (petit diamètre)	DLF-LF Principalement controlatéral	PBN → amygdale et strie terminale	Motivationnel-affectif Fonctions autonomes
Spinoparabrachio-hypothalamique	Peau Viscères Articulations/muscles	I II (peu)	NS	Non myélinisés Myélinisés (petit diamètre)	DLF-LF Principalement controlatéral	PBN → hypothalamus (VMH)	Motivationnel-affectif Fonctions endocrines
Spino-hypothalamique	Peau Viscères	I V X LSN	NS WDR Non-N (peu)	Non myélinisés Myélinisés (petit diamètre)	VLF Principalement controlatéral	Hypothalamus et thalamus Amygdale, striatum	Sommeil Fonctions autonomes et endocrines Thermorégulation
Spino-cervical	Peau Articulations/muscles	I (peu) **III/IV** V	WDR **Non-N**	Myélinisés (petit et gros diamètres)	DLF Ipsilatéral, puis controlatéral à partir du LCN	Relais LCN (niveau C1-C3) → Thalamus controlatéral (VPL/VMPo) et mésencéphale (PAG et SCL)	Sensori-discriminatif Motivationnel-affectif Fonctions autonomes ?
Colonnes dorsales	Peau Viscères Articulations/muscles	**III-V** VI VII	NS WDR Non-N	Myélinisés (petit et moyen diamètres)	DF et DLF Ipsilatéral, puis controlatéral à partir des DCN	Relais DCN → Thalamus controlatéral (VPL/VMPo) SCL et moelle épinière (peu)	Sensori-discriminatif (VPL) Motivationnel-affectif (VMPo)

Principales caractéristiques des voies ascendantes. Abréviations : ME, Moelle épinière ; NS, Nociceptif spécifique ; Non-N, Non nociceptif ; WDR, (Wide dynamic range) nociceptif non spécifique ; DCN, Noyaux des colonnes dorsales ; DF, Cordon dorsal ; DLF, Cordon dorsolatéral ; DRN, Noyaux dorsaux du raphe ; LCN, Noyau cervical latéral ; LF, Cordon latéral ; LRN, Noyau réticulaire latéral ; LSN, Noyau spinal latéral ; ML, Lémnisque médian ; NCF, Noyau cuneiforme ; MDvc, Thalamus dorso-médian, partie ventrale ; NPGC/NGC, Noyau (paro) gigantocellulaire ; PAG, Substance grise périaqueducale ; PBN, Noyau parabrachial ; RF, Formation réticulée ; SCL, Colliculus superieur ; VLF, Cordon ventrolatéral ; VMPo, Thalamus ventromédian postérieur ; VPL/VPM, Thalamus ventropostérolateral/ventropostéromédian ; VPI, Thalamus ventropostérioinférieur et VMH, Hypothalamus ventromédian *(Modifié d'après Millan, 1999).*

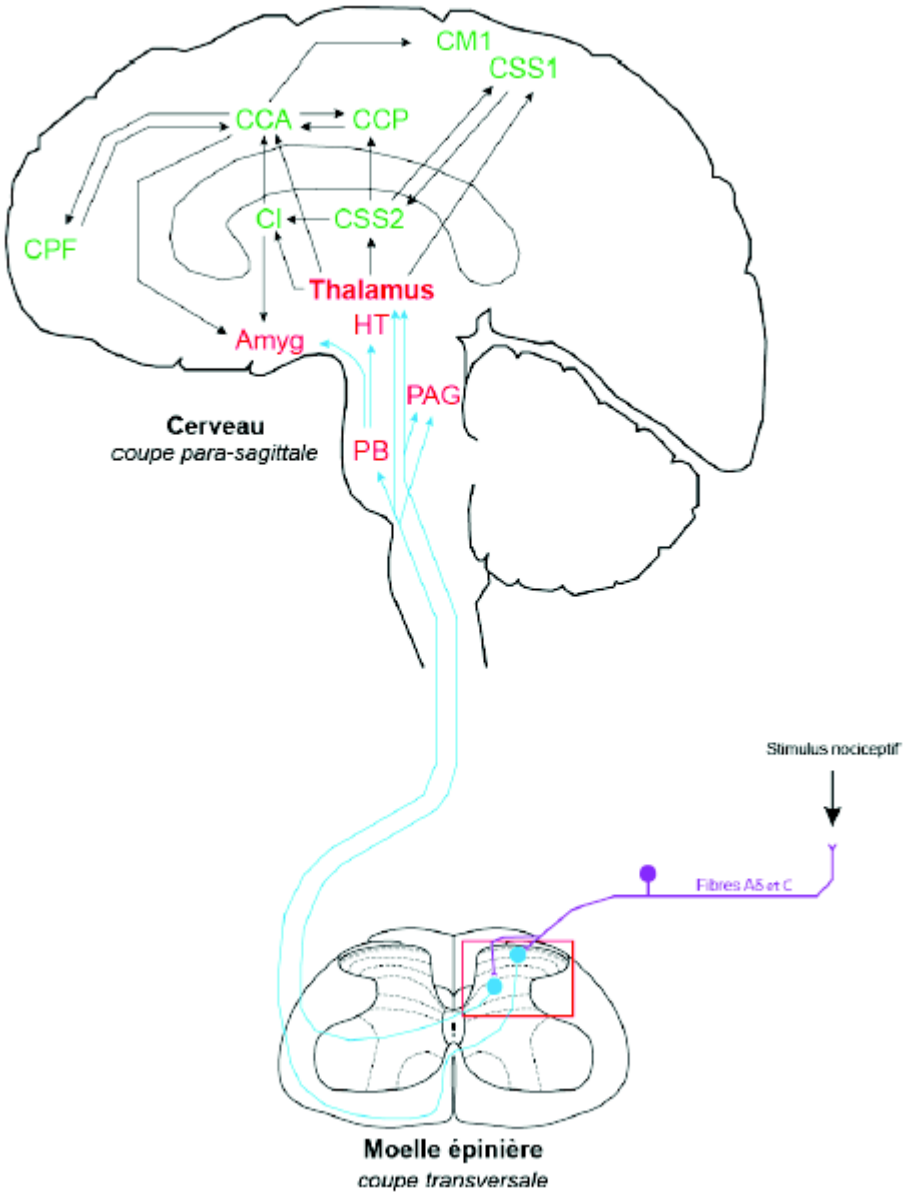


Figure 9 : Représentation schématique des principales voies ascendantes nociceptives et des régions cérébrales impliquées dans le traitement de la douleur. Le stimulus douloureux est détecté en périphérie par les terminaisons des nocicepteurs (Aδ et/ou C), puis transmis jusque dans la corne dorsale de la moelle épinière. A ce niveau, des neurones de projection nociceptifs spécifiques (NS) et non spécifiques (WDR) intègrent l'information douloureuse avant de la transmettre, via différentes voies ascendantes (en bleu), à plusieurs structures cérébrales (en rouge) : le thalamus, mais aussi la substance grise périaqueducale (PAG), l'aire parabrachiale (PB), l'hypothalamus (HT) et l'amygdale (Amyg). Un dernier contact synaptique se fait au niveau du thalamus principalement avec un neurone dit de troisième ordre qui projette à son tour sur différentes régions corticales (en vert) : le cortex insulaire (CI), le cortex somato-sensoriel primaire et secondaire (CSS1 et CSS2), le cortex cingulaire antérieur et postérieur (CCA et CCP), le cortex moteur primaire (CM1), le cortex préfrontal (CPF) (Modifiée d'après (Schweinhardt and Bushnell 2010).

1.4.2 Les voies descendantes nociceptives

Les voies nociceptives descendantes, issues du tronc cérébral et d'autres centres supra spinaux, jouent un rôle important dans la modulation et l'intégration de l'information nociceptive au niveau de la corne dorsale de la moelle épinière. Ces voies peuvent exercer une action inhibitrice ou excitatrice sur les neurones nociceptifs de la corne dorsale et ainsi réduire ou potentialiser le message douloureux. Les voies descendantes inhibitrices, principalement sérotoninergiques, noradrénergiques, opioidergiques et GABAergiques (M J Millan et al. 1997) peuvent non seulement agir sur les terminaisons des fibres afférentes nociceptives en réduisant la libération des neurotransmetteurs pronociceptifs (M J Millan et al. 1997), mais aussi sur les neurones de projection eux-mêmes en inhibant leur activité directement ou indirectement via la modulation du réseau d'interneurones excitateurs et inhibiteurs de la corne dorsale (Yang et al. 1998). Cependant, les voies descendantes nociceptives n'exercent pas uniquement une action inhibitrice sur la corne dorsale de la moelle épinière. En effet, un même neurotransmetteur de ces voies descendantes, pourra exercer de multiples actions post-synaptiques selon les neurones médullaires contactés (par exemple, interneurones inhibiteurs vs neurones de projection) et le type de récepteur activé (par exemple, récepteurs sérotoninergiques inhibiteur vs excitateur). Ces voies descendantes inhibitrices et facilitatrices peuvent avoir pour origine la même structure cérébrale, conférant à une même structure la capacité d'un contrôle positif et/ou négatif sur les neurones nociceptifs de la corne dorsale (Sandkühler 1996). Comme pour les voies descendantes inhibitrices, il a été montré que les voies descendantes excitatrices peuvent non seulement agir sur les terminaisons des fibres afférentes nociceptives, mais aussi sur les neurones intrinsèques (neurones de projection et interneurones inhibiteurs et excitateurs) de la corne dorsale de la moelle épinière (M J Millan et al. 1997).

Par conséquent, en modulant l'activité des neurones nociceptifs de la corne dorsale de la moelle épinière (via de multiples mécanismes), les centres supérieurs via les voies descendantes inhibitrices et excitatrices participent eux aussi à l'intégration de l'information nociceptive.

1.5 L'amygdale au sein de la matrice douloureuse

L'amygdale est une structure importante dans l'intégration et la mise en forme de l'expression doulouresue, en particulier pour la réponse émotionnelle (Kalivas et al. 1982) Mon travail a porté principalement sur les symptômes de l'anxiété réactive à la douleur

neuropathique et sur les signes de dépression associés. Pour cette raison, son rôle est détaillé dans les paragraphes qui suivent.

1.5.1 Amygdale & douleur

Un nombre croissant d'études a commencé à s'intéresser au rôle de l'amygdale dans la douleur au cours de ces trente dernières années. En effet, la douleur possède également une composante émotionnelle forte, désagréable, qui conditionne un comportement aversif. L'amygdale intègre de nombreuses informations sensorielles, dont certaines sont nociceptives, et polymodales. Il est admis que l'amygdale attribue à ces informations une valeur émotionnelle, que l'on appelle « valence », et qui peut être positive ou négative. Par exemple, lors d'un protocole de peur conditionnée, l'association entre le son et le choc électrique va recevoir une valence négative, qui sera stockée dans les structures cérébrales de la mémoire émotionnelle. Ainsi, lors d'une présentation ultérieure du stimulus sonore, le comportement de l'individu sera associé à de la peur et à une stimulation exacerbée de tous ses paramètres autonomes. Par ailleurs, si l'on prend l'exemple d'un animal dans la nature qui se retrouve face à un prédateur, sa réponse comportementale adaptée inclura des phénomènes d'inhibition de la douleur (hypoalgésie) afin de faciliter une réaction rapide de fuite ou d'attaque (J. E. LeDoux 2000). On voit donc que l'amygdale, qui fait partie des structures activées dans la "matrice" douloureuse, joue un rôle clé dans l'expression comportementale de la sensation douloureuse. Au delà de la douleur aigue (clinique ou non), il existe une relation forte et réciproque entre douleur chronique et état émotionnel. En effet, une douleur chronique peut conduire certains patients à des états anxieux et dépressifs. Inversement, un état anxieux (ou dépressif) chronique augmente le risque de développer une pathologie douloureuse chronique et peut induire des phénomènes d'hypersensibilité sensorielle. Ces aspects ont pu être montrés en clinique chez l'homme (Gallagher, Moore, and Chernoff 1995) ainsi que dans des modèles animaux (Gonçalves et al. 2008; Yalcin et al. 2011). De manière générale, on peut dire que si le stress et la peur peuvent inhiber la douleur, l'anxiété et les états dépressifs vont avoir tendance à augmenter l'intensité d'une douleur ressentie. Dans l'une ou l'autre de ces situations, l'amygdale peut participer aux mécanismes d'hyper- ou d'hypoalgésie, mais également aux troubles émotionnels associés à la douleur.

Le noyau central de l'amygdale (CeA, appelé aussi "amygdale nociceptive") est une structure cible de la voie nociceptive spino-parabrachio-amygdaloïde, mais ses efférences envoie également des informations importantes vers les structures du tronc cérébral pour la modulation douloureuse "descendante". Ainsi, l'analgésie associée lors d'un protocole de

peur conditionnée est très atténuée chez des animaux dont le CeA a été lésé (Fox and Sorenson 1994).

Le rôle clé de l'amygdale centrale dans la nociception est également attesté par l'administration de substances pharmacologiques qui modulent l'activité des réseaux neuronaux. L'injection de neurotensine, un peptide neuromodulateur, dans le CeA produit un effet antinociceptif (Kalivas et al. 1982). De la même manière, une injection de bicuculline, un antagoniste spécifique des récepteurs GABAA, provoque un effet antinociceptif, tandis que l'injection de muscimol, un agoniste GABAA, induit une augmentation des symptômes douloureux (Hasanein, Mirazi, and Javanmardi 2008). A l'échelle cellulaire et moléculaire, les mécanismes de plasticité synaptique sont également en jeu au niveau des afférences apportant les informations nociceptives. En 2004, Neugebauer et ses collaborateurs ont montré que dans un modèle de douleur aiguë chez le rat, la transmission synaptique excitatrice (NMDA dépendante) des afférences nociceptives au CeA était augmentée à partir de 6 à 8 heures après l'induction de la douleur (W. Li and Neugebauer 2004). Quelques années plus tard, Ikeda et ses collègues ont réalisé le même type d'étude mais avec un modèle de douleur neuropathique (Ikeda et al. 2007). Ils ont ainsi pu montrer qu'une douleur neuropathique induit une PLT (Potentialisation à long terme) de la transmission synaptique excitatrice enregistrée dans les neurones du CeA. La PLT est bilatérale (observée dans les noyaux du CeA gauche et droit) pour les afférences synaptiques issues du noyau basolatérale de l'amygdale (BLA) mais uniquement controlatérale à la lésion pour celles provenant du noyau parabrachial. A la différence du modèle aigu de douleur, la PLT est ici indépendante des récepteurs NMDA du glutamate. Ces quelques études montrent bien la place importante qu'occupe le CeA dans l'un des circuits d'intégration et de modulation de la douleur.

Néanmoins, comme l'ont montré les études portant sur le processus d'intégration et de "mémorisation" dans les protocoles de peur conditionnée, le BLA est également un complexe important au sein de l'amygdale lors du traitement de l'information nociceptive. Le BLA reçoit des informations nociceptives (Lanuza, Moncho-Bogani, and Ledoux 2008), . Une étude a également montré que l'infusion d'opioïdes dans le BLA induit une action anti-nociceptive puissante (Helmstetter et al. 1998). Le BLA, bien qu'il ne soit pas directement inclus dans la voie spino-parabrachio-amygdaloïde, peut donc néanmoins l'influencer, via ses projections sur le CeA.

1.5.2 Rappel anatomique

L'amygdale est l'une des principales structures du système limbique. Elle correspond à un ensemble de noyaux qui, chez la plupart des mammifères, est situé à la face médiane

du lobe temporal, dans la partie antérieure de l'extrémité temporale de la corne des ventricules latéraux (Veinante, Yalcin, and Barrot 2013). Différentes descriptions anatomiques de cette structure relativement hétérogène, utilisant des nomenclatures différentes, ont été réalisées (Pitkänen 2000).

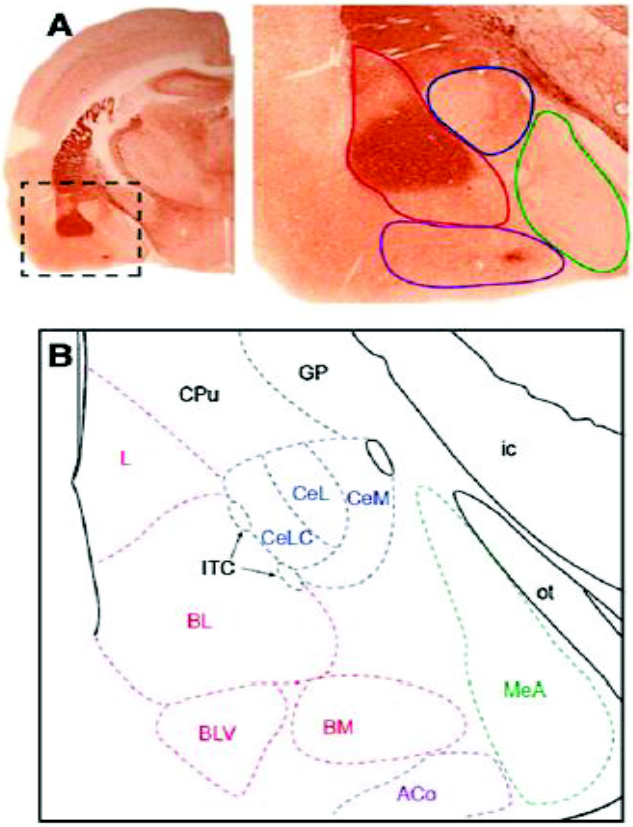


Figure 10 : Organisation anatomique de l'amygdale. A: section frontale d'un cerveau de rat au niveau de l'amygdale traitée pour la coloration de l'acétylcholinestérase. La zone encadrée indique la position de la région agrandie droite. Les quatre groupes principaux sont décrits: Superficielle (violet), basolatérale (rouge), centrale (bleu), médiale (vert). B: Représentation schématique des principaux noyaux de l'amygdale. Le groupe basolatérale (rouge) comprend l'latéral (L), basolatérale (BL), ventro-basolatérale (BLV) et (BM) noyaux basomedial. Le groupe central est représenté par le noyau central avec ses subdivisions. (CELC), latéral (CDDE) et médial (CEM). La médiane (vert) et des groupes superficiels (violets) sont représentés à ce niveau par le groupe médian (MEA) et cortical antérieur (ACO). Les masses de cellules intercalées (ITC, noir) semblent coincées entre BL et le CEA. Autres abréviations: CPU: caudé-putamen; ic: capsule interne; GP: pallidus globus; OT: tractus optique (Veinante, Yalcin, and Barrot 2013).

Le groupe basolatéral

Le groupe basolatéral est composé du noyau latéral, du noyau basal (parfois appelé basolatéral), et du noyau basal accessoire (également appelé basomédian). Dans la littérature, il est courant de retrouver ce groupe de trois noyaux sous la dénomination de « complexe basolatéral » (BLA). Le noyau latéral est localisé dorsalement dans l'amygdale et situé juste au-dessus du noyau basal. Chez la souris, la capsule externe se divise en deux ramifications qui vont entourer les noyaux latéral et basal (Paxinos and

Watson 2001). A titre de comparaison, chez le rat, ces deux noyaux sont bordés latéralement par la capsule externe et médialement par le noyau central. Le noyau basal accessoire, est quant à lui situé ventralement par rapport au noyau basal. Le noyau latéral présente trois subdivisions : dorsolatérale, ventrolatérale et médiane. Le noyau basal a, quant à lui, deux subdivisions : une partie antérieure magnocellulaire et une partie postérieure parvocellulaire.

Le groupe des noyaux corticaux

Le second groupe est celui des noyaux corticaux. Ce groupe est ainsi nommé car les noyaux qui le composent possèdent de nombreuses caractéristiques corticales ainsi qu'une structure organisée en couches, comme c'est le cas dans le cortex (Alheid, De Olmos, and Beltramino 1995). Ce groupe est constitué du noyau du tractus olfactif latéral, du noyau du lit du tractus olfactif latéral et des noyaux corticaux antérieur et postérieur. L'ensemble de ces noyaux est situé très ventralement, à la surface du cerveau.

Le groupe centromédian

Le groupe centromédian est composé du noyau central et du noyau médian. Chez la souris, ces noyaux sont localisés médialement par rapport au groupe basolatéral. Le noyau central (CeA) est le noyau principal de ce groupe, et se subdivise en trois parties définies par leur cytoarchitecture, leur neurochimie et leurs connections : la partie capsulaire, la partie latérale et la partie médiane. Le noyau central est généralement défini comme étant le noyau de sortie de l'amygdale (Pitkänen 2000).

Les autres noyaux de l'amygdale

Il subsiste un dernier groupe de noyaux, qui ont été définis comme faisant partie de l'amygdale (Pitkänen, Savander, and LeDoux 1997), mais qui ne s'intègre pas dans les groupes cités précédemment en raison de leurs caractéristiques anatomo-fonctionnelles. Ce groupe est constitué de l'aire de l'amygdale antérieure, de l'aire amygdalo-hippocampique et des noyaux (ou « masses ») intercalés. L'aire de l'amygdale antérieure est la plus rostrale des parties de l'amygdale, tandis que l'aire amygdalo-hippocampique est la plus caudale. Les noyaux intercalés sont, quant à eux, de petits groupes de neurones situés entre les fibres délimitant les différents noyaux de l'amygdale.

1.5.3 Afférences de l'amygdale

Les afférences de l'amygdale peuvent être séparées en fonction du type d'information qu'elles acheminent. Les afférences provenant des régions corticales et thalamiques, qui sont les plus nombreuses, transportent des informations venant principalement d'aires sensorielles, ou en rapport avec les circuits de la mémoire. Ces afférences sont glutamatergiques, majoritairement ipsilatérales et entrent dans l'amygdale via la capsule externe (Mascagni, McDonald, and Coleman 1993). Les informations acheminées peuvent être des modalités sensorielles primaires (olfactive, somatosensorielle, gustative et viscérale, auditive ou encore visuelle), ou bien des informations de type polymodal. Celles-ci sont composées de plusieurs modalités sensorielles qui ont été associées et intégrées préalablement dans une ou plusieurs aires corticales avant d'être transmises (McDonald 1998). Il existe également d'autres entrées provenant des zones hypothalamiques ou du tronc cérébral, qui apportent quant à elles des informations en rapport avec le comportement ou les systèmes autonomes.

<u>Afférences du complexe basolatéral de l'amygdale</u>

Les noyaux du complexe basolatéral de l'amygdale (BLA), qui est considéré comme l'entrée principale de l'amygdale (Pitkänen 2000), reçoivent de nombreuses informations sensorielles primaires. Les informations olfactives proviennent des bulbes olfactifs principal et accessoire, du cortex piriforme et du noyau olfactif antérieur, et projettent vers tous les noyaux du BLA, ainsi que certains noyaux corticaux (Luskin and Price 1983; Scalia and Winans 1975). Les informations gustatives et viscérales provenant des aires primaires du cortex insulaire projettent de façon importante dans le noyau latéral et le noyau basal (Shi and Cassell, 1998). Des entrées se font également à partir du noyau ventro-postéro-médian du thalamus et connectent le noyau latéral et basal (Nakashima et al. 2000). Les informations auditives et visuelles proviennent en revanche plutôt d'aires associatives et pas ou peu des aires primaires. Les informations auditives proviennent des aires auditives secondaires et du noyau géniculé médian du thalamus, et connectent le noyau latéral de l'amygdale (J. E. LeDoux, Farb, and Romanski 1991; J. E. LeDoux, Farb, and Ruggiero 1990). De la même manière, les informations visuelles proviennent du thalamus et des aires visuelles secondaires et connectent également le noyau latéral de l'amygdale (C. Shi and Davis 2001). Enfin pour les informations somatosensorielles et notamment nociceptives, la plupart des afférences proviennent des aires somatosensorielles primaires et vont contacter le noyau latéral et le noyau basal de l'amygdale (C. J. Shi and Cassell 1998). Des informations somatosensorielles arrivent également à l'amygdale via des projections du noyau parabrachial, et des noyaux géniculés médian et intralaminaire

postérieur du thalamus, qui sont impliqués dans les circuits véhiculant la transmission de l'information nociceptive (Bernard, Peschanski, and Besson 1989; Bordi and LeDoux 1994). Ces noyaux connectent l'amygdale via le noyau latéral et le noyau basomédian de l'amygdale (Bernard, Alden, and Besson 1993). Les noyaux du BLA reçoivent également un certain nombre de données polymodales. La majeure partie d'entres elles proviennent du cortex préfrontal qui va connecter essentiellement le noyau basal de l'amygdale, mais également et dans une moindre mesure les noyaux latéral et basomédian (Mcdonald, Mascagni, and Guo 1996). La seconde partie des informations polymodales provient des structures impliquées dans la mémoire déclarative à long terme : le cortex périrhinal, le cortex entorhinal, le cortex parahippocampique et l'hippocampe (Milner, Squire, and Kandel 1998). Les connections entre le BLA et ces structures sont massives et réciproques (McDonald 1998). Enfin le BLA, reçoit également des informations provenant de l'hypothalamus (Pitkänen 2000).

Afférences du noyau central de l'amygdale

Le noyau central de l'amygdale (CeA) reçoit également des informations sensorielles primaires, mais elles sont restreintes à certaines modalités. Ainsi le CeA ne reçoit pas ou peu d'informations olfactives et auditives (J. E. LeDoux, Farb, and Romanski 1991; J. E. LeDoux, Farb, and Ruggiero 1990; Luskin and Price 1983; Scalia and Winans 1975). Les informations gustatives et viscérales provenant des aires primaires du cortex insulaire, du noyau ventro-postéro-médian du thalamus et du noyau parabrachial projettent dans la partie latérale du noyau central (Bernard, Alden, and Besson 1993). Les informations visuelles proviennent du thalamus et des aires visuelles secondaires et connectent la partie latérale du noyau central de l'amygdale (C. Shi and Davis 2001). Pour les informations somatosensorielles, la plupart des afférences provient des aires somatosensorielles primaires et connecte le noyau central (C. J. Shi and Cassell 1998). Les informations somatosensorielles impliquées dans la transmission de l'information nociceptive, qui proviennent du noyau parabrachial, et des noyaux géniculé médian et intralaminaire postérieur du thalamus, projettent dans la partie médiane du noyau central (Bernard, Alden, and Besson 1993). Le noyau central reçoit, tout comme le BLA, des informations polymodales de la part du cortex préfrontal (Mcdonald, Mascagni, and Guo 1996), du cortex entorhinal (McDonald and Mascagni 1997), de l'hippocampe (Canteras and Swanson 1992), et de l'hypothalamus (Pitkänen 2000). En revanche, à la différence du BLA, le CeA reçoit des entrées provenant de nombreuses structures du tronc cérébral : noyau parabrachial, substance grise périaqueducale (PAG), BNST, substance innominée, formation réticulée ponto-mésencéphalique, aire tegmentale ventrale, substance noire,

locus coeruleus, raphé (Alheid, De Olmos, and Beltramino 1995; Cassell, Freedman, and Shi 1999). Certaines structures, notamment la PAG et le noyau parabrachial, sont fortement impliquées dans les voies de la nociception (Gauriau and Bernard 2002). La connexion avec le noyau parabrachial inclus le CeA dans la voie spino-parabrachio-amygdaloïde, qui est une voie spécifique de la douleur (Bernard, Alden, and Besson 1993).

1.5.4 Efférences de l'amygdale

Efférences du complexe basolatéral de l'amygdale

Le BLA est considéré comme l'entrée principale de l'amygdale, il possède également des efférences notables. Tout d'abord, il existe des connections réciproques importantes vers les centres de la mémoire desquels il reçoit des informations polymodales, comme celles issues du cortex périrhinal (McDonald 1998) ou encore de l'hippocampe (Petrovich, Canteras, and Swanson 2001). Il a également été montré que le BLA projette de façon importante vers le noyau accumbens (McDonald 1991). Le noyau latéral et le noyau basal projettent tous deux vers le cortex préfrontal ainsi que le thalamus (McDonald 1998). Enfin, le BLA projette de manière importante mais non réciproque vers le CeA (Savander et al. 1995).

Efférences du noyau central de l'amygdale

Le noyau central, noyau de sortie principal de l'amygdale, présente de nombreuses efférences qui vont avoir une implication dans certains types de comportements ; la peur par exemple, notamment la peur conditionnée, ou bien la fuite face à une situation dangereuse. Le noyau central peut également contrôler les réponses autonomes associées ou non à ce comportement, comme par exemple la libération d'hormones de stress (i.e. corticotrophine, corticostérone), ou l'augmentation de la pression artérielle et du rythme cardiaque (Davis, Rainnie, and Cassell 1994; J. LeDoux 2003). Ainsi, la projection la plus massive du CeA s'effectue vers 3 structures importantes du tronc cérébral. Tout d'abord la PAG, qui est impliquée dans la vocalisation, la fuite, l'analgésie ou encore la modulation cardiovasculaire (Rizvi et al., 1991; Behbehani, 1995). La seconde structure du tronc cérébral contactée par le CeA est le noyau du tractus solitaire, qui module le système vagal (van der Kooy et al. 1984). Enfin, le noyau parabrachial, duquel le CeA reçoit des informations nociceptives, est également modulé par ce dernier (Moga et al. 1990). Le CeA, qui reçoit des informations ascendantes nociceptives via la voie spino-parabrachio-amygdaloïde (Gauriau and Bernard 2002), peut également jouer un rôle sur les contrôles descendants nociceptifs (Mark J Millan 2002). Le noyau central projette également vers les noyaux de l'aire latérale de l'hypothalamus (J. E. LeDoux et al. 1988), ainsi que vers le

BNST (H. W. Dong, Petrovich, and Swanson 2001), qui innerve lui aussi les noyaux hypothalamiques. Enfin, le CeA projette vers la plupart des noyaux monoaminergiques : le Locus Coeruleus qui est noradrénergique, les noyaux dopaminergiques comme la substance noire et l'aire tegmentale ventrale, ainsi que le Raphé qui est sérotoninergique (Alheid, De Olmos, and Beltramino 1995).

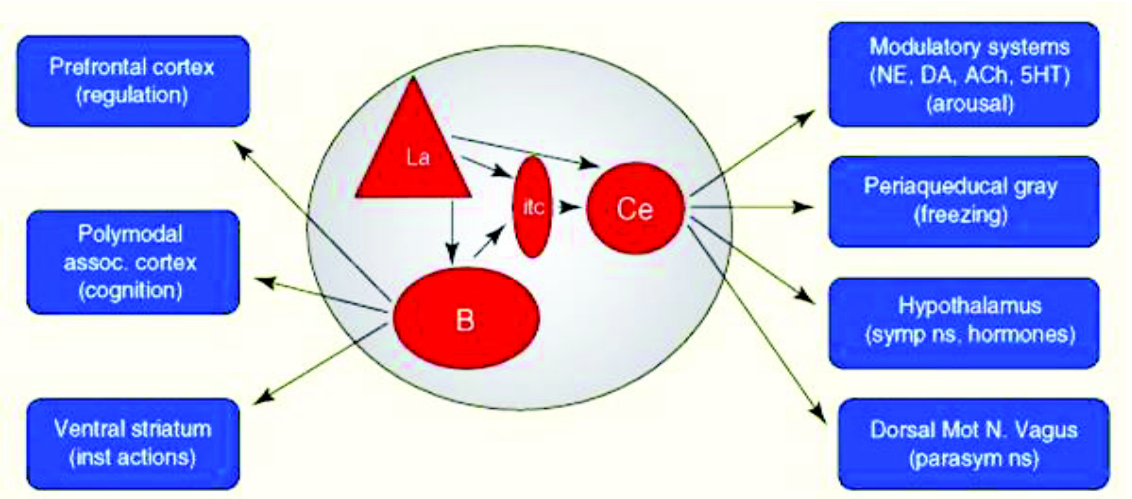


Figure 11 : Representation schematique de diferrentes afférences et efférences de l'amygdale et d'autres structures.

1.5.5 Connections intra-amygdaliennes

Plusieurs études ont montré que les noyaux de l'amygdale présentent de nombreuses interconnections entre eux (McDonald 1998; Pitkänen, Savander, and LeDoux 1997; Sah et al. 2003). Cette organisation permettrait ainsi une entrée des informations sensorielles dans l'amygdale via le BLA, qui sont traitées localement, puis vont suivre une progression latéro-médiane vers le CeA, qui va alors agir comme le noyau de sortie de l'amygdale (Pitkänen, Savander, and LeDoux 1997). Cependant, les mécanismes synaptiques des différents circuits intra-amygdaliens sont encore assez mal connus. Les connexions présentées dans cette partie seront réduites au complexe basolatéral et au noyau central de l'amygdale, puisque ce sont les mieux décrits actuellement, tant sur leurs implications que sur leur physiologie.

Le noyau latéral présente des connexions entre ses différentes subdivisions, afin de traiter localement les informations sensorielles et polymodales qu'il reçoit (Pitkänen et al. 1995). Il projette également de façon importante au noyau basal et au noyau basomédian ainsi qu'à la partie capsulaire du CeA (Pitkänen et al. 1995). Ces connexions sont réciproques, à l'exception de celle avec le noyau central (Savander et al. 1997). Le noyau basal, quant à lui, reçoit de nombreuses informations polymodales et sensorielles. Il présente également des connexions entre ses différentes subdivisions mais la plus

importante projection du noyau basal est vers la partie médiane du CeA (Savander et al. 1995). Etant donné que les efférences du CeA vers les centres contrôlant les réponses autonomes émergent de la partie médiane, les projections du noyau basal peuvent donc avoir un rôle important dans la modulation de la sortie d'informations de l'amygdale.

Le noyau central, qui représente donc la sortie majeure de l'amygdale, reçoit beaucoup de contacts des autres noyaux amygdaliens mais n'en fait pas en retour. En revanche, le CeA présente lui aussi de nombreuses connexions entre ses différentes subdivisions (Jolkkonen and Pitkänen 1998).

Pour résumer, les différents noyaux de l'amygdale présentent de nombreuses connexions entre eux, ce qui indique un traitement local de l'information assez important, avant qu'elle ne sorte de la structure pour conduire éventuellement à des modifications du comportement ou des paramètres autonomes. Le BLA, qui peut être considéré comme l'étage d'entrée et d'intégration des informations sensori-discriminatives, va transmettre l'information traitée au CeA. Après intégration de cette information au sein du noyau, le CeA va alors agir en tant qu'étage de sortie de l'amygdale. Le BLA pourrait donc être considéré comme un modulateur du fonctionnement du CeA. La compréhension des mécanismes en jeu dans ces traitements locaux d'informations est un élément clé afin de comprendre comment l'amygdale module les paramètres comportementaux, physiologiques et autonomes.

1.5.6 Amygdale basolatérale : aspects neurochimiques.

Le noyau basal peut être subdivisé en une division basomédiale, basolatérale, et basoventrale. Comme indiqué plus haut, le noyau latéral est la principale porte d'entrée des informations sensorielles de l'amygdale. Il possède des connexions réciproques denses avec les régions corticales sensorielles. Le noyau central est la principale porte de sortie de l'amygdale pour l'expression physiologique des émotions. Le noyau basal qui reçoit de multiples connexions à partir du noyau latéral agit donc comme un relais « modulateur » sur le CeA. Le noyau basal forme une boucle de connectivité avec le cortex préfrontal médian (CPFm). Cette connexion réciproque est considérée comme importante dans la douleur. Dans le complexe basolatéral de l'amygdale, les neurones de projections du BLA sont glutamatergiques et forment les cellules de sortie de ce complexe. En effet, ils présentent une forte immunoréactivité pour le glutamate et l'aspartate, mais pas pour l'acide glutamique décarboxylase (GAD), l'enzyme de synthèse du GABA (Swanson and Petrovitch, 1998). Les interneurones locaux du BLA sont quant à eux GABAergiques. En effet, ils expriment fortement la GAD (Nitecka and Ben-Ari 1987)(Fig. 9). Les neurones de projection du BLA reçoivent des afférences corticales et thalamiques via des synapses

asymétriques (Pitkänen et al. 1995), ce qui confirme la nature glutamatergique de ces entrées synaptiques. La présence de récepteurs AMPA et NMDA du glutamate à ces synapses excitatrices a pu être démontrée grâce à des études électrophysiologiques (Davis, Rainnie, and Cassell 1994; Mahanty and Sah 1999). Les récepteurs AMPA impliqués ont les mêmes propriétés quelle que soit la nature de l'afférence (corticale ou thalamique). En revanche, les récepteurs NMDA présents aux synapses provenant d'afférences thalamiques ne semblent pas avoir la même nature que ceux exprimés par les synapses provenant d'afférences corticales (Weisskopf, Bauer, and LeDoux 1999). A la plupart des synapses, les récepteurs NMDA ne sont pas actifs au potentiel de repos membranaire des neurones (généralement vers -60 mV), en raison du blocage de leur canal par le magnésium extracellulaire (Nowak et al.). Ce blocage du canal est voltage-dépendant et n'est supprimé que par la dépolarisation du neurone au-delà d'un certain seuil, qui est variable selon le type de sous-unités qui constituent le récepteur. Certaines études ont montré que les récepteurs NMDA présents aux synapses des afférences thalamiques sont moins sensibles au blocage par le magnésium et sont actifs au potentiel de repos membranaire des neurones (Mahanty and Sah 1999; Weisskopf, Bauer, and LeDoux 1999). Par ailleurs, la présence présynaptique et postsynaptique de récepteurs métabotropiques du glutamate a également été montrée sur les neurones de projection du BLA (Rainnie, Fernhout, and Shinnick-Gallagher 1992).

Les neurones du BLA expriment également des récepteurs au GABA. La composante synaptique rapide est médiée par les récepteurs GABAA, tandis que la composante synaptique lente est médiée par les récepteurs GABAB (Rainnie, Asprodini, and Shinnick-Gallagher 1991; Washburn and Moises 1992). Ce fonctionnement des synapses GABAergiques a déjà été observé précédemment dans l'hippocampe (Dutar and Nicoll 1988). Par ailleurs, il a été clairement établi que les interneurones du BLA modulent l'activité des neurones de projections via des circuits locaux utilisant des mécanismes d'inhibition de type « feedback » ou « feedforward » (Dityatev and Bolshakov 2005). Plusieurs groupes de recherche ont étudié le type de sous-unités composant les récepteurs GABAA dans l'amygdale. En effet, ce type de récepteur appartenant à la famille des récepteurs canaux activés par les ligands est constitué de 5 sous-unités qui vont former un canal perméable aux ions chlore et bicarbonate (Olsen and Tobin 1990). 21 sous-unités différentes ont pu être identifiées grâce à l'étude moléculaire du récepteur : 6 sous-unités α, 4 β, 4 γ, 1 δ, 1 ε, 1 π, 1 θ et 3 ρ (Sieghart and Sperk 2002). Le type de sous-unités qui vont former le pentamère du récepteur va déterminer ses propriétés biophysiques et pharmacologiques (Sieghart and Sperk 2002). Dans le système nerveux des mammifères,

le récepteur GABAA est constitué de 2 sous-unités α, 2 sous-unités β et une 1 sous-unité γ, mais cette dernière peut varier en fonction de l'emplacement du récepteur ((H Möhler 2006). ans le BLA, la stœchiométrie majoritaire semble être α1/2-β1-2/3-γ2 (Esmaeili, Lynch, and Sah 2009; Heldt and Ressler 2007). Les récepteurs contenant les sous-unités α1,2,3,5 en combinaison avec n'importe quelle sous-unité β et une sous-unité γ2 sont sensibles à la modulation par les benzodiazépines (Pritchett et al. 1989). Ces molécules, qui font partie des principaux modulateurs allostériques positifs du récepteur GABAA (Haefely 1984), se fixent sur un site de modulation propre situé à l'interface entre la sous-unité α et la sous-unité γ (Sigel and Buhr 1997). L'application de diazépam (DZP), une benzodiazépine couramment utilisée, a été testée dans le BLA. In vitro, le DZP induit une augmentation de l'amplitude et de la cinétique des courants post-synaptiques inhibiteurs des neurones du BLA (Marowsky, Fritschy, and Vogt 2004). Infusé in vivo directement dans le BLA chez des rats, le DZP est anxiolytique et anti-nociceptif (Jiménez-Velázquez, López-Muñoz, and Fernández-Guasti 2010). Les récepteurs GABAA du BLA sont également sensibles à leur antagoniste spécifique (Marowsky, Fritschy, and Vogt 2004), la bicuculline, contrairement à une partie des récepteurs présents dans le CeA qui y sont moins sensibles (Delaney and Sah 1999). En plus des transmissions synaptiques glutamatergique et GABAergique que l'on retrouve dans la plupart des structures corticales, on trouve un certain nombre d'autres neurotransmetteurs et neuromodulateurs dans le BLA. On note par exemple la présence de terminaisons dopaminergiques provenant des structures mésolimbiques, ainsi que de ses récepteurs D1 et D2 (Rosenkranz and Grace 2002) sur les neurones BLA. Les afférences provenant du Raphé libèrent de la sérotonine dans le BLA (Daftary, Calderon, and Rios 2012), et certains neurones expriment les récepteurs sérotoninergiques 5-HT1A, 5-HT2 et 5-HT3 (Stein, Davidowa, and Albrecht 2000). Par ailleurs, des études ont montré la présence des 3 types de récepteurs aux opiacés (mu, kappa et delta) (Le Merrer et al. 2009), de récepteurs CB1 aux cannabinoïdes (Hasanein et al. 2007), le facteur neurotrophique BDNF ainsi que son récepteur TrkB (Conner et al. 1997), ou encore le facteur de libération de la corticotrophine (CRF) et ses récepteurs CRF1 et CRF2 (Giesbrecht et al. 2010). Enfin, on retrouve plusieurs neuropeptides tels que le neuropeptide Y (Giesbrecht et al. 2010), la cholécystokinine (Chung and Moore 2009), le VIP (Roberts et al. 1982), la neurotensine ou encore la substance P (Zhao et al. 2009). L'ensemble de ces neurotransmetteurs et neuromodulateurs a un rôle non négligeable de régulation des transmissions excitatrice et inhibitrice au sein du BLA. L'amygdale étant une structure d'intégration de différents types d'informations, son fonctionnement est dépendant de l'équilibre entre la transmission synaptique excitatrice et la transmission

synaptique inhibitrice. En effet, dans la plupart des structures d'intégration du système nerveux central, la balance entre l'excitation et l'inhibition régit le fonctionnement de la structure (Lu et al. 2010). Ceci a pu être observé dans le cortex somatosensoriel (Zhang and Sun 2011), l'hypothalamus latéral (Stanley et al. 2011), l'hippocampe, le cortex préfrontal (Yizhar et al. 2011), ou encore la moelle épinière (Hathway et al. 2006). Le maintien de cet équilibre est crucial puisque son dysfonctionnement est à la base de certaines pathologies, telle que l'épilepsie (Derchansky et al. 2008), la schizophrénie (Yizhar et al. 2011), l'autisme (Yizhar et al. 2011), ou encore la douleur (FitzGerald 2005; Hathway et al. 2006; Petrou et al. 2012).

2 Partie II : Les douleurs neuropathiques

2.1 Données de clinique humaine

2.1.1 Définitions

Depuis 1994, la douleur neuropathique est définie par l'association internationale pour l'étude de la douleur (International Association for the Study of Pain, IASP) comme une « douleur initiée ou causée par une lésion primitive ou un dysfonctionnement du système nerveux ». Il a été plus récemment proposé de définir la douleur neuropathique comme « une douleur associée à une lésion ou une maladie affectant le système somatosensoriel » (Treede et al. 2008), mais cette définition n'a pas encore reçue un large consensus. Les douleurs neuropathiques sont souvent méconnues, sous estimées et encore mal prises en charge. Cependant, ces douleurs ne sont pas rares, puisque selon une étude épidémiologique récente en population générale, des douleurs chroniques de caractéristiques neuropathiques affectent 7 % de la population française adulte (5 % pour les douleurs neuropathiques modérées à sévères), ce qui représente un quart des patients douloureux chroniques (Bouhassira et al. 2008). À ce jour, suffisamment d'arguments cliniques et scientifiques sont disponibles pour considérer la douleur neuropathique comme une entité spécifique qu'il est possible de diagnostiquer, d'évaluer et de traiter indépendamment de l'étiologie en cause (N Attal et al. 2008). L'objectif de ces recommandations pour la pratique clinique est de synthétiser les données de la littérature relatives au diagnostic, à l'évaluation et aux traitements des douleurs neuropathiques pour faciliter leur reconnaissance et leur prise en charge en médecine ambulatoire.

2.1.2 Étiologies

Les deux tableaux qui suivent, tirés de la revue de Martinez et al. 2010 donnent une image des principales formes de neuropathies périphériques et centrales.

	Douleur post-zostérienne	
Lésion focale (mononeuropathie, plexopathie, radiculopathie)	Lésion nerveuse post-traumatique post-chirurgicale*	**Névrome, lésion partielle/complète d'un tronc**
		Douleur post-amputation (névrome, douleur fantôme)
		Avulsion / Etirement plexique
		Syndrome douloureux régional complexe (type II)
	Radiculopathie	**Sciatique**
		Cruralgie
		Névralgie cervicobrachiale
		Autre
	Compression	**Syndrome du canal carpien, du tunnel tarsien**
		Névrome de Morton
		Syndrome de Parsonage-Turner
	Diabète	**Cruralgie**
		Névralgie intercostale
		Atteinte des nerfs crâniens
	Cancer	**Plexite tumorale ou radique**
		Méningite carcinomateuse
	Vascularite	**Lupus**
		Périartérite noueuse
Polyneuropathie Polyradiculonévrite	Métabolique ou Nutritionnelle	**Diabète**
		Alcool
		Hypothyroïdie
		Carence en vitamine B1 (pellagre, béribéri)
		Carence en vitamine B12
	Infectieuse ou post-infectieuse	**VIH**
		Guillain-Barré
		Borréliose
	Médicamenteuse	**Antirétroviraux**
		Chimiothérapie anticancéreuse : Cisplatine,
	Autres	**Disulfiram, Isoniazide, Ethambutol,**
	Cancer	**Syndrome paranéoplasique**
		Myélome
	Toxique	**Arsenic**
		Thallium
		Organophosphorés
		Acrylamide
		Ethylène oxyde
	Neuropathie héréditaire	**Fabry**
		Amylose
		Charcot-Marie-Tooth type 5, type 2B
	Vascularite	**Gougerot-Sjögren**
		Lupus
		Sarcoïdose
	Autres	**Erythromélalgie**
		Neuropathie sensitive idiopathique à petites fibres
		Neuropathie au froid

Tableau 2 : Etiologies d'origine périphérique des douleurs neuropathiques (Martinez et al. 2010)

Lésions du système nerveux central	Accident vasculaire cérébral (notamment tronc cérébral et thalamus) et médullaire incluant infarctus, hémorragie et malformation vasculaire	
	Sclérose en plaques	
	Traumatisme crânien ou médullaire incluant les douleurs postcordotomie	
	Syringomyélie, Syringobulbie	
	Crises épileptiques douloureuses	
	Maladie de Parkinson	
	Abcès médullaire ou cérébral	
	Tumeur cérébrale ou Tumeur médullaire	Gliome
		Cavernome
		Angiome
		Hémangioblastome
		Neurinome
		Schwannome
	Myélite	Inflammatoire
		Infectieuse
		Postvaccinale
		Lupique
		Carence en vitamine B12

Tableau 3 : Etiologies d'origine centrale des douleurs neuropathiques (Martinez et al. 2010).

2.1.3 Diagnostic

Selon les recommandations de la Société Française d'Etude et Traitement de la Douleur (SFETD), on peut distinguer les principaux éléments cliniques qui orientent vers le diagnostic d'une douleur neuropathique (Martinez et al. 2010):

- Le contexte de survenue :

Il peut y avoir existence d'une lésion ou d'une maladie connue ou suspectée du système nerveux. De plus, un contexte particulier (postopératoire, traumatique) pouvant s'accompagner d'une lésion nerveuse oriente aussi vers le diagnostic de douleur neuropathique. Il peut exister un décours temporel plausible entre la lésion et l'apparition de la douleur. Ce temps peut être marqué par un intervalle libre de plusieurs semaines ou mois (généralement pas plus d'un an) entre la lésion et l'apparition des douleurs.

- Description des douleurs :

On retrouve les caractéristiques particulières des douleurs spontanées continues (brûlure, froid douloureux) ou paroxystiques (décharges électriques).

De plus, il existe une association à des douleurs provoquées (par le frottement, la

pression, le froid ou le chaud) ; l'allodynie au frottement et au froid étant plus caractéristique de ces douleurs.

- Sensations positives non douloureuses associées :

Le patient décrit généralement un engourdissement, des fourmillements, des picotements, des démangeaisons

- Signes neurologiques négatifs dans la zone douloureuse :

On retrouve un déficit thermo-algique (piqûre, chaud, froid), d'autres déficits sensitifs (tact, proprioception), des déficits moteurs ainsi que des anomalies de réflexes (en fonction de l'étiologie).

- Signes neurologiques positifs dans la zone douloureuse :

On retrouve une allodynie au frottement, à la pression, au froid, au chaud.

- Aire douloureuse :

La douleur siège habituellement dans un territoire déficitaire systématisé compatible avec une lésion neurologique périphérique ou centrale. L'IASP a mis à jour en 2011 les définitions des termes propres à la douleur neuropathique :

Termes	Définitions
Douleur neuropathique	Douleur secondaire à une lésion ou une maladie affectant le système somato-sensoriel
Allodynie	Douleur provoquée par un stimulus qui normalement ne produit pas de douleur
Analgésie	Absence de douleur en réponse à une stimulation normalement douloureuse
Anesthésie douloureuse	Douleur dans une aire ou une région anesthésiée
Dysesthésie	Sensation anormale et désagréable qui peut être spontanée ou provoquée
Hyperalgésie	Réponse exagérée à une stimulation qui normalement est douloureuse
Hyperesthésie	Sensibilité exagérée à une stimulation, à l'exception des systèmes sensoriels spécifiques
Hyperpathie	Réponse retardée, souvent explosive, à un stimulus plus souvent répétitif et dont le seuil est augmenté

Hypoalgésie	Diminution de la douleur évoquée par un stimulus normalement douloureux
Hypoesthésie	Diminution de la sensibilité à une stimulation, exception faite des systèmes sensoriels spécifiques
Paresthésies	Sensations anormales qui peuvent être spontanées ou provoquées

Tableau 4 Les définitions de l'IASP des termes propres à la douleur neuropathique

2.1.4 Outils de Dépistage et d'Évaluation

Avant même d'utiliser les outils disponibles pour analyser la douleur neuropathique, le médecin évalue le patient selon le modèle multidimensionnel bio-psycho-social décrit par F. Boureau et al (Boureau et al. 2000). Il convient d'analyser la composante sensorielle et discriminative de la douleur, sa composante affective et émotionnelle, cognitive et comportementale. L'interrogatoire du patient est fondamental. Pour cibler plus précisément l'éventuelle composante neuropathique de la douleur, des outils de dépistage et d'évaluation existent. L'outil diagnostique DN4 a été initialement développé et validé sur une population de 160 patients présentant une douleur neuropathique ou une douleur non neuropathique (Bouhassira et al. 2005). Il comporte sept items d'interrogatoire et trois items d'examen clinique. L'étude de validation a permis d'établir qu'un score d'au moins 4/10 permettait d'orienter vers le diagnostic de douleur neuropathique avec une excellente spécificité (89,9 %) et sensibilité (82,9 %), mais la partie « interrogatoire » de cet outil a également une bonne valeur diagnostique (Bouhassira et al. 2005). Il présente l'avantage d'une grande simplicité d'utilisation permettant son emploi rapide en pratique clinique quotidienne. C'est le questionnaire de référence en France.

2.1.5 La prise en charge thérapeutique des douleurs neuropathiques

Les douleurs neuropathiques font partie de ces douleurs pour lesquelles les thérapeutiques antalgiques classiques sont en grande partie inefficaces. Cependant, les travaux scientifiques de recherche ont permis une évolution des connaissances et des progrès considérables dans la compréhension des mécanismes périphériques et centraux, et par conséquent la découverte de nouvelles cibles pour le développement d'agents pharmacologiques. Les traitements en vigueur sont résumés dans les tableaux ci-dessous. Les antidépresseurs sont actuellement les molécules les plus intéressantes à

côté des opiacés qui malheureusement ont une efficacité parfois limitée.

L'intérêt des antidépresseurs dans le traitement des douleurs neuropathiques est apparu dès 1960 après les travaux de (Paoli et al. 1960) qui ont observé, après administration d'imipramine chez des patients déprimés souffrant de sclérose en plaques, outre une amélioration de leur état dépressif, une réduction de leurs douleurs. Ces traitements possèdent une activité antalgique indépendante de leur action thymoanaleptique. Cet effet résulte en partie d'un blocage de la recapture des monoamines (sérotonine et/ou noradrénaline), permettant de renforcer les contrôles inhibiteurs descendants (Martinez et al. 2010). De plus, il a été récemment proposé que les tricycliques pourraient avoir des effets directs sur les récepteurs β-2-adrénergiques (Martinez et al. 2010)

Tableau 5 : Synthèse des traitements médicamenteux de niveau de preuve A ou B commercialisés en France pour le traitement des douleurs neuropathiques et libellé des autorisations de mise sur le marché (AMM).

Traitements	Ndp	Grade de recommandation	AMM en analgésie chez l'adulte	Recommandation
Antidépresseurs tricycliques				
Amitriptyline	1	A (preuve scientifique d'efficacité dans plusieurs étiologies, études négatives dans la douleur neuropathique du VIH)	AMM douleur neuropathique périphérique de l'adulte	Recommandé en 1re intention
Imipramine	1	A (preuve scientifique d'efficacité dans plusieurs étiologies)	AMM douleur neuropathique	Recommandé en 1re intention
Clomipramine	1	A (preuve scientifique d'efficacité dans plusieurs étiologies)	AMM douleur neuropathique	Recommandé en 1re intention
Maprotiline	2	B (présomption d'efficacité)	Pas d'AMM	Recommmandé en 2nde intention
Antidépresseurs ISRNA				
Duloxetine	1	A (preuve scientifique d'efficacité dans la polyneuropathie diabétique)	AMM douleur neuropathique diabétique périphérique chez l'adulte	Recommandé en 1re intention (polyneuropathie douloureuse du diabète)
Venlafaxine	1	A (preuve scientifique d'efficacité dans la polyneuropathie sensitive)	Pas d'AMM	Recommandé en 2nde intention
Antiépileptiques				
Gabapentine	1	A (preuve scientifique d'efficacité dans plusieurs étiologies mais études négatives dans les neuropathies douloureuses du diabète)	AMM douleur neuropathique périphérique de l'adulte	Recommandé en 1re intention
Prégabaline	1	A (preuve scientifique d'efficacité dans plusieurs étiologies mais études négatives dans la radiculopathie lombosacrée et	AMM douleur neuropathique périphérique et centrale de l'adulte	Recommandé en 1re intention

Tableau 6 (Suite)

Traitements	Ndp	Grade de recommandation	AMM en analgésie chez l'adulte	Recommandation
Opiacés				
Tramadol	1	A (preuve scientifique intention d'efficacité dans la polyneuropathie diabétique y compris pour l'association avec associée le paracétamol)	AMM douleur modérée à intense	Recommandé en 2nde ou en 1re intention si crises douloureuses ou douleur inflammatoire
Sulfate de morphine	1	A (preuve scientifique des d'efficacité dans plusieurs étiologies)	AMM douleurs persistantes intenses ou rebelles aux autres antalgiques, en particulier douleur d'origine cancéreuse	Recommandé en cas d'échec traitements précédents[a]
Oxycodone	1	A (preuve scientifique des d'efficacité dans plusieurs étiologies)	AMM douleur chronique d'origine cancéreuse intenses ou rebelles aux antalgiques de niveau plus faible	Recommandé en cas d'échec traitements précédents[a]
Emplâtres de lidocaine	1	A (preuve scientifique intention d'efficacité dans la douleur post-zostérienne mais une étude multicentrique négative)	AMM douleur neuropathique post-zostérienne	Recommandé en 1re dans la DPZ chez le sujet âgé présentant une allodynie chez qui les traitements systémiques sont déconseillés ou contre-indiqués

Ndp : niveau de preuve.
[a] Les opiacés forts ne constituent pas un traitement de première intention de la douleur chronique non cancéreuse.

2.2 Identifier et étudier la douleur chez l'animal

2.2.1 Introduction critique

Certains auteurs ont questionné le bien fondé de l'utilisation des rongeurs pour l'étude de la douleur dans un but translationnel (Langley et al. 2008). Cette interrogation est pertinente au vue de la difficulté à développer chez l'Homme de nouveaux traitements pharmacologiques sur la base de leur potentiel thérapeutique chez l'animal (Hill 2000). Comme le dit A.D. Craig, un rat n'est pas un singe qui n'est pas un humain (Anand et al. 1996). Sa critique de l'utilisation des rongeurs repose sur le manque d'homologie des structures anatomiques qui véhiculent et intègrent l'information nociceptive pour aboutir à l'expérience douloureuse. En effet, toutes les structures des voies spino-thalamo-corticales ne sont pas identiques chez l'Homme ou les singes et chez les rongeurs. Un des exemples le plus frappant au niveau anatomique est l'individualisation de l'insula chez l'Homme, absente chez les rongeurs, espèces lissencéphales. Cependant, les voies de projections spinothalamiques existent chez le rat, et ces voies ont bien des terminaisons corticales dans le cortex cingulaire (Hoover and Vertes 2007) et le cortex insulaire (Allen et al. 1991). Ainsi, dire que l'absence d'homologie stricte des structures et des circuits neuroanatomiques entre l'Homme et les rongeurs rend caduque l'étude des voies et des mécanismes de la douleur chez les rongeurs dans un but translationnel paraît excessif.

Au cours du temps, des tests sont apparus mesurant non plus uniquement des réponses réflexes mais aussi des comportements motivés (Johansen, Fields, and Manning 2001) mettant en œuvre des processus corticaux plus complexes. Ils ont permis la mise en évidence de la composante aversive/motivationnelle de la douleur chez le rongeur. La présence de douleurs spontanées est particulièrement handicapante pour les patients neuropathiques (Backonja and Stacey 2004). L'étude de cette composante a longtemps été ignorée chez les rongeurs du fait d'obstacles expérimentaux. La douleur spontanée semble pouvoir être évaluée, au moins partiellement, avec des protocoles de préférence de place qui donne une idée de la motivation pour l'analgésie de l'animal (King et al. 2009). La diversification des tests utilisés et des comportements observés chez le rongeur est en faveur d'une meilleure

compréhension des processus mis en jeu dans la douleur neuropathique (i.e. composante chronique).

2.2.2 Comment appréhender la douleur chez l'animal ?

2.2.2.1 Les comportements spontanés

Afin d'évaluer rapidement et par simple observation le bien être animal, des critères comportementaux et physiologiques ont été identifiés et établis en premier lieu par les comités d'éthique et les instituts vétérinaires de veille sanitaire dans le but de suivre l'état de santé des animaux, d'assurer leur bien-être et de minimiser leurs souffrances. Cette surveillance est d'autant plus nécessaire que l'animal est dans l'incapacité de faire part de ses impressions vis-à-vis de la gêne, de l'inconfort qu'il ressent en condition de douleur. La douleur est une expérience sensorielle aversive qui provoque des **réactions motrices** et **végétatives** protectrices, conduisant à l'apprentissage d'un comportement d'évitement et pouvant modifier le comportement spécifique de l'espèce, y compris le comportement social. Par simple observation des **comportements spontanés** de l'animal (nature et fréquence d'apparition) et de son état général (intégrité physique) (Jeffrey S Mogil, Simmonds, and Simmonds 2009), l'expérimentateur peut en théorie évaluer avec plus ou moins de précision les "signes physiologiques et comportementaux" de douleur chez l'animal. Les principaux signes comportementaux utilisés comme critères d'évaluation de la douleur et de la souffrance dans les modèles de douleur animale sont : la protection de la région douloureuse, un animal sur ses gardes associé ou non à l'agressivité (morsures, combats), les vocalisations (ultrasons), les mutilations (grattage, arrachage, autotomie de la région douloureuse), l'agitation (activité locomotrice/déambulation, comportement d'exploration et redressement exacerbés), la prostration, les tremblements, les positions anormales (tête repliée vers l'abdomen, hyperlordose lombaire, répartition du poids de l'animal anormal) et même récemment les mimiques faciales associée à la douleur. Lorsque cette douleur évolue vers une forme chronique, ces signes comportementaux peuvent s'accompagner d'une diminution de l'appétit et donc d'une perte de poids, d'une diminution du temps de toilettage, de l'activité locomotrice et d'exploration, d'une perte du sommeil, d'une diminution du comportement sexuel et des interactions sociales. Les principaux signes physiologiques affectés pouvant être observés et/ou

mesurés sont : la dilatation des pupilles, le changement de la pression artérielle et de la fréquence cardiaque, l'augmentation de la fréquence respiratoire, la modification de la température corporelle, la pilo-érection, l'augmentation de la diurèse et des défécations., Cette analyse de la douleur chez l'animal, sur des bases comportementales, nécessite une bonne connaissance de la physiologie de l'espèce utilisée afin de pouvoir interpréter les comportements observés. Néanmoins, la reconnaissance ainsi que la quantification de ces comportements spontanés et états physiologiques restent fastidieuses et compliquées. En effet, en plus de la grande disponibilité dont l'expérimentateur doit faire preuve lors de ces inspections visuelles, il n'est généralement pas évident de faire la différence entre des comportements spontanés et perturbations physiologiques induits par un état douloureux et par exemple ceux induits par un état de stress, d'anxiété.

2.2.2.2 Les comportements évoqués par la stimulation sensorielle

Pour mieux appréhender et quantifier la réponse douloureuse de l'animal, différents tests nociceptifs comportementaux sont utilisés. A la différence des comportements spontanés observables sans aucune stimulation nociceptive expérimentale de l'animal, ces tests mesurent des réponses comportementales dites évoquées. Ils consistent par exemple à appliquer un stimulus nociceptif d'une modalité sensorielle donnée (mécanique, thermique, chimique ou électrique) sur une partie du corps de l'animal, conduisant au retrait défensif de cette partie du corps ou à d'autres comportements simples qui peuvent être facilement mesurés. A l'heure actuelle, l'ensemble de ces tests reste largement utilisé dans le domaine de la recherche préclinique sur la douleur (Jeffrey S Mogil et al. 2006)En effet, dans ces derniers, les multiples réponses comportementales évoquées associées à la grande variabilité des seuils de réponse posent de sérieux problèmes d'évaluation et d'interprétation. D'une manière générale, les comportements évoqués classiquement mesurés lors de ces tests sont les réflexes spinaux (tels que le réflexe de retrait induit par l'application d'un stimulus nociceptif) (Kauppila, Kontinen, and Pertovaara 1998), les réflexes spino-bulbo-spinaux (tels que le saut ou l'étirement abdominal) ou de simples comportements innés (comme vocaliser, se lécher, se gratter, se mordre) (Matthies and Franklin 1992). Parmi ces réponses comportementales, le réflexe de retrait est souvent mesuré lors des tests. Cependant le réflexe de retrait bien que considéré comme un indice de la douleur ressentie par l'animal, n'est pas une mesure

directe de la douleur elle-même, mais plutôt de l'hypersensibilité (allodynie et hyperalgésie) qui accompagne fréquemment la douleur.

2.2.2.3 Les facteurs affectant la mesure de la douleur chez l'animal

De nombreux facteurs peuvent affecter les mesures de douleur chez l'animal. Par conséquent, la valeur d'une étude dépend également de la prise en compte de ces facteurs. Ainsi, il a été montré dans des tests mesurant les comportements induits par l'application de stimuli nociceptifs que les rongeurs femelles étaient largement plus sensibles que les mâles (Mogil et al. 2000). Cette observation est également faite chez les femmes comparativement aux hommes de manière très générale. La sensibilité d'un animal vis-à-vis d'une substance analgésique est également dépendante du sexe, avec une efficacité analgésique plus importante chez les mâles (Craft 2003). De plus, il a été rapporté que cette dernière différence observée entre les femelles et les mâles n'est pas identique chez les différentes souches de rat et de souris (Terner et al. 2003). Parallèlement au facteur sexe, il existe des facteurs génétiques capables d'influencer la réponse douloureuse. Une étude récente effectuée sur 11 souches différentes de souris du même sexe révèle un effet génotypique hautement significatif pour les 25 tests nociceptifs réalisés (Lacroix-Fralish and Mogil 2009). Le traitement de la douleur est fondamentalement différent entre ces différentes souches de souris également.

D'autres facteurs qui ne sont pas directement liés à l'animal utilisé peuvent également être impliqués et affecter la douleur chez l'animal. Par exemple, les paramètres d'intensité, de durée et de localisation du stimulus nociceptif lui-même, peuvent affecter de manière importante les résultats des tests comportementaux (Le Bars, Gozariu, and Cadden 2001). Il en va de même pour des facteurs liés à l'élevage et/ou au protocole expérimental, plus subtils et rarement pris en compte (Rice et al. 2008). Certains régimes alimentaires, tels que ceux contenant du soja (Shir et al. 1998) ou des acides gras omega-3 (Pérez et al. 2005) semble affecter les comportements douloureux chez le rat en fonction du genotype (Shir and Seltzer 2001). Le stress des animaux (rats et souris) lors des études précliniques est fréquemment sous-estimé. Ce stress peut être responsable d'effets à la fois analgésique (Terman et al. 1984) et hyperalgésique (Imbe, Iwai-Liao, and Senba 2006). Enfin, il a été montré que la texture de la litière (Robinson, Dowdall, and Meert

2004), la température ambiante , la nature de la plateforme sur laquelle sont réalisés les tests comportementaux (Pitcher, Ritchie, and Henry 1999), ainsi que l'isolement (Berman and Rodin 1982), les interactions sociales (Langford et al. 2006) et certains comportements comme le comportement de toilettage (Callahan et al. 2008), affectent les résultats des études comportementales sur la douleur.

2.2.3 Les modèles animaux d'étude de la douleur neuropathique

Dans ce paragraphe seront traités les éléments liés aux modèles chez le rongeur. Tout l'enjeu de la recherche fondamentale dans le domaine de l'étude de la douleur chronique est d'établir des modèles expérimentaux chez l'animal en recherchant des analogies avec ce qui est décrit en clinique. De telles études réalisées chez l'animal, en particulier pour les modèles de douleur chronique, sont limitées par des règles éthiques strictes respectant les recommandations européennes et nationales. Les expérimentations ne sont possibles qu'avec l'autorisation du Comité Régional d'Ethique en Matière d'Expérimentation Animale (CREMEAS) et pour des expérimentateurs agréés.

2.2.3.1 Modèles Lésionnels

Le modèle de transsection du nerf sciatique (Wall et al. 1979) (**Figure 12**) modélise les symptômes cliniques du membre fantôme, un phénomène apparaissant chez l'homme après une amputation ou lors de lésions médullaires transversales. La section du nerf sciatique est effectuée dans le milieu de la cuisse de l'animal. Afin d'éviter toute ré-innervation, la partie proximale du nerf peut être insérée dans un tube de polyéthylène ou un segment de 5 à 8 mm de long peut être enlevé et la partie proximale insérée entre les muscles. Cette axotomie totale entraîne une interruption immédiate et irréversible dans la transmission afférente et efférente. L'inconvénient de ce modèle est que la motricité du membre lésé est dramatiquement altérée rendant impossible l'évaluation de l'allodynie et de l'hyperalgésie du membre déafférenté, l'allodynie mécanique pourra uniquement être mesurée dans le voisinage de la zone déafférentée (Kauppila and Xu 1996). Le modèle de constriction chronique du nerf sciatique (CCI) développé par (Bennett and Xie 1988) (**Figure 12**) modélise les symptômes cliniques de compression nerveuse chronique. Dans ce modèle, quatre ligatures lâches sont réalisées autour du nerf sciatique au milieu de la cuisse de l'animal. Cela entraine une réaction inflammatoire

locale ainsi que l'apparition d'un œdème augmentant la compression des axones. La constriction du nerf sciatique conduit à une lésion des fibres afférentes et efférentes (déafférentation partielle). Après constriction du nerf sciatique du rat, une perte importante des fibres Aα et Aβ, ainsi que de quelques fibres Aδ et C (Gautron et al. 1990). Le principal inconvénient de ce modèle réside dans la souplesse qui caractérise la ligature induisant la constriction du nerf sciatique, qui est fatalement dépendante de l'expérimentateur mais surtout de son appréciation d'une « ligature lâche (Bridges, Thompson, and Rice 2001)

Alors que le modèle de Bennett (CCI) conduit à une lésion des fibres nerveuses situées principalement à la surface du nerf sciatique, le modèle de ligature partielle du nerf sciatique (Seltzer, Dubner, and Shir 1990)(**Figure 12** : PSNL, pour "partial sciatic nerve ligation") simule une contusion nerveuse (Seltzer, Dubner, and Shir 1990). Cette ligature partielle est une ligature serrée réalisée au milieu de la cuisse de l'animal sur la face dorsale du nerf sciatique à l'aide d'une aiguille recourbée et d'un fil de soie, dans le but de capturer environ un tiers, à la moitié, des fibres du nerf. En utilisant cette procédure, environ 33 à 50% des fibres du nerf sciatique sont endommagées, cependant dans la partie du nerf non traitée les fibres nerveuses restent intactes. Ce modèle est considéré comme ayant une faible composante inflammatoire comparé au modèle de constriction chronique. L'inconvénient de ce modèle est que le nombre de neurones sensitifs primaires ligaturés entre chaque animal reste variable. De plus, avec ce modèle il n'est pas facile de relier la lésion partielle du nerf sciatique à un DRG en particulier ou à un niveau spécifique de la moelle épinière.

Le modèle du nerf épargné (Decosterd and Woolf 2000) (**Figure 12**: SNI pour "spared nerve injury") est, techniquement, un modèle plus simple de dénervation partielle du membre postérieur (Decosterd and Woolf 2000), qui se traduit par une variabilité minimale du nombre de neurones sensitifs primaires lésés entre chaque animal opéré. Le tronc du nerf sciatique se divise en trois branches principales qui contribuent à l'innervation cutanée de la surface plantaire du membre postérieur du rat : nerf tibial, péronéal et sural (**Figure 12**). Dans la plupart des cas, le nerf tibial et péronéal sont sectionnés alors que le nerf sural est laissé intact. La ré-innervation par les nerfs sectionnés est empêchée par une ligature (réalisée avant section) ou le

prélèvement d'un segment nerveux de 2 à 4 mm de long (Decosterd and Woolf 2000). Contrairement aux modèles PSNL mentionnés ci-dessus, dans lequel les fibres nerveuses lésées et intactes sont localisées dans le même nerf (le nerf sciatique), dans le modèle SNI le contact direct entre fibres lésées et fibres intactes est évité.

Contrairement aux modèles mentionnés ci-dessus, dans lesquels la lésion du nerf périphérique est réalisée sur le membre postérieur (mi-cuisse), la lésion des nerfs dans le modèle de (Kim and Chung 1992) est pratiquée sur les racines, à proximité de la moelle épinière (**Figure 12**). Une ligature serrée est réalisée sur les nerfs spinaux lombaires L5 et L6 tout en laissant le nerf spinal L4 intact. L'avantage de ce modèle est que dans un ganglion rachidien dorsal (DRG en anglais) donné tous les neurones sensoriels primaires sont, soit lésés (L5 et L6) (Costigan, Scholz, and Woolf 2009), soit intacts (L4). En outre, il est également accepté que ce modèle puisse également être réalisé par la ligature du nerf spinal L5 uniquement, plus simple à réaliser (Kim and Chung 1992). Bien que ce modèle expérimental (ligatures L5-L6 ou L5 uniquement) présente l'avantage d'être précis (ligature serrée et de la totalité du nerf spinal) et donc reproductible a priori, l'inconvénient majeur est que la chirurgie réalisée afin de pouvoir ligaturer les nerfs, peut provoquer des dommages tissulaires qui peuvent affecter les DRG intacts à proximité.

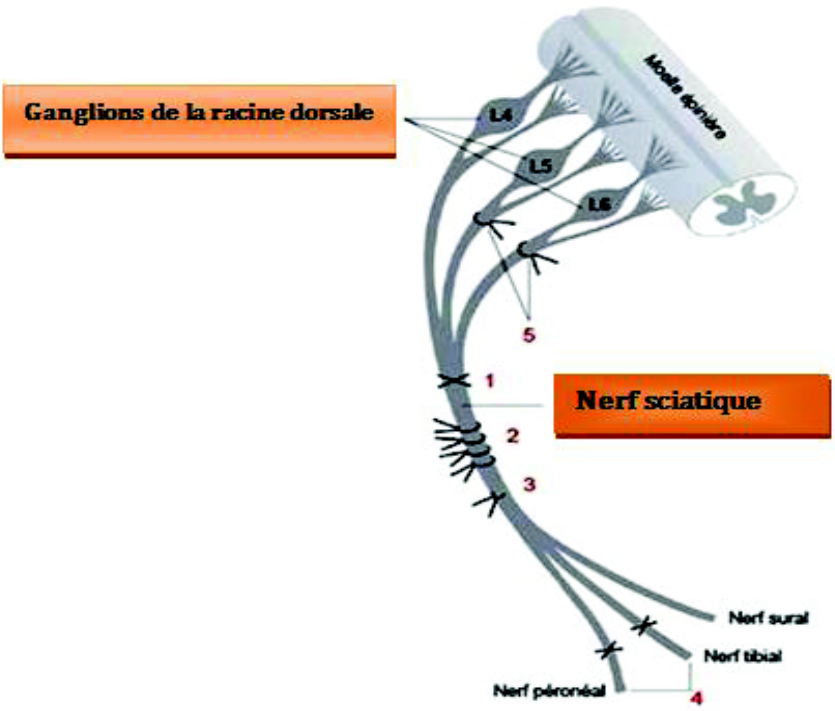


Figure 12 : Représentation schématique de cinq modèles lésionnels de douleur neuropathique périphérique. Le modèle de transsection du nerf sciatique (1), le modèle de constriction chronique du nerf sciatique (2, CCI), le modèle de ligature partielle du nerf sciatique (3, PSNL), le modèle du nerf épargné (4, SNI) et le modèle de ligature de nerfs spinaux L5-L6 ou L5 uniquement (5); Voir détails dans le texte (Modifié d'après (Klusáková and Dubový 2009).

2.2.3.2 Model du « cuff »

Le modèle du « cuff » décrit d'abord chez le rat (Mosconi and Kruger 1996) puis adapté au sein de notre laboratoire chez la souris (Benbouzid et al. 2008), est le modèle utilisé pour effectuer ce travail de thèse. Le principe est de poser un petit tube en polyéthylène, d'une dimension et d'un diamètre précis, autour de la branche principale du nerf sciatique (voir les méthodes). L'hyperalgésie mécanique induite par la chirurgie est observable 3 jours après la chirurgie et persiste au moins 2 mois (Benbouzid et al. 2008). De manière intéressante, les symptômes douloureux sont accompagnés après quelques semaines de troubles émotionnels bien caractérisés (Benbouzid et al. 2008). Ce modèle sera détaillé par la suite dans les matériels et méthodes puis dans les résultats.

2.2.3.3 Les modèles de neuropathie induits par les substances chimiotoxiques

Le modèle de diabète expérimental à la streptozocine chez le rat comme modèle de douleur chronique a été validé en 1986 par Forman et collaborateur (Forman et al. 1986) qui ont mis en évidence d'une diminution des seuils de réponse à la plaque chaude chez des rats diabétiques (STZ). Depuis ce modèle a essentiellement été caractérisé par Courteix et collaborateur (Courteix, Eschalier, and Lavarenne 1993). Dans ce modèle, les rats, rendus diabétiques par injection de streptozocine par voie intra-péritonéale, présentent des signes caractéristiques des douleurs neuropathiques deux semaines après induction du diabète. Les expérimentateurs ont observés des modifications des réactions des animaux à des stimulations nociceptives et non nociceptives pouvant correspondre à l'apparition d'une hyperalgésie et d'une allodynie. Ce modèle a été particulièrement discuté sur le plan éthique du fait de l'état de santé général détérioré des animaux (réduction de la prise de poids corporel, polyurie, diarrhée, vessie distendue). Il a été montré qu'un traitement chronique à l'insuline, à une dose ajustée pour rétablir une normo-glycémie, permet d'améliorer l'état général des rats.

Un autre modèle physiopathologique a été décrit comme modèle de douleur neuropathique induit par un traitement rétroviral utilisé dans le traitement du VIH chez l'homme. Dans ce modèle, les rats sont traités par la molécule de synthèse 2′,3′-dideoxycytidine (ddC) qui est un analogue nucléosidique inhibiteur de la transcriptase inverse virale. Les animaux traités présentent des modifications comportementales caractéristiques des douleurs neuropathiques comme l'apparition d'une allodynie et d'une hyperalgésie mécanique ou encore d'une allodynie au froid (Van Steenwinckel et al. 2008).

Les traitements anticancéreux induisent des neuropathies périphériques par leur action neurotoxique sur les fibres sensorielles périphériques et sont à l'origine de douleurs chroniques. Ces modèles animaux, en comparaison avec les modèles lésionnels, présentent l'avantage de se rapprocher un peu plus des problématiques de la clinique humaine. En effet ces modèles reproduisent également les symptômes de douleurs neuropathiques chez l'homme, tout en gardant l'avantage d'être à l'origine d'effets secondaires limités chez l'animal et de s'affranchir des réactions secondaires survenant à la suite des interventions chirurgicales. Les traitements

antitumoraux qui servent de modèles de douleurs neuropathiques sont les suivants : Vincristine sulfate, oxaliplatine, paclitaxel (N Authier et al. 2000; Nicolas Authier et al. 2003).

2.2.4 Physiopathologie des neuropathies : aspects périphériques

2.2.4.1 Sensibilisation périphérique

Les modifications périphériques décrites dans les modèles animaux sont multiples, et leur rapport avec les différents symptômes est loin d'être élucidé. En périphérie et à l'aide d'outils fonctionnels comme l'électrophysiologie, on observe des décharges ectopiques dans les fibres myélinisées et amyéliniques dans les modèles lésionnels comme le modèle de constriction du nerf sciatique (Kajander and Bennett 1992). De nombreuses études ont montré des modifications électrophysiologiques au niveau des fibres afférentes primaires. Par l'analyse comportementale, des modifications de la sensibilité des fibres afférentes primaires ont été observées dans tous les modèles, en particulier sous la forme d'une allodynie statique mécanique et au froid, deux caractéristiques fréquentes des neuropathies. Ainsi, dans le modèle de douleur neuropathique induite par le diabète (streptozocine STZ), une hypersensibilité aux stimuli mécaniques a été observée (Ahlgren and Levine 1994). Elle se traduit électrophysiologiquement par une augmentation de la décharge en potentiel d'action cinq minutes après l'arrêt de la stimulation dans une sous-population de fibres C chez les animaux STZ comparativement aux animaux contrôles (Ahlgren, White, and Levine 1992). Cette hyperexcitabilité des fibres C est particulièrement notable car la majorité d'entres-elles prennent en charge les informations nociceptives. Cette même modification électrophysiologique est en accord avec ce qui a été observé chez des patients présentant une névralgie chronique (Koltzenburg, Torebjörk, and Wahren 1994)Les études réalisées sur un modèle de section complète du nerf sciatique ont permis de mettre en évidence une mort neuronale tardive qui affecte de 30 à 37% des cellules du DRG, principalement des neurones de petit diamètre (Tandrup, Woolf, and Coggeshall 2000). Une augmentation de la mort cellulaire est logiquement observée dans les douleurs neuropathiques induites par les agents chimiotoxiques comme la streptozocine (Obrosova et al. 2002) et al., 2002), les anticancéreux (Groninger et al. 2002) ou encore le traitement contre le sida (Cory, Hickerson, and Cory) . Une

inhibition des activateurs et des effecteurs de certaines caspases, impliquée dans la mort cellulaire programmée (apoptose), semble d'ailleurs réduire les douleurs observées chez les rats dans le modèle ddC (Joseph and Levine 2004). Il est intéressant de noter qu'une activation partielle des voies apoptotiques n'engendre pas forcement une mort cellulaire (Joseph and Levine 2004) mais pourrait contribuer au développement des douleurs neuropathiques observées dans ces modèles.

2.2.4.2 Régulations de l'expression protéique

Un grand nombre de changements dans l'expression de gènes de protéines, ou encore des modifications post-traductionnelles des protéines dans les ganglions des racines dorsales ont été rapportés dans les modèles de douleurs neuropathiques. Cette partie n'a pas la prétention d'être exhaustive mais d'apporter une vue d'ensemble sur les changements décrits dans les modèles de douleurs neuropathiques, en particulier pour ce qui concerne les variations de l'expression de canaux ioniques (Na^+, Ca^{2+}, K^+), de peptides neuromodulateurs et de leurs récepteurs.

2.2.4.3 Canaux ioniques

Une accumulation et une augmentation de la densité membranaire de canaux Na^+ voltage-dépendants ont été observées par immunohistochimie dans des axones de nerfs lésés de patients souffrant de névromes (England et al. 1996). Cette accumulation pourrait contribuer à l'augmentation de l'excitabilité et de l'activité spontanée des fibres périphériques observées. En effet, Devor et al ont montré qu'une application systémique de lidocaïne supprimait les décharges ectopiques générées par une lésion de nerf chez le rat (Devor, Wall, and Catalan 1992). La Lidocaïne est un anesthésique local qui bloque la conduction nerveuse par diminution de la perméabilité membranaire aux ions Na^+ qui survient lors de la phase de dépolarisation. Cette observation suggère que certains types de canaux Na^+ joueraient un rôle dans les modifications électrophysiologiques observées.

Depuis de nombreux sous types de canaux Na^+ ont été identifiés comme étant impliqués dans le développement et/ou le maintien des douleurs neuropathiques. Ainsi, des études utilisant le principe de la « perte de fonction » par la technique des oligonucléotides antisens et des 'siRNA' ont mis en évidence l'importance du canal

sodique $Na_V1.8$ dans la neurophysiologie et les effets comportementaux observés dans des modèles de douleurs neuropathiques après ligature du nerf spinal ou une lésion par constriction des nerfs (Dong et al. 2007). Une étude récente propose un transport axonal local de l'ARNm du canal $Na_V1.8$ au niveau du site de la lésion, l'augmentation de la protéine sur ce site pourrait contribuer à l'hyperexcitabilité observée dans la partie proximale du nerf lésé (Thakor et al. 2009). D'autres sous-types de canaux Na^+ ont également été décrits pour leur implication dans l'hyperexcitabilité engendrée par les douleurs neuropathiques : $Na_V1.3$ et $Na_V1.7$. En effet, le premier semble contribuer à l'excitabilité neuronale dans un modèle de ligature chez le rat ((Black et al. 1999). Le deuxième a été mis en évidence comme contribuant à l'hyperexcitabilté neuronale dans différents modèles de douleur chez l'homme (Cox et al. 2006). Il est intéressant de noter que l'une de ces études chez l'homme a montré qu'une mutation par perte de fonction de ce canal entraînait une insensibilité congénitale à la douleur (Cox et al. 2006). La mutation par gain de fonction de ce canal chez l'homme génère, quant à elle, une diminution des seuils nociceptifs en condition d'inflammation chronique. Il a également été montré que des mutations empêchant l'inactivation de ce canal semblent causer des douleurs aiguës paroxystiques (Fertleman et al. 2006).

Les canaux Ca^{2+} voltage-dépendant représentent une des voies majeures d'entrée de calcium dans la cellule nerveuse. Les canaux Ca^{2+} semblent également contribuer au développement et/ou au maintien des douleurs neuropathiques. En effet, on sait que l'entrée de Ca^{2+} dans la cellule participe à la régulation de nombreux mécanismes, incluant l'activation de kinases impliquées dans les voies de transduction du message douloureux ou encore la libération par exocytose des neurotransmetteurs et des neuromodulateurs stockés dans les vésicules pré-synaptiques dans les terminaisons centrales des fibres sensorielles primaires.

Il est intéressant de noter que de nombreuses études ont montré une augmentation significative de la sous-unité α2δ-1 dans de nombreux modèles de douleurs neuropathiques. La sous-unité α2δ-1 contribue à la régulation des propriétés des canaux Ca^{2+} voltage dépendant de type N et L en augmentant la fonctionnalité de ces canaux ce qui aurait pour conséquence une augmentation du « trafficking » des canaux (Cantí et al. 2005). L'augmentation de cette sous-unité semble contribuer au

développement des douleurs neuropathiques. Cette augmentation d'expression, observée pour l'ARNm de la sous-unité α2δ-1 (H. Wang et al. 2002) mais également pour la protéine dans les ganglions des racines dorsales (C.-Y. Li et al. 2004) coïncide avec l'apparition de l'allodynie mécanique dans le modèle de ligature des nerfs spinaux (C.-Y. Li et al. 2004). La surexpression de la sous-unité α2δ-1 chez la souris entraine l'apparition d'une allodynie mécanique en absence de toute lésion nerveuse (C.-Y. Li et al. 2006). De plus, il est intéressant de noter que la gabapentine et la prégabaline, qui présentent des effets bénéfiques sur le traitement des douleurs neuropathiques chez l'homme, sont des ligands de cette sous-unité (Field et al. 2006)). Enfin, Field et collaborateur ont montré qu'une souris exprimant une sous-unité α2δ-1 présentant une mutation empêchant la fixation des gabapentinoïdes développait des douleurs neuropathiques insensibles à la gabapentine et à la pregabaline (Field et al. 2006). Tous ces arguments contribuent à valider le fait que cette sous-unité joue un rôle important dans les douleurs neuropathiques. Récemment, il a été montré que la gabapentine produisait une inhibition des courants Ca^{2+} par réduction de l'expression des sous-unités des canaux calciques $Ca_V\alpha1$ et α2δ à la membrane plasmique inhibant alors le « trafficking » des ces canaux calciques (Hendrich et al. 2008). Enfin d'autres types de canaux Ca^{2+} ont été découverts comme étant impliqués dans les douleurs neuropathiques. Ainsi il a été décrit que les canaux calciques de type T (famille des canaux Ca^{2+} de type Ca_V3) participaient à la transmission du message nociceptif mais également aux douleurs chroniques associées à une lésion périphérique ((Jevtovic-Todorovic and Todorovic 2006)). Ainsi, il a été montré récemment qu'une constriction du nerf sciatique entrainait une augmentation des courants Ca^{2+}produit par les canaux $Ca_V3.2$ de type T dans les neurones depetits diamètre ((Jagodic et al. 2008).

Les canaux K^+ semblent également jouer un rôle dans les douleurs neuropathiques. Par exemple, les canaux K^+ sensibles à l'ATP (K_{ATP}), qui sont connus pour réguler l'excitabilité membranaire et la libération des neurotransmetteurs, ont été rapportés comme atténuant l'hyperexcitabilité des neurones sensoriels induite par une inflammation périphérique (Chi, Jiang, and Nicol 2007). De plus, une étude récente a montré que ces canaux étaient présents sur les neurones sensoriels de petit et de large diamètre et que leur activité dans les neurones de large diamètre diminuait à la suite d'une lésion de nerf périphérique

(Kawano et al. 2009). Les courants générés par ces canaux [$I_{K(ATP)}$] participent au maintien du potentiel membranaire de repos des neurones de large diamètre. Mais cette contribution est atténuée après axotomie, suggérant ainsi un rôle dans l'hyperexcitabilité des neurones de large diamètre dans les douleurs neuropathiques (Kawano et al. 2009). Il a également été montré une diminution de l'expression de certains gènes de canaux K^+ voltage dépendant (K_v) dans les ganglions des racines dorsales dans le modèle de douleurs neuropathiques après constriction du nerf sciatique (Kim and Chung 1992). Cette diminution d'expression des canaux K^+ voltage dépendant pourrait contribuer à l'excitabilité neuronale et à la genèse des décharges ectopiques observée dans ces modèles.

2.2.4.4 Peptides

De nombreuses études ont révélé des modifications d'expression de neuropeptides. On observe par exemple une diminution de l'expression de la substance P et du CGRP, deux peptides ayant une activité excitatrice, dans les neurones du DRG après axotomie. Parallèlement, une augmentation de l'expression de neuropeptides inhibiteurs comme la galanine est constatée dans les corps cellulaires des fibres périphériques à la suite d'une axotomie (Hökfelt, Zhang, and Wiesenfeld-Hallin 1994). Noguchi et collaborateurs ont également montré que cette diminution d'expression de la substance P était spécifique des neurones de petits diamètres et que, simultanément, on observait une augmentation de l'expression de ce peptide dans les neurones de moyens et larges diamètres (Noguchi et al. 1994). Cette observation suggère donc un changement phénotypique des fibres Aβ qui exprimeraient la substance P ce qui aurait pour conséquence de permettre une libération de ce peptide après stimulation des fibres de gros diamètres. Cette plasticité des fibres de gros diamètre pourrait expliquer qu'une stimulation normalement non nociceptive soit intégrée (voir perçue) comme nociceptive par l'organisme après lésion nerveuse.

2.2.4.5 Récepteurs

Un grand nombre de récepteurs a également été rapporté comme étant impliqué dans les douleurs neuropathiques. Pour ne citer qu'un exemple, des études ont montré une diminution de l'expression des récepteurs opioïdes de type MOR sur les terminaisons axonales pré- synaptique et sur les corps cellulaires des neurones

nociceptifs post-synaptiques après lésion de nerf (Kohno et al. 2005). En situation physiologique basale, la libération de glutamate par les terminaisons pré-synaptiques est inhibée par l'activation de nombreux récepteurs couplés aux protéines G y compris les MOR. La diminution de l'expression de ces récepteurs pourrait alors contribuer à l'augmentation de la libération de glutamate dans de la corne dorsale de la moelle épinière.

L'ensemble de ces études a permis de mettre en évidence le rôle d'un certain nombre de protéines potentiellement impliquées dans le développement et/ou le maintien des douleurs neuropathiques. Il n'en reste pas moins que ces études restent focalisées sur un petit nombre de protéines spécifiques connues pour être impliquées dans la douleur chronique, et empêchent encore aujourd'hui d'avoir une vision d'ensemble des modifications phénotypiques observées dans ces modèles.

2.2.4.6 Plasticité centrale

- Dans la corne dorsale de la moelle épinière

Les douleurs neuropathiques génèrent des modifications durables de l'activité neuronale, regroupées sous le terme générique de « sensibilisation centrale ». Cette sensibilisation centrale peut se traduire à différents niveaux: une augmentation de l'excitabilité des neurones post-synaptiques résultant d'une hypersensibilité de ces derniers dans la détection de stimuli périphériques transmis par les neurones sensoriels périphériques; une réactivité gliale (microgliale et astrocytaire) contribuant au développement et à l'entretien de cette sensibilisation ; une plasticité des contrôles descendants où l'efficacité des contrôles inhibiteurs est réduite; une altération de la balance entre excitation et inhibition des réseaux d'interneurones dans les structures relais du système nociceptif. Toutes ces modifications ont pour conséquence de générer une hyperexcitabilité auto-entretenue des neurones nociceptifs de la corne dorsale aux neurones des structures corticales qui se traduit par l'expression comportementale de symptômes douloureux et de douleurs spontanées.

De nombreuses études ont montré le rôle des modifications de l'activité des neurones postsynaptiques dans la sensibilisation centrale. La dépolarisation initialement induite par le glutamate, la substance P et d'autres peptides excitateurs, permet l'activation des récepteurs NMDA du glutamate par la levée du blocage Mg^{2+}

(obturant le pore du canal dans les conditions physiologiques). Les récepteurs NMDA activés entraînent une entrée importante de calcium dans la cellule et participent à l'activation exacerbée des neurones post-synaptiques (Masakazu Yoshimura and Yonehara 2006). Les récepteurs AMPA (alpha-amino-3-hydroxy-5methyl-4-isoxazoleproprionate) du glutamate semblent également participer à la sensibilisation centrale. Une augmentation du Ca^{2+} médié par les récepteurs AMPA et NMDA du glutamate dans les neurones post-synaptiques lors de la transmission synaptique est un mécanisme initiateur avéré des changements à court et à long terme (potentialisation et dépression) dans le système nerveux central en général et dans le système nociceptif spinal comme cela a pu être bien démontré par les travaux de Sandkuhler et collaborateurs (par exemple) (Gu et al. 1996). De plus, l'expression des récepteurs AMPA est augmentée dans les couches superficielles de la corne dorsale de la moelle épinière dans le modèle SNL (Petrou et al. 2012). Enfin, une augmentation d'expression des ARNm des récepteurs AMPA et NMDA a été démontrée dans le modèle du rat diabétique (Tomiyama et al. 2005).

De nombreuses données suggèrent qu'une partie des douleurs neuropathiques serait due également à des modifications des systèmes inhibiteurs. Ainsi il a été montré dans le modèle SNL une diminution de l'expression des récepteurs opioïdes μ sur les terminaisons centrales des fibres afférentes et sur les neurones post-synaptiques, pouvant contribuer à une hyperexcitabilité des neurones nociceptifs (Kohno et al. 2005). Ces résultats ont été corroborés par des études fonctionnelles menées chez le rat. En effet, il a été montré chez les rats arthritiques qu'une injection de morphine (2 mg/kg i.v.) diminue de 46% les activités spontanées enregistrées dans la corne dorsale de la moelle épinière (Lombard and Besson 1989). En revanche, l'utilisation de la même dose de morphine chez le rat dont la patte antérieure a été déafférentée par section des racines dorsales ne produit qu'un faible effet inhibiteur sur les activités spontanées des neurones enregistrées dans la corne dorsale. Ce résultat suggère que le système opioïde est moins efficace dans un modèle de douleur produit par déafférentation que dans un modèle de douleur arthritique.

2.2.4.7 Des modifications dans les structures supraspinales

De nombreuses études ont été menées sur les modifications générées par les lésions à l'origine de douleurs neuropathiques dans les centres modulateurs

supraspinaux de la douleur localisés dans la région bulbaire rostroventrale: la substance grise périaqueducale (SGPA), le noyau magnus du raphé, le locus coeruleus. Les données rapportées sur les effets de lésion d'un nerf montrent que l'activité des neurones de ces régions semble dépendant du type de modèle de neuropathie induit chez le rat. Ainsi Pertovaara et Kauppila rapportent une augmentation unilatérale de l'activité des neurones de la région bulbaire rostroventrale après section d'un nerf sciatique (Pertovaara and Kauppila 1989), tandis qu'une étude menée par Luukko et Pertovaara sur le modèle de douleur neuropathique CCI ne révèle aucun changement dans les activités spontanées ou évoquées de ces mêmes neurones (Luukko and Pertovaara 1993). A l'opposé par utilisation de la technique de dosage quantitative de déoxyglucose radioactif afin de mesurer le taux d'utilisation local du glucose, Mao et collaborateurs ont montré une augmentation de l'activité métabolique dans la SGPA, le locus coeruleus ou encore dans des structures pontiques dans le même modèle CCI chez le rat (Mao, Mayer, and Price 1993). Une étude plus récente menée avec un modèle de ligature partielle du nerf sciatique, indique une activité pronociceptive accrue des neurones de la medulla rostro-ventro-médiale (Gonçalves, Almeida, and Pertovaara 2007). Ces auteurs ont montré une augmentation de l'activité des cellules activatrices et une diminution de l'activité des cellules inhibitrices, pouvant ainsi contribuer à l'amplification de la transduction du message douloureux dans la corne dorsale de la moelle épinière. Des modifications de l'activité neuronale ont également été observées dans le thalamus. Parmi ces changements, une augmentation bilatérale de l'activité spontanée des neurones du noyau ventro-postéro-médian du thalamus est décrite après ligature du nerf infraorbitaire chez le rat (Vos et al. 2000). Dans le modèle SNL une diminution de la quantité de sérotonine (5-HT) et de norépinephrine (NE) est constatée dans le thalamus ventro-basal du côté contralatéral à la lésion (Goettl et al. 2002).

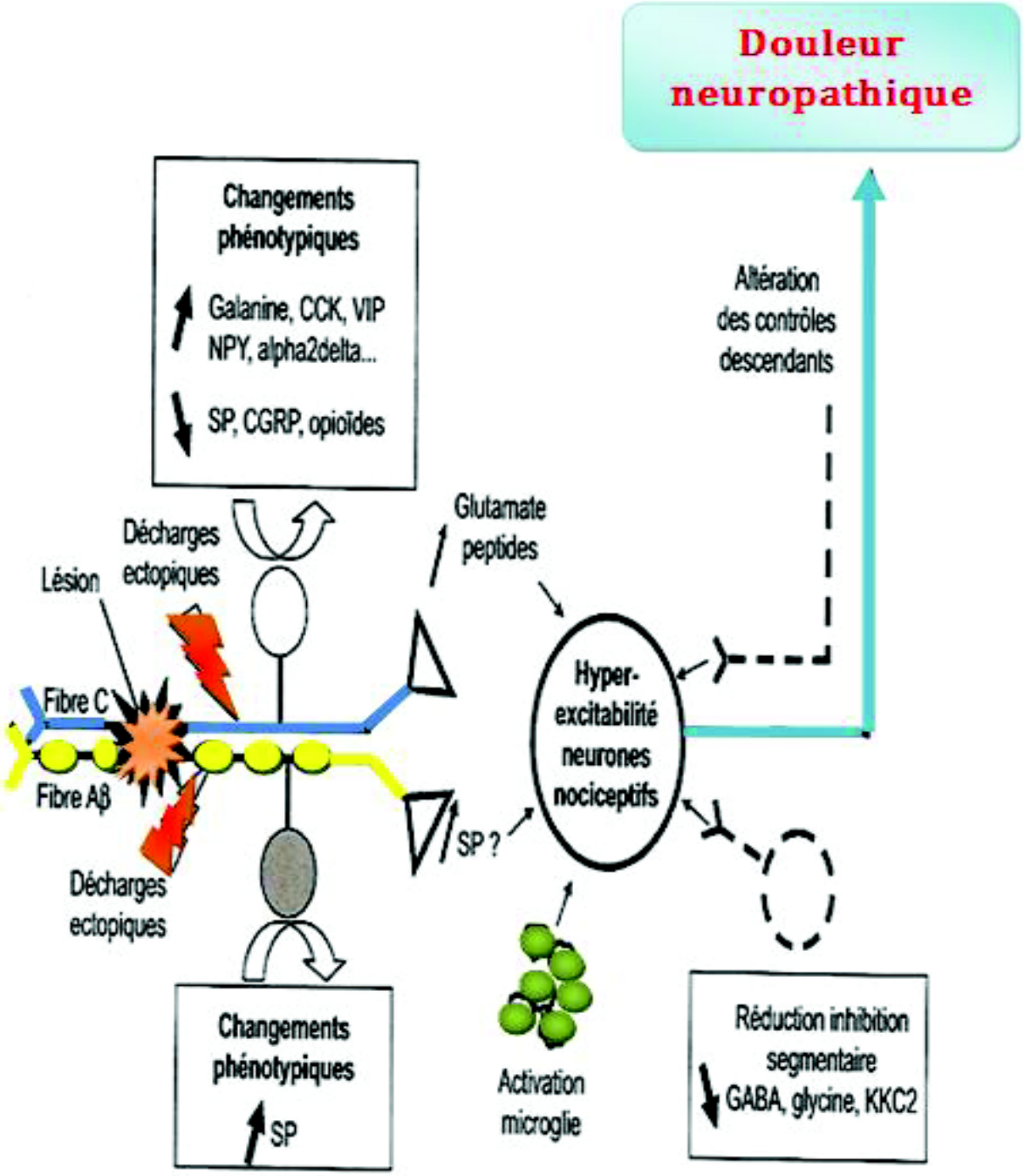


Figure 13 : Principaux mécanismes des douleurs neuropathiques périphériques. Extrait de (N. Attal, D. Bouhassira 2000).

3 Partie III : Les troubles anxio-dépressifs.

3.1 Introduction

3.1.1 Anxiété

Les troubles anxieux constituent un ensemble de troubles psychologiques et neurologiques qui incluent plusieurs formes de peurs, d'anxiété anormales ou pathologiques. Selon la classification internationale des maladies (CIM-10) publié par l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS), les troubles anxieux comprennent 6 formes principales (**Tableau 7**) qui peuvent regrouper différents symptômes décrits dans le DSM-IV-TR (**Tableau 8**). L'équipe de Kessler a montré que 18 % des américains étaient annuellement affectés par un ou plusieurs de ces troubles (Kessler et al. 2005). Parmi les troubles anxieux, entre 50 % et 90 % de la population atteinte des troubles d'anxiété généralisée (TAG) (Lewis-Fernández, Hinton, et al. 2010)souffre également d'une autre maladie mentale, telle que le trouble de panique, la dépression ou un abus de drogue ou d'alcool (Lewis-Fernández, Gorritz, et al. 2010). Le TAG est le trouble anxieux le plus souvent déclaré en urgence psychiatrique (Wittchen, Mühlig, and Beesdo 2003).

En examen clinique, les questionnaires standards, comme la « Zung Self-Rating Anxiety Scale » (SAS) créée par William Zung en 1971, sont utilisés pour quantifier l'intensité des symptômes d'anxiété (Zung). La SAS comporte 20 items, le score total est compris entre 20 et 80. Selon cette échelle, un score compris entre 20 et 44 caractérisera des anxiétés normales, tandis qu'un score supérieur à 45 indiquera des niveaux d'anxiété allant du niveau léger (45 < score < 59) à extrême (75 < score < 80).

Anxiété généralisée	**Caractérisée par une inquiétude excessive en ce qui concerne des activités ou des événements du quotidien pendant une période d'au moins six mois**	**3 % et 6 %**
Trouble panique	Les attaques récurrentes d'anxiété sévère (panique), qui ne sont pas liées à une situation particulière ou un environnement et sont donc imprévisibles	2 % et 4 %
Trouble de stress post- traumatique	Une réponse retardée ou prolongée à un événement stressant ou à une situation d'une menace exceptionnelle comme une catastrophe naturelle	7%

Trouble obsessionnel compulsif	Comprend deux aspects : pensées obsessionnelles et actes compulsives	1,6 % à 2,5 %
Phobie sociale	C'est la peur de l'humiliation et l'embarras lors des situations d'expositions publiques.	5 % à 12 %
Phobie spécifique	La peur excessive de quelque chose en particulier. Par exemple, animal, sang etc.	4% à 13%

Tableau 7 : Classification et description des troubles anxieux dans CIM-10. La prévalence de chaque forme d'anxiété est notée dans la colonne de droite (Lewis-Fernández, Gorritz, et al. 2010).

Tableau 8 : Critères de l'anxiété généralisée selon le DSM-IV
A. Anxiété, inquiétudes ou soucis excessifs survenant de façon générale tous les jours au cours d'une période d'au moins 6 mois. **B.** Difficulté à contrôler cette anxiété et à oublier ses soucis ; **C.** Anxiété et soucis associés à au moins trois des six symptômes suivants : - agitation ou sensation d'être survolté ou à bout ; - fatigabilité ; - difficulté de concentration ou trous de mémoire ; - irritabilité ; - tension musculaire ; **D.** Perturbation du sommeil **E.** Altération du fonctionnement social, professionnel **F.** Perturbation ne pouvant être liée aux effets physiologiques directs d'une substance

Tableau 8 : Critères de l'anxiété généralisée selon le DSM-IV

3.1.2 Dépression

Les troubles dépressifs sont un enjeu de santé publique majeur et soulèvent de nombreuses questions de société. Le rapport de l'OMS (2001) indique que la dépression majeure est aujourd'hui la première cause d'incapacité avec presque 12% du total de patients dépressifs ayant une maladie mentale sous-jacente. Elle figure au quatrième rang des principales causes de morbidité. L'OMS évalue qu'en l'an 2020, la dépression deviendra la deuxième cause mondiale, responsable d'incapacité (en nombre d'années) après les maladies cardio-vasculaires ischémiques, et dans les pays développés.

3.1.2.1 Les symptômes de la dépression

Selon les critères américains du DSM-IV, la dépression se manifeste par

1. une tristesse de l'humeur,
2. une perte d'intérêt pour toute activité y compris celles qui procurent du plaisir habituellement
3. une sensation de fatigue ou une baisse de l'énergie.
4. les troubles de la concentration ou du processus de prise de décision,
5. une diminution de l'estime de soi et de la confiance en soi,
6. une culpabilité injustifiée,
7. des idées mortifères et suicidaires,
8. des troubles du sommeil et une perte d'appétit,
9. une prise ou une perte de 5% ou plus du poids habituel en un mois

Les états dépressifs sont courants, surtout après une épreuve douloureuse, mais on ne diagnostique un trouble dépressif que si une personne présente au moins cinq des neuf symptômes précédents et au moins l'un des deux critères doit être présent : humeur triste ou anhédonie pour une durée d'au moins deux semaines, la plupart du temps, entraînant un changement dans le mode de fonctionnement habituel. La dépression peut aussi s'accompagner de symptômes somatiques. La dépression donne lieu à différents degrés de gravité, qui vont de légers à graves (Figure 1). Le risque évolutif le plus grave de cette pathologie est évidemment le suicide. Pour l'année 2010 en France, près de 70 % des suicidés souffraient d'une dépression sévère. Le diagnostic de la dépression demeure à l'appréciation des médecins et des psychiatres qui disposent des échelles d'évaluation de Hamilton (HAMILTON 1960) ou de Montgomery et Asberg (Guelfi 1993). L'échelle d'Hamilton est à ce jour la plus couramment utilisée (Guelfi 1993). Cette échelle comporte 17 ou 21 items selon les versions. Plus le score est élevé, plus la sévérité de la dépression est importante. En effet, un score compris entre 10 et 13 caractérise des symptômes dépressifs légers, alors qu'un score supérieur à 18 indique des symptômes dépressifs modérés à sévères.

3.2 Troubles anxio-dépressifs

3.2.1 Comorbidité et hypothèses neurochimiques

La dépression présente une co-morbidité élevée avec les troubles anxieux.

Ainsi, 50-60% des patients "déprimés" présentent ou ont présenté des troubles anxieux au cours de leur dépression. A l'inverse, de nombreux patients souffrant de troubles anxieux ont reçu un traitement par antidépresseurs au cours de leur suivi thérapeutique. Il faut noter que de nombreux antidépresseurs (comme les ISRS), sont utilisés à la fois pour leur propriétés antidépressives et/ou anxiolytiques puisqu'ils ciblent la neurotransmission catécholaminergique et sérotoninergique. Ces propriétés ont d'ailleurs donné lieu aux hypothèses monoaminergiques de la dépression.

De nombreuses études montrent également l'implication du système GABAergique dans la dépression. Une réduction des taux de GABA a été observée dans le plasma (Petty and Schlesser 1981; Petty and Sherman 1984) ou dans le cortex des patients déprimés en post mortem (Gerner and Hare 1981). Des variations significatives des quantités d'ARNm codants pour les différentes sous-unités du récepteur GABAA ont également été observées dans le cortex cérébral de patients décédés et ayant été dépressifs (Sequeira et al. 2009). D'autres études récentes ont mis en évidence une diminution de certains marqueurs spécifiques des neurones GABAergiques, dans différentes structures limbiques comme le cortex préfrontal, le cortex cingulaire et le complexe basolatéral de l'amygdale (Guilloux et al. 2011). Ces descriptions chez l'humain ont été partiellement confirmées dans un modèle de souris mutées pour la sous-unité du récepteur gamma2 du récepteur GABA-A , qui présentent un phénotype anxio-dépressif précoce, associé à des perturbations de l'axe HPA et une altération de la survie neuronale hippocampique (Earnheart et al. 2007; Shen et al. 2010).

3.2.2 Données épidémiologiques des troubles anxio-dépressifs

La fréquence des troubles anxieux et dépressifs dans les consultations des médecins généralistes avoisine les 20% (Demertzis and Craske 2006). Cette estimation est probablement minorée car plusieurs études ont montré que leurs détections et leurs traitements sont incomplets (Weisberg et al. 2007). En effet, 30% à 50% des patients ne semblent pas détectés selon ces travaux (Pignone 2002). L'anxiété et la dépression sont deux troubles qu'il n'est pas toujours facile de différencier. L'OMS a indiqué que la dépression et l'anxiété ont été une cooccurrence courante (Sartorius et al. 1996) puisque ces troubles se conjugueraient chez la moitié environ de tous les sujets

concernés (Zimmerman, McDermut, and Mattia 2000). La co-morbidité est donc une caractéristique fondamentale des troubles anxieux et de la dépression, et cette affirmation n'est pas confinée à certains troubles comme les troubles de l'anxiété généralisée. La co-morbidité présente une augmentation qui est dépendante de l'âge, chez les patients jeunes (Wittchen, Mühlig, and Beesdo 2003). Cependant, chez les patients dépressifs présentant des symptômes anxieux, leur trouble dépressif semble plus grave avec plus d'épisodes, plus de risques de suicide et une réponse mauvaise au traitement (Brown et al. 2001). Des données récentes ont prouvé qu'il y a eu une prévalence plus forte de la complication des troubles anxieux et dépressifs chez les patients âgés déprimés (Beekman et al. 2000) et chez les femmes déprimées (Y. Li et al. 2012). Les troubles n'amènent pas seulement une dégradation de la qualité de vie mais déclenchent également une cascade de modifications des fonctions endocriniennes et immunitaires qui accroissent la prédisposition à toute une série de maladies physiques (rapport OMS, 2001).

3.2.3 Origine des troubles anxieux dépressifs mixtes

Les troubles anxio-dépressifs mixtes peuvent s'expliquer par différentes causes dont une prédisposition génétique. Tout d'abord, un facteur génétique contribuant à l'internalisation des troubles, à la fois dans la dépression majeure (MDD), les troubles de l'anxiété généralisée (GAD) et les phobies, a été identifié et peut expliquer partiellement l'anxiété et la dépression rencontrées chez des jumeaux (Kendler et al. 2003). Il est clair qu'une origine génétique commune est une explication partielle, car certains facteurs génétiques particuliers ont pu être reliés à l'anxiété seule ou à la dépression (Kendler et al. 2003).

Les facteurs environnementaux jouent aussi un rôle important dans l'apparition et le maintien de ces troubles. En effet, il a été montré qu'un faible statut socio-économique dans l'enfance ou une période de chômage à l'âge adulte permet de séparer les patients avec MDD-GAD mixte des patients déprimés seul (Cerdá et al. 2010). De plus, une recherche clinique a montré qu'il existe des différences de caractéristiques cliniques entre les patients dépressifs en fonction des différents troubles de l'anxiété (Y. Li et al. 2012).

Récemment, des chercheurs ont montré que des traumatismes crâniens peuvent aussi contribuer à l'apparition de ces deux troubles (Schönberger et al.

2011). Selon ces travaux, 19% et 26 % des victimes étaient atteintes respectivement de dépression et/ou d'un trouble anxieux 6 mois après le traumatisme. Parmi ces patients, 11 % présentaient des troubles anxio-dépressifs (Schönberger et al. 2011).

Bien que la co-morbidité des troubles anxieux et dépressifs soit assez élevée, et qu'ils partagent quelques symptômes cliniques et des traitements communs, leurs étiologies sont différentes: les facteurs tels que la personnalité des sujets, les terrains génétiques et le facteur biologique sont différents, et les diagnostics cliniques également. Le traitement des troubles anxio-dépressifs est plus compliqué et difficile que le traitement de la dépression seule ou de l'anxiété seule (Brown et al. 2001).

3.3 Les régions cérébrales impliquées dans les troubles anxio-dépressifs

3.3.1 Le complexe amygdalien

L'hippocampe ventral a une forte connexion avec l'amygdale, mais ces deux régions ne peuvent pas être considérées comme réalisant une construction unitaire (McNaughton and Gray 2000; C. Shi and Davis 1999). L'hippocampe et l'amygdale contribuent de façon différente au mécanisme d'anxiété et de peur (McNaughton and Gray 2000). La peur est une réponse phasique à un objet qui est explicite, terrible et conditionnel, tandis que l'objet de l'anxiété est indistinct, inconditionnel et terrible selon C. Shi and Davis 1999). D'autres chercheurs ont pensé que la peur est liée à un évitement actif, une réponse d'évasion et un retrait de danger. Par contre, l'anxiété causée par un stimulus indistinct et horrible est associée à un conflit et à une incertitude (McNaughton and Gray 2000). La peur serait ainsi un précurseur logique de l'anxiété. En revanche, l'anxiété peut inhiber le système de la peur (McNaughton and Gray 2000). La peur conditionnelle est un modèle important des troubles anxieux (Fiddick 2011),

L'amygdale est une structure principalement connue pour son implication dans le traitement de l'information émotionnelle (incluant la nociception) et la mise en forme d'une réponse adaptée. Les études de neuroimagerie ont impliqué l'amygdale lors de stimulations caractéristiques qui peuvent provoquer la peur et

l'anxiété (Britton et al. 2006), et dans des changements de renforcement de stimuli de peur (Alvarez et al. 2008). Quelques études fonctionnelles contrôlées de neuroimagerie ont trouvé que chez les patients anxieux, l'activité de l'amygdale est augmentée en réponse à la vue d'un visage menaçant (Blair et al. 2008).

Les lésions de l'amygdale n'ont pas d'effets sur les performances dans le test de labyrinthe en croix surélevé ou « elevated plus maze » (EPM) (Kjelstrup et al. 2002) et dans les tests d'interactions sociales (Bannerman et al. 2002). Dans le test d'« Hyponéophagia », les animaux avec une lésion de l'amygdale ont eu besoin de plus de temps pour commencer à se nourrir, un résultats opposé de celui de la lésion de l'hippocampe ventral (Bannerman et al. 2002). Les lésions de l'amygdale ont produit des déficits robustes et fiables dans le test de la peur (J. E. LeDoux 1992). Un diminution de la densité gliale (Bowley et al. 2002), moins d'oligodendrocytes dans l'amygdale (Hamidi, Drevets, and Price 2004), ou un traitement anormale des stimuli émotionnels par l'amygdale peuvent induire une dépression majeure (Roberson-Nay et al. 2006). L'amygdale présente une densité élevée en sites de liaison des BZD (Niehoff and Kuhar 1983) . La perfusion directe de BZD dans l'amygdale provoque un effet anxiolytique dans plusieurs tests (Nagy, Zámbó, and Decsi 1979), mais pas dans le test « elevated plus maze » (EPM) (Treit, Pesold, and Rotzinger 1993), car les lésions de l'amygdale n'ont pas bloqué les effets d'un traitement aux BZD dans ce test (Gonzalez, Andrews, and File 1996). Récemment, les variations d'allèles de deux gènes sérotoninergiques (5-HTT et Tph2) ont été associées à l'activation de l'amygdale suite à la vue de visages fâchés chez l'Homme (Furmark et al. 2009).

3.3.2 Cortex cingulaire

Le cortex cingulaire est une zone épaisse de cortex encerclant le corps calleux ou corpus callosum (Shackman et al. 2011) et est une des parties la plus grande et la plus archaïque du système limbique dans le cerveau (Fiddick 2011). Les premières recherches ont suggéré qu'il joue un rôle critique dans l'affect et la motivation (Papez 1995). En plus de l'émotion (Kober et al. 2008), les études récentes ont montré que cette région est associée à la réaction à la douleur (Tracey 2007) et au contrôle cognitif (Cole et al. 2009).

De nombreux éléments indiquent que l'apprentissage de la peur et la

mémoire sont modulés par des changements synaptiques dans l'ACC (Zhuo 2008). Une stimulation électrique de l'ACC induit la mémoire de la peur (J. Tang et al. 2005). La formation de la mémoire de la peur s'accompagne d'un changement structural des neurones de l'ACC (Restivo et al. 2009). Chez l'homme, les neurones de l'ACC sont activés en réponse à des stimuli pernicieux (Hutchison et al. 1999)et sont nécessaires à la perception de la douleur (Rainville et al. 1997). Dans le test de la peur, l'activité de l'ACC est diminuée par la présence d'un choc électrique (Knight et al. 2004)

Quand des visages menaçants sont présentés à l'homme et à des animaux ou que ceux-ci sont confrontés à une situation effrayante, l'activité neuronale dans l'amygdale et le cortex cingulaire est changée (Jeon et al. 2010). Cette région a des liens importants avec d'autres structures cérébrales impliquées dans la modulation des comportements émotionnelles, et participe dans ce réseau étendu au traitement émotionnel et à la régulation de la réponse autonome (Schloesser, Martinowich, and Manji 2012). La dépression est multi-symptomatique associant des troubles de l'humeur, de la cognition, des comportements et de la fonction végétative. La perturbation de la fonction du cortex cingulaire peut influer sur les structures impliquées dans la pathophysiologie de la dépression (Hamani et al. 2011)

Hamani a suggéré que les projections du cortex cingulaire vers le cortex préfrontal peuvent interférer avec les processus exécutifs et cognitifs tandis que les projections vers l'hypothalamus peuvent perturber la fonction végétative conduisant à des troubles du sommeil (Saper, Scammell, and Lu 2005), de l'appétit et à des anomalies de la réponse au stress et du métabolisme du cortisol. Les projections du cortex cingulaire vers l'hippocampe et le cortex entorhinal peuvent influencer les fonctions cognitives.

Chez les patients dépressifs et anxieux, les études d'imagerie ont montré une augmentation de l'activité du cortex cingulaire (Konarski et al. 2009), tandis qu'une diminution de l'activité a été observé après un traitement avec un ISRS ou avec une thérapie électro-convulsive (Nobler et al. 2001). Certaines études ont aussi montré que le volume du cortex cingulaire est diminué chez les patients avec une dépression familiale, une dépression psychotique ou chez les patients ayant un

trouble bipolaire (J. L. Price and Drevets 2010). Cependant, d'autres équipes n'ont pas observé ce phénomène (Brambilla et al. 2002). Par ailleurs, une diminution de la densité gliale et un réduction de la taille neuronale sont observées chez les patients déprimés (Cotter et al. 2001).

3.3.3 La formation hippocampique

L'hippocampe est une structure limbique extrêmement sensible aux hormones du stress, qui semble jouer un rôle majeur dans la physiopathologie et le traitement des troubles de l'humeur, et module la réponse antidépressive dans les modèles comportementaux de la dépression. L'hippocampe surveille et règle les fonctions de l'axe HPA. La lésion de l'hippocampe affaiblit la contrôle de la réponse hormonal au stress (Dedovic et al. 2009). Inversement, une augmentation des hormones du stress peut conduire à un dysfonctionnement de l'hippocampe chez l'Homme et chez les Rongeurs (Herman et al. 2005).

Les études de lésions ont confirmé les différentes fonctions comportementales associées aux sous-régions ventrale et dorsale de l'hippocampe Les rats chez lesquels on a réalisé une lésion ventrale présentent une perturbation de la réponse à la peur dans le test de conditionnement contextuel à la peur ("Contexual Fear Conditionning"), une diminution de l'anxiété dans différents paradigmes expérimentaux (le test de la cage claire/obscure, test d'hyponéophagie, open field (Bannerman et al. 2003). Dans d'autres études, la lésion de la région ventrale a montré un effet anxiolytique (McNaughton and Gray 2000), associé à diminution des taux plasmatiques de corticostérone suite à un stress (Kjelstrup et al. 2002). En comparaison, la lésion de la région dorsale de l'hippocampe diminue l'apprentissage spatial dans les tests de mémoire tels que "l'appetitive maze task" en altérant aussi bien le travail spatial et la mémoire spatiale (Bannerman et al. 2003). Cependant, les lésions dorsales ne semblent pas être responsables d'effets majeurs dans les tests d'anxiété (Bannerman et al. 2003; Kjelstrup et al. 2002).

Les études de la fonction de l'hippocampe se sont concentrées sur la mémoire et l'apprentissage (Squire, Stark, and Clark 2004). Cependant, il y a de nombreux éléments qui indiquent un rôle clé de l'hippocampe dans la régulation de l'anxiété (McNaughton and Gray 2000). L'équipe de Moser (Moser and Moser 1998) a proposé que l'hippocampe ne travaille pas comme une structure unitaire.

En effet, les différences des profils d'expressions de gènes et des projections anatomiques suivis l'axe de dorsal-ventral suggèrent de diviser l'hippocampe en plusieurs zones indépendantes dédiées à des fonctions distinctes (Fanselow and Dong 2010). De plus, les études sur les expressions de gènes ont montré que certains gènes sont exprimés de façon différente dans l'hippocampe dorsal et ventral (Leonardo et al. 2006): par exemple, les gènes Wolframin, LPH, Epha7 sont plus riches dans l'hippocampe ventral que dorsal, tandis que les gènes Dcn, Neuromatin sont exprimés préférentiellement dans l'hippocampe ventral (Leonardo et al. 2006).

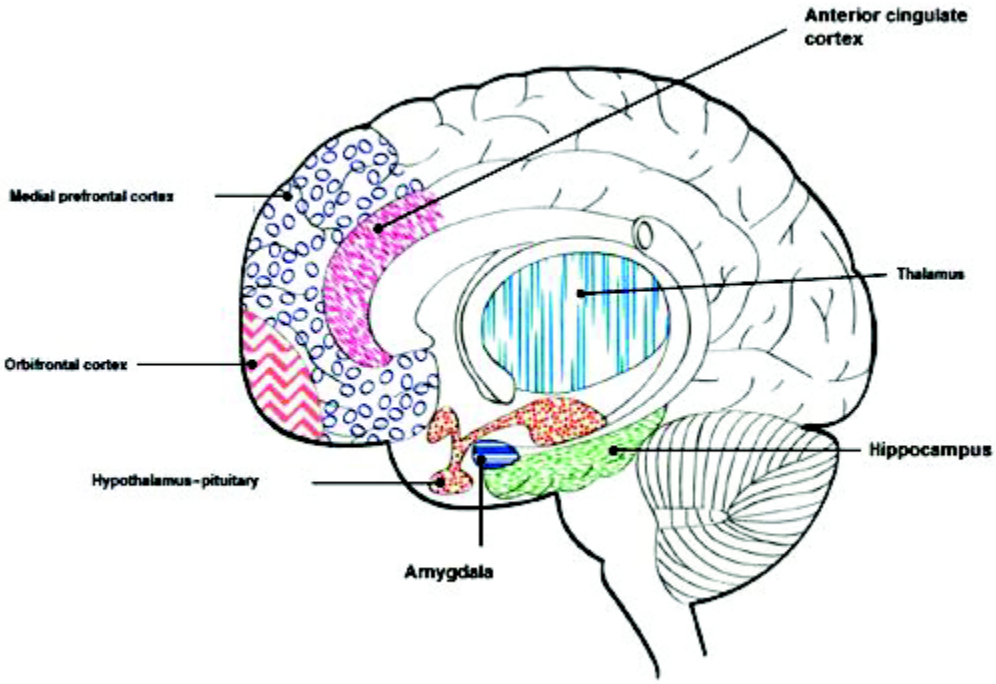


Figure 14 : Circuit du système limbique-préfrontal important dans les troubles de l'humeur. Circuit reliant les régions du cerveau, y compris le cortex préfrontal, l'amygdale, l'hippocampe et le système de l'axe Hypothalamo-hypophyso-surrénalien, qui jouent un rôle important dans les troubles de l'humeur et sont probablement ciblées par les médicaments stabilisateur de l'humeur (D'après Schloesser, Martinowich, and Manji 2012)

3.4 Rôle des noyaux sérotoninergiques dans les troubles anxio-dépressifs

Les symptômes anxio-dépressifs répondent souvent à la thérapie médicamenteuse par les ISRS indiquant une possible dysfonction neuronale

commune dans tous les deux pathologies psychiatriques (Hanns Möhler 2012). De nombreuses études ont montré l'importance du système sérotoninergique central dans le contrôle et la régulation des troubles de l'humeur tels que l'anxiété ou la dépression. Le système sérotoninergique peut contrôler le sommeil, moduler les comportements, réguler la température corporelle (Gingrich and Hen 2001). Une meilleure connaissance de ce système permettrait d'améliorer la compréhension de l'étiologie des troubles anxio-dépressifs et de développer les médicaments encore plus efficaces.

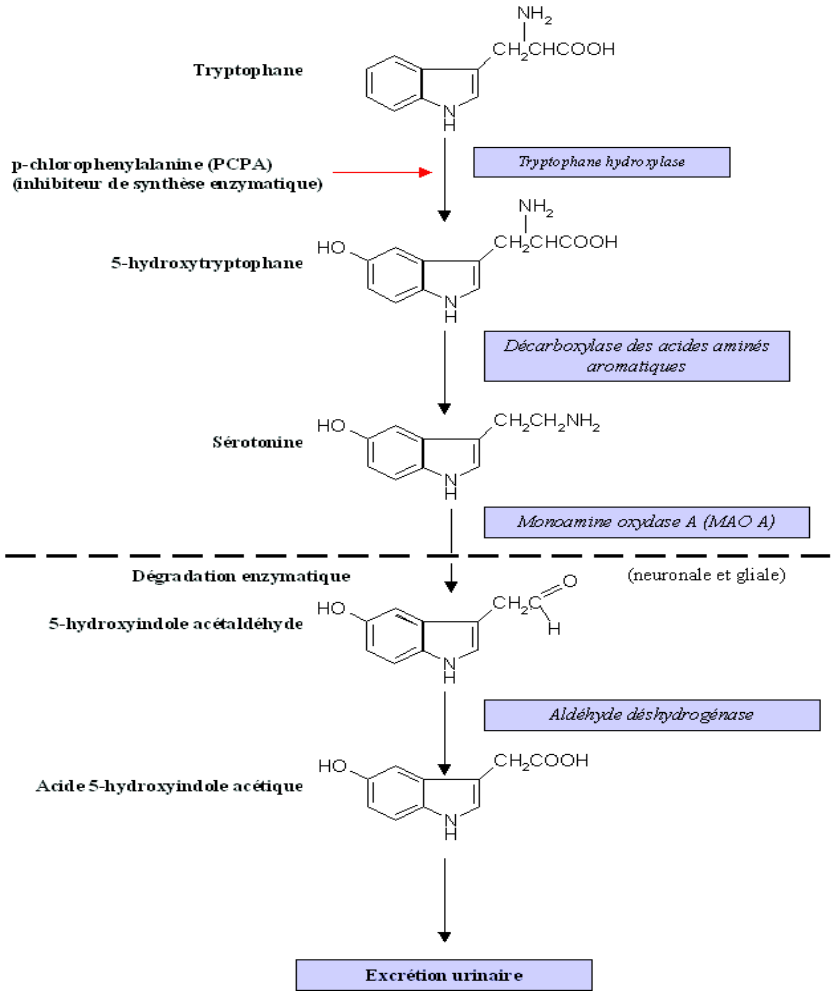


Figure 15 : Métabolisme de la sérotonine. A partir de l'isomère L du tryptophane, l'étape limitante dans la voie de biosynthèse de la sérotonine est catalysée par la tryptophane hydroxylase. Dans le système nerveux, cette enzyme est exclusivement localisée dans les neurones sérotoninergiques. D'après (M. Hamon 1995b).

3.4.1 Les neurones sérotoninergiques

Les corps cellulaires des neurones sérotoninergiques identifiés par histochimie de fluorescence (Dahlström and Fuxe 1964) et immunohistochimie (Jansson et al. 1998), situés principalement dans le tronc cérébral, constituent l'ensemble des noyaux du raphé (Dahlström and Fuxe 1964). Environ 30% des neurones des noyaux du raphé sont sérotoninergiques. L'innervation sérotoninergique est diffuse et on peut détecter des terminaisons sérotoninergiques dans tout le SNC (FUXE 1965). On en retrouve aussi dans le noyau suprachiasmatique de l'hypothalamus. Les noyaux du raphé dorsal et médian sont composés de corps cellulaires, dont la majorité de fibres se terminent dans de nombreuses régions antérieures du cerveau et en particulier dans les structures limbiques comme le cortex préfrontal, le striatum, le septum, l'hippocampe, l'hypothalamus, le thalamus et les noyaux de l'amygdale (Grozdanovic and Baumgarten 1996) impliquées dans le contrôle des émotions. Les noyaux du raphé magnus, pallidus et obscurus se projettent principalement du cerveau vers la moelle épinière par des voies descendantes. De plus, les noyaux du raphé reçoivent des afférences de multiples origines : du septum, du cortex préfrontal et cingulaire, de la substance noire, de l'hypothalamus, de l'amygdale (Peyron et al. 1998) et aussi des noyaux du raphé eux-mêmes, le noyau du raphé médian envoyant, par exemple, des projections qui se terminent dans le noyau du raphé dorsal (Tischler and Morin 2003)

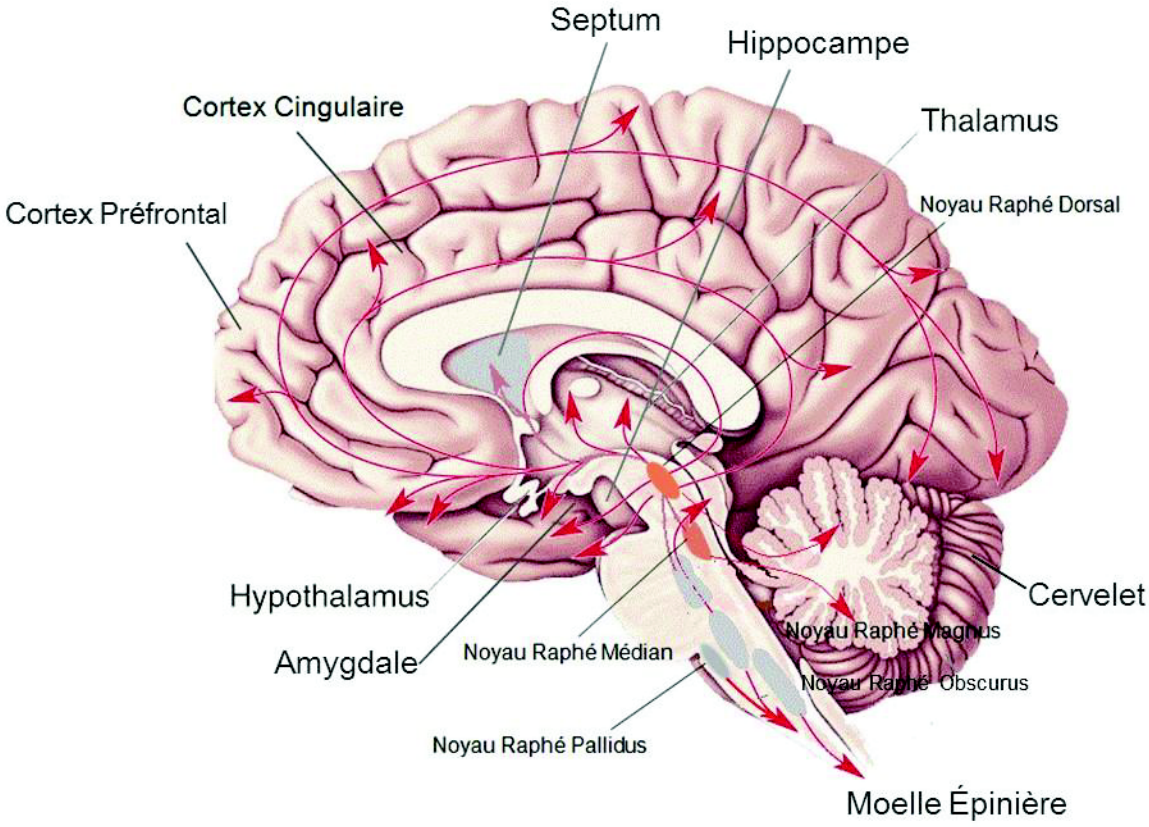


Figure 16 : Représentation schématique de l'innervation sérotoninergique du Système Nerveux Central chez l'homme. D'après (M. Hamon 1995b).

Les corps cellulaires des neurones sérotoninergiques sont regroupés essentiellement en noyaux localisés dans la région sagittale du tronc cérébral, constituent l'ensemble des noyaux du raphé (dorsal, médian, magnus, pallidus et obscurus). Les fibres des noyaux du raphé dorsal et médian se terminent dans le cortex préfrontal, le striatum, le septum, l'hippocampe, l'hypothalamus, le thalamus et les noyaux de l'amygdale. Les noyaux du raphé magnus, pallidus et obscurus se projettent principalement du cerveau vers la moelle épinière

3.4.2 Les récepteurs sérotoninergiques

Le système sérotoninergique comprend une quinzaine de types et sous-types de récepteurs de la sérotonine (Pytliak et al., 2011) classés en 7 familles (**Tableau 9**) : 5-HT1 (1A, 1B/1D, 1E, 1F) ; 5-HT2 (2A, 2B, 2C) ; 5-HT3 (3A, 3B, 3C), 5-HT4(4A-4H), 5-HT5 (5A, 5B), 5-HT6 et 5-HT7 (**Tableau 9**).

Family	Potential	Type	Mechanism of action
5-HT$_1$	Inhibitory	G_i/G_0-protein coupled	Decreasing intracellular concentration of cAMP
5-HT$_2$	Excitatory	G_{q11}-protein coupled	Increasing intracellular concentration of IP3 and DAG
5-HT$_3$	Excitatory	Ligand-gated Na^+/K^+ channel	Depolarization of cell plasma membrane
5-HT$_4$	Excitatory	G_s-protein coupled	Increasing intracellular concentration of cAMP
5-HT$_5$	Inhibitory	G_i/G_0-protein coupled	Decreasing intracellular concentration of cAMP
5-HT$_6$	Excitatory	G_s-protein coupled	Increasing intracellular concentration of cAMP
5-HT$_7$	Excitatory	G_s-protein coupled	Increasing intracellular concentration of cAMP

Tableau 9 : Les différents types de récepteurs de la sérotonine (5-HT).
(D'après (Pytliak et al. 2011)

Tous les sous-types de récepteurs peuvent se trouver sur les neurones postsynaptiques (Pytliak et al. 2011). Par ailleurs, les récepteurs 5-HT1A et 5-HT1B sont localisés aussi sur les corps cellulaires des neurones présynaptiques et dendritiques (M. Hamon 1995a). Une stimulation des récepteurs présynaptiques peut inhiber l'activité électrique des neurones (ou firing), la synthèse et la libération de la sérotonine car ces autorécepteurs sont couplés à une protéine Gi/o et mobilisent une conductance potassique quand ils sont activés (effecteur, un canal K+) (Göthert and Schlicker 1990)

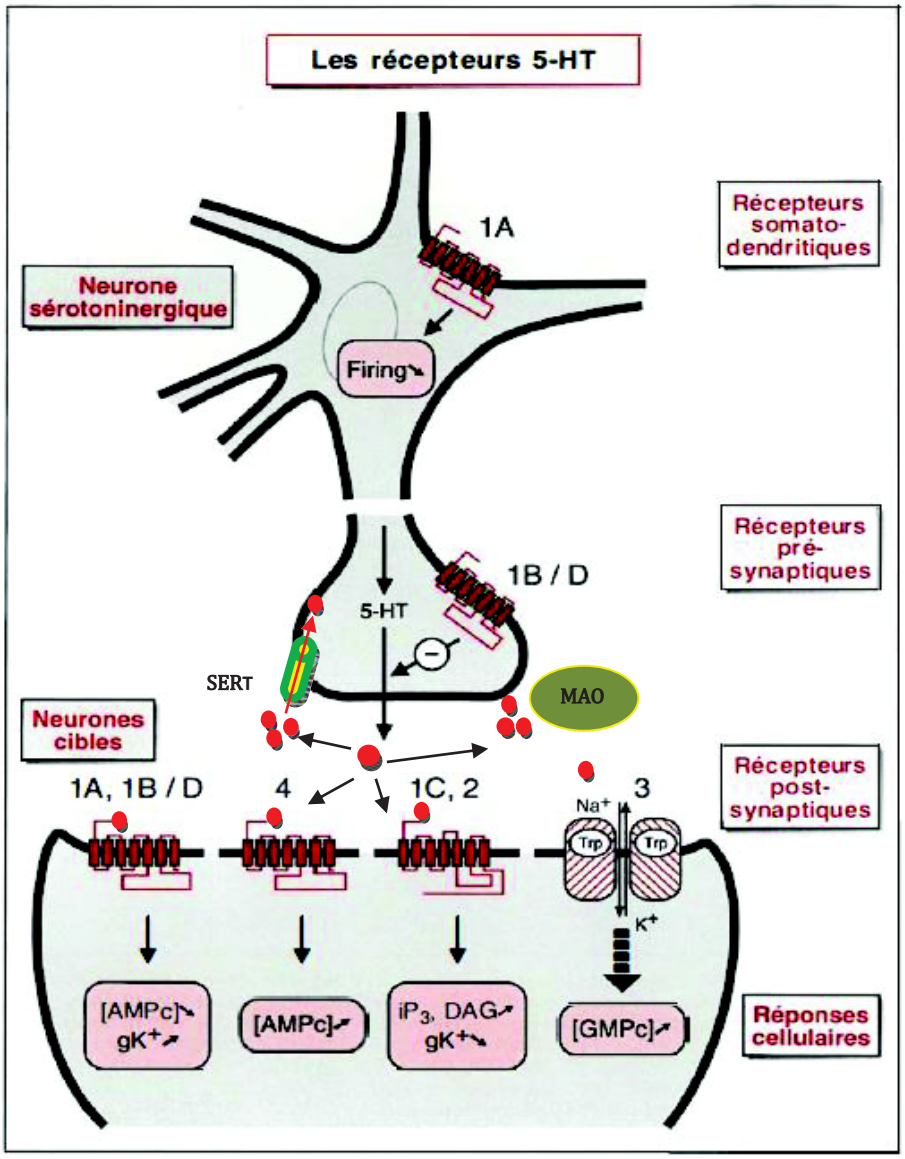


Figure 17 : Localisation des différents types de récepteurs centraux de la 5-HT par rapport aux neurones sérotoninergiques. Tous les récepteurs, qu'ils soient (5-HT1A, 5-HT1c, 5-HT10, 5-HT2 ou non (5-HT3), couplés à des protéines G sont situés sur les cibles postsynaptiques des neurones sérotoninergiques. En outre, le récepteur 5-HT1A est également présent sur les somas et les dendrites de ces neurones (autorécepteurs somatodendritiques) tandis que les récepteurs 5-HT11/5-HT10 sont situés sur leurs terminaisons (autorécepteurs présynaptiques). La stimulation des autorécepteurs 5-HT1A provoque une inhibition de l'activité électrique (firing) des neurones sérotoninergiques ; celle des autorécepteurs 5-HT11y'5-HT10 déclenche un frein de la libération de 5-HT à partir des terminaisons. La stimulation des récepteurs couplés aux protéines G provoque l'activation (+) ou l 'inhibition (-) de systèmes de seconds messagers ou de conductances ioniques (gK notamment) ; celle des récepteurs 5-HT3 se traduit par l'ouverture d'un canal pour les ions Na + et K + . La dépolarisation qui en résulte entraîne finalement une augmentation des concentrations intracellulaires de Ca 2 + et de GMP cyclique. SERT : transporteur de la sérotonine. MAO : monoamine oxydase. (M. Hamon 1995b)

Je limiterai la présentation des récepteurs de la sérotonine à certains sous-types impliqués potentiellement dans les troubles anxio-dépressifs : soit les récepteurs 5-HT1A, 5-HT1B qui ont fait l'objet de beaucoup d'attention.

L'activité d'un neurone sérotoninergique est en partie régulée par deux types d'autorécepteurs 5-HT1A et 5-HT1B et par le transporteur de la sérotonine (5-HTT) (Piñeyro and Blier 1999). Pendant l'activité électrique, la sérotonine est libérée par les terminaisons neuronales et active les récepteurs 5-HT disponibles. Pour réguler l'activité électrique et la libération de la sérotonine, trois mécanismes de rétrocontrôle ont été identifiés permettant de moduler l'activité de ces neurones. Premièrement, le transporteur 5-HTT membranaire situé sur la terminaison synaptique et les dendrites des neurones sérotoninergique : il sert à la recapture de la sérotonine et assure son retour dans le neurone qui l'a libérée. Ce transporteur est la cible des principaux antidépresseurs actuels, les ISRS qui le bloquent de façon dose-dépendante. La conséquence de ce blocage est le maintien de concentrations élevées de 5-HT dans la synapse, et donc une activation de la neurotransmission sérotoninergique centrale. Ensuite, l'activation des autorécepteurs 5-HT1B au niveau de la terminaison synaptique inhibe directement la libération de la sérotonine. Enfin, l'autorécepteur 5-HT1A somatodendritique dont l'activation diminue indirectement la libération de la sérotonine grâce à l'inhibition de l'activité électrique des cellules (Olivier and van Oorschot 2005).

3.4.2.1 Rôles des récepteurs 5-HT1A/1B

- Evidences chez l'Homme

Etant donné le rôle central du récepteur 5-HT1A dans la régulation du système sérotoninergique, de nombreuses études ont examiné le rôle de ce récepteur dans l'étiologie de l'anxiété/dépression. Le **Tableau 10** indique le niveau d'expression des récepteurs 5-HT1A dans différentes structures cérébrales chez les sujets dépressifs. Utilisant différentes méthodes (liaison, PET, ARNm), la plupart de ces études sont en faveur d'une baisse ou d'une absence de modification de l'expression du récepteur 5-HT1A. Ainsi, une tendance à une diminution de leur expression apparaît comme un bon indicateur d'un état dépressif. Le niveau d'expression des récepteurs 5-HT1A est diminué chez les patients dépressifs par rapport à des sujets sains : ces effets correspondent à des réponses à l'agoniste du

récepteur 5-HT1A in vivo et à la liaison de ce récepteur à des fragments de tissu cérébral (Drevets et al. 2007)

Le **Tableau 10** souligne également la variabilité de ces résultats, probablement en raison des variations de l'intensité de l'état dépressif des patients, de la nature de leur traitement antidépresseur, des approches méthodologies et/ou, des régions cérébrales étudiées. Par exemple, des études post mortem menées chez des patients suicidés soulignent l'importante augmentation de la densité des autorécepteurs 5-HT1A dans le NRD (Boldrini et al. 2008). D'autres études de tomographie par émission de positrons (PET) chez des patients dépressifs, ont révélé une diminution de la capacité de liaison de ces récepteurs (Drevets et al. 2007). Cependant, chez ces patients, de nombreux éléments peuvent expliquer cette diminution d'expression du récepteur, notamment la diminution du nombre de neurones sérotoninergiques, l'action d'un traitement antidépresseur ou d'une élévation chronique des concentrations de cortisol plasmatique.

Région cérébrale	Méthode	Variation	Références
Raphé	Liaison	Augmention	Stockmeier et al., 1998
Raphé	Liaison	Diminution	Arango et al., 2001
Raphé	PET	Diminution	Drevets et al., 2000 ; Meltzer et al., 2004
Hippocampe	ARNm	Diminution	Lopez-Figueroa et al., 2004 ;
Cortex frontal	PET	Diminution	Bhagwagar et al., 2004 ; Sargent et al., 2000 ; Drevets et al., 2000.
Cortex frontal	ARNm	Diminution	Lopez-Figueroa et al., 2004 ;
Raphé	PET	Inchangé	Bhagwagar et al., 2004
Hippocampe	Liaison	Inchangé	Lowther et al., 1997; Stockmeier et al., 1997
Cortex frontal	Liaison	Inchangé	Arranz et al., 1994; Lowther et al., 1997; Stockmeier et al., 1997
Cortex frontal	PET	Inchangé	Meltzer et al., 2004

Tableau 10 : Résumé de l'expression des récepteurs 5-HT1A chez des patients dépressifs d'après la littérature.

En outre chez les individus dépressifs suicidés, une diminution du nombre de neurones sérotoninergiques exprimant le transporteur de la sérotonine dans le noyau du raphé dorsal (Arango et al. 2001) est accompagnée d'une diminution du nombre de projections sérotoninergiques vers le cortex (Austin et al. 2002). Du côté post- synaptique, une diminution de l'expression d'ARNm de ce récepteur a été observée dans l'hippocampe des patients (López-Figueroa et al. 2004). La diminution des récepteurs 5-HT1A a également été mesurée par PET dans le cortex préfrontal chez des patients souffrant d'épisodes dépressifs (Moses-Kolko et al. 2008).

On sait que le récepteur 5-HT1A est impliqué dans le traitement de la dépression et de l'anxiété. En effet, en clinique, différents types d'agents pharmacologiques ciblant le récepteur 5-HT1A sont utilisés dans le traitement de différents troubles anxio-dépressifs :

- l'agoniste des récepteurs 5-HT1A, la buspirone pour ses propriétés anxiolytiques modérées chez l'homme (Feighner and Boyer 1989), mais plus convaincantes dans des modèles animaux (Costall et al. 1988).
- Un beta bloquant, le pindolol, utilisé pour ses propriétés antagoniste des récepteurs 5-HT1A a été proposé afin de diminuer le long délai d'action des ISRS (Artigas et al. 1996) et augmenter leur efficacité clinique chez les patients résistants à un traitement antidépresseur classique (Arborelius et al. 1996)). Cette co-administration dès le début du traitement permet une inactivation plus rapide des autorécepteurs 5-HT1A que celle obtenu lors de la désensibilisation progressive de ces autorécepteurs après traitement chronique avec un ISRS (Stockmeier, Wingenfeld, and Gudelsky 1992)

- Evidences dans des modèles animaux

Afin de mieux comprendre le mécanisme de l'activation des récepteurs 5-HT1A et les conséquences comportementales dans les troubles anxio-dépressifs, les chercheurs ont créé différentes souris mutées pour le récepteur 5-HT1A, dites «knockout» constitutives, obtenues par recombinaison homologue (KO 5-HT1A) issues de trois fonds génétiques différents, [fond 129/Sv (Ramboz et al. 1998), C57Bl/6J (Heisler et al. 1998)) et Swiss Webster (Parks et al. 1998). Ces différents

modèles ont permis de confirmer que le récepteur 5-HT1A module les comportements de type anxieux. Toutes les souris KO 5-HT1A de trois fonds génétiques différents présentent un phénotype hyper-anxieux dans plusieurs tests comme le labyrinthe en croix surélevé, le test de la double enceinte éclairée et le test du champ ouvert ou « Open Field » (Zhuang et al. 1999). D'autres modèles, issus d'une construction génétique plus complexe, ont permis de mettre en évidence que l'activation de l'hétérorécepteur postsynaptique 5- HT1A au cours du développement normalise le comportement émotionnel chez la souris (Gross et al. 2002). Il semble que l'expression du récepteur 5-HT1A dans l'hippocampe et le cortex soit essentielle pour établir un phénotype comportemental « normal » (Alexandre et al. 2006). Des études très récentes ont également montré que la suppression génétique des autorécepteurs tout au long de la vie de l'animal est nécessaire et suffisant pour induire un phénotype anxieux chez l'animal ((Richardson-Jones et al. 2011)).Il faut noter que les animaux surexprimant le récepteur 5-HT1A pendant la période postnatale, présentent, à l'inverse, des comportements anxieux réduits (Kusserow et al. 2004). Enfin de façon, intéressante, il a été rapportée que l'augmentation de la neurogenèse par les ISRS est bloquée chez les souris KO 5-HT1A ((Luca Santarelli et al. 2003). Or, ce processus semble être un des éléments nécessaires (mais pas suffisant) pour obtenir la réponse antidépressive d'un ISRS. En effet, dans les modèles animaux d'anxiété/dépression, par exemple le stress modéré chronique ou« chronic mild stress » (CMS) (Bessa et al. 2008), un traitement chronique aux ISRS induit une amélioration comportementale chez la souris, qui est corrélée à une augmentation de la neurogenèse hippocampique adulte. Ceci avait été montré au préalable chez le rat naïf, non déprimé (Malberg et al. 2000). En effet, un traitement chronique de fluoxétine induit la prolifération des cellules progénitrices du gyrus dentelé de l'hippocampe, et accélère la maturation des nouveaux neurones qui vont intègrer le circuit neuronal (J.-W. Wang et al. 2008)

3.4.2.2 Les récepteurs 5-HTlB

Certain chercheurs ont mesuré une réduction de la liaison du récepteur 5-HT1B dans le striatum ventral chez les patients dépressifs (Murrough and Neumeister 2011). Cependant, son implication précise dans les troubles anxio-dépressifs reste à définir. Les souris KO 5-HT1B présentent une augmentation de

leur comportement agressif, du comportement exploratoire et de l'impulsivité motrice par rapport au souris normales (Bouwknecht et al. 2001). Les souris KO 5-HT1B ont aussi une réponse autonome et locomotrice exagérée à un stress aigu (Bouwknecht et al. 2001). Dans les tests comportementaux de peur non conditionnée, les souris KO 5- HT1B ne présentent pas de différences par rapport à leurs congénères sauvages (**Tableau 12**).

Test	Paramètre observé	Effet de la mutation	Référence
Labyrinthe en Croix surélevée	Entrées dans les bras ouverts Temps passé dans les bras ouverts Entrées dans les bras fermés Temps passé dans les bras fermés	Aucun effet	Brunner et al. 1999 Crabbe et al. 1999 Malleret et al. 1999 Lopez-Rubalcava Hen et al. 2000)
Champ Ouvert	Entrées au centre de l'Open Field Temps passé au centre de l'Open Field Activité Locomotrice	Aucun effet	Saudou et al. 1994 Crabbe et al. 1999 Scearce-Levie et al. 1999 Zhuang et al. 1999 Malleret et al, 1999
Test de la cage claire/obscure	Tems passé dans le compartiment clair	Aucun effet	Ramboz et al. 1996)

Tableau 12 : Résumé du phénotype comportemental des souris KO 5-HT1B dans différents tests d'anxiété.

Dans le test de la nage forcée, les souris KO 5-HT1B, contrairement aux souris KO 5-HT1A, ne présentent pas de modifications du temps de nage à l'état basal (Gardier et al. 2001). De plus, les ISRS ne diminuent pas le temps d'immobilité des souris KO 5-HT1B suggérant que ces récepteurs sont nécessaires pour observer l'activité antidépressive des ISRS dans ce test. Le récepteur 5-HT1B est important pour la modulation du comportement agressif et la fonction de la sérotonine dans les comportements. Ce récepteur semble pourtant jouer un rôle important dans le pathophysiologie des pathologies psychiatriques telles que la dépression, l'anxiété et l'agressivité (Murrough and Neumeister 2011).

3.5 Traitements

3.5.1 Traitements antidépresseurs

Depuis les années 1950, on a découvert plusieurs familles d'antidépresseurs (**Figure 18**). D'abord, les inhibiteurs de monoamine oxydase (IMAO) sont les premiers antidépresseurs utilisés à partir de 1950 (tel que la phénelzine) qui augmente la concentration en sérotonine en inhibant les monoamines oxydases chargées de sa dégradation. Mais, les IMAO ont des effets indésirables graves comme les interactions avec d'autres médicaments. Les IMAO ont été remplacés rapidement par les antidépresseurs tricycliques (ATC) comme l'imipramine. Les ATC peuvent augmenter les concentrations de neurotransmetteurs (la sérotonine, la noradrénaline ou la dopamine) par inhibition de la recapture présynaptique de ces monoamines. Les ATC ont aussi des inconvénients : un long délai d'action (4 à 6 semaines), et une altération des rythmes cardiaques etc.. Enfin, les chercheurs ont développé d'autres antidépresseurs, moins toxiques que les TCA. Les inhibiteurs sélectifs de la recapture de la sérotonine (ISRS) élèvent la concentration de sérotonine dans la synapse en inhibant sélectivement sa recapture présynaptique. En clinique, les ISRS sont largement utilisés pour le traitement de la dépression et des troubles anxieux. Jusqu'à aujourd'hui, de nouveaux antidépresseurs sont apparus régulièrement sur le marché comme, par exemple, les inhibiteurs du recapture mixte de la sérotonine et de la noradrénaline (IRSNa), les Inhibiteurs sélectifs de la recapture de la noradrénaline (ISRN), et l'agomélatine, antidépresseur ayant un mécanisme d'action original, puisque c'est à la fois un agoniste des récepteurs mélatoninergiques MT1 et MT2, et un antagoniste des récepteurs de la sérotonine de type 5-HT2C (de Bodinat et al. 2010).

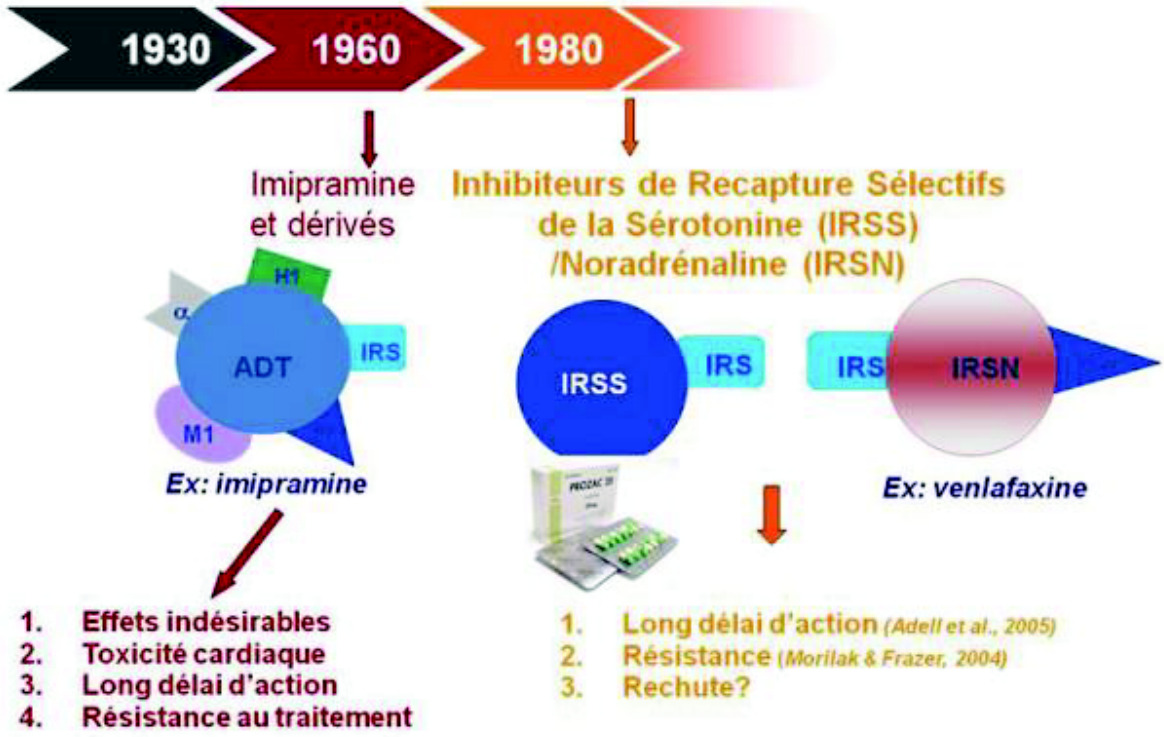


Figure 18 : Chronologie de la découverte des principaux traitements antidépresseurs, leur mécanisme d'action et leurs inconvénients

3.5.1.1 Les inhibiteurs sélectifs de la recapture de la sérotonine (ISRS)

Depuis les années 1980, le développement des inhibiteurs sélectifs de la recapture de la sérotonine (ISRS) a permis une avancée majeure dans le traitement de la dépression. Les ISRS augmentent les concentrations intrasynaptiques de sérotonine par blocage immédiat du transporteur sérotoninergique (SERT) qui assure la recapture de la sérotonine par le neurone. Cette augmentation se traduit par une plus grande intensité et durée de stimulation des récepteurs post-synaptiques (Lesch 2001). Des études in vitro montrent que les différents ISRS bloquent le transporteur SERT avec une affinité de 10 à 3000 fois supérieure à celle du transporteur de la noradrénaline (NAT). Les études de microdialyse intracérébrale et d'électrophysiologie menées chez le rat ou la souris montrent que l'administration d'une dose unique d'ISRS provoque une plus forte augmentation des concentrations extracellulaires de 5-HT ([5-HT]ext) autour des corps cellulaires situés dans les noyaux du raphé (Guilloux et al. 2006) que dans les régions cérébrales riches en terminaisons sérotoninergiques (Guilloux et al. 2006).

Cependant, suite au blocage de SERT par les ISRS, les autorécepteurs somatodendritiques 5-HT1A et terminaux 5-HT1B sont activés par la 5-HT endogène qui s'accumule dans le milieu intra-synaptique. Un rétrocontrôle négatif s'exerce alors sur la libération de sérotonine. En microdialyse intracérébrale, après traitement chronique avec un ISRS, on observe une désensibilisation des autorécepteurs 5-HT1A (Popa et al. 2010), c'est-à-dire objectivé par l'absence de réponse d'un ligand sélectif de ces récepteurs : un agoniste, le 8-OH-DPAT (Dawson et al. 2002; Newman et al. 2004) ou un antagoniste, le WAY 100635 (Dawson et al. 2002), sur la neurotransmission 5-HT chez le Rat. Les études observant les effets d'un traitement ISRS chronique sur l'activité des autorécepteurs terminaux 5-HT1B amènent à des conclusions contradictoires. Si certaines révèlent des modifications de l'activité inhibitrice des autorécepteurs 5-HT1B (Newman et al. 2004), d'autres n'ont pas réussi à identifier de telles altérations chez le rat (Cremers et al. 2000) ou chez la souris (Gardier et al. 2003). Deux exemples : (1) chez le Rat, l'administration chronique d'un ISRS, la fluoxétine, désensibilise les autorécepteurs 5-HT1B dans le cortex frontal (Lifschytz et al. 2004) ; (2) chez la souris, le blocage soutenu du transporteur de la sérotonine par la paroxetine (1 mg/kg/j pendant 14 jours), ne potentialise pas les effets d'une dose challenge de paroxétine sur les concentrations extracellulaires de 5-HT dans l'hippocampe (Gardier et al. 2003)

Il est probable que des différences de conditions expérimentales (espèce animale, rythme d'administration, durée du traitement) expliquent les divergences constatées entre ces travaux.

Les effets thérapeutiques des antidépresseurs sérotoninergiques sont observés seulement après un délai d'action de 3 à 4 semaines de traitement (Wang et al., 2001). Cependant, environ 30% des patients déprimés sont résistants au traitement. Ce long délai d'action serait associé à un profil temporel de désensibilisation des récepteurs spécifiques de la sérotonine (Gardier et al. 1996) et aussi aux changements structurels du circuit neuronal et l'implication de la neurogenèse hippocampique adulte (Sahay and Hen 2007). Dans les modèles animaux d'anxiété/dépression, un traitement chronique aux ISRS induit une amélioration comportementale, qui est corrélée à une augmentation de la neurogenèse hippocampique (Malberg et al. 2000). Brièvement, l'ablation de la

genèse de nouveaux neurones dans l'hippocampe par irradiation aux rayons X supprime à la fois la prolifération des cellules progénitrices du gyrus dentelé de l'hippocampe, la maturation des nouveaux neurones et certains effets comportementaux d'un traitement chronique ISRS (Luca Santarelli et al. 2003). De plus, l'augmentation de la neurogenèse hippocampique par les ISRS est bloquée chez les souris KO 5-HT1A de souche C57Bl/6j (Luca Santarelli et al. 2003)

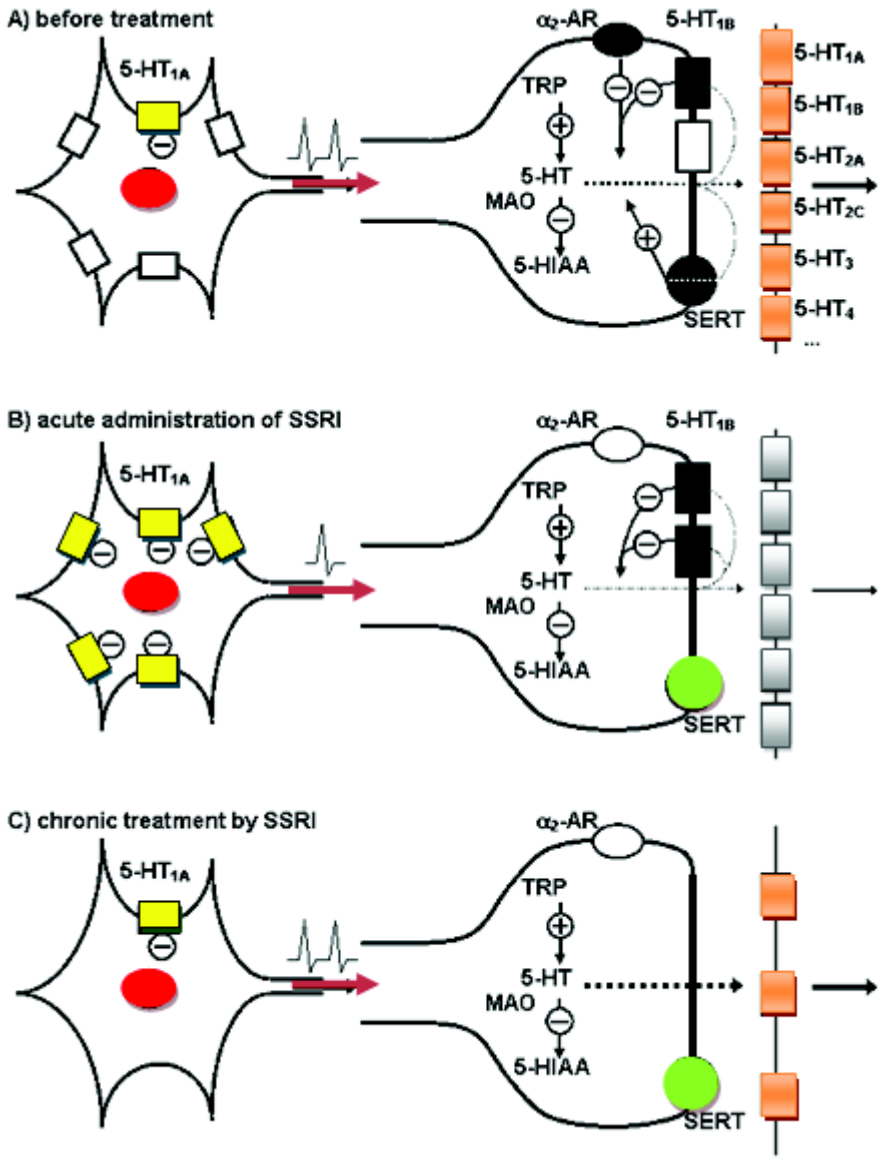


Figure 19 : Mécanisme d'action pré-synaptique des ISRS. Voir texte pour les détails (d'après http://psych.lf1.cuni.cz/bpen/psychopharmacology.htm)

Avant le traitement (Figure 19 A) : Il y a un déficit relatif de 5-HT dans les neurones sérotoninergiques chez un patient dépressif. De nombreux types de récepteurs de la sérotonine sont surexprimés dont les autorécepteurs somatodendritiques 5-HT1A et terminaux 5-HT1B présynaptiques ainsi que les récepteurs post-synaptiques. La libération de la sérotonine dans la fente synaptique peut être affectée: 1. positivement par l'activité de transporteur de la sérotonine ou par la disponibilité du L-tryptophane (TRP, précurseur de la sérotonine); 2. Négativement par l'activation des récepteurs présynaptiques 5-HT1B et les récepteurs somatodendritiques 5-HT1A qui exercent un rétrocontrôle négatif sur la synthèse et la libération de 5-HT.

Après l'administration aiguë des ISRS (Figure 19 B): Le transporteur de la sérotonine est bloqué par l'ISRS ce qui a pour conséquence pour la sérotonine de rester plus longtemps dans l'espace extracellulaire. Cela provoque principalement une augmentation de la sérotonine dans la zone somatodendritique. Le rétrocontrôle négatif exercé par les récepteurs inhibiteurs présynaptiques et somatodendritiques est augmenté, les fréquences de décharge en potentiels d'action et les concentrations de sérotonine libérée au niveau présynaptique sont diminuées.

Après un traitement chronique par ISRS (**Figure 19 C**): L'augmentation de la 5-HT extracellulaire active de façon prolongée les autorécepteurs inhibiteurs somatodendritiques ce qui les désensibilise progressivement. Ce phénomène expliquerait pourquoi l'action thérapeutique des antidépresseurs n'est pas immédiate.

Les résultats sont plus convaincants lorsqu'il s'agit des autorécepteurs 5-HT1A. Un consensus existe chez les Rongeurs pour affirmer que l'administration chronique d'un ISRS désensibilise les autorécepteurs 5-HT1A somatodendritiques. L'effet thérapeutique des ISRS pourrait donc être potentialisé par le blocage des récepteurs 5-HT1A par un antagoniste sélectif, empêchant ainsi l'inhibition de la libération de 5- HT par l'activation de ces autorécepteurs. Un traitement chronique avec la fluoxétine ((Anthony, Sexton, and Neumaier 2000) ou la paroxétine (Anthony, Sexton, and Neumaier 2000) diminue l'expression de l'ARNm du récepteur 5-HT1A dans les noyaux du raphé, mais pas dans l'hippocampe chez le

rat. De plus, ces effets semblent être spécifiques des autorécepteurs puisqu'aucun changement n'a été observé sur les hétérorécepteurs des neurones non sérotoninergiques (Neumaier, Root, and Hamblin 1996). Contrairement aux récepteurs 5-HT1A, les arguments en faveur de la désensibilisation des récepteurs 5-HT1B après une administration d'un ISRS sont plus faibles (Jongsma et al. 2005).

3.5.1.2 L'agomélatine

Le développement de molécules à action antidépressive et capables d'agir sur plusieurs systèmes à la fois semble une piste intéressante (M J Millan et al. 1997). En effet, par exemple, il a été montré que la co-administration d'un ISRS avec du lithium améliore les bénéfices thérapeutiques du ISRS (Wong et al. 2008). L'agomélatine (Valdoxan, S20098) développée par les laboratoires Servier, a été mise sur marché dans plus de 72 pays depuis 2009 (Carney and Shelton 2011). Cette molécule propose un mécanisme d'action original en agissant sur les systèmes mélatoninergique et sérotoninergique. Il s'avère que le rythme circadien et le sommeil régulés par la mélatonine est fortement perturbé pendant un épisode dépressif (Benca and Peterson 2008). Soulager les troubles du sommeil est aussi un critère thérapeutique pour les meilleurs antidépresseurs dans le traitement des troubles dépressifs (Benca and Peterson 2008). L'agomélatine est un analogue synthétique de la mélatonine (Cardinali et al. 2011) possédant des propriétés agonistes des récepteurs de la mélatonine 1 et 2 (Audinot et al. 2003). L'agomélatinepossède également des propriétés antagonistes sur récepteurs 5-HT2C (M J Millan et al. 2003). Par l'activation des récepteurs mélatoninergiques, l'agomélatine corrige la désynchronisation des rythmes circadiens dans plusieurs modèles de dépression chez l'animal (Martinet, Guardiola-Lemaitre, and Mocaer 1996). Grâce à un blocage sur l'activité du récepteur 5-HT2C, l'agomélatine produit également un effet anxiolytique (M J Millan et al. 2003) et augmente la neurotransmission médiée par la noradrénaline et la dopamine (Stahl et al. 2010). Ces propriétés sont des points bénéfiques majeurs dans le contrôle des troubles de l'humeur, de la réponse au stress et de l'activité antidépressive d'un composé (de Bodinat et al. 2010). Par contre, l'agomélatine n'a pas d'effet sur la recapture des monoamines et pas d'affinité significative sur les récepteurs adrénergiques, dopaminergiques ou GABAergiques (Carney and Shelton 2011), confirmant ainsi

l'originalité de son mécanisme d'action.

En préclinique, les résultats montrent que l'agomélatine possède des propriétés antidépressives et anxiolytiques dans plusieurs paradigmes comportementaux incluant le test de la nage forcée (Rainer et al. 2012), le test résignation acquise (« the learned helplessness test », (Bertaina-Anglade et al. 2006), le test de suspension caucale (« tail suspension test », le test du labyrinthe en croix surélevée (Koresh et al. 2012), le test de champ ouvert et le test d'alimentation supprimée par la nouveauté (Rainer et al. 2012) et ceci, dans différents modèles animaux d'anxiété-dépression (Koresh et al. 2012; Rainer et al. 2012). L'administration chronique d'agomelatine améliore le rythme circadien dans ces modèles ou rétablit les altérations induites par le stress sur le ratio d'activité jour/nuit chez les rongeurs (Rainer et al. 2012). Enfin, l'administration d'agomelatine réduit l'excès de libération de la glutamate induite par le stress aigu dans le cortex préfrontal (Tardito et al. 2010).

3.5.2 Traitements anxiolytiques

Les anxiolytiques sont indiqués pour traiter les manifestations anxieuses. Actuellement, seuls les benzodiazépines et la Buspirone ont l'AMM pour le trouble anxieux généralisé. :

3.5.2.1 Les benzodiazépines

Les benzodiazépines (BZD) ne doivent pas être utilisées en traitement de fond de l'anxiété généralisée ou dans les troubles dépressifs. La haute autorité de santé préconise de les utiliser pendant de courtes durées. Dans le TAG, elles doivent intervenir après les antidépresseurs IRS surtout s'il y a une comorbidité anxieuse (Pourmotabbed et al. 1996). Les BZD ont une efficacité optimale au bout d'une à deux semaines(Pourmotabbed et al. 1996). Cette efficacité anxiolytique diminuerait ou même disparaitrait après 4 semaines de traitement (selon les composés) en raison d'une forte tolérance fonctionnelle observée (Pourmotabbed et al. 1996).

Les BZD entrainent également une dépendance physique et un syndrome de sevrage peut survenir à l'arrêt. Le syndrome de sevrage se manifeste par un rebond des manifestations anxieuses, des douleurs musculaires, une irritabilité, une agitation et

des céphalées. Le rebond d'anxiété serait plus fréquent avec les BZD à demi-vie courte qu'avec les BZD à demi-vie intermédiaires (Pourmotabbed et al. 1996)

3.5.2.2 La Buspirone (BUSPAR™)

La Buspirone a une autorisation de mise sur le marché (AMM 1986) pour le trouble anxieux généralisé. Par contre, cette molécule n'a pas d'indication pour la dépression hormis sur la part d'anxiété ressentie par les patients. Cependant une méta-analyse de 1992 avait montré une amélioration des patients atteints de TAG associé à des symptômes anxieux avec un traitement par Buspirone versus placebo (Gammans et al. 1992). Son mécanisme d'action est différent de celui des benzodiazépines. Il s'agit d'un agoniste de la neurotransmission sérotoninergique au récepteur 5-HT1a appartenant à la classe des azapirones. La buspirone a surtout un effet sur les symptômes psychiques du TAG. Elle est actuellement peu utilisée en France notamment en raison de son délai d'action et de son action variable selon les patients. (Gammans et al. 1992). Contrairement aux benzodiazépines, elle n'entraine ni dépendance ni syndrome de sevrage. Elle présente aussi un léger effet sédatif mais moins important que les benzodiazépines.

3.5.2.3 L'hydroxyzine (ATARAX™)

L'hydroxyzine est un dérivé de la pipérazine non apparentée chimiquement aux phénothiazines et aux benzodiazépines. L'hydroxyzine possède une AMM pour le traitement des manifestations mineures de l'anxiété (AMM 1957, revalidée en 1988)(Lader and Scotto 1998). Elle peut être efficace dans les troubles anxieux à une dose de 50mg par jour pendant des traitements de 4 semaines (Lader and Scotto 1998). Contrairement aux BZD, elle n'entraine pas de dépendance. Son action présumée passe par l'activation des récepteurs histaminique H1 centraux et périphériques. Une activité anticholinergique est également documentée.

3.5.2.4 L'étifoxine (STRESAM™)

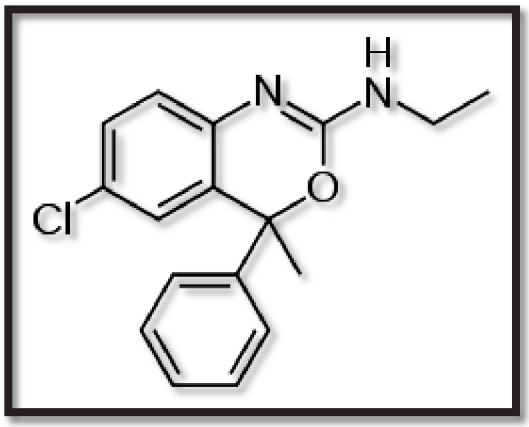


Figure 20 : 6-chloro-N-ethyl-4-methyl-4-phenyl-4H-benzo[d][1,3]oxazin-2-amine

L'etifoxine est un anxiolytique non-benzodiazépinique prescrit en France (AMM 1979) pour le traitement des « manifestations psychosomatiques de l'anxiété telles que dystonies neurovégétatives à expression cardiovasculaire » ou bien le trouble de l'Adaptation avec Anxiété (TTA). Les études de tolérance ont montre une très bonne sécurité d'emploi jusqu'à la dose maximale de 1500 mg tolérée chez le volontaire sain adulte. Cette molécule possède en outre très peu ou pas d'impact sur les fonctions cognitives et la vigilance (Micallef et al. 2001) et n'entraine pas de phénomènes d'addiction ou sevrage.

Dans un premier temps, son mode d'action a été caractérisé par des techniques d'électrophysiologie. Ces études ont montre que l'etifoxine agit de deux manière. La première (directe) consiste en la fixation sur un site de liaison spécifique localisé sur la sous unité beta du récepteur GABAa (A. Hamon et al. 2003a). Cette fixation augmente de manière dose-dépendante les courants GABAa et résulte de l'effet allostérique positif de l'étifoxine qui augmente l'affinité du GABA pour son récepteur (R Schlichter et al. 2000). L'Etifoxine se fixe également sur un complexe protéique mitochondrial: le TSPO (pour translocator protein. Il agit sur ce complexe en stimulant l'entrée de cholesterol dans la mitochondrie. Cette entrée augmente, par loi d'action de masse, la synthèse de neurostéroides neuroactifs, en particulier les neurostéroides réduits en position 3alpha comme l'allopregnanolone (M Verleye et al. 2001). Ce dernier résultat a été confirmé par le dosage des neurostéroides dans le

cerveau. Les résultats montrent une augmentation de la synthèse de pregnenolone, progestérone, 5-dihydroprogestreones et allopregnenolone dans le cerveau et le plasma des rats normaux. Un résultat similaire et été obtenu pour des rat gonadectomsisé et surrénalectomisés suggérant une synthèses locale au niveau du système nerveux (Marc Verleye et al. 2005). Les neurostéroïdes réduits en position 3-alpha (comme l'allopregnanolone) sont les plus puissants modulateurs endogènes du récepteur $GABA_A$. L'action indirecte de l'étifoxine passe par la production de ces composés qui modulent positivement l'inhibition médiée par les récepteurs $GABA_A$.

Les études chez le rongeur révèlent plusieurs effets thérapeutiques potentiels de l'étitoxine. Tous d'abord, l'étifoxine réduit l'anxiété chez le rat à travers la potentialisation de la fonction inhibitrice du récepteur $GABA_A$. Elle réduit aussi l'intensité des manifestations neurovégétatives (hyperthermie, accroissement de la motricité du colon, réduction de la vidange gastrique) après un stress (Marc Verleye and Gillardin 2004). Dans un modèle d'œdème cérébral chez le rat, les traitement préventifs et curatif avec l'étifoxine ont réduit significativement la taille de l'œdème (P. Girard, Pansart, and Gillardin 2009). De plus, il a été montré que l'étifoxine favorisent l'augmentation de le régénération et la croissance et accélérait la récupération fonctionnelle de rats ayant subis une lésion nerveuse par cryolésion (C. Girard et al. 2008). Chez la souris l'étifoxine possède un effet anticonvulsivant (Marc Verleye, Heulard, and Gillardin 2009; Marc Verleye et al. 2011) qui semble dépendant du niveau d'expression de la sous unité beta au sein du récepteur $GABA_A$.

Depuis la description du mode d'action directe et indirect, notre laboratoire a contribué à mieux comprendre l'effet analgésique de l'étifoxine voir revue (Poisbeau et al. 2014). Ce dernier a été mis en évidence pour la première fois à l'aide de modèles animaux de douleurs pathologiques: les modèles de neuropathies généralisées par traitements antitumoraux à la vincristine sulfate, à l'oxaliplatine et au paclitaxel (Maya Aouad et al. 2009; Poisbeau et al. 2014), le modèle de neuropathie par compression chronique (cuff) du nerf sciatique (M Aouad et al. 2014) et celui de la monoarthrite articulaire du genou (Maya Aouad et al. 2014). Ce dernier modèle a permis de constater que l'effet bénéfique de l'étifoxine était multiple, sur la composante inflammatoire associée mais aussi sur le rétablissement de l'homéostasie chlorure indispensable à l'optimisation de l'inhibition par les récepteur-canaux

perméable aux ions chlorure comme le récepteur $GABA_A$. Ces travaux ont également permis de confirmer que l'effet antinociceptif est bien médié par les récepteurs $GABA_A$, du moins au niveau des cornes dorsales de la moelle épinière (Juif, Melchior, and Poisbeau 2015)

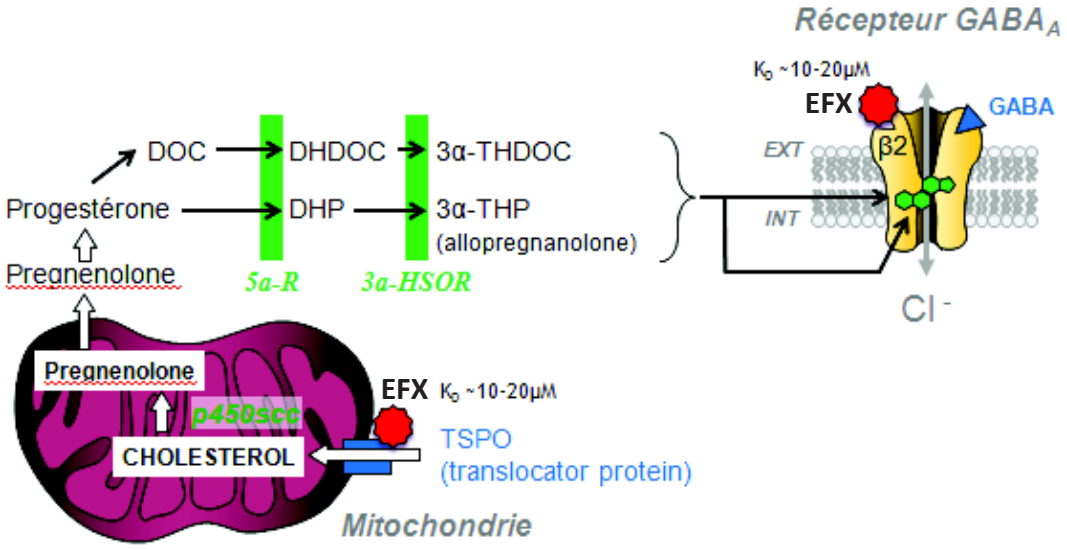


Figure 21 : Mode d'action de l'étifoxine (A. Hamon et al. 2003b; R Schlichter et al. 2000) EFX : étifoxine ; TSPO : Translocator protein

4 Objectifs du travail de thèse

4.1 Contexte scientifique

Les 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. L'effet analgésique de l'étifoxine repose en grande partie sur la production des neurostéroïdes 3α,5α-réduits (Poisbeau et al. 2014). 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.

Les neurostéroïdes sont des modulateurs puissants du 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 3α,5α-réduits de la PROG (comme l'alloprégnanolone ou 3α,5α-THP et la 3α,5α-THDOC) ainsi que la déhydroépiandrostérone (DHEA) et la DHEAS modulent les niveaux d'anxiété (pour revues (Dubrovsky 2006; Longone et al.).Chez les rongeurs, une diminution de la concentration cérébrale de 3α,5α-THP et de 3α,5α-THDOC est observée dans le cas de comportements anxieux et/ou agressifs. A l'inverse, une augmentation du taux de ces composés dans le cerveau produit des effets anxiolytique, sédatif, anticonvulsivant et/ou anesthésique (pour revue, (Maria Luisa 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 gammahydroxybutyrique ou GHB, l'étifoxine, l'éthanol), implique une augmentation de la concentration cérébrale des neurostéroïdes activateurs du système GABAergique (M L Barbaccia et al. 2002; Sanna et al. 2004; Marc Verleye et al. 2005). En revanche, les drogues anxiogéniques (par exemple le FG7142) provoquent une diminution de la concentration de 3α,5α-THDOC et de 3α,5α-THP dans le cortex cérébral (pour revue, (Biggio et al. 2007). Des injections de PROG ou de 3α,5α-THDOC à des rongeurs anxieux augmentent significativement leur activité exploratoire (Bitran, Shiekh, and McLeod 1995; Löfgren 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.). 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, s'ils sont rendus possibles, aideront sans doute à confirmer la contribution de la neurostéroïdogenèse 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 neurostéroïdogenèse une fois que ces stéroïdes franchissent la barrière hémato-encéphalique (Pico-Alfonso et al. 2004; Söndergaard, Hansson, and Theorell; Strous et al. 2003).

Puisque l'étifoxine exerce des effets analgésiques en stimulant la production cérébrale de 3α,5α-THP (Nguyen et al. 2006; Servant et al.; Ugale et al. 2007; Marc Verleye et al. 2005) et en amplifiant l'activité GABAergique, son utilisation pourrait constituer une stratégie thérapeutique efficace pour les troubles anxiodépressifs réactionnels à l'apparition d'un douleur chronique (i.e. troubles émotionnels induits par une pathologie lésionnele réelle ou décrite en de tels termes). Son action durable sur les symptomes douloureux combinée aux nombre faible d'effets secondaires que présente la molécule en fait un bon candidat pour un tel traitement.

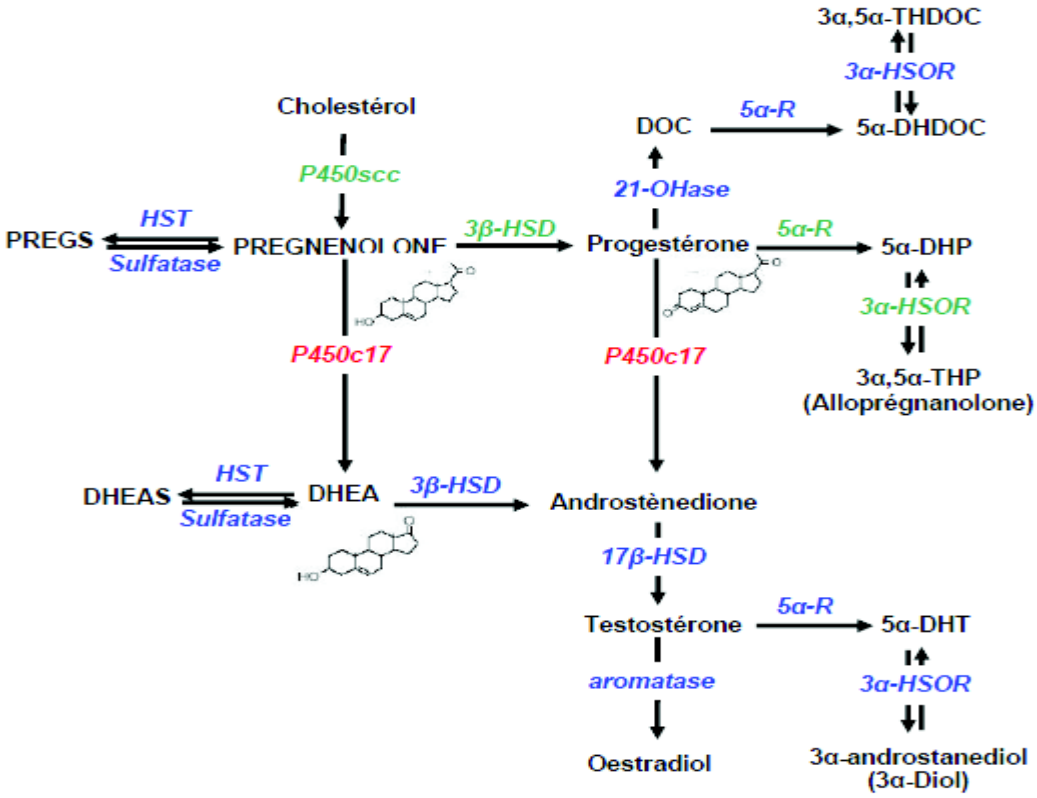


Figure 22 : Voies de biosynthèse des neurostéroïdes. P450scc: cytochrome P450 side-chain-cleavage; P450c17: cytochrome P450c17 ou 17α-hydroxylase/17,20 lyase; 3β-HSD: 3β-hydroxystéroïde déshydrogénase; 17β-HSD: 17β-hydroxystéroïde déshydrogénase; 3α-HSOR: 3α-hydroxystéroïde oxydo-réductase; 21-OHase: 21-hydroxylase; 5α-R: 5α-réductase; HST: sulfotransférase.5α-DHDOC: 5α-dihydrodéoxycorticostérone; DHEA: déhydroépiandrostérone; DHEAS: déhydroépiandrostérone sulfate; 5α-DHP: 5α-dihydroprogestérone; 5α-DHT: 5α-dihydrotestostérone; DOC: déoxycorticostérone; PREGS: prégnènolone sulfate; 3α,5α-THDOC: 3α,5α-tétrahydrodéoxycorticostérone; 3α,5α-THP: 3α,5α-tétrahydroprogestérone ou alloprégnanolone.

4.2 Objectifs du travail

En utilisant le modèle de neuropathie par compression chronique du nerf sciatique et sa bonne caractérisation sur le plan des co-morbidités anxieuses et dépressives, le but du travail de thèse a été de:

- mettre en évidence l'intérêt thérapeutique potentiel d'un traitement à l'étifoxine pour les symptomes sensoriels et émotionnels des douleurs neuropathiques.

- proposer l'amygdale comme une cible privilégiée de l'action de l'étifoxine dans son action analgésique et anxiolytique.

Après une partie descriptive des matériels et méthodes, le travail de thèse est présenté sous la forme de deux articles rédigés en anglais. Ces articles sont complétés le cas échéant par des données supplémentaires. Une discussion reprend quelques points clés du travail et les questions encore ouvertes.

B. Matériels et méthodes

Ce chapitre regroupe l'ensemble des méthodes que j'ai personnellement utilisées au cours du travail de thèse. Certaines sont directement visibles dans les deux projets d'articles qui constituent le fil rouge de cette thèse mais d'autres font partie de l'article déjà publié (Poisbeau et al. 2014), des résultats complémentaires et des annexes

1 Évaluation éthique des procédures expérimentales

Le travail de thèse a respecté la réglementation en vigueur en France en application de la directive européenne 2010/63/UE. Cette réglementation est placée sous la responsabilité du ministère de l'Agriculture qui a établi les principes généraux suivants:

- La réglementation protège les animaux vertébrés, y compris les formes larvaires autonomes ou fœtales évoluées, et les céphalopodes.
- Les animaux doivent provenir d'élevages ou de fournisseurs agréés.
- Une expérience sur animaux n'est licite que si elle est nécessaire et irremplaçable et que si elle relève de la recherche en santé humaine ou animale, de la protection de l'environnement ou de l'enseignement supérieur ou professionnel ou d'enquêtes médico-légales. Les principes de remplacement (par une méthode ne nécessitant pas d'animaux), de réduction (par la diminution du nombre d'animaux au strict minimum) et de raffinement (par le choix des méthodes les plus douces) doivent être respectés (règle des 3R).
- Les expériences douloureuses doivent être pratiquées sous anesthésie sauf dérogation documentée. La mort comme donnée d'observation de l'expérience, doit être évitée autant que possible.
- Tout établissement éleveur, fournisseur ou utilisateur doit être agréé (conformité des installations et de la formation du personnel). L'agrément est accordé pour 6 ans. Un vétérinaire et une structure du bien-être des animaux doivent être désignés. Des inspections régulières sont réalisées.
- Tout projet de recherche qui inclut le recours à l'expérimentation animale doit faire l'objet d'une évaluation éthique favorable délivrée par un comité d'éthique agréé. Il doit obtenir une autorisation délivrée par le ministère de la recherche.
- Une commission nationale de l'expérimentation animale composée de 20 membres (ministères, recherche publique et privée, associations de protection

animale, professionnels de la recherche) donne des avis et fait des propositions.

- Un comité national de réflexion éthique sur l'expérimentation animale établit le bilan annuel national d'activité des comités d'éthique et formule des recommandations. Il est composé de 14 membres (ministères, professionnels, médecin, vétérinaire, philosophe, juriste, sociologue, associations de protection animale).

Dans notre cas, les projets sont soumis au Comité Régional d'Ethique en matière d'Expérimentation Animale (CREMEAS, agrément national CEEA 35) pour une expérimentation prévue au sein de l'établissement utilisateur Chronobiotron UMS-3415 (agrément A67-2018-38 obtenu le 10/12/2013). Toutes les procédures ont été effectuées sous la responsabilité de personnels accrédités, ayant suivi les formations de niveau 1 et de chirurgie (selon les expériences).

1.1 Animaux

La majorité des expériences de ce travail a été réalisé sur des souris C57BL/6J âgées de 8 à 12 semaines au moment de la chirurgie. Seuls les mâles sont utilisés afin de s'affranchir d'un effet sexe spécifique bien documenté dans les mesures de nociception (Greenspan et al. 2007). Les animaux sont maintenus en cycle 12 heures d'obscurité et 12 heures de lumière (lumière entre 8:00 et18:00), avec accès illimité à la nourriture et boisson ad *libitum*. Les conditions d'hébergement de l'animalerie sont les suivantes: température maintenue à 22 $\pm$ 2°C, hygrométrie contrôlée à 50 $\pm$ 5 %. Afin de limiter le stress d'isolement, les souris ont été hébergées en cage collective (2-4 individus par cage) en respectant les recommandations d'espace pour la stabulation et en enrichissant *à minima* la litière avec un bâton en bois et un abri.
Lorsque des rats ont été utilisés, des individus mâles adultes (9-11 semaines, 250-350 g; Janvier) issus de la souche Sprague-Dawley ont été utilisés et soumis à des conditions d'hébergements identiques à celles des souris.

2 Modèles de douleur

2.1.1 Neuropathie par compression chronique du nerf sciatique.

Parmi les nombreux modèles disponibles, le modèle neuropathique retenu dans ce travail est celui du « cuff » décrit d'abord chez le rat (Mosconi and Kruger 1996) puis adapté au sein du laboratoire chez la souris (Benbouzid et al. 2008). Les

animaux sont maintenus pendant la durée de la chirurgie sous anesthésie générale gazeuse à l'isoflurane 2,5%. Une incision de 0,5 à 1 cm est effectuée le long de la patte arrière droite de l'animal, puis le nerf sciatique est isolé et exposé à l'air libre. Un petit morceau (1-2 mm de long) de tube en polyéthylène (« cuff »; PE10, diamètre interne : 1,09 mm, diamètre externe : 0,38 mm), préalablement stérilisé, est posé autour de la branche principale du nerf sciatique. Le nerf est alors remis en place et la plaie est refermée à l'aide de plusieurs points de suture simples. A noter que pour les animaux du groupe pseudo-opéré (ou "sham"), la chirurgie se déroule exactement de la même manière, à la seule différence qu'aucun morceau de polyéthylène n'est apposé sur le nerf sciatique. Le réveil des animaux dure moins d'une heure mais s'effectue néanmoins sous observation régulière. Il faut noter qu'une hyperalgésie postopératoire et bilatérale est observable pendant les 3 premiers jours qui suivent la chirurgie. Cette hyperalgésie disparaît des pattes gauches non-opérées et des pattes droites du groupe sham après cette période. Par contre, l'hyperalgésie mécanique induite par la compression calibrée produite sur le nerf reste importante et persiste au moins 2 mois (Benbouzid et al. 2008).

2.1.2 Neuropathie généralisée par traitement chimiothérapique au taxol

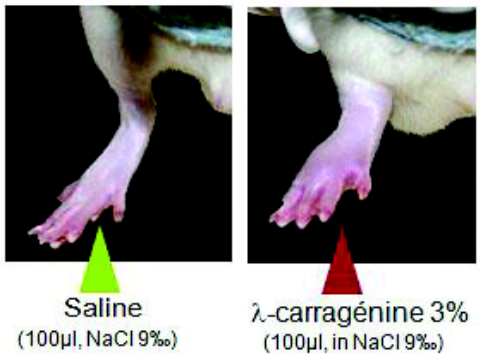
Dans la partie initiale du travail de thèse, j'ai participé à un travail sur les neuropathies généralisées induites par les traitements avec des agents antitumoraux et étudié le bénéfice apporté par traitement à l'étifoxine. ce travail a été complémentaire à celui initié dans le laboratoire (Maya Aouad et al. 2009) et a permis la publication d'une revue reprenant certains éléments de ces études (Poisbeau et al. 2014).

Paclitaxel (**Taxol** ®) a été administrée comme décrit précédemment (Flatters and Bennett 2006) : une solution de stock (Taxol ®) 6 mg / ml dilué dans le Cremophor EL et l'éthanol déshydraté 95%; Bristol-Myers Squibb) a été dilué dans une solution saline (NaCl 0,9 %) à une concentration de 2 mg / ml et injectée par voie intrapéritonéale (IP) à une dose de 2 mg / kg sur quatre jours alternés (J0, J2, J4 et J6) pour une dose cumulée de 8 mg / kg. Les animaux témoins (n=8) ont reçu des injections du véhicule (le Cremophor EL et l'éthanol déshydraté 95% sont mélangés (v/v), l'ensemble est dilué dans 2 volumes de la solution saline (NaCl 0,9 %)).

Dans une de cette étude chez le rat, une autre méthode a été utilisée. Elle repose sur (1) l'utilisation de filaments ne déclenchant une réponse de retrait de la patte postérieure que si l'animal présente un symptôme d'allodynie et (2) d'un filament de plus gros diamètre qui déclenche un retrait de patte dans 40 à 50% des essais. Dans ce deuxième cas, c'est l'hyperalgésie qui peut être mesurée si ce pourcentage de retrait augmente.

2.1.3 Sensibilisation inflammatoire à la carragénine λ

Les données issues du laboratoire concernant l'action analgésique de l'étifoxine dans les douleurs inflammatoires pointe du doigt une possible action inflammatoire (Aouad et al, Pain 2014). L'étude qui trouve en annexe avait pour objectif de mieux comprendre cet effet anti-inflammatoire aigu en utilisant le modèle carragénine chez le rat Sprague-Dawley mâle adulte (9-11 semaines, 250-350 g; Janvier). Pour cela, la carragénine λ (concentration 3% dans une solution saline 0,9%; volume: 100 µl; Sigma-Aldrich, pays) ou son véhicule ((solution saline 0,9%; volume: 100 µl) a été injectée en intraplantaire dans une seule patte. Comme l'indique l'image ci-dessous, quatre heures après l'injection, les souris présentent un important œdème de la patte injectée qui est accompagné d'une hyperalgésie thermique et mécanique.



Avec ce modèle, une mesure de la taille de l'œdème est classiquement utilisée. Nous avons également utilisé dans notre étude un imageur thermique afin de mesurer la température de surface locale correspondante à l'inflammation.

Le volume de la patte est mesuré pour déterminer le volume de l'œdème induit par le traitement. La méthode utilisée, basée sur le principe d'Archimède, utilise une balance (Sartorius-Werke type 2204, précision = 0,1 g. Göttingen Allemagne), sur laquelle est posé un récipient cylindrique rempli d'eau. L'augmentation de poids indiquée par la balance est enregistrée lorsque la patte du rat est trempée dans l'eau

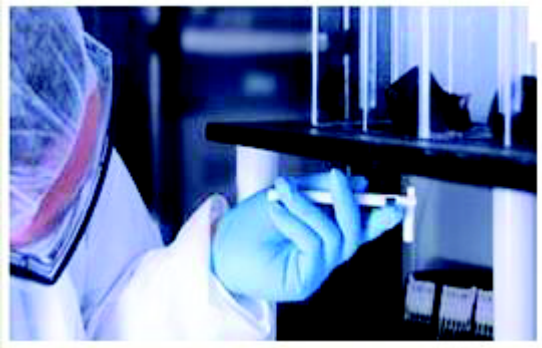
jusqu'à l'articulation de la cheville. Le volume d'eau déplacée par la patte correspond à un accroissement de la force appliquée sur le plateau de la balance tel que 1 g corresponde à 1 ml.

2.2 Mesure de la nociception

2.2.1 Évaluation de la nociception mécanique par les filaments de von Frey

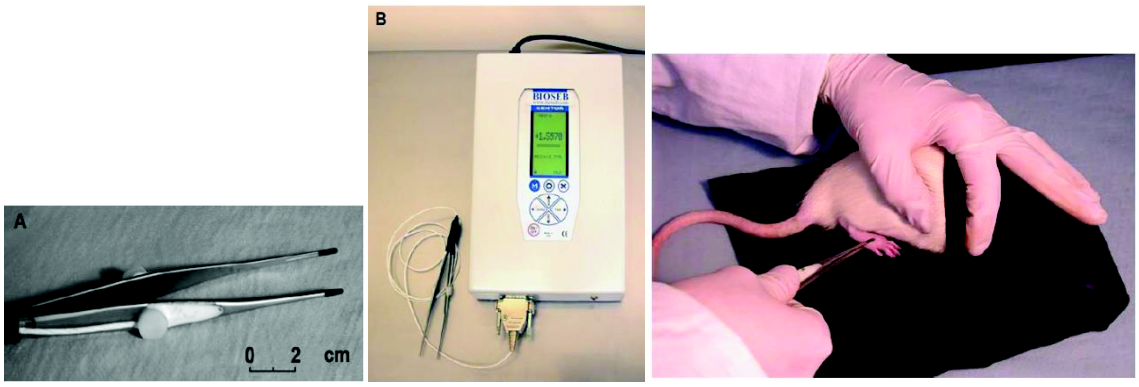
Le test des filaments de von Frey (Bioseb, France) est utilisé pour déterminer le seuil de sensibilité mécanique des pattes postérieures des animaux (rat ou souris) en suivant la procédure de Chaplan (Chaplan et al. 1994) dans la grand majorité de nos études. Pour l'ensemble des résultats présentés dans cette thèse, la patte droite correspond à la patte cuff, et la patte gauche à la patte contrôle. L'ensemble des animaux utilisés est familiarisé avec l'environnement expérimental du test au moins une semaine avant le démarrage du projet. Ils sont systématiquement placés 15 minutes sur le dispositif avant d'être testés. Ce dispositif consiste en une enceinte en plastique transparent (7 cm X 9 cm X 7 cm) reposant sur une grille. La sensibilité mécanique est évaluée en appliquant une pression calibrée (en grammes) sur les voûtes plantaires des pattes postérieures grâce à des filaments de différents calibres. La pression exercée augmente en fonction du calibre des filaments appliqués. Si, pour un filament donné, l'animal retire sa patte au moins 3 fois sur 5 applications, et qu'au filament supérieur au moins 3 réponses sur 5 sont à nouveau observées, alors le seuil de retrait est considéré comme correspondant au grammage du premier filament (la plus faible valeur).

Le principe est d'appliquer chaque filament 5 fois par patte afin de mesurer le nombre de réponses aversives. Ces dernières sont généralement des retrait rapides de la patte stimulées ou des léchages stéréotypés (distincts d'un toilettage).



2.2.2 Évaluation de la nociception mécanique par la pince calibrée

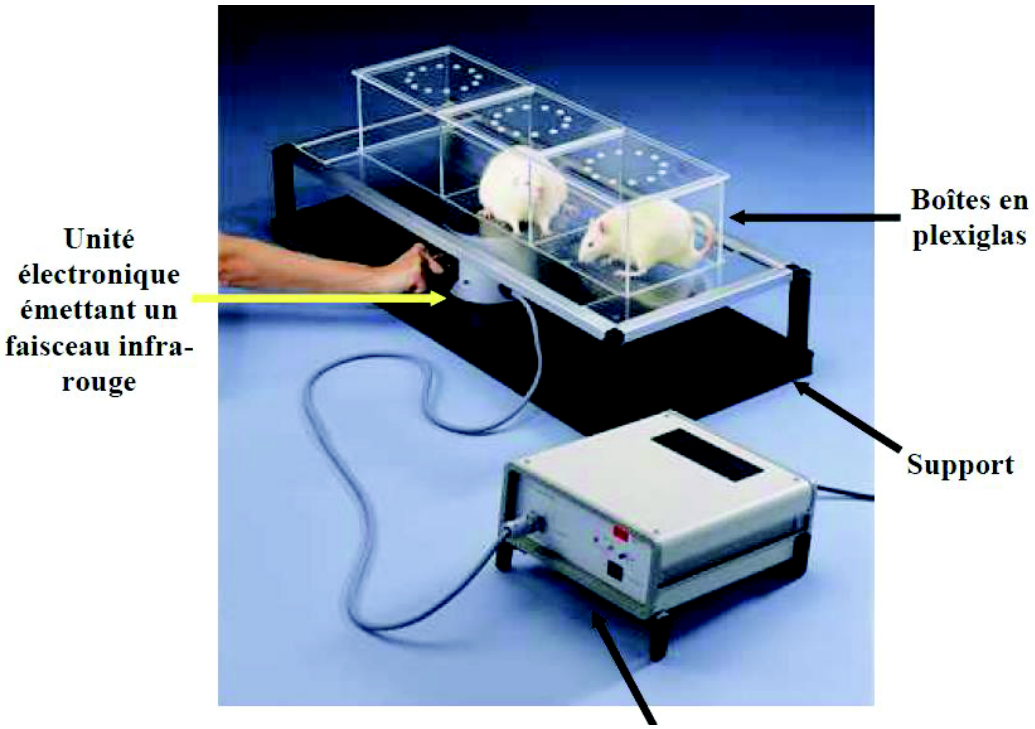
La mesure des **seuils nociceptifs mécaniques** est effectuée par le test de la pince calibrée que nous avons mis au point au laboratoire et développé en partenariat avec la société Bioseb il y a quelques années (Luis-Delgado et al., 2006). La pince (Longueur =15 cm; aire de contact: 7 mm x 1,5 mm) est équipée de capteurs (jauges de contraintes) qui permet de mesure la pression exercée à la pointe (voir photos ci-dessous, A-B).



Pendant le test, la tête de l'animal est couverte afin de l'apaiser (photo de droite ci-dessus), une pression graduée est alors exercée sur la patte postérieure de l'animal jusqu'au retrait ou la vocalisation de l'animal. Cette valeur correspond au seuil nociceptif. La mesure est répétée 3 fois pour chaque patte et la moyenne des seuils par patte est utilisée.

2.2.3 Évaluation de la nociception thermique au chaud

La mesure des seuils nociceptifs thermiques au chaud est effectuée par le test du Plantar en suivant la méthode de Hargreaves (Ugo Basile, Comerio, Italie). Il permet de mesurer le temps de latence de retrait de la patte des animaux en réponse à une stimulation thermique chaude (Hargreaves et al., 1988).



Les rats habitués au test sont placés dans des boîtes individuelles (23 × 18 × 14 cm) sur un plancher en plastique permettant le transfert de chaleur. Une source chaude infrarouge, concentrée en un faisceau, est placée par l'expérimentateur sous la surface plantaire postérieure de l'animal. La latence de retrait de la patte est calculée automatiquement lorsque l'animal retire sa patte du plancher (Dispositif expérimental ci-dessus). La latence de retrait de la patte traduit le seuil de sensibilité au chaud. Une latence limite est fixée à 20 secondes afin de ne pas endommager les tissus par la chaleur en absence de réponse de retrait de la patte.

Le temps moyen de latence de retrait (en secondes) est déterminé pour chacune des pattes postérieures. 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.

2.2.4 Mesure indirecte de la douleur spontanée par conditionnement de place

Ce modèle, initialement proposé par (Carr, Phillips, and Fibiger 1988). Dans ce test, on conditionne l'animal à associer un stimulus avec un environnement donné. L'objectif de ce test est de tester si, à la suite de l'apprentissage, l'animal montre une préférence pour l'environnent associé à l'administration de la drogue.

Appareil constitué de 2 compartiments distincts (motifs et texture des parois différents) séparés par des cloisons que l'on peut garder ouvertes ou fermées. Un compartiment intermédiaire sert de sas d'entrée donnant un accès aux deux compartiments.

Les mouvements de l'animal et le temps passé dans chaque compartiment sont enregistrés par un système de traçage vidéo contrôlé par un logiciel informatique.

C'est le temps passé dans chacun des compartiments qui fourni une indication de la préférence (ou l'aversion) qu'a développé l'animal suite à l'injection de la substance.

L'animal montre sa préférence en passant plus de temps dans l'un des compartiments. Son choix détermine ainsi si:

- la substance testée à des propriétés aversive ou renforçante
- l'animal a développé une dépendance pour la substance

Le test se déroule on trois étapes :

Étape 1 : Préconditionnement

Étape 2 : Conditionnement

Étape 3 : Test de préférence

2.2.4.1 Conditionnement de préférence de place à la morphine (5mg/kg s.c).

2.2.4.1.1 Préconditionnement :

Habituation de chaque animal au dispositif. On place l'animal dans le compartiment intermédiaire avec un accès libre aux deux compartiments pendant 15 à 20 minutes (portes ouvertes).

Exclusion des animaux qui montrent une préférence initiale pour un compartiment particulier, c'est-à-dire ceux qui passent:

- 80% (temps passé> 720 sec) de leur temps dans l'un des deux compartiments (Nestler et coll., 2004)
- Moins de 20% (temps passé <120) de la durée totale dans l'un des deux compartiments

2.2.4.1.2 Conditionnement

3 jours de conditionnement :

- 2 appariements par jour espacés de 4h avec enregistrement pendant 30 minutes des mouvements de l'animal.

- **Matin**: compartiment 1 = injection de saline puis l'animal est placé dans le compartiment pendant 30 minutes (portes fermées).
- **Après-midi**: compartiment 2 = injection de la morphine 5 mg/kg par voie sous cutanée, puis l'animal est placé dans le compartiment pendant 30 minutes (portes fermées).

2.2.4.1.3 Test de préférence

- L'animal est placé dans le compartiment intermédiaire, avec un libre accès aux deux autres compartiments (portes ouvertes).
- Enregistrement pendant 15 minutes.

2.2.4.1.4 Évaluation de la préférence :

On compare le pourcentage de temps passé dans le compartiment associé à la morphine par rapport à celui passé dans le compartiment neutre. Le pourcentage de temps passé dans le compartiment associé à la morphine est appelé « preferences scores » (Cabib, Piazza et coll., 1996).

2.2.4.2 Conditionnement de préférence de place à la clonidine (10µg/µl).

2.2.4.2.1 Préconditionnement

- La même procédure que la précédente

2.2.4.2.2 Conditionnement

1 jour de conditionnement. :

- Matin: compartiment 1 = injection de saline puis l'animal est placé dans le compartiment pendant 30 minutes (portes fermées).
- Après-midi: compartiment 2 = injection de la clonidine (10µg/µl) par voie intrathecale, puis l'animal est placé dans le compartiment pendant 30 minutes (portes fermées).
- L'intervalle de temps entre les deux injections (matin-après-midi) est de 4h.

2.2.4.2.3 Test de préférence

2ème jour

L'animal est placé dans le compartiment intermédiaire, avec un libre accès aux deux autres compartiments (portes ouvertes).

Enregistrement pendant 15 minutes.

2.2.4.2.4 Évaluation de la préférence:

On compare le pourcentage de temps passé dans le compartiment associé à la clonidine par rapport à celui passé dans le compartiment neutre.

2.3 Evaluation de l'anxiété & de la dépression

2.3.1 Hyponéophagie (Novelty Suppressed Feeding Test: NSF): Test prédictif d'un phénotype anxio/dépressif

Ce test induit une situation de motivations conflictuelles chez l'animal, entre celle dirigée vers la nourriture et la peur de s'aventurer au centre de l'enceinte. Ce test a montré son aptitude à mettre en évidence des changements dans le comportement des rongeurs comme le rat et la souris, après un traitement par anxiolytiques (traitement aigu) et antidépresseurs (traitement chronique) (Luca Santarelli et al. 2003). L'animal à jeun depuis 24 heures est placé dans une cage rectangulaire de 2500 cm^2 (50x50x20 cm). Au centre de cette cage est disposé un cercle blanc éclairé sur lequel sont déposés deux granulés de nourriture, puis un chronomètre est immédiatement lancé. La latence pour mordre manifestement le granulé (croquer dans le granulé en utilisant ses pattes avant) est enregistrée. Les animaux sont testés individuellement pendant une période de 10 minutes (L. Santarelli 2003). On mesure la latence mis par l'animal pour aller se nourrir. Une administration d'un anxiolytique ou d'un antidépresseur réduit la latence à se nourrir. A la suite de ce test, l'animal est replacé dans sa cage et on mesure sa consommation de nourriture pour vérifier que les variations du temps de latence entre des animaux traités à l'etifoxine et des animaux non traités.

2.3.2 Test d'enfouissement de billes (Marble Burying Test)

Dans une cage d'hébergement conventionnelle (dimension 27 x 16 x 14 cm) contenant une épaisseur de 3 cm de sciure fine. Dans cette cage, 25 billes de verre (diamètre de 1 cm) sont reparties à la surface de la sciure. La souris est alors placée dans la cage pendant 30 minutes. Après cette période, un expérimentateur indépendant compte le nombre de billes enfouies au moins au 2/3. Ce nombre correspond au score d'anxiété (Nicolas, Kolb, and Prinssen 2006).

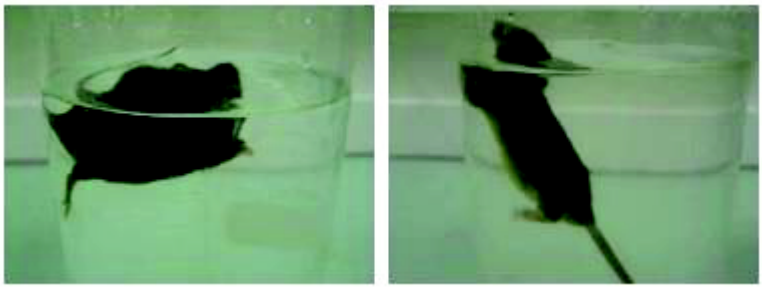
2.3.3 Toilettage (Splash Test)

Le temps de toilettage, s'il est faible, est révélateur d'une négligence qui pourrait être mis en analogie avec le manque de soin observé parfois chez des patients dépressifs (L. Santarelli 2003; Yalcin et al. 2011). Ce score de toilettage est effectué pendant une période de 5 minutes à la suite d'une aspersion du pelage dorsal à l'aide d'une solution de sucrose à 10%.

2.3.4 Nage Forcée (Forced Swim Test: FST)

Le FST est un test prédictif d'une activité de type antidépressive. IL consiste à placer les souris dans un cylindre de verre (dimension: Hauteur 17,5 cm x diamètre 12,5 cm) contenant une hauteur d'eau de 11,5 cm (température comprise entre 23-25°C). Le test dure 6 minutes, mais seules les 4 dernières minutes du test sont utilisées pour

comptabiliser le temps de nage. Lorsque la souris reste immobile en flottant ou fait de petits mouvements sans nager, la durée d'immobilité est mesurée. Cette durée est proportionnelle à l'intensité de la dépression selon les auteurs de ce modèle (Porsolt, Le Pichon, and Jalfre 1977).



2.3.5 Injections intrathécales

Les injections intrathécales (i.t.) des molécules testées ont été effectuées selon les descriptions de (Hylden and Wilcox 1980). Les animaux sont tout d'abord anesthésiés à l'isoflurane 2,5%. L'injection est effectuée à l'aide d'une aiguille de 26G × 1/2" reliée à une seringue Hamilton de 50 µL qui est introduite perpendiculairement à travers la colonne vertébrale jusque dans l'espace sub-arachnoïdien entre les vertèbres L5 et L6 (Yalcin et al. 2009). 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). L'injection i.t a été utilisée par exemple dans le test de préférence de place pour administrer la clonidine.

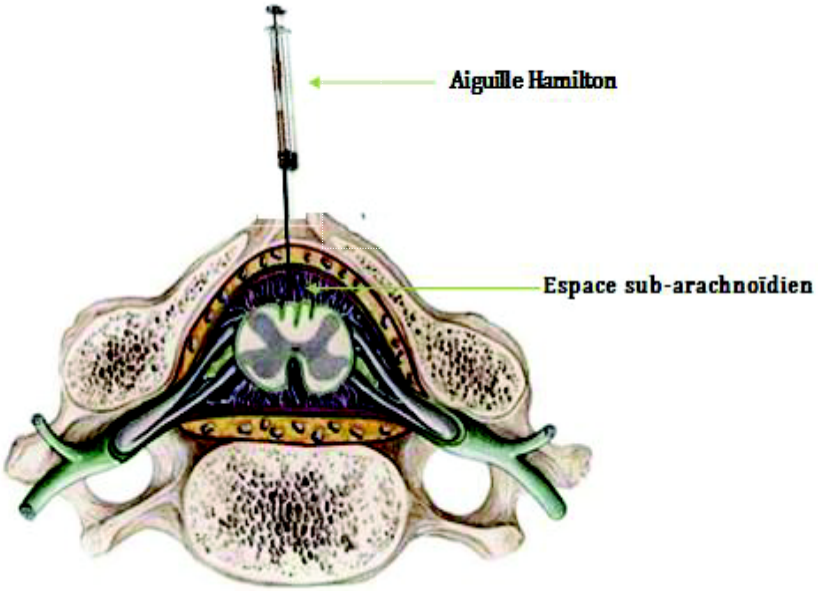


Figure 23 : Méthode d'injection intrathécale. Une aiguille connectée à une seringue est introduite perpendiculairement à travers la colonne vertébrale dans l'espace sub-arachnoïdien.

2.3.6 Quantification des catécholamines

Quantifications des protéines par la méthode de Bradford

La méthode de Bradford est un dosage colorimétrique se basant sur un changement d'absorbance à 595 nm, qui se manifeste par le changement de couleur du bleu de Coomassie suite à sa liaison avec les acides animés basiques (arginine, histidine et lysine) des protéines. Dans un premier temps, on réalise une gamme étalon on préparant des quantités croissantes d'albumine sérique bovine (SAB, fraction V ; 0µg a 20µg). En parallèle, de 1 à 5µg d'extrait de cerveaux de souris sont testées. Les volumes sont ajustés à 800µl avec de l'eau ultrapure. Apres ajout de 200µl de réactif de Bradford (Proein Assay, Bio-Rad) et 5 min d'incubation, on procède à la lecture des absorbances à l'aide d'un spectrophotomètre à une longueur d'onde de 595 nm. L'équation de la droite d'étalonnage obtenue grâce aux concentrations connues de SAB permet de calculer la quantité de protéines présentes dans les extraits de cerveaux.

2.4 Principe de la chromatographie liquide couplé à la spectrométrie de masse (LC-MS/MS)

2.4.1 Chromatographie liquide:

La chromatographie en phase liquide à haute performance est une **technique de séparation** en fonction de caractéristiques physicochimiques des molécules d'un mélange de composés comme leur hydrophobicité, leur charge nette ou leur encombrement stérique suivant la colonne utilisée. Son principe est basé sur la différence d'affinité, pour un composé donné, entre une phase stationnaire et une phase mobile (ou éluant).

2.4.2 Spectrométrie de masse:

La **spectrométrie de masse** est une technique physique d'analyse permettant de détecter et d'identifier des molécules d'intérêt par mesure de leur masse, et de caractériser leur structure chimique. Son principe réside dans la séparation dans un champ électrique de molécules chargées en fonction de leurs rapports masse sur charge (m/z). Un spectromètre de masse est composé d'une source d'ionisation qui ionise les composés, d'un analyseur de m/z (analyse MS) ou d'une combinaison d'analyseurs (analyse MS/MS), d'un détecteur d'ions et d'un système de traitement du signal. Ces instruments sont caractérisés par leur mode d'ionisation, leur précision en masse et leur résolution (pouvoir séparateur). Certaines sources d'ionisation (l'électro nébulisation ou ESI) peuvent être couplées directement à une méthode de séparation comme la chromatographie liquide dans le but d'augmenter le pouvoir séparateur de l'analyse (**LC-MS/MS**).

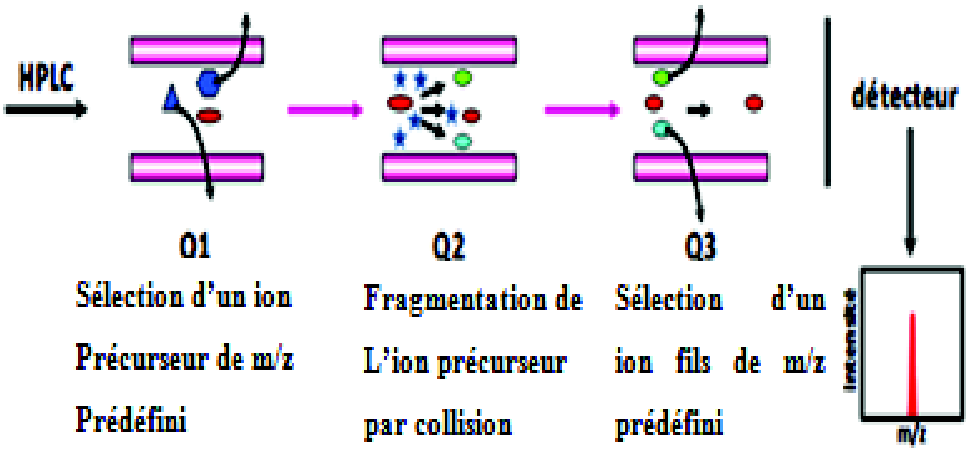


Figure 24 : Schéma simplifié d'un spectromètre de masse triple quadripôle

Le système LC-MS/MS utilisé lors de mes analyse est constitue de deux appareils distincts :

Une chaine de chromatographie liquide à ultra performance (UPLC) Dionex Ultimate3000 permet de séparer les constituants d'un échantillon en fonction de leur caractère hydrophobe dans notre cas. Dans cette technique, une phase mobile liquide aqueuse et acide (H2O 99.9% /acide formique 0.1% v/v) véhicule l'échantillon à travers une colonne contenant une phase stationnaire dont les particules sont greffées avec des chaines de 18carbones (C18, de nature apolaire). Les molécules liées à la phase stationnaire sont éluées en appliquant un gradient croissant de solvant polaire en condition acide (Acetonitrile 99.9%/acide formique 0.1% v/v). Plus une molécule est hydrophobe, plus elle est retenue sur la colonne et nécessite donc un pourcentage élevé d'ACN pour être éluée.

2.4.3 Spectrométrie de masse triple quadripôle (Endura, Thermo Electron, Contrôlé par le logiciel Xcalibur v. 2.0).

Lors de la première étape, un ion précurseur de m/z prédéfini est sélectionné dans le premier quadripôle de l'instrument (**Q1**). Cet ion est ensuite fragmenté dans le second quadripôle (**Q2**) par collision avec un gaz. D'argon sous pression. Enfin, un ou plusieurs ions correspondant à des fragments spécifiques de l'ion précurseur, de **m/z**

prédéfini, est sélectionné dans le troisième quadripôle (**Q3**). C'est l'intensité du signal généré par cet ion fils qui est utilisée pour la quantification de la molécule analysée.

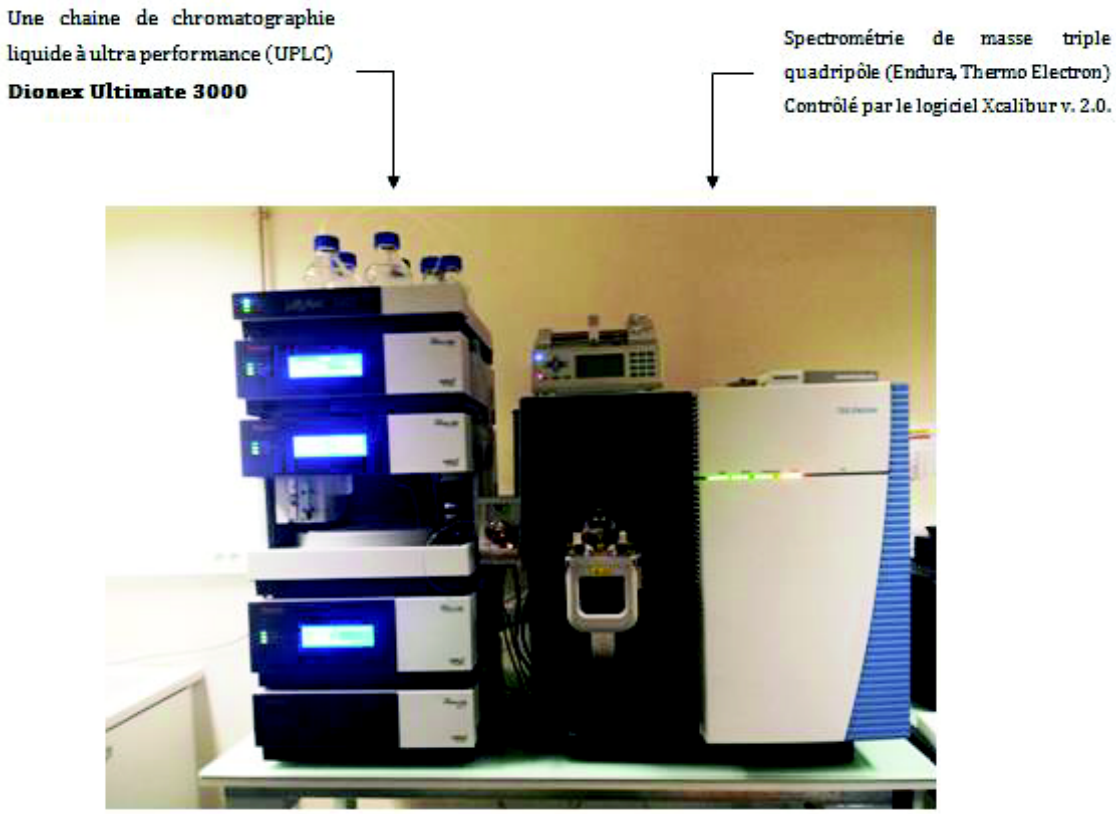


Figure 25 : Photographie du système de la « Chromatographie liquide couplé à la spectrométrie de masse en tandem (LC-MS/MS)».

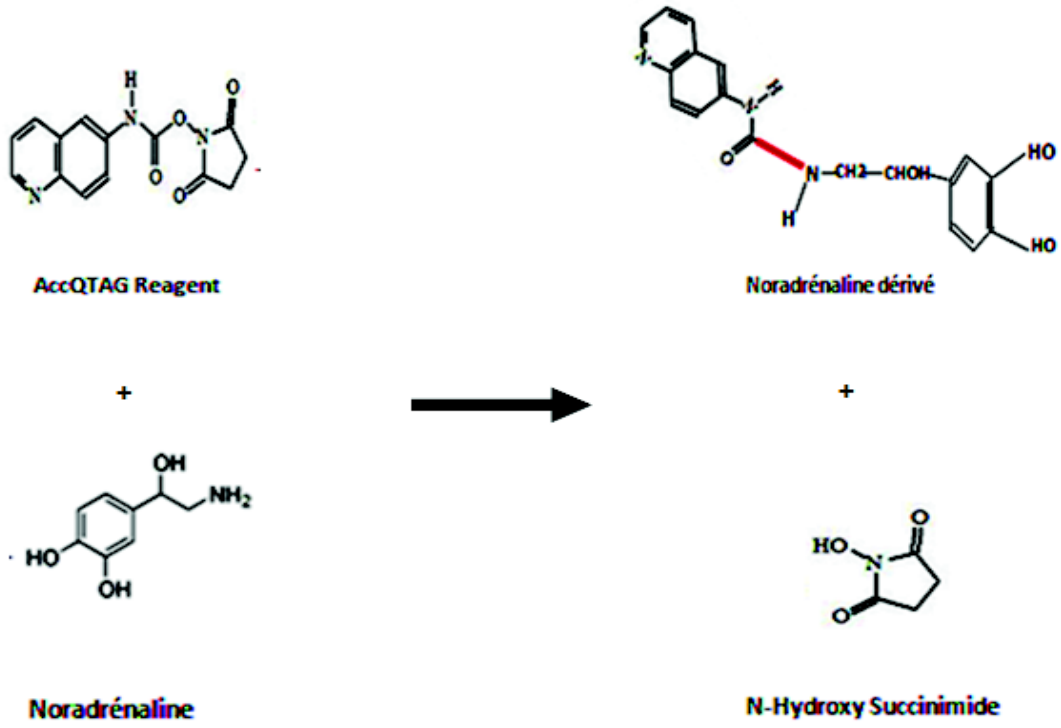
Préparation des échantillons pour l'analyse en chromatographie liquide couplé à la spectrométrie de masse en tandem (LC-MS/MS).

- Prélèvement du tronc cérébral pour chaque groupe à deux points temporel distincts 2 et 8 semaines. J'ai suivi les étapes suivantes :
  - Homogénéisation des tissus dans l'eau ultra pure (500µl).
  - Sonication pendant 10secondes à 70% Ampl.
  - Centrifugation : 5 à 10min à 15000 g.
  - Quantifications des protéines par la méthode de **Bradford.**

Pour le dosage des catécholamines, j'ai utilisé le « AccQ•Tag™ Ultra *Derivatization* Kit » de dosage pour les acides aminés. C'est une méthode de quantification de l'acide aminé rapide, reproductible et sensible dans des échantillons biologiques, en

particulier. La méthode a été développée et validé en utilisant des mélanges de types d'acides aminés contenant des acides aminés acides, neutres et basiques. Ce kit peut permettre une détection UV. Cependant, cette méthode est applicable à toutes molécules possédant une fonction amine. La détection des produits peut se faire par LC-MS/MS.

Exemple de la dérivation de la Noradrénaline en utilisant le *«* AccQ•Tag *™* Ultra Derivatization Kit».



<u>Pour AccQTAG dérivation on mélange</u> :

- 10µl de l'échantillon
- 10µl du standard interne deutéré.
- 45 µl tampon borate
- 10 µl du l'AccQTAG derivative agent

- Vortexer, attendre 10 min à T°C ambiante (travailler dans le noir)
- Placer les tubes au Thermomixer à 55°C à 10 min
- laisser refroidir en suite (micro-centrifuge)
- Ajouter **25** d'acide formique à 0.4%
- Injection par LC-MS/MS

❖ Elution des catécholamines par UPLC

Les séparations ont été réalisées sur une colonne de type phase inverse (Accucore RP-MS de 18 carbones, 100 x2.1 mm 2.6 µm, Thermo Electron) avec un débit de 0.4ml/min à 40°C. L'élution des catecholamines a été réalisée à l'aide d'un gradient (Tableau suivant) utilisant les tampons suivant :

Tampon A	**H2O 99.9%/acide formique 0.1%v/v**
Tampon B	**Acetonitrile 99.9% / acide formique 0.1% (v/v).**

❖ Quantification des catécholamines par la spectrométrie de masse.

L'analyse quantitative des catécholamines a été réalisée en mode Selected Reaction Monitoring (SRM). Cette approche permet de quantifier uniquement les ions fils sélectionnés, issus de la fragmentation des catécholamines. L'ionisation electrospary s'est fait à 3600 Volts, alors que le capillaire de nébulisation était chauffé à 292°C. La température du tube de transfert d'ions était de 342°C. La pression du gaz de collision (argons) appliqué était de 2mTor. Les transitions (productions des ions fils) et les énergies de collision appliquées sont indiquées dans tableau suivant :

Composé	Précurseur (m/z)	Produit (m/z)	Énergie de collision (V)
AccQTAG-Noradrénaline	340.25	171.1	35
AccQTAG-C6-Noradrénaline	346	171.11	35
AccQTAG-Sérotonine	347.25	171.149	38
AccQTAG-D4-Sérotonine	351.25	171.149	40
AccQTAG-Adrénaline	354	171.154	38
AccQTAG-D6-Adrénaline	360.25	171.153	36
AccQTAG-Dopamine	324.25	171.15	33
AccQTAG-D4-Dopamine	328.25	171.165	35
AccQTAG-L-dopa	368.25	171.105	35
AccQTAG-D3-L-dopa	372.25	171.151	36

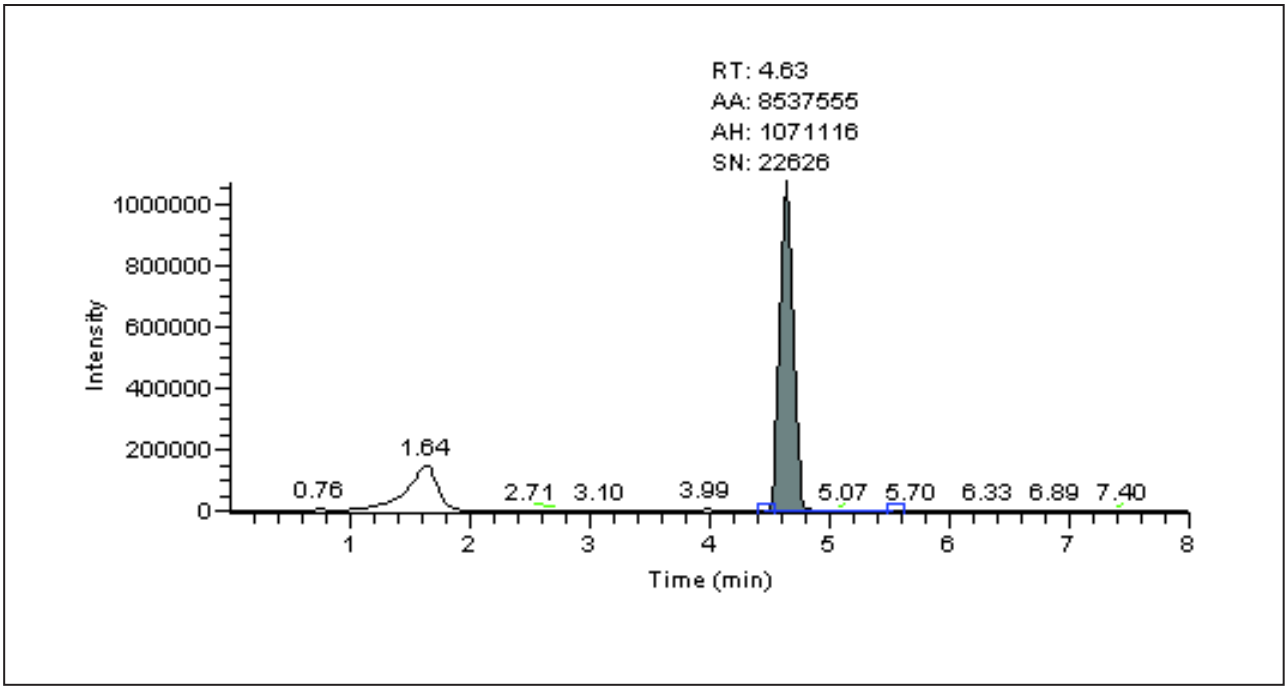


Figure 26 : Exepmle d'un spectre HPLC « AccQ-Tag-Serotonine »

L'identification et la quantification des composées sont basées sur

- Les temps de rétention en UPLC et les coélution avec des standards internes deutérés
- La sélection des ions parents
- La présence des ions fils

L'association des modules UPLC et MS/MS confère une spécificité et une sensibilité de détection idéales. L'utilisation de standards internes deutérés permet quant à elle d'estimer d'une manière absolue et fiable les quantités des catécholamines présentes dans les échantillons : en effet, les caractéristiques physico-chimiques des analytes d'intérêt et de leurs homologues deutérés sont similaires. L'élution sur la colonne UPLC, l'ionisation et la fragmentation des standards internes se déroulent donc de la même manière que pour les molécules d'intérêt correspondante. La seule différence entre les standards et les molécules recherches réside dans l'ajout de masse correspondant aux atomes de deutérium ou de carbone.

2.5 Injections intra-amygdaliennes

Pour procéder à ces injections, l'implantation chronique de canules intracérébrale dans le noyau basolatéral de l'amygdale (BLA) a été rendue nécessaire. Elles ont permis de montrer l'action de plusieurs composés bloquant la transmission GABAergique et glutamatergique dans la réponse nociceptive. C'est sur cette base que le mode d'action de l'étifoxine, comparativement au diazépam, a pu être caractérisé.

2.5.1 Anesthésie des animaux

Les souris sont anesthésiées par une injection intrapéritonéale de Médétomidine (Domitor®, 1 mg/kg) et de Kétamine (Imalgène®, 75 mg/kg). La kétamine est un antagoniste du récepteur NMDA du glutamate et va avoir une action dissociative. La Médétomidine est un agoniste des récepteurs α_2 adrénergiques et est utilisée pour ses effets sédatif, analgésique et myorelaxant. Les animaux sont alors montés sur un cadre stéréotaxique et reposent sur un dispositif chauffant maintenant leur température corporelle à leur valeur physiologique (37 $\pm$ 1°C) durant toute la durée de la chirurgie. On vérifie ensuite que le crâne de l'animal est parfaitement horizontal (« flat skull ») afin d'éviter tout biais lors de la prise des coordonnées stéréotaxiques.

2.5.2 Implantation stéréotaxique bilatérale des canules dans le BLA

Une incision sagittale de la peau du crâne est effectuée afin de pouvoir discerner les repères anatomiques que sont le Lambda et le Bregma. Ces sutures des différents os crâniens servent de référence afin de prendre les coordonnées stéréotaxiques du BLA à l'aide de l'atlas publié par Paxinos et Watson (Paxinos and Watson 2001). Pour chaque animal, les coordonnées sont les suivantes : Antéro-postérieur, -1.8 mm ; Latéral, $\pm$ 3.1 mm ; Dorso-ventral, - 4.2 mm. Après mesure de ces coordonnées, deux trous sont percés dans le crâne à l'aide d'une fraise dentaire au dessus des BLA de chaque côté. Avant de descendre les canules, deux vis sont insérées dans l'os crânien en avant et en arrière de l'emplacement des canules. Ces vis serviront de points d'ancrage pour le ciment dentaire. Les canules (diamètre externe : 0,64 mm, diamètre interne : 0,32 mm, PlasticsOne, USA), sont ensuite descendues lentement l'une après l'autre dans la structure. L'ensemble des éléments est alors

inclus dans du ciment dentaire, puis l'animal est retiré du cadre stéréotaxique afin qu'il récupère de la chirurgie pendant environ 1 semaine.

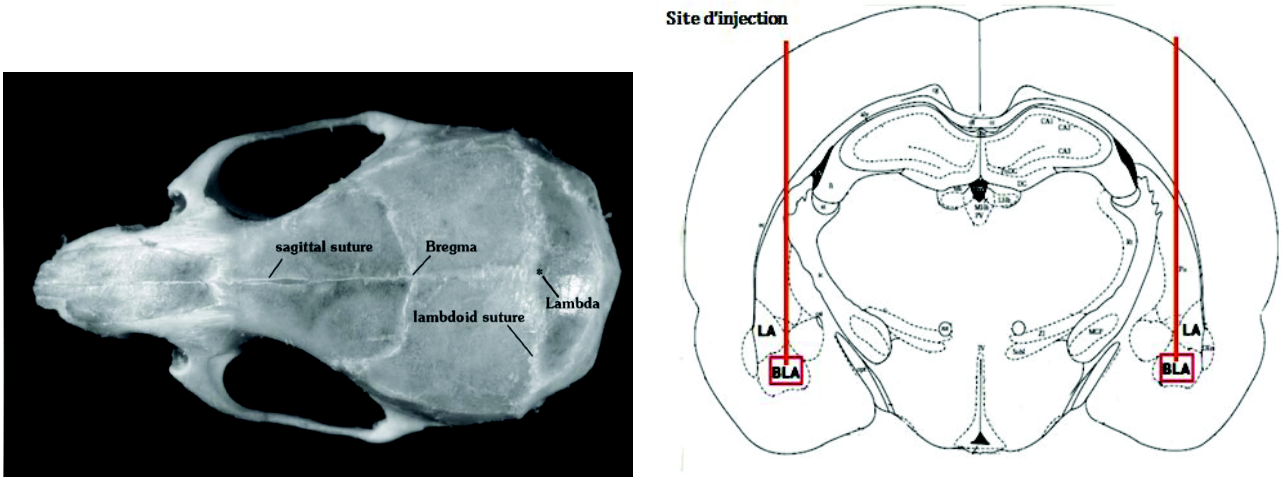


Figure 27 : La surface dorsale de l'os crânien de la souris, montrant les points de références : Bregma et Lambda. (*Paxinos and Waston 2001*).

2.5.3 Injections chez la souris libre de ses mouvements

Le jour de l'injection, l'animal est anesthésié légèrement à l'isoflurane 2% afin de faciliter la mise en place des aiguilles d'injection (diamètre externe : 0,30 mm, diamètre interne : 0,15 mm, longueur : 6 mm, PlasticsOne, USA) dans les deux canules. L'animal est alors placé dans une petite boite en plastique transparent sans couvercle, afin de limiter ses déplacements pendant l'injection dans les canules. Un volume de 0,5 µL de la solution d'intérêt est injecté durant 5 minutes (débit de 0,1 µL/min) à l'aide d'une micropompe d'injection (CMA 400, CMA Microdialysis, Suède). Les aiguilles sont alors laissées en place pendant 5 minutes supplémentaires pour s'assurer que l'ensemble du volume injecté ait correctement diffusé dans la structure, et ne remontera pas par capillarité dans la canule lorsque l'on retirera l'aiguille. Les animaux sont ensuite placés directement dans leurs cages de von Frey pour être testés 15 minutes après l'injection. L'injection suivante s'effectue au minimum une semaine après la précédente, et un maximum de 4 injections par canules peut être effectué. Au-delà, l'insertion à répétition de l'aiguille dans la canule peut causer des dommages certains dans la structure visée.

2.5.4 Préparation des substances pharmacologiques

Toutes les solutions pour les injections ont été préparées extemporanément dans une solution saline (NaCl 0,9 %). La bicuculline (Sigma-Aldrich, France), un antagoniste spécifique des récepteurs $GABA_A$, a été diluée dans de l'eau pure pour une concentration stock de 10 mM, puis utilisée à une concentration finale de 10 µM.

Le MK-801 (Sigma-Aldrich, France), un antagoniste non-compétitif des récepteurs NMDA du glutamate, a été dilué dans de l'eau pure pour une concentration stock de 1 mM, puis utilisé à une concentration finale de 1 µM. Le diazépam (Roche, France), une benzodiazépine ayant une action allostérique positive sur les récepteurs $GABA_A$, a été dilué dans de l'éthanol absolu pour une concentration stock de 10 mM, puis utilisé à une concentration finale de 10 µM. La concentration finale d'éthanol est inférieure à 0,1 %. L'étifoxine (6-Chloro-4-methyl-4-phenyl-3,1-benzoxazin-2-yl (ethyl) aminehydrochloride ou Stresam®, Biocodex, Gentilly, France) est diluée dans du DMSO pour une concentration stock de 100 mM. L'EFX est utilisée diluée dans la saline à la concentration finale de 60 µM. La concentration finale de DMSO est inférieure à 0,1 %. Enfin, dans certaines expériences un blocage de la neurostéroïdogénèse était nécessaire. Nous avons alors utilisé du finastéride (Sigma-Aldrich, France), un inhibiteur de la 5α-réductase qui réduit les stéroïdes en composés neuroactifs. Les animaux ont reçu des injections sous-cutanées (25 mg/kg) tous les 2 jours durant 2 semaines. Le finastéride est dilué dans le l'éthanol absolu pour une concentration stock de 10 mM, puis mélangé à l'huile d'olive pour l'injection. Le volume total de la suspension injectée est de 200 µL par animal.

2.5.5 Prélèvement des cerveaux pour vérification histologique

A la fin de l'expérience, la dernière injection est réalisée avec du bleu de pontamine (Chicago blue', Sigma-Aldrich, France), ce qui permet a posteriori de faire une vérification histologique du site d'implantation des canules (Figure 27). Après l'injection, on attend environ 30 minutes afin que le colorant se répartisse de façon homogène dans le BLA. Les animaux sont alors anesthésiés avec de l'isoflurane 2,5 % puis décapités. Leur cerveau est prélevé puis immédiatement placé dans une solution d'isopentane (SigmaAldrich, France) à -80°C. Après cette congélation rapide, la

conservation des cerveaux peut alors se faire à -21°C jusqu'au moment de la réalisation des tranches. On utilise ensuite un cryostat (Microm HM 560, Thermo Scientific, USA) afin de couper les cerveaux en tranches coronales d'une épaisseur de 40 µm. Les tranches sont récupérées et directement montées sur lame pour une observation au microscope (Leica DMRD, Allemagne). Le cerveau de chaque animal est alors contrôlé afin de s'assurer de la bonne implantation bilatérale des canules dans le BLA (Figure 27). Si l'une des deux, ou les deux canules d'un animal s'avèrent être mal implantées, ce dernier est retiré de l'étude.

2.6 Immunohistochimie du TSPO

Les animaux sont euthanasiés par dislocation cervicale, le cerveau est immédiatement prélevé et mis dans une matrice pour réaliser des tranches coronales d'une épaisseur de 40 µm. Toutes les opérations, à partir du prélèvement du cerveau, sont effectuées sur la glace. L'immunohistochimie a été réalisée sur un ensemble distinct d'animaux (n = 6).

Trois à quatre semaines après le Cuff, les souris ont été perfuses par voie intracardiaque avec 100 ml du phosphate buffer (PB) (0,1 M, pH 7,4), suivi de 100 ml d'une solution contenant 4% de paraformaldehyde dans du phosphate buffer (PB).

Les tranches contenant nos régions d'intérêt ont été recueillies, immergé pendant la nuit dans le même fixateur, et lavés le lendemain dans un tampon phosphate salin (PBS). Les tranches coronales ont été préparées en utilisant un vibratome (Leica VT1000S, Nussloch, Allemagne), ensuite, elles ont été rincées trois fois pendant 10 min dans du tampon phosphate salin (PBS) et incubées pendant 1 h dans une solution de blocage constituées du tampon phosphate salin (PBS) contenant 5% de sérum d'âne et 0,5% de Triton X-100.

Les sections ont ensuite été incubées pendant une nuit avec un anticorps anti-TSPO « anti-Peripheral-Type Benzodiazepine Receptor (TSPO)» (Polyclonal de lapin 1: 400, ref : ab108489, abcam) dilué dans du PBS contenant 1% de sérum d'âne et 0,5% de Triton X-100. Après lavage avec du PBS (5 x 10 min), les coupes ont été incubées avec l'anticorps secondaire (Alexa Fluor 488 donkey anti-rabbit IgG: 1:1000; Sigma-Aldrich) pendant 2 h à température ambiante. Après rinçage avec du PBS (3 x 10 min), les coupes ont été montées sur des lames revêtues de gélatine. Les

échantillons ont été analysés et photographiées à l'aide d'un microscope (Leica DMRD, Allemagne).

2.7 Statistiques

Les analyses statistiques ainsi que les graphiques ont été effectués avec le logiciel Prism 6.0 (GraphPad Software, USA).

Les résultats sont exprimés en valeur moyenne ± SEM (erreur standard à la moyenne). Dans les différents graphiques, la barre d'erreur correspond à la SEM.

Le test non paramétrique de suivi d'un test post-hoc de Tukey a été utilisé afin de comparer les effets d'un traitement sur un même animal, ou pour comparer les différents groupes entre eux. Le seuil de significativité a été fixé à 5 %.

C. Résultats

a. Partie I

Rappel du contexte scientifique et objectif du travail.

La douleur neuropathique est un syndrome secondaire à une maladie ou à une lésion affectant le système nerveux somatosensoriel. Environ 30% des patients souffrant de douleurs neuropathiques présentent des troubles de l'humeur. Les causes biologiques de ces comorbidités ne sont pas clairement établies. Grâce à l'utilisation d'un modèle murin de douleur neuropathique, nous avons cherché à comprendre l'effet d'un traitement à l'étifoxine sur les conséquences émotionnelles de cette douleur.

Plusieurs études montrent que les troubles dépressifs et les troubles anxieux coexistent chez les patients souffrent de douleur chronique (Twillman 2007). Les patients souffrant également de troubles d'ordre cognitif, les plus fréquents sont des troubles de la mémoire, des problèmes d'anticipation, une difficulté de concentration et des troubles attentionnels. Chez le rongeur, et malgré les nombreuses études explorant les mécanismes de la douleur chronique, peu d'entre elles se sont intéressées aux relations entre douleur et troubles affectifs, notamment l'anxiété. En 1999, Kontinen et collaborateurs n'ont pas réussi à mettre en évidence des troubles anxieux deux semaines après l'induction d'une neuropathie part ligature des nerfs spinaux (Kontinen et al. 1999). Par contre, une autre étude a pu monter un états anxieux chez la souris 4 semaines après l'induction de la douleur par ligature du nerf sciatique ou par injection intraplantaire de CFA (Narita et al. 2006). Plus récemment, la présence de signes d'anxiété et de dépression a pu être démontrée en utilisant le modèle de douleur neuropathique par compression chronique avec un « cuff » (Yalcin et al. 2011). Ainsi, l'apparition de comportements de type anxieux puis dépressifs se développent quatre semaines après la chirurgie induisant la neuropathie. Ces études montrent qu'il existe aussi, chez le rongeur, un lien de comorbidité entre la douleur chronique et les états anxieux/dépressifs. La séquence temporelle semble faire se succéder le développement d'un symptôme douloureux persistent, l'anxiété puis le comportement dépressif.

Dans l'étude qui suit, l'hyperalgésie mécanique statique sera mesurée à l'aide des filaments de von Frey et la composante aversive de la douleur, mesurée à l'aide du test de préférence de place, complètera l'établissement du phénotype douloureux. Contrairement au test de von Freyqui mesure une réponse à une

douleur provoquée (i.e. hyperalgésie), ce test mesure une réponse à une douleur spontanée (King et al. 2009). Cette évaluation est très importante car nous savons que les douleurs spontanées sont très invalidantes et très fréquentes chez les patients souffrant de douleur neuropathique ((Backonja and Stacey 2004). Toutefois, ce signe est difficile à mettre en évidence chez l'animal dont la plainte ne peut pas être perçue pas de manière évidente pour les expérimentateurs. En complément, une série de testsmesurant l'anxiété et la dépression sera effectuée dès la 4ème semaine de neuropathie.

L'objectif du travail est d'évaluer le potentiel thérapeutique de l'étifoxine sur les symptômes douloureux et les troubles anxiodépressifs induits par la douleur neuropathique. Ce travail n'a jamais été mené sur les symptômes douloureux développés par les souris. Une mesure des concentrations de monoamines (sérotonine, dopamine, noradrénaline) dans el tronc cérébral vient compléter l'étude car ces molécules sont bien connues pour influencer les réponses émotionnelles.

Les résultats montrent qu'un traitement par 5 injections journalières d'étifoxine (50mg/kg) supprime durablement les symptômes d'hyperalgésie. Le comportement de préférence de place pour recevoir une injection d'analgésique (i.e. clonidine) est également supprimé sans que les capacités cognitives des souris semblent affectées par le traitement à l'étifoxine. Les troubles anxiodépressifs qui s'installent habituellement 4-6 semaines après l'induction de la neuropathie sont également indétectables après traitement à l'étifoxine. Enfin, des variations dans les concentrations de sérotonine et de noradrénaline pourraient laisser penser que ces contrôles sont rétablis par le traitement.

Article I

ETIFOXINE EFFECTS ON PAIN SYMPTOMS, REACTIVE ANXIETY AND DEPRESSIVE-LIKE BEHAVIORS IN NEUROPATHIC MICE

Nisrine Kamoun, Yannick Goumon, Ipek Yalcin, Pierrick Poisbeau

Centre National de la RechercheScientifique and University of Strasbourg, Institute for Cellular and Integrative Neuroscience (INCI), F -67084 Strasbourg, France

Correspondingauthor: Prof. Pierrick Poisbeau, Institut des Neurosciences Cellulaires et In, CNRS UPR-3212, 5 rue Blaise PascalStrasbourg cedex. Email: poisbeau@inci-cnrs.unistra.fr

Number of pages: xx

X figures, x table

Number of words: Abstract (xxx), Introduction (xxx), and Discussion number of words: xxx (Abstract, Introduction, Materials & Methods, Results, Discussion, References and Figure Legends)

Conflict of Interest: Pierrick Poisbeau, Nisrine Kamoun received financial support from Biocodex to investigate etifoxine molecular mechanisms of action. Other authors declare no conflict of interest.

Acknowledgements: The following institutions gave their support to the project: Centre National de la RechercheScientifique, Université de Strasbourg, and a scholarship from Région Alsace to NK. We thanks Biocodex laboratories (Gentilly, France) for kindly providing us with etifoxine.

Abstract

Neuropathic pain is associated with significant co-morbidity, including anxiety and depression, which impact considerably on the overall patient experience. Several lines of evidence suggest that anxiolytics may be of interest to alleviate pain symptoms and the associated negative emotions in chronic pain states. Among them, the non-benzodiazepine anxiolytic etifoxine (EFX: stresam™) has an interesting pharmacological profile. In patients, it has a weak sedative action, with limited functional tolerance and dependence, and without cognitive declines.

Aims

In this study, we aim at analyzing the preclinical therapeutic potential of etifoxine on the anxiodepressive consequences of neuropathic pain.

Methods

Neuropathic pain is induced by the implantation of a compressive cuff around the main branch of the sciatic nerve. Mechanical nociceptive thresholds were measured with von Frey filaments applied directly on the plantar surface of the mice hindpaws. Spontaneous pain was assessed by the conditioned place preference (CPP) test for clonidine analgesia. Two weeks after cuff implantation, EFX treatment (or vehicle) was administered daily and for 5 days, at a reference dose of 50mg/kg IP**.** Anxiety and depressive like behaviors were evaluated by a battery of behavioral tests including novelty suppressed feeding (hyponeophagy), marble burying, splash and forced swim test. Eventually, dosages by mass spectrometry were performed in order to quantify the brainstem levels of monoamines, which are known to highly control emotional responses.

Results

Mechanical allodynia resulting from the compression of the sciatic was fully abrogated after 2-3 daily injections of etifoxine and allodynia never reappeared after the 5-day treatment for at least 90 days. Etifoxine analgesia was further confirmed using the CPP test since EFX-treated mice did not show any preference for the clonidine compartment associated with analgesia. We also show that EFX-treatment did not altered the memory acquisition performance of mice which were able to develop a preference for the recreational effect of morphine. Compared to vehicle-

treated mice which exhibited anxious and depressive-like behaviors 4-6 weeks after the initiation of neuropathic pain, EFX restored normal anxiodepressive behaviors levels as seen for non-painful mice. This observation fits well with the normalization of serotonin levels after EFX treatment. EFX-induced increases in noradrenaline may also contribute to limit the reactive anxiodepressive signs in neuropathic mice.

Conclusions

Our results showed that a 5-day treatment with EFX not only suppressed pain symptoms and spontaneous pain behaviors, but also prevented theanxiodepressive consequences of this neuropathic pain state. This effect is likely to involve the monoamine descending controls since serotonin and noradrenaline levels are re-established at control levels in the brainstem.

Introduction

There is a significant co-morbidity between neuropathic pain and various neuropsychiatric disorders, including anxiety and depression (Bair et al. 2003; Dersh). The high prevalence of these disorders and associated clinical burden among patients with chronic pain is well recognized, although the evidence for common pathophysiological mechanisms is only now beginning to emerge (RJ 2005; Ulrich-Lai et al. 2006). In addition, chronic pain patients have an increased incidence of depression and anxiety, stress-related disorders that are frequently accompanied by disturbances in the limbic system (e.g. hippocampus and amygdala) and the HPA axis. A recent study found symptoms of depression and anxiety in the majority of patients suffering from lesions of a peripheral nerve or nerve root,(Meyer-Rosberg et al. 2001) with one study finding a prevalence rate for depression approaching 100% among chronic pain patients . In turn, there is evidence for the deleterious impact of affective illness on both the diagnosis and prognosis of neuropathic pain (Gustorff et al. 2008).

Rodent models have proved valuable in identifying pathophysiological mechanisms and therapeutic targets for emotional (Cryan and Holmes 2005) and pain disorders (Gustorff et al. 2008; Hasnie et al. 2007; Takahiro Suzuki et al. 2007) However, relatively few studies have investigated the potential effects of neuropathic pain on measures of fear-avoidanceand depression-related behaviors in rodents. Gonçalves and colleagues (Gonçalves et al. 2008) found that Spared nerve injury induced neuropathic pain and after two months of neuropathic pain, SNI animals exhibited signs of sustained persistent pain associated with a significant depressive-like behavior. At the CNS level, a structural reorganization of the amygdaloid complex was observed that was associated with a significant increase in the volume of the basolateral (BLA) and central (CeA) AMY nuclei. Recently, a mice modelof neuropathic pain, using a calibrated chronic constriction of the sciatic nerve by means of a polyethylene cuff, showed that that neuropathic pain induced anxiety and depression-related behaviors in a time-dependent manner (Yalcin et al. 2011). Indeed, neuropathic mice developed anxiety-related behaviors 4 weeks after the surgery, whereas depression-related behaviors were only observed after 6 weeks following the induction of neuropathic pain (Yalcin et al. 2011).

Mood disorders might be the result of an abnormal processing of pain informations through the pain matrices and particularly by limbic structures in charge of coding the affective and emotional component of pain. With regards to the known modulators of emotions in normal and pathological states(Berton and Nestler 2006), the function of monoamines in these circuits might be strongly altered. This idea is supported by the relative efficacy of antidepressant to treat neuropathic pain states, either by inhibiting monoamine reuptake (e.g. selective serotonin reuptake inhibitors, SSRIs) or by inhibiting their catabolism (e.g. monoamine oxidase inhibitors). The efficacy of monoaminergic controls is also placed under a fine control by local GABAergic inhibitory interneurons, whose function was demonstrated to be altered in several preclinical models of neuropathic pain conditions as well .This is the reason why re-establishing GABAergic inhibition in the nociceptive system could, in principle, be an interesting therapeutical strategy. Moreover, this action is expected to reduce pain as well as to control associated emotional disorders(Munro, Hansen, and Mirza 2013).In line, we recently proposed to use compounds which promote the local production of analgesic neurosteroids acting at GABAA receptors (Poisbeau et al. 2014), thus possibly giving rise to long-lasting effects.

Etifoxine (EFX), a non benzodiazepine anxiolytic, has several advantages with respect to the above strategy. Etifoxine not only binds to a specific site on the β subunit of GABAA receptors to potentiate its function(A. Hamon et al. 2003b). It can also stimulates the local synthesis of neurosteroids by stimulating cholesterol transport into the mitochondria to further amplify GABAergic inhibition ((A. Hamon et al. 2003b; R??my Schlichter et al. 2000; M. Verleye et al. 2001). Etifoxine has been shown to alleviate pain symptoms in several experimental models of pain and this includes chemotherapy-induced generalized neuropathy, mononeuropathy and inflammation in rats (M Aouad et al. 2014; Maya Aouad et al. 2009, 2014). Little is known, however, on its efficacy as pain killer in mice and its interest to reduce the emotional alteration resulting from nerve lesions.

Thus, the aim of the present study was to evaluate the anxiolytic and antidepressant-like effects of etifoxine in a murine model of neuropathic pain. We used the sciatic nerve compression model of neuropathy in mice (Benbouzid et al.

2008)to assess time-dependent changes in mechanical nociception and emotional disorders. In parallel, monoamine levels in the brain stem were measured.

Materials & Methods

Animals and ethical issues

All the experiments were performed on male C57BL/6J mice aged from 8 to 12 weeks at the time of surgery. The mice were group-housed four or five per cage and maintained under a 12h light dark cycle (light on at 6:00 am) with water *ad libitum*.

Neuropathic pain model

We used a murine model of neuropathic pain induced by a chronic compression of the right sciatic nerve by mean of a calibrated polyethylene cuff. This model, initially developed in the rat (Mosconi and Kruger 1996) has been adapted to mice and fully characterized for the time course of pain and anxiodepressive symptoms (Benbouzid et al. 2008; Yalcin et al. 2011).

All surgeries were done under aseptic conditions and ketamine/xylazine anesthesia (ketamine: 17 mg/mL, i.p., xylazine: 2.5 mg/mL, i.p., 4 mL/kg; Centravet, Taden, France). The common branch of the right sciatic nerve was exposed and a 2 mm long splitted section of polyethylene tubing (ID = 0.38 mm, ED = 1.09 mm; PE-20, Harvard Apparatus, Les Ulis, France) was placed around it (Cuff group). The shaved skin layer was closed using suture. Sham-operated mice underwent the same surgical procedure as described above but without implantation of the cuff (sham group).

Von Frey measure of mechanical nociception

The mechanical threshold for hindpaw withdrawal was determined using von Frey hairs (Chaplan et al. 1994). Mice were placed in clear Plexiglas® boxes (7 cm × 9 cm × 7 cm) on an elevated mesh screen. Calibrated von Frey filaments (Bioseb, Chaville, France) were applied to the plantar surface of each hindpaw in a series of ascending forces (ranging between 0.4 g and 15 g). Each filament was tested 5 times per paw, and the mechanical threshold was defined as 3 or more withdrawals observed out of the five trials.

Conditioned place preference

Multi-trial morphine conditioning: A place-conditioning procedure was performed as described in earlier studies (Han et al*,* 2010). Preconditioning to an automated 3 chamber CPP box was performed across 3 days. All animals were exposed to the environment with full access to all chambers across 30 min each day. On day 3, behavior was recorded for 15 min and analyzed to verify absence of preconditioning chamber preference. Animals spending more than an 80% (time spent > 720 sec) or less than 20% (time spent < 120) of the total time in a chamber were eliminated from further testing (approximately 10% of total animals). Following the pre-conditioning phase, mice underwent conditioning across 3 days with alternating treatment-chamber pairings, animals were conditioned to the saline-paired side for 30 min in the morning and to 5 mg/kg of s.c. morphine-paired side for 30 min in the afternoon. After three conditioning sessions, animals were tested for 20 min, and preference was determined as time spent in the drug-paired compartment after conditioning minus time spends in the drug-paired compartment at baseline. Animals showing strong bias (over 250 s difference in the time spent between the two sides) for one side at baseline were excluded from the study.

Single trial clonidine conditioning: All experiments were conducted following the previously published procedure for rats (King et al. 2009). The apparatus (Imetronic, Pessac, France) consists of 3 Plexiglas chambers separated by manually operated doors. Two chambers (size 15 cm x 24 cm x 33 cm) distinguished by the texture of the floor and by the wall patterns are connected by a central chamber (size 15 cm x 11 cm x 33 cm). Three to four weeks after the Cuff/Sham surgery, mice went through a 3-day preconditioning period with full access to all chambers for 30 minutes each day. Time spent in each chamber was analyzed to control for the lack of spontaneous preference for one of the compartments. Animals spending more than 75% or less than 25% of the total time in one of the lateral chambers were removed from the study. On the conditioning day (day 4), mice first received intrathecal saline (10 µl) and were placed in a conditioning chamber. Four hours later, mice received intrathecal clonidine (10 µg /10 µl) and were placed in the opposite chamber. Clonidine is a α2-adrenoceptor agonist classically inducing analgesia after intrathecal administration. Conditioning sessions lasted 15 minutes each, without access to the

other chambers. On the test day (day 5, 20 hours after the last afternoon session), mice were placed in the center chamber with free access to all chambers and the time spent in each chamber was recorded for 30 minutes. With this procedure, CPP is the consequence from combined spontaneous pain-induced aversion to the unpaired side and spontaneous pain relief-induced reward in the clonidine paired side.

Anxiety and depression-related tests

Novelty Suppressed Feeding Test (NSF): The testing apparatus consisted of a 40x40x30 cm plastic box with the floor covered with 2 cm of sawdust. Twenty-four hours before the test, food was removed from the home cage. At the time of testing, a single pellet of food was placed on a paper in the center of the box. An animal was then placed in a corner of the box and latency to first contact or to eat the pellet were recorded within a 5-min period. This test induces a conflict between the drive to eat the pellet and the fear of venturing in the center of the box (Luca Santarelli et al. 2003).

Marble Burying Test: This test was done in Plexiglas® cages (27x16x14 cm) containing 3 cm of fine sawdust. Twenty-five glass marbles (1 cm diameter) were evenly spaced on top of the sawdust. Mice were placed individually into the cages and left undisturbed for 30 minutes, following which they were removed, and an observer blind to the condition of the animals counted the buried marbles. Marbles were considered buried if two thirds or more of their surface was covered by sawdust. The number of buried marbles is considered a measure of animal anxiety (Benbouzid et al. 2008; Jacobson et al. 2007; Nicolas, Kolb, and Prinssen 2006).

Splash Test: This test, based on grooming behavior, was performed as previously described (Luca Santarelli et al. 2003; Yalcin et al. 2008). The frequency and latency of the grooming behavior were scored during 5 min after spraying a 10% sucrose solution on the dorsal coat of the mice.

Forced Swim Test: Forced swim test (FST) (Porsolt, Le Pichon, and Jalfre 1977) was done by gently lowering the mouse into a glass cylinder (height 17.5 cm, diameter 12.5 cm) containing 11.5 cm of water (23°–25°C). Test duration was 6 min. The mouse was considered immobile when it floated in an upright position and made only small movements to keep its head above water. Because little immobility was

observed during the first 2 min, the duration of immobility was quantified over the last 4 min of the 6-min test.

Intrathecal (i.t.) injections

Briefly, a 27-gauge needle connected to a 50 µL Hamilton syringe was inserted between the L_5 and L_6 vertebrae, into the sub-arachnoidal space. The needle placement was checked by the elicitation of a tail flick movement.

Intrathecal (i.t.) injections of the clonidine (10 µg in 10 µL) were performed under halothane anaesthesia after 3 weeks of treatment. For technical reasons, such procedure can be done only twice on the same mouse. This procedure is similar to the one previously used to assess antiallodynic action of antidepressant drugs (Yalcin et al. 2009b).

Mass spectrometry dosage

Tissue collection: Brains were removed from the skull of C57Bl/6j mice anesthetized with a mixture of ketamine (75 mg/kg, i.p.) and xylazine (5 mg/kg, i.p.). Brainstem was then isolated on ice and stored at −80 °C until prepared for monoamines analysis. An AccQ-tag derivatization kit (Waters) was used to quantify catecholamine concentrations in brainstem extracts following the manufacturer's instructions. Amounts of monoamines (nmole/g) were normalized according to protein's concentrations (Protein Assay; Bio-Rad) determined after the extraction homogenization.

AccQTag Derivatization & Analysis: Amino acid derivation with AccQTag reagents was conducted according to the manufacturer's protocol. Briefly, 10 µL of a biological extract were mixed with 45 µL of borate buffer and 10 µL of AccQTag reagent were added. The reaction was allowed to proceed for 10 min at 55 °C and then was measured using a chromatographic system (Dionex Ultimate 3000, Sunnyvale, CA, USA) composed of a pump with a built-in degasser (Dionex, Sunnyvale, CA, USA), The system was controlled by Chromeleon 7 (Dionex, Sunnyvale, CA, USA) Software. Standards or samples were injected at 10-µL volumes onto the MG 100 × 2.1 mm 2.6µm. column, (Thermo Electron, USA). The column was kept at 40 °C. The mobile phase consisted of formic acid 0.1% and 99.9%, of H2O, mixed together in a proportion of (*v*/ *v*). The mobile phase was pumped at a flow rate of 0.4 mL/min.

Drug

Etifoxine hydrochloride (batch 562, Biocodex, France) was suspended in 0.9% saline containing 1% Tween 80 (v/v) and administered intraperitoneally (i.p.) in a volume of 10ml/kg of body weight. Control animals received an equivalent volume of vehicle.

Statistics

Data are presented as mean $\pm$ standard error of the mean (SEM). Statistical analyses were performed with Graphpad Prism software, using multifactor analysis of variance (ANOVA) with or without repeated measures or two-tailed Student t-test. The Tukey posthoc test and Bonferroni comparisons have been used when appropriate for multiple comparisons in the analysis of behaviors. Kruskal-Wallis statistics were used for HPLC experiments. Differences were considered to be statistically significant for $p < 0.05$.

Results

Etifoxine effect on neuropathic pain symptoms in mice

As previously characterized, the cuff surgery procedure (Day 0, Figure 1A) rapidly induced a decrease in the mechanical nociceptive threshold which persisted (contrary to the sham group) for more than 90 days. This time course was in sharp contrast with that of the sham group [not shown but see (Benbouzid et al) which only displayed a transient postoperative hyperalgesia as also seen for the left hindpaw (no surgery).

As illustrated in figure 1A, mean von Frey thresholds decreased significantly for the right (cuffed) hindpaw (two-way ANOVA with repeated measure, time x paw side, $F_{(35,175)} = 19.91$; $P < 0.001$; $n = 6$ per group) compared to the left (contralateral hindpaw). Mean thresholds of the right hindpaw dropped from 8.67 ± 0.42 g at day 0 to 0.56 ± 0.03 g at day 7(Bonferroni comparisons, $p < 0.001$) whereas this value was of 7.67 ± 0.33 g for the left hindpaw (Bonferroni, $p > 0.05$) for the same day. The two groups of mice were then treated at day 15 with either etifoxine (Figure 1A) or its vehicle (Figure 1A) for 5 days (grey period). In comparison to the vehicle-treated group, etifoxine injections progressively restored within 3 days threshold similar to the contralateral side or to those measured in the sham group (not shown). Surprisingly, etifoxine alleviation of pain symptoms persisted until the end of the observation period (i.e. about 3 months here) contrary to what was seen in the vehicle-treated group.

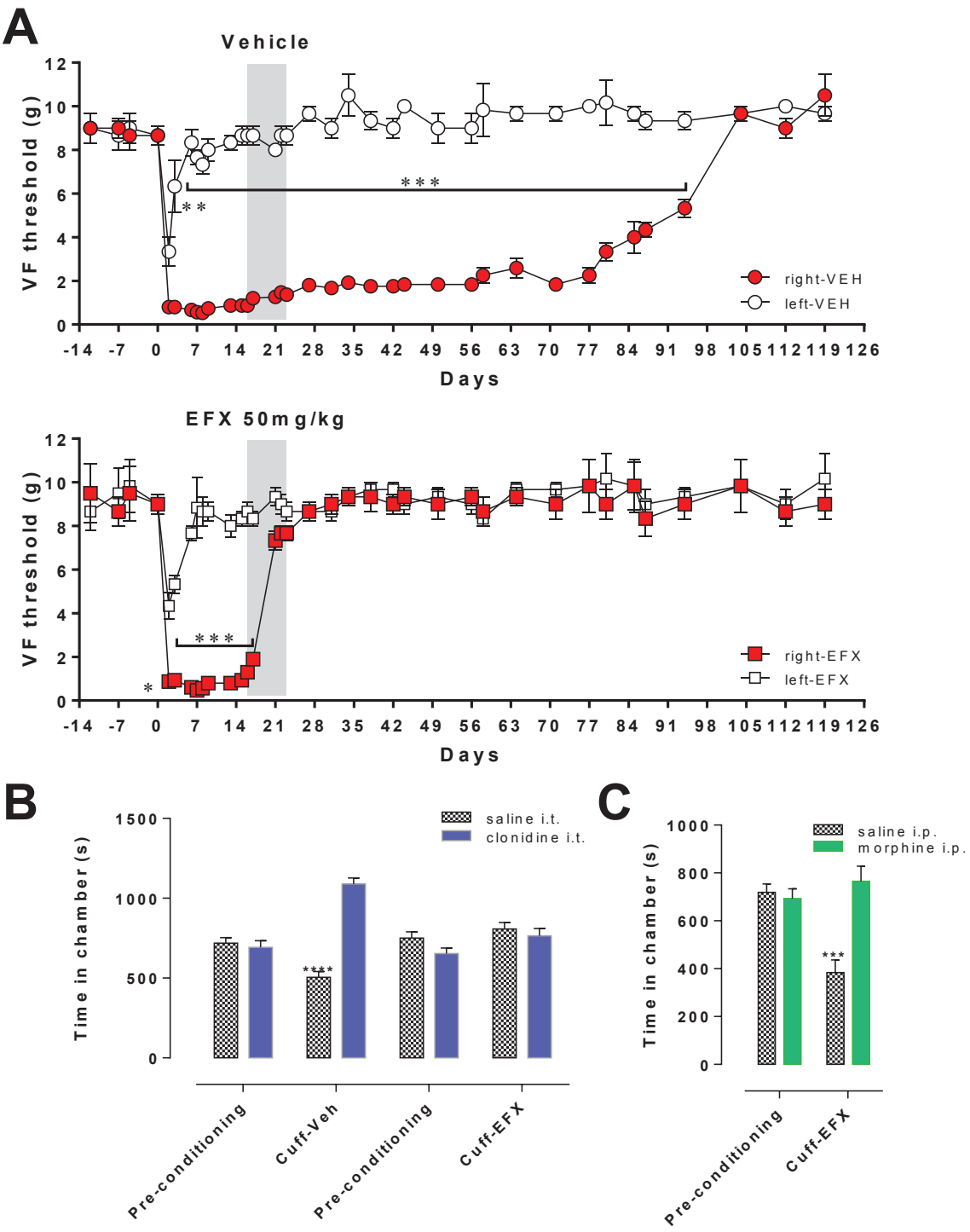


Figure 1: Characteristics of etifoxine action on mechanical nociception (A), spontaneous pain behavior (B) and morphine rewarding conditioning (C). A. Time-course of von Frey threshold before and after the cuff surgery (at day 0). Left and right hindpaw values (ipsilateral to the lesion) are shown for the vehicle- and etifoxine-treated groups (n = 6 per group). Treatment period is indicated by a grey box. B. Time spent, by vehicle- and etifoxine-treated cuff mice (n = 8 per group), in conditioning chambers associated with a single saline or clonidine injection (10 µg IT). C. Time spend in the conditioning chambers associated with 3 daily subcutaneous injection of morphine (5 mg/kg SC) for both mice groups (n = 8 per

group). Statistics: (A) Bonferroni comparisons after two-way RM ANOVA at a given time point between left and right paws. (B-C): Tukey posthoc analysis after two-way ANOVA within groups. Code (**) $p < 0.01$, (***) $p < 0.001$.

The presence of spontaneous pain is often more debilitating than the alteration of evoked nociceptive responses. Recently, it has been shown that such spontaneous pain can be unmasked in animal models of neuropathic pain by relieving the tonic-aversive state in chronic pain thanks to non-rewarding analgesic drugs. In good agreement, place preference conditioning for clonidine analgesia could clearly be demonstrated with the cuff group treated with vehicle (Figure 1B; two-way ANOVA, conditioning drug x treatment, $F_{(1, 28)} = 61, 06$; $P < 0{,}001$, $n = 8$). This was not the case for the etifoxine group thus suggesting that etifoxine provided enough analgesia to prevent mice from seeking clonidine in the conditioning compartment. To further demonstrate that etifoxine treatment does not altered the learning capacity of cuffed mice; repeated morphine administration was performed in order to reveal physical dependence and the associated preference for morphine (Figure 1C). This preference could easily be demonstrated with the EFX-treated cuff group (two-tailed Student's t-test, $t = 3.4$, $df = 7$, $p = 0.0113$) thus confirming that etifoxine has limited (if any) negative influence on learning capacities.

Etifoxine effect on anxiodepressive signs in neuropathic mice

A battery of behavioral test was then performed to assess anxiety and depression-related signs in neuropathic mice 4-6 weeks after the induction of the nerve lesion.

Novelty-suppressed feeding (NSF) test measure a rodent's avoidance of exposure to novel areas, in which they might be more vulnerable to predation (Figure 2A1). Allodynic mice (i.e. cuffed mice treated with vehicle) displayed increased time to first contact with the food pellet (Two-way ANOVA, surgery x treatment, $F_{(1,36)} = 87{,}37$; $P < 0{,}001$, $n = 10$). Etifoxine significantly shortened this time within the cuff group (compared to vehicle: Tukey, $p < 0.001$) but also between groups (EFX-treated cuff versus sham: Tukey, $p < 0.05$). The marble burying test is a useful model to measure anxiety and obsessive-compulsive behavior. A mouse with any of these emotional disorders tends to bury more marbles as significantly observed in the case of cuffed mice treated with vehicle (Two-way ANOVA, surgery x treatment,

$F_{(1,36)} = 395,2$; $P < 0,001$, $n = 10$). Once again, etifoxine treatment not only resulted in a reduced number of buried marbles compared to vehicle-treated allodynic mice and to sham disregards of the treatment (Figure 2A2).

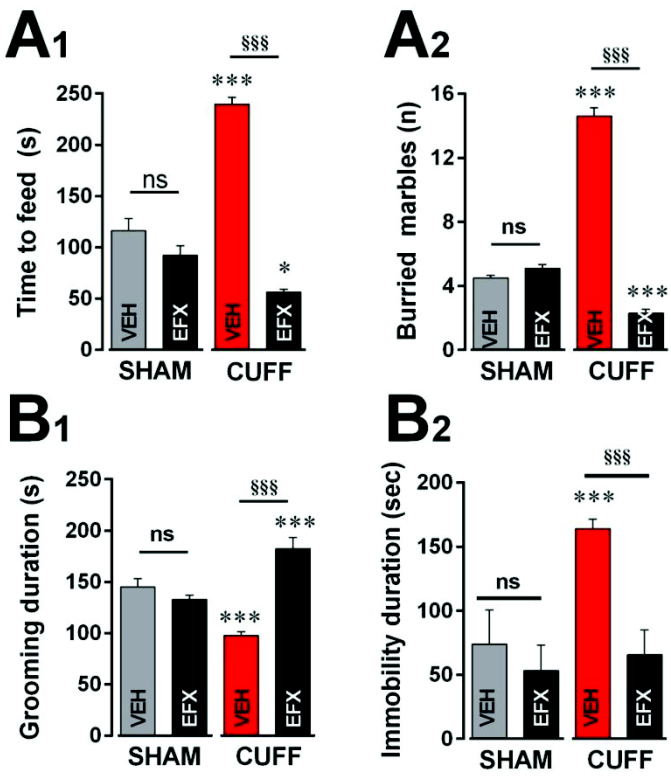


Figure 2: Effect of etifoxine on anxiodepressive signs seen in sham and cuff mice, treated or not with etifoxine (n = 10 per group). Histograms illustrating the time to feed in the novelty suppressed feeding (NSF) test (A1), the mean number of buried marbles (A2), the grooming duration after splashing sucrose (B1) and immobility duration during the forced swimming test (FST) (B2). Statistics: Tukey posthoc analysis after two-way ANOVA within groups. Code: (*) between groups – vehicle or etifoxine, (§) within groups – sham or cuff; (*) $p < 0.05$, (***,§§§) $p < 0.001$.

Depression-like phenotype was assessed using the splash test and the forced swimming test (FST). The splash test allows measurement of grooming behavior. This index of hygiene has been reported to be affected in murine models of mood disorders and is significantly reduced in the case of allodynic mice, as previously reported (Figure 2B1: Two-way ANOVA, surgery × treatment, $F_{(1,36)} = 42.93$, $p < 0.001$; $n = 10$). If etifoxine treatment was without effect in the case of sham mice (within group), it increased significantly the grooming behavior of cuff mice compared to vehicle-treated (allodynic) mice and to sham as well. Immobility duration during FST is frequently used as an index of depression-related behavior in mice and this immobility time is highly increased in mice displaying allodynia

(vehicle treated cuff mice) as shown in Figure 2B2 (Two-way ANOVA, surgery × treatment, $F_{(1,36)} = 29.67$, $p < 0.001$; n = 10). In the etifoxine treated group, immobility time could not be shown as different as in the sham group (painfree mice). Together, these test claimed for a clear alleviation of anxiodepressive signs in cuffed mice treated by etifoxine. These overall benefits might be associated with normalization of monoaminergic controls in the central nervous system. We next measured these levels in the brainstem (Figure 3) where most monoaminergic neurons are located.

Etifoxine treatment on brainstem monoamine levels

Levels of noradrenaline, between the brainstem of sham (n = 6) or cuffed mice, collected 2 (n = 5) or 8 weeks (n = 5) after surgery, were apparently not different from each other. This was in sharp contrast with the very levels of noradrenaline measured in EFX-treated cuff mice at 8 weeks (KW = 10.51; p = 0.0147; n = 10) (Figure 3A). A slightly different profile was found for serotonin since concentrations in the brainstem of cuffed mice (2 and 8 weeks, n = 5 per group) were significantly lower than those found in the sham group (KW = 9.967; p = 0.0189; n = 10). These concentrations were fully recovered in the brainstem of cuffed mice treated with etifoxine as illustrated in Figure 3B. Note that no differences could be found for dopamine.

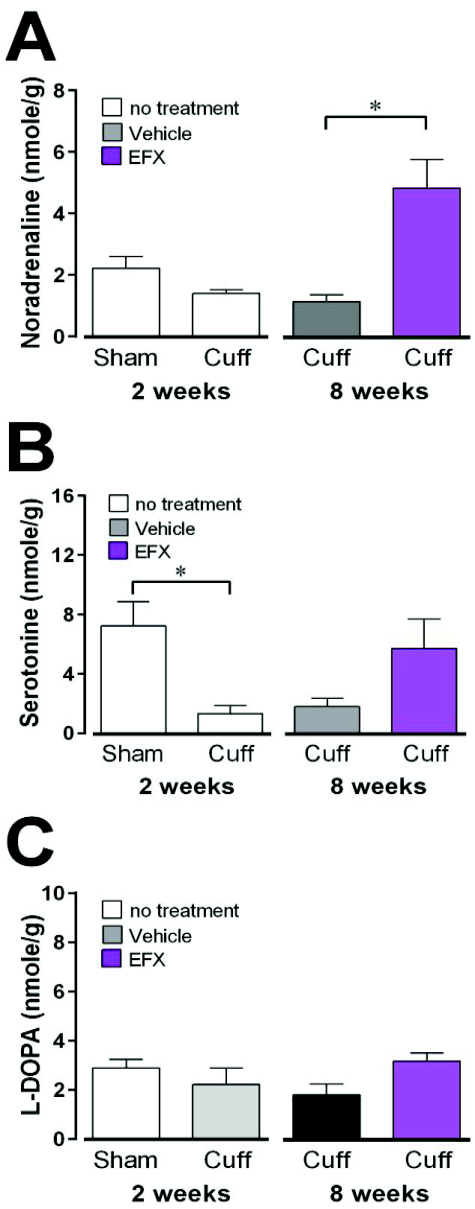


Figure 3: Histogram showing the concentration of noradrenaline (A), serotonin (B) and dopamine (C) in the brain stem of sham- and cuff mice, taken 2 or 8 weeks after surgery. Statistics: Dunns multiple comparisons after Kruskal-Wallis analysis. Code: (*) $p < 0.05$.

Discussion

In this study, we first show that mechanical allodynia is rapidly and completely alleviated by a 5-day treatment with EFX i.p. in a mice model of neuropathic pain. This result is fully consistent with our recent findings using rat model of inflammatory (Aouad et al., 2014b) and neuropathic pain (Aouad et al., 2009; Aouad et al., 2014a) for review see also (Poisbeau et al., 2014). With regards to mechanisms leading to

neuropathic pain, several lines of evidence suggest that disinhibition at various levels of the nociceptive system is likely to play a key role (Nickel et al., 2012). Furthermore, strategies aimed at elevating GABAA receptor-mediated inhibition received some attention (Munro et al., 2013). As a possible therapeutic agent, EFX has limited negative side effects (Micallef et al., 2001; Nguyen et al., 2006) and interesting mechanisms of action on GABAA receptors. A rapid allosteric positive modulation involves the binding of EFX on a specific binding site when β2 or β3 subunits are present in the GABAA receptor composition (Verleye et al., 1999; Schlichter et al., 2000; Verleye et al., 2002; Hamon et al., 2003). A slower and longer-lasting positive modulation could possibly be achieved after binding to the mitochondrial TSPO complex promoting neurosteroidogenesis (Schlichter et al., 2000; Verleye et al., 2005). This latter action is associated with the intracellular synthesis of allopregnanolone, one of the most potent endogenous allosteric modulator of GABAA receptors which potentiate its function after binding to intracellular sites (Akk et al., 2005; Hosie et al., 2006).

EFX analgesia in pathological pain states is not only robust but also persists long after the cessation of the treatment, as shown in various rat models of neuropathic pain (Aouad et al., 2009; Aouad et al., 2014a). Since this effect has been shown to be associated with the production of allopregnanolone and fully abolished when allopregnanolone synthesis inhibitors are given to rats (Aouad et al., 2014a), it is tempting to speculate that neurosteroidogenic-induced processes also accounts for the beneficial effects observed on reactive anxiety/depression in the chronic phase of this neuropathic pain model. At least here, we confirmed that EFX not only reduced mechanical allodynia but also spontaneous pain behaviors as seen by the lack of conditioned place preference for clonidine analgesia.

As mentioned above, mood disorders such as anxiety and depression are frequently observed in patients suffering from neuropathic pain (Gustorff et al., 2008). Signs of anxiety and depression are also seen in the late phases of neuropathic pain states in animal models (Suzuki et al., 2007; Goncalves et al., 2008; Matsuzawa-Yanagida et al., 2008). The emotional consequences of chronic nerve constriction by «cuff» in mice have been well characterized recently using behavioral tests (Yalcin et al., 2011). Mice developed anxiety-related behavior 4 weeks after induction of the

neuropathy, and depression-related behaviors after 6 to 8 weeks. Our study shows that these anxiety and depression-related behaviors could not be detected after EFX treatment compared to vehicle-treated animals. Mood disorders may perfectly be triggered by plastic changes induced by the long-term sensitization processes associated with neuropathic pain symptom expression (Nickel et al., 2012). This hypothesis fits well with the depressive signs expressed after chronic stress (Pittenger and Duman, 2008). In line with this idea, the compensatory actions of EFX (i.e. directly on GABAA receptors or indirectly via the production of allopregnanolone) may have prevented or limited the sensitization processes necessary to trigger plastic changes within the nociceptive system. A similar finding was reached while using benzodiazepine-site ligand in the spinal cord of rat suffering from inflammatory or neuropathic pain (Knabl et al., 2008). It is interesting to note here that, apart from GABAergic transmission, EFX may also limit prostaglandin E2-mediated glycinergic disinhibition and protect from chloride homeostasis disruption (Aouad et al., 2014b). To further support this idea, NMDA glutamate receptor-dependent windup short-term plasticity was indeed strongly reduced in wide dynamic range neurons of the rat spinal cord after application of EFX (Juif et al., 2015).

Alternatively, the anxiolytic profile of EFX and the associated mechanisms of action could be sufficient to limit the emotional (negative) processing of ascending nociceptive messages. Unfortunately, this study does not provide enough material to fully support this hypothesis which will require further investigation. Neuropathic pain states have been also associated with an impairment of descending controls using serotonin or noradrenaline (e.g. but not exhaustive) as neurotransmitters (Vanegas and Schaible, 2004). It is then interesting to note that noradrenalin and serotonin reuptake inhibitors, in particular tricyclic and SSRNI (for Selective Serotonin Noradrenaline Reuptake Inhibitors) antidepressants are recommended for neuropathic pain as first-line treatments (Baron et al., 2010). It is interesting to note here that elevated concentration for noradrenaline, serotonin but not for L-DOPA were found in mice brainstem, only if they were pretreated by EFX. This lead to the straight forward hypothesis that EFX potentiate these descending inhibitory controls. It is unclear at this stage if this effect is maintained by GABAergic systems at different levels of the nociceptive system. The literature from the spinal cord indicates,

however, that GABAergic inhibition is ensured by a proper chloride homeostasis which has been shown to be protected by EFX treatment, previously (Coull et al., 2003; Coull et al.,

References:

Aouad, M, N Petit-Demoulière, Y Goumon, and P Poisbeau. 2014. "Etifoxine Stimulates Allopregnanolone Synthesis in the Spinal Cord to Produce Analgesia in Experimental Mononeuropathy." *European journal of pain (London, England)* 18(2): 258–68. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23881562.

Aouad, Maya et al. 2014. "Etifoxine Analgesia in Experimental Monoarthritis: A Combined Action That Protects Spinal Inhibition and Limits Central Inflammatory Processes." *Pain* 155(2): 403–12. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24239672.

Aouad, Maya, Alexandre Charlet, Jean-Luc Rodeau, and Pierrick Poisbeau. 2009. "Reduction and Prevention of Vincristine-Induced Neuropathic Pain Symptoms by the Non-Benzodiazepine Anxiolytic Etifoxine Are Mediated by 3alpha-Reduced Neurosteroids." *Pain* 147(1-3): 54–59. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19786322.

Bair, M J, R L Robinson, Wayne K, and K Kroenke. 2003. "Depression and Pain Comorbidity: A Literature Review." *Archives of Internal Medicine* 163: 2433–45.

Benbouzid, Malika et al. 2008. "Sciatic Nerve Cuffing in Mice: A Model of Sustained Neuropathic Pain." *European journal of pain (London, England)* 12(5): 591–99. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18006342.

Berton, Olivier, and Eric J Nestler. 2006. "New Approaches to Antidepressant Drug Discovery: Beyond Monoamines." *Nature reviews. Neuroscience* 7(2): 137–51.

Chaplan, S R et al. 1994. "Quantitative Assessment of Tactile Allodynia in the Rat Paw." *Journal of neuroscience methods* 53(1): 55–63.

Cryan, John F, and Andrew Holmes. 2005. "The Ascent of Mouse: Advances in Modelling Human Depression and Anxiety." *Nature reviews. Drug discovery* 4(9): 775–90.

Dersh, Jeffrey, Peter B Polatin, and Robert J Gatchel. 2002. "Chronic Pain and Psychopathology: Research Findings and Theoretical Considerations." *Psychosomatic medicine* 64(5): 773–86.

Gonçalves, Leonor et al. 2008. "Neuropathic Pain Is Associated with Depressive Behaviour and Induces Neuroplasticity in the Amygdala of the Rat." *Experimental Neurology* 213(1): 48–56.

Gustorff, B. et al. 2008. “Prevalence of Self-Reported Neuropathic Pain and Impact on Quality of Life: A Prospective Representative Survey.” *Acta Anaesthesiologica Scandinavica* 52(1): 132–36.

Hamon, Alain et al. 2003. “The Modulatory Effects of the Anxiolytic Etifoxine on GABAA Receptors Are Mediated by the beta Subunit.” *Neuropharmacology* 45(3): 293–303.

Hasnie, F S et al. 2007. “Mechanical and Cold Hypersensitivity in Nerve-Injured C57BL/6J Mice Is Not Associated with Fear-Avoidance- and Depression-Related Behaviour.” *British journal of anaesthesia* 98(6): 816–22. http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2656645&tool=pmcentrez&rendertype=abstract.

Jacobson, Laura H, Bernhard Bettler, Klemens Kaupmann, and John F Cryan. 2007. “Behavioral Evaluation of Mice Deficient in GABA(B(1)) Receptor Isoforms in Tests of Unconditioned Anxiety.” *Psychopharmacology* 190(4): 541–53.

King, Tamara et al. 2009. “Unmasking the Tonic-Aversive State in Neuropathic Pain.” *Nature neuroscience* 12(11): 1364–66.

Meyer-Rosberg, K et al. 2001. “Peripheral Neuropathic Pain--a Multidimensional Burden for Patients.” *European journal of pain (London, England)* 5(4): 379–89. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11743704.

Mosconi, T, and L Kruger. 1996. “Fixed-Diameter Polyethylene Cuffs Applied to the Rat Sciatic Nerve Induce a Painful Neuropathy: Ultrastructural Morphometric Analysis of Axonal Alterations.” *Pain* 64(1): 37–57.

Munro, Gordon, Rikke R. Hansen, and Naheed R. Mirza. 2013. “GABAa Receptor Modulation: Potential to Deliver Novel Pain Medicines?” *European Journal of Pharmacology* 716(1-3): 17–23.

Nicolas, Laurent B., Yeter Kolb, and Eric P M Prinssen. 2006. “A Combined Marble Burying-Locomotor Activity Test in Mice: A Practical Screening Test with Sensitivity to Different Classes of Anxiolytics and Antidepressants.” *European Journal of Pharmacology* 547(1-3): 106–15.

Poisbeau, Pierrick et al. 2014. “Analgesic Strategies Aimed at Stimulating the Endogenous Production of Allopregnanolone.” *Frontiers in Cellular Neuroscience* 8(June): 1–8.

Porsolt, R D, M Le Pichon, and M Jalfre. 1977. “Depression: A New Animal Model Sensitive to Antidepressant Treatments.” *Nature* 266(5604): 730–32.

Price, D D. 2000. “Psychological and Neural Mechanisms of the Affective Dimension of Pain.”

Science (New York, N.Y.) 288(5472): 1769–72.

RJ, Leo. 2005. "Chronic Pain and Comorbid Depression." *Current treatment options in neurology* 7(5): 403–12.

Santarelli, Luca et al. 2003. "Requirement of Hippocampal Neurogenesis for the Behavioral Effects of Antidepressants." *Science* 301(5634): 805–9.

Schlichter, Remy et al. 2000. "Modulation of GABAergic Synaptic Transmission by the Non-Benzodiazepine Anxiolytic Etifoxine." *Neuropharmacology* 39(9): 1523–35.

Suzuki, Takahiro et al. 2007. "Experimental Neuropathy in Mice Is Associated with Delayed Behavioral Changes Related to Anxiety and Depression." *Anesthesia and Analgesia* 104(6): 1570–77.

Ulrich-Lai, Yvonne M et al. 2006. "Limbic and HPA Axis Function in an Animal Model of Chronic Neuropathic Pain." *Physiology & behavior* 88(1-2): 67–76.

Verleye, M. et al. 2001. "Functional Modulation of Gamma-Aminobutyric acidA Receptors by Etifoxine and Allopregnanolone in Rodents." *Neuroscience Letters* 301(3): 191–94.

Yalcin, Ipek et al. 2008. "Effects of 5,7-Dihydroxytryptamine Lesion of the Dorsal Raphe Nucleus on the Antidepressant-like Action of Tramadol in the Unpredictable Chronic Mild Stress in Mice." *Psychopharmacology* 200(4): 497–507.

———. 2011. "A Time-Dependent History of Mood Disorders in a Murine Model of Neuropathic Pain." *Biological Psychiatry* 70(10): 946–53. http://dx.doi.org/10.1016/j.biopsych.2011.07.017.

Résultats complémentaires:

Conséquence du traitement à l'etifoxine sur les signes anxio-depressifs qui persistent après disparition de l'allodynie mécanique.

En utilisant le modèle de neuropathie par compression chronique du nerf sciatique, on a pu mettre en évidence l'effet du traitement à l'étifoxine sur le comportement anxiodépressif chez les souris cuff. En effet, nous avons suivi dans un premier temps le développement de l'allodynie mécanique dans le modèle du cuff grâce au test des filaments de von Frey, nous avons pu démontrer que l'allodynie disparait chez le groupe traités à l'étifoxine et persiste 3 mois chez le groupe contrôle, au-delà de 3 mois cette allodynie disparait complètement chez ce dernier groupe (**Figure 28**).

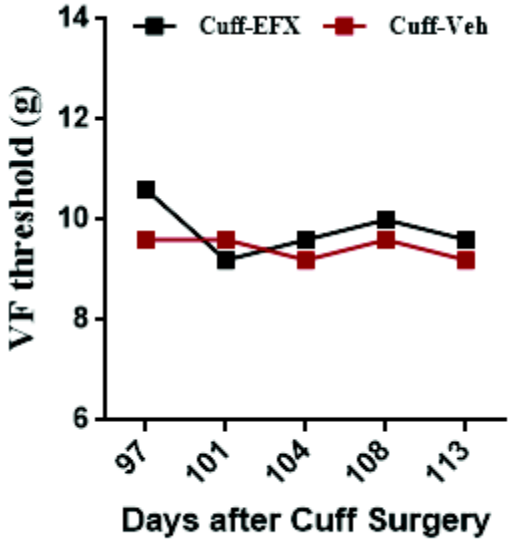


Figure 28 : Mesure de l'allodynie chez le groupe cuff traités à l'étifoxine ou véhicule.

L'apparition de comportements de type anxieux puis dépressifs est classiquement détectée 4 à 6 semaines après le début de la neuropathie (Yalcin et al. 2011), et persiste même après la disparition de l'allodynie (Figure 28, vers 12 semaines). A l'aide de différents testes d'anxiétés et dépression nous avons pu démontrer le potentiel thérapeutique de l'étifoxine sur les conséquences émotionnels induites par la douleur neuropathique. L'étifoxine réduit fortement le comportement de type anxio-dépressif chez les animaux traités à l'étifoxine contrairement au groupe

contrôle (Figure 29). Ces résultats viennent confirmer les résultats qu'on à déjà obtenus (Article I), et de nous laisse poser plusieurs questions sur les mécanismes d'action de l'étifoxine et son potentiel thérapeutiques sur les conséquences émotionnels induite par la douleur neuropathique.

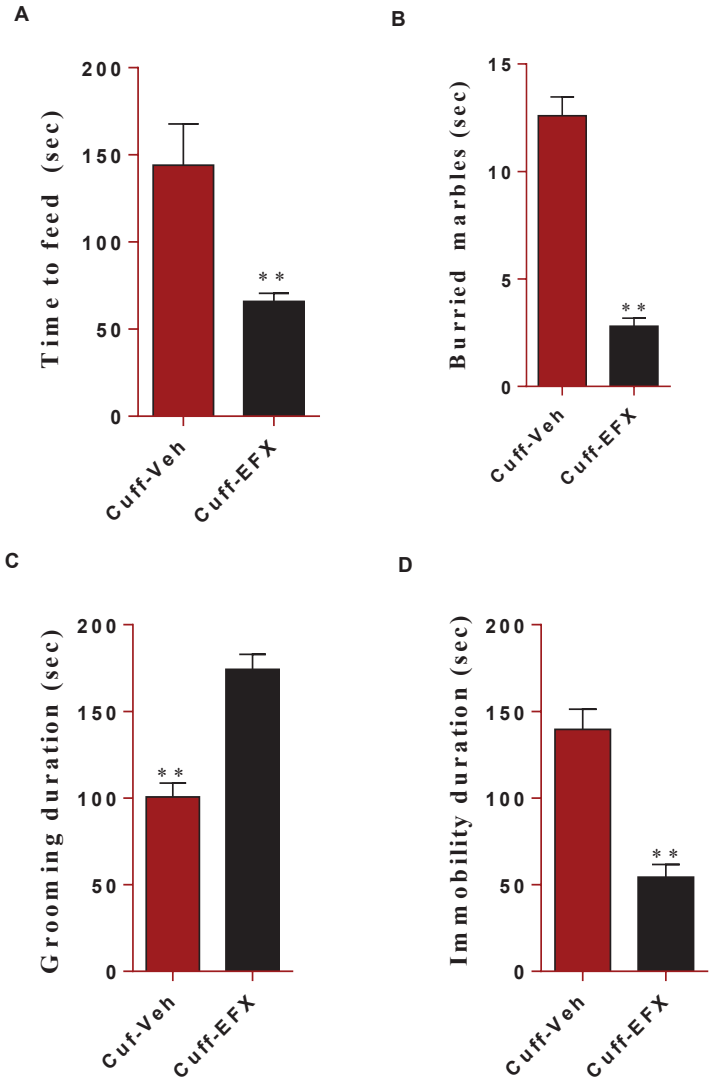


Figure 29 : Effet de l'étifoxine sur les signes anxiodépressifs observés chez les cuff, traité ou non à l'étifoxine (n = 10 par groupe) 12 semaines. Histogrammes illustrant le temps de se nourrir dans le test d'alimentation supprimée par la nouveauté (novelty suppressed feeding test (NSF)) (A), le nombre moyen de billes enfouies (B), la durée de toilettage (C) et de la durée d'immobilité pendant le test de la nage forcée (FST) (D). Les tests statistiques ont été effectués à l'aide du logiciel GraphPad (Prism 6) en utilisant ANOVA à 2 facteurs suivi du test post hoc de Tukey. Les astérisques indiquent une significativité statistiques à $p < 0.01$ (**).

b. Partie II

Rappel du contexte scientifique et objectif du travail.

L'amygdale est impliquée dans l'une des principales voies nociceptives ascendantes et plusieurs équipes ont identifié son implication également dans la modulation des contrôles descendants. Néanmoins, la plupart des études s'intéressant au rôle de l'amygdale dans la douleur se sont focalisées sur le noyau central. Peu de données sont disponibles quant à l'implication du complexe basolatéral de l'amygdale (BLA) dans la modulation de la douleur.

L'article qui suit a eu pour objectif de démontrer l'importance du complexe BLA dans la modulation de la sensibilité nociceptive chez la souris. Les souris ont été implantées chroniquement avec des canules dans les deux complexes BLA (implantation bilatérale). Sur des souris non douloureuses, l'injection d'antagonistes des contrôles glutamatergiques NMDA (MK-801) ou des contrôles GABAergiques (bicuculline) a permis de moduler la balance excitation-inhibition et d'affecter les seuils nociceptifs. Face à ce résultat, nous avons tenté d'amplifier les contrôles inhibiteurs GABAergiques afin de limiter les symptômes douloureux neuropathiques. Pour cela nous avons utilisé le diazépam, une benzodiazépine de référence, et l'étifoxine, un anxiolytique non-benzodiazépinique qui semble posséder de bonnes propriétés analgésiques chez la souris. L'étude est complétée par une approche de patch-clamp afin de caractériser l'effet de l'étifoxine sur la transmission synaptique GABAergique rapide.

Le diazépam, injecté bilatéralement à une dose de 1 µM, produit une analgésie inférieure à 2 heures dont la composante tardive semble impliquer la production limitée des neurostéroïdes analgésiques comme démontré chez des souris incapable d'en produire (traitement au finastéride). Cette propriété du diazépam avait déjà été démontrée précédemment dans la moelle épinière (Keller et al. 2004). L'étifoxine infusée à la dose de 60 µM provoque une analgésie durable (au moins 3 heures) qui est totalement portée par la production locale de neurostéroïdes puisque cet effet disparait en présence de finastéride. En utilisant des tranches d'amygdale et la technique du patch-clamp, l'effet analgésique semble corrélé avec une augmentation durable de la transmission synaptique dans le complexe BLA.

Article II (Déjà publié)

FAVORING INHIBITORY SYNAPTIC DRIVE MEDIATED BY GABAA RECEPTORS IN THE BASOLATERAL NUCLEUS OF THEAMYGDALA EFFICIENTLY REDUCES PAIN SYMPTOMS IN NEUROPATHIC MICE

Alexandre Zeitler*, Nisrine Kamoun*, Stéphanie Goyon, Jérôme Wahis, Alexandre Charlet, Pierrick Poisbeau, Pascal Darbon

* These authors contributed equally to this work.

Centre National de la Recherche Scientifique and University of Strasbourg, Institute for Cellular and Integrative Neuroscience (INCI), F-67084 Strasbourg, France

Corresponding author: Dr Pascal Darbon, Institut des Neurosciences Cellulaires et Intégratives, UPR

3212 CNRS, 5 rue Blaise Pascal, 67084 Strasbourg cedex, France. Email: pascal.darbon@incicnrs.unistra.fr

Running title: basolateral amygdala inhibition reduces allodynia

Keywords: neuronal network, etifoxine, neurosteroid

Conflict of Interest: Pierrick Poisbeau received financial support from Biocodex to establish its molecular mechanisms of action. Other authors declare no conflict of interest

Acknowledgements: The following institutions gave their support to the project: Centre National de la Recherche Scientifique, Université de Strasbourg, Région Alsace (to AZ and NK). We thank Biocodex laboratories (Gentilly, France) and, especially, Dr Marc Verleye for kindly providing us with etifoxine; Dominique Ciocca (Chronobiotron, UMS 3415) for helping us to set up cannula implantation. Tando Maduna for english proofreading and editing

Abstract

Pain is an emotion and neuropathic pain symptoms are modulated by supraspinal structures such as the amygdala. If the central nucleus of the amygdala is often named as the “nociceptive amygdala”, little is known on the role of the basolateral amygdala. Here, we monitored the mechanical nociceptive thresholds in a mouse model of neuropathic pain and infused modulators of the glutamate/GABAergic transmission in the BLA via chronically-implanted cannulas. First, we found that NMDA-type glutamate receptor antagonist (MK-801) exerted a potent anti-allodynic effect whereas a transient allodynia was induced after perfusion of bicuculline, a GABAA receptor antagonist. Potentiating GABAA receptor function using diazepam (DZP) or etifoxine (EFX, a non benzodiazepine anxiolytic) fully but transiently alleviated mechanical allodynia. Interestingly, the anti-allodynic effect of EFX disappeared in animals incapable of producing 3alpha-steroids. DZP had a similar effect but of shorter duration. As indicated by patch-clamp recordings of BLA neurons, these effects were mediated by a potentiation of GABAAR-mediated synaptic transmission. Together with a presynaptic elevation of miniature IPSC frequency, the duration and amplitude of GABAA mIPSCs was also increased (postsynaptic effect). The analgesic contribution of endogenous neurosteroid seemed to be exclusively postsynaptic. This study highlights the importance of BLA and of the local inhibitory/excitatory neuronal network activity while setting the mechanical nociceptive threshold. Furthermore, it appears that promoting inhibition in this specific nucleus could fully alleviate pain symptoms. Therefore BLA could be a novel interesting target to develop pharmacological or non pharmacological therapies.

Introduction

The amygdaloid complex (or amygdala) is constituted by a dozen of subcortical nuclei within the temporal lobe. It can be subdivided anatomically and functionally in four distinct sub-region: superficial, basolateral, central and medial (Veinante et al., 2013). Functionally, it is an important structure of the limbic system providing an emotional value to sensory information and leading to adaptative behavioral responses. In line with our study, the amygdala plays a key role linking pain sensation and emotional responses as demonstrated by anatomical, electrophysiological, pharmacological and behavioral approaches [for review see (Neugebauer et al., 2009)].

The central nucleus of the amygdala (CeA), often referred to as the "nociceptive amygdala", serves as the output nucleus for major amygdala functions and regulates behavioral responses through projections to hypothalamic nuclei and various brainstem areas(Veinante et al., 2013). This nucleus receives nociceptive information from two major pathways. A first pathway is constituted by the spino-parabrachio-amygdaloid projections (Gauriau & Bernard, 2002). It provides nociceptive information of different modalities originating from a large number of tissues (e.g. skin, viscera, joints, muscles) and is mostly associated with an increase in the activity of CeA neurons. The second is involved in the processing of polymodal nociceptive information originating from the thalamus and cerebral cortex. This sensory information is initially processed by neuronal circuits in the basolateral nucleus of the amygdala (BLA) before reaching the CeA, directly or indirectly via a relay in the intercalated cell clusters (ITC). Transfer of this information is ensured by a subpopulation of glutamatergic BLA neurons establishing excitatory synapses with the target neurons. In comparison to the direct BLA-CeA projections which generate excitation, synaptic connections to intercalated GABAergic neurons provide an inhibitory interface capable of generating feed-forward inhibition (Royer et al., 1999). Interestingly, the lesion of BLA has been recently proposed to prevent the development of chronic pain states (Li et al., 2013).

BLA contribution to nociceptive processing cannot be restricted to an input provider to CeA. Its role in the control of analgesic responses has been largely demonstrated after local infusion of a wide variety of pharmacological substances (Veinante et al.,

2013). BLA injection of morphine suppresses formalin-induced conditioned place aversion, at least in part, through inhibition of glutamatergic transmission mediated by NMDA receptors (Deyama et al., 2007). From this study, it is also clear that the place aversion induced by intraplantar formalin is associated with excessive glutamate levels in the BLA. Of particular interest for our present study, stress-induced analgesia has been significantly reduced after bilateral BLA injection of the GABAA receptor agonist, muscimol, or of the positive allosteric modulator, diazepam (Helmstetter, 1993; Rea et al., 2011). These experiments and others dealing with the modulation of anxiety strongly indicated that GABAergic inhibitory transmission in BLA plays a key role in the processing of sensory information including nociception.

In addition to the influence of GABAergic ITC neurons, the coding properties of glutamatergic BLA projection neurons can be placed under the control of local GABAergic interneurons. Although not fully characterized, they account for about 10-15% of the neuronal population and are tentatively classified based on expression of neurochemical markers such as parvalbumin, somatostatin, cholecystokinin, calbindin, calretinin and vasoactive intestinal peptide [see references in (Ehrlich et al., 2009)]. The majority (50%) are parvalbumin-positive interneurons which establish synaptic contacts on the soma and proximal dendrites of projection neurons. Location of these inhibitory synapses is of course expected to play a critical role for the coding properties of principal BLA neurons (Veres et al., 2014). This may easily explain the anxiolytic efficacy of benzodiazepine (Nagy et al., 1979; Shibata et al., 1982) which may preferentially target BLA sites (Niehoff & Kuhar, 1983; Thomas et al., 1985; Hodges & Green, 1987). Based on these studies, anxiolytic effects have been attributed to the recruitment of α2/3-containing GABAA receptors expressed by BLA neurons. It is interesting to note here that ITC neurons express high amounts of extrasynaptic α4/δ-containing GABAA receptors, known to be extremely sensitive to neurosteroids, which contribute largely to a tonic inhibition of principal BLA neurons (Marowsky & Vogt, 2014).

To date there is still little data demonstrating the influence of inhibitory/excitatory BLA microcircuits on nociceptive processes and pain responses. We therefore used a mouse model of neuropathic pain and intra-BLA injections to manipulate the balance between excitatory and inhibitory controls. Focusing mostly on GABAergic inhibitory

controls, we characterized the analgesic action of benzodiazepine and non-benzodiazepine allosteric modulators of GABAA receptor function after in vivo intra-BLA injections. The associated changes in GABAergic synaptic transmission are also studied using patch-clamp recordings of pyramidal neurons of the BLA in brain slices.

Materials and methods

Animals and ethical issues

In the present study, behavioral testing was performed on 8-12 week old C57Bl6J male mice (20-30 g; Janvier, Le Genest St. Isle, France), housed under standard conditions (room temperature: 22 °C; 12/12 h light/dark cycle) with ad libitum access to food and water. All animals were habituated to the room and to the tests at least 1 week before starting the experiments. For electrophysiological recordings P21-28 C57Bl6J mice of both sexes were used and housed in the same conditions. All procedures were performed in accordance with the recommendations of the directive (2010/63/EU) of the European Parliament and of the Council of September 22, 2010. The project received authorization from the French Department of Agriculture (license number 67-116 to PP) and from the regional ethic committee (CREMEAS AL/12/15/03/07).

Surgical procedures

All surgeries were done under aseptic conditions and with ketamine/xylazine anesthesia (ketamine: 17 mg/mL, i.p., xylazine: 2.5 mg/mL, i.p., 4 mL/kg; Centravet, Taden, France).

Cannula implantation and drug infusion: The animals were anesthetized with intraperitoneal injection (i.p.) of a mixture containing ketamine (75 mg/kg) and detomidine (1 mg/kg). At the time of the surgery, the animals were implanted with two 6 mm long 23-gauge stainless steel guide cannulas (OD 0.64 mm, ID 0.32 mm, PlasticsOne USA). All animals were bilaterally implanted with cannulas targeting the basolateral amygdala (BLA relative to bregma; AP: −1.8 mm; ML: ±3.1 mm; DV: −4.2 mm) by stereotaxic instrument according to the mouse brain atlas of Paxinos & Watson (2001). After surgery animals received Atipamezole (10 mg/kg) i.p. and Ketofene (5 mg/Kg) i.m., after which animals spent 7 days for recovery before

starting the experiments. Prior to drug injection animals were lightly anesthetized with isoflurane (2%) and 30 G cannulas (OD 0.3 mm, ID 0.15 mm, length 6 mm, PlasticsOne USA) were inserted. Drugs (0.5 µl) were infused during 5 min (0.1 µL/min) with a syringe Pump (CMA 400, CMA Microdialysis, Sweden). The injection needles were left in place for an additional 5 min to allow diffusion. Animals were tested 15 min after infusion after visual inspection of full recovery from anesthesia. After finishing the test sessions, bilateral injections of a 1% Chicago Sky Blue (Sigma) solution were targeted to the BLA (0.5 µl/each side) as described in the drug section. After 30 min, the animals were anesthetized with isoflurane (2.5%) and decapitated. Brains were removed, frozen in Isopentane (Sigma) and stored at -80°C. Sectioning (40 µm) was done with cryostat (Microm HM560, Thermo Scientific, USA). The sites of injections were verified according to the atlas of Paxinos and Watson (2001). Animals with injection sites located outside the BLA regions were not used in the analysis.

Neuropathic pain model: To produce a controlled constriction of the sciatic nerve, we used the cuff model which has been well characterized previously (Benbouzid et al., 2008). The common branch of the right sciatic nerve was exposed and a 2 mm long split section of polyethylene tubing (ID = 0.38 mm, ED = 1.09 mm; PE-20, Harvard Apparatus, Les Ulis, France) was placed around it (Cuff group). The shaved skin layer was sutured closed. Sham-operated mice underwent the same surgical procedure as described above but without implantation of the cuff (Sham group).

Measures of mechanical nociception and pain symptoms

Mechanical threshold was measured using von Frey filaments (Bioseb, Chaville, France) as previously described (Chaplan et al., 1994). Mice were placed in clear Plexiglass boxes (7 cm × 9 cm × 7 cm) on an elevated mesh screen, and were allowed to habituate for 15 minutes before testing. Filaments were applied to the plantar surface of each hindpaw in a series of ascending forces. We approached the filament toward the plantar surface slowly until it slightly bent at contact. At that point the pressure was immediately removed. Each filament was tested five times per paw and the threshold was defined as three or more withdrawals observed among the five consecutive trials. The results were expressed in grams and both hindpaws

(ipsilateral allodynic right paw and controlateral control left paw) were tested on cuff and sham animals.

Patch-clamp recordings

Slice preparation and solutions. Coronal slices containing the basolateral nuclei of the amygdala were prepared from C57Bl6J mice (21-28 week old). Briefly, after ketamine anesthesia (2.5 mg/100g, i.p., Centravet, Taden, France), animals were decapitated, and brains were removed quickly and immersed in 4 °C Mg- artificial cerebrospinal fluid (ACSF) containing (in mM): 124 NaCl, 10 MgSO4, 2.7 KCl, 1.25 NaH2PO4,26 NaHCO3, 2 CaCl2, continuously bubbled with 95% O2-5% CO2 leading to pH 7.4. The brain was glued on the slicer platform, and coronal brain slices (325 µm thick) were prepared with a tissue slicer (Leica 1200vs, Germany). Slices were hemisected and incubated for 45 min at 34 °C in artificial cerebrospinal fluid (ACSF) containing (in mM) 124 NaCl, 2.7 KCl, 1.25 NaH2PO4, 1.3 MgSO4, 2.0 CaCl2, 26.0 NaHCO3, bubbled with 95% O2/5% CO2. After another hour at room temperature, in ACSF containing 0.5 µM TTX (Abcam Biochemicals, UK) and 2 mM Kynurenic acid (Sigma-Aldrich) to block sodium voltage dependent ionic channels and ionotropic glutamatergic receptors, a single slice was transferred to the recording chamber.

Electrophysiological recordings and data acquisition: Whole-cell voltage clamp recordings were obtained with an Axon MultiClamp 700B amplifier (Axon Instruments, Foster City, CA, USA). Borosilicate glass electrodes (R = 3 - 8 MΩ) with inner filament (OD 1.2 mm, ID 0.69 mm; Harvard Apparatus Ltd, UK) were pulled using a horizontal laser puller (P2000; Sutter Instruments, USA). Pipettes were filled with an intracellular solution containing (in mM): 125 KCl, 2 MgCl2, 10 HEPES, 2 MgATP, 0.2 Na-GTP (pH adjusted to 7.3 with KOH, osmolarity 295 mOsm adjusted with sucrose). Due to chloride reversal potential of 0 mV and holding potential of -60mV, inward synaptic currents correspond to GABA mIPSCs. Series capacitances and resistances were compensated electronically throughout the experiments using the main amplifier. Recordings were filtered at 2 kHz, digitized at 10 kHz and stored with pClamp 8.0 software (Molecular Devices; Sunnyvale, USA) before analysis. All recordings were from neurons identified visually as having a large, pyramidal-like soma corresponding to glutamatergic BLA output neurons. Our patch-clamp

configuration for mIPSC did not allow us to record action potential firing, therefore, these neurons could not be identified by their accommodating firing pattern (Sah et al., 2003). In a subset of experiments however, we found that large pyramidal-like cells indeed displayed accommodated spiking when TTX and kynurenic acid were absent from the extracellular medium (data not shown). In addition, biocytine was included in the pipette solution identifying that these pyramidal neurons had axons targeting the CeA (data not shown).

Data analysis: Synaptic currents were detected and analyzed using the Strathclyde electrophysiology software packages WinEDR and WinWCP (courtesy of Dr. J. Dempster, University of Strathclyde, Glasgow, UK). Detection of each single event was further confirmed by visual inspection. For each synaptic current, the peak amplitude was measured as well as the exponential decay time constant (τ) and the overall inhibitory charge (area under the curve: AUC). In some experiments Excitatory/Inhibitory ratio (E/I ratio) was calculated. For each recorded cell, excitatory charge per time unit measured at ECl was divided by inhibitory charge per time unit measured at Ecation.

Drug application: We used bicuculline methiodide (10 μM; Sigma-Aldrich) or MK-801 (1 μM; Sigma-Aldrich) as antagonists of GABAA receptor and NMDA glutamate receptor currents, respectively. They were prepared as 1000 x concentrated solution in water. Diazepam (Roche, France), was dissolved in absolute ethanol at the final concentration 10μM (final ethanol concentration inferior to 0.1%). Etifoxine (2-ethylamino-6-chloro-4-methyl-4-phenyl-4H-3,1-benzoxazine hydrochloride; Stresam™, Biocodex, Gentilly, France) was prepared in DMSO (Sigma- Aldrich) and injected at a final concentration of 60 μM (final concentration of DMSO was inferior to 0.1%). Drugs were either infused (0.5 μL) in the basolateral nuclei in vivo or bath-applied at the same concentration on amygdala slice in vitro. Finasteride ([FIN, 1,(5α)-androsten-4-aza-3-one-17β-(N-tertbutyl-carboxamide), Steraloids, Newport, Rhode Island, USA)] solubilized in ethanol and diluted in olive oil has been used to inhibit 5α-reductase activity. It was subcutaneously injected (100 μL, 25 mg/kg) 3 times every 2 days.

Statistics

Data are presented as mean ± standard error of the mean (SEM). Statistical analyses were performed with Graphpad Prism software, using multifactor analysis of variance (ANOVA) or t-test. The Tukey posthoc test and Bonferroni comparisons have been used when appropriate for multiple comparisons in the behavioral, as well as electrophysiological experiments. Differences were considered to be statistically significant when $p < 0.05$.

Results

The influence of inhibitory and excitatory controls in the basolateral nucleus of the amygdale (BLA) was characterized in a mouse model of mono-neuropathy resulting from a chronic constriction of the sciatic nerve. As shown in Figure 1A, the surgery aimed at installing a polyethylene cuff around the main branch of the right sciatic nerve triggers a significant ipsilateral (right paw) reduction in the von Frey (VF) threshold as a measure of mechanical nociceptive thresholds (repeated measures two way ANOVA, time x paw side, $F_{(51,561)} = 4.406$, $p < \mathbf{0.0001}$). Compared to the value before surgery (4.75 ± 0.55 g, n = 12), the threshold was strongly reduced to 0.62 ± 0.04 g (n = 12, Tukey $p < \mathbf{0.0001}$) after 7 days and remained significantly lower for more than 70 days (Figure 1A). During this period, the VF values of the ipsilateral paw were significantly different for every time point from the respective mean values of the contralateral paw and of both paws of sham-operated mice. This result is fully in agreement with the presence of a mechanical allodynia resulting from the “cuff” compression of the right sciatic nerve.

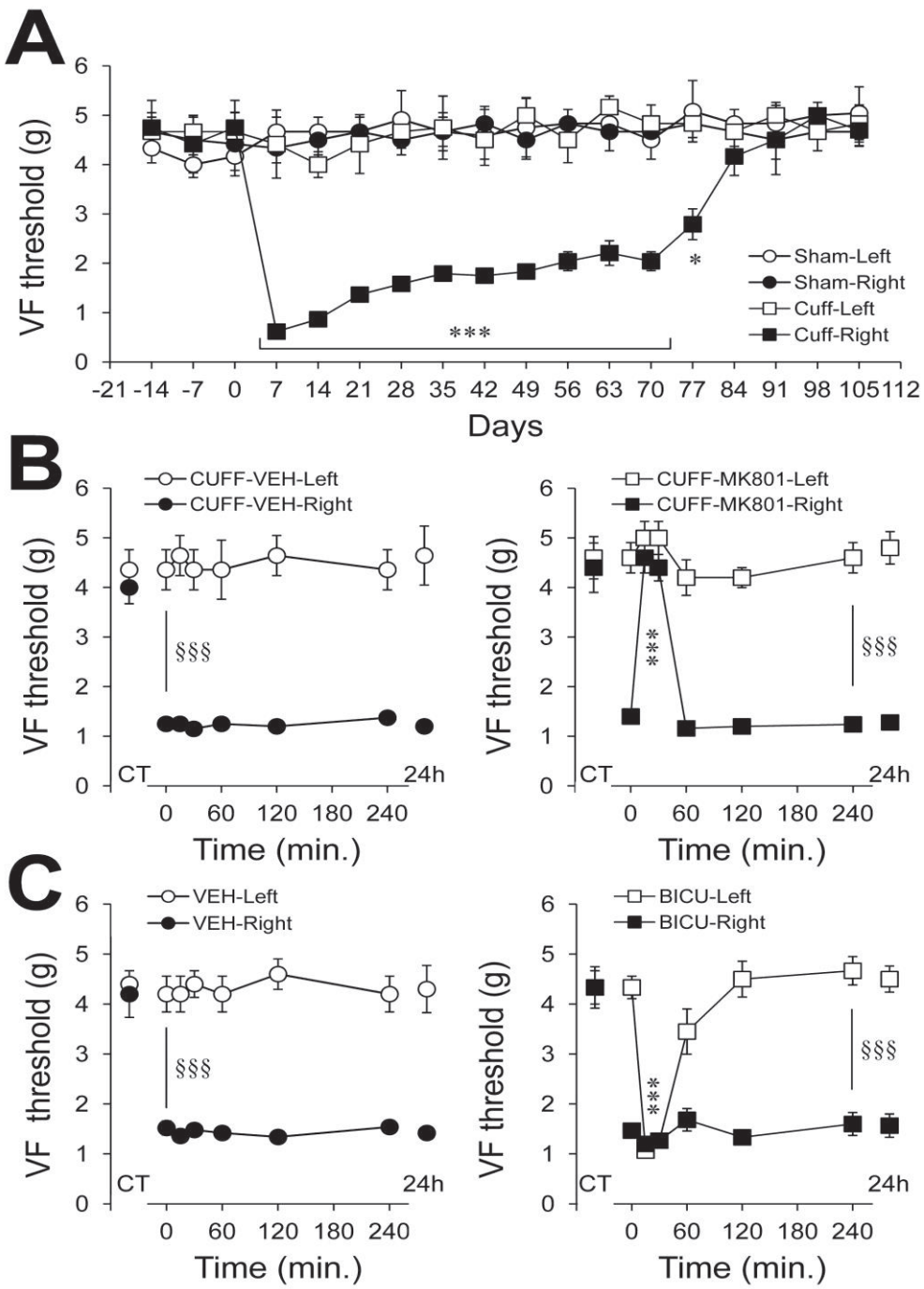


Figure 1: Changes in mechanical nociceptive thresholds measured with von Frey (VF) filament in mice, sham-operated (SHAM, panel A) or with a chronic compression of the right sciatic nerve (CUFF, panels A-C). Values are shown for left and right hindpaws. A, time course of VF threshold before and after surgery (day 0) for both hindpaws in sham and cuffed mice. Note that mechanical allodynia developed rapidly for right hindpaw of cuffed mice and persisted for about 3 months. B-C, Changes in VF thresholds in neuropathic mice after a bilateral BLA injection at time 0 of the vehicle solutions (left graphs), 1 µM MK801 (B, right graph) or 10 µM bicuculline (C, right graph). VF threshold are also given in control (CT, i.e. before cuff surgery). Tukey (*, compared to paw value at time 0) and Bonferroni (§, for a time point between paws) multiple comparisons are indicated: $p < 0.001$ (***, §§§), $p < 0.05$ (*, §).

Excitation/inhibition balance control of nociception and pain in mice BLA

Using mice pre-implanted with BLA cannulas and bilateral injections, the effects of drugs modulating the balance between fast excitation and inhibition were analyzed 2 weeks after the cuff surgery. As shown above, VF thresholds measured 2 weeks after surgery, between intact left and cuffed right paws, were significantly different (repeated measures two-way ANOVA, time, $F_{(5,90)} = 21.9$, $p < \mathbf{0.0001}$; Bonferroni, $p < \mathbf{0.0001}$). As early as 15 minutes after BLA injection of the NMDA receptor antagonist MK-801 (1 μM, figure 1B), VF threshold significantly increased from 1.36 ± 0.04 g to 4.62 ± 0.31 g (n = 10; Tukey $p < 0.001$) and remained not significantly different from the intact contralateral paw also after 30 minutes (Bonferroni, **p=0.073**). This strong analgesic effect was transient and thresholds returned to basal (neuropathic) levels 60 minutes after the BLA infusion (1.16 ± 0.07 g, n = 10; compared to before injection: Tukey, **p=0.9**). We next used bicuculline to inhibit GABAA receptor-mediated inhibition in the BLA (Figure 1C). If bicuculline (10 μM) had no significant effect on the allodynic right paw (from 1.47 ± 0.12 g to 1.20 ± 0.06 g after 15 minutes, n = 12; Bonferroni, p=0.99), it induced a rapid decrease in the mean VF threshold of the left (intact) hindpaw (from 4.33 ± 0.22 g to 1.07 ± 0.04 g after 15 minutes, n = 12; repeated measures two-way ANOVA, time x paw side, $F_{(5,45)} = 25.21$, $p < 0.001$; Tukey, $p < 0.0001$). These low VF thresholds were not different from the cuffed paw 15 and 30 minutes after bicuculline injection (Bonferroni, p=0.95). Note that MK-801 and bicuculline effects were short-lasting (below 1 hour) but particularly efficient to produce analgesia or allodynia, respectively. This effect seemed specific since vehicle injections were ineffective to modulate VF thresholds in all cases (n = 10 for MK-801 and n = 12 for bicuculline).

Analgesia mediated by the potentiation of inhibition in BLA microcircuits

Since the function of BLA microcircuits also relies on the activity of GABAergic interneurons, we next evaluated the consequences of injecting $GABA_A$ receptor positive modulators on mechanical nociception and allodynia. We first used the classical benzodiazepine diazepam (DZP; Figure 2A, left graph). The injection of DZP at 1 μM (final volume 0.5 μl) was associated with a rapid and significant increase in the mean VF threshold for left and right hindpaw (repeated-measures two-way

ANOVA, time x paw side, $F_{(5,55)} = 17.97$, **$p < 0.0001$**). This increase was modest but statistically significant in the case of left hindpaw since the maximal antinociceptive effect was reached 30 minutes after injection of DZP when VF mean threshold reached 6.33 ± 0.22 g (compared to before injection : 4.67 ± 0.28 g, n = 12; Tukey, **$p < 0.0001$**). DZP analgesic effect was more pronounced for the ipsilateral (allodynic) paw (from 1.33 ± 0.04 g to 5.33 ± 0.38 g, 30 minutes after DZP, n = 12; Tukey, **$p < 0.001$**). In both paws, VF threshold changes followed a similar time-course. DZP-induced analgesic effect was still present 1 hour after the injection and thresholds were back to their respective basal values after 2 hours. We also used the recently described non-benzodiazepine compound etifoxine (EFX; Figure 2B, left graph) which potentiates $GABA_A$ receptor function after binding to a site distinct from the benzodiazepines. Injected at a concentration of 60 µM, we found that it only increased, significantly, the VF threshold of the allodynic paw (repeated-measures two-way ANOVA, time x paw side, $F_{(5,45)} = 10.08$, **$p < 0.0001$**) but was without apparent effect on the left paw (from 4.80 ± 0.33 g to 5.20 ± 0.33 g, 2 hours after EFX, n = 10; Tukey, **$p=0.99$**). Mean VF thresholds of the right hindpaw were increased from 1.28 ± 0.06 g to a maximal value of 4.40 ± 0.40 g (n = 10; Tukey, **$p < 0.0001$**), 2 hours after EFX bilateral injection. No statistical differences could be found between the two paws of the cuffed EFX-treated mice at times 60 and 120 minutes. It should be noted here that the anti-allodynic effect was much slower to establish, compared to DZP, but was also transient since thresholds were back to their original level 4 hours after the injection.

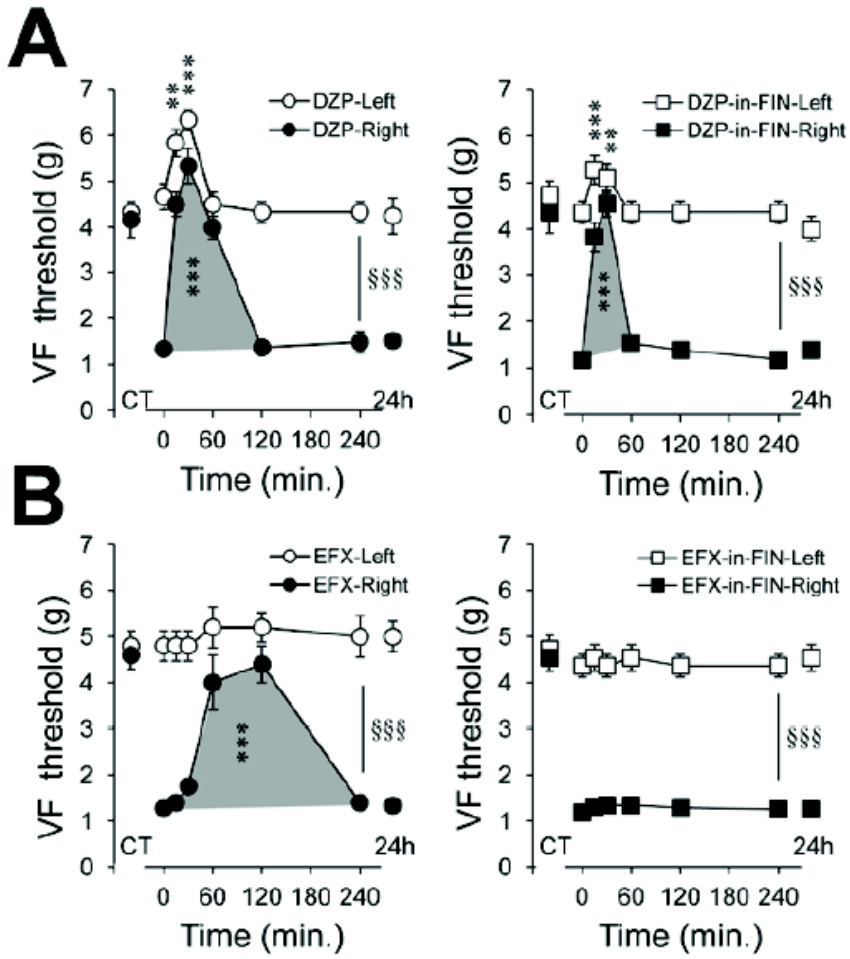


Figure 2: Effects of BLA bilateral injections of diazepam (1 µM DZP, panel A) and etifoxine (EFX, 60 µM, panel B) at time 0 on VF thresholds. Right graphs were obtained in finasteride-treated animals (FIN). In all cases, VF threshold are also given in control (CT, i.e. before cuff surgery). Tukey (*, compared to paw value at time 0) and Bonferroni (§, for a time point between paws) multiple comparisons are indicated: $p < 0.001$ (***, §§§), $p < 0.01$ (**).

Apart from a direct allosteric modulation of $GABA_A$ receptor function, DZP and EFX are known to also bind to mitochondrial translocator protein (TSPO). In several brain structures, this action has been shown to promote the intracellular synthesis of allopregnanolone-like compounds (neurosteroids) which are the most potent endogenous modulators of $GABA_A$ receptor function (Poisbeau et al., 2014). To verify this hypothesis, the synthesis of allopregnanolone-like compounds was inhibited by treating the mice with 3 subcutaneous injections of finasteride every two days before BLA infusions (see methods). As illustrated in figure 2 (right graphs), DZP analgesia persisted in finasteride-treated mice (repeated-measures two-way ANOVA, time x

paw side, $F_{(5,50)} = 18.51$, **$p < 0.0001$**) whereas EFX action was fully prevented (repeated-measures two-way ANOVA, $F_{(5,50)} = 0.20$, **$p=0.99$**). Since DZP analgesic effect was shorter (less than 1 hour) in finasteride-treated mice, this result suggests that part of the transient analgesic effect is also taken in charge by endogenous neurosteroid. In the case of EFX and at this concentration, endogenous production of allopregnanolone-like compounds is necessary to observe the anti-allodynic effect.

Modulation of inhibitory synaptic controls by EFX in mice BLA neurons

To go one step further, the effect of these modulators was more directly characterized by using patch recording of BLA pyramidal neurons and analysis of $GABA_A$ receptor-mediated synaptic currents ($GABA_AR$ IPSCs; Figure 3). As expected, DZP applied at 1 µM on BLA neurons potentiated the apparent affinity of $GABA_A$ receptors. This was clearly seen by a prolongation of the decaying time constant (from 16.84 ± 2.17 to 30.62 ± 3.82 ms, n = 6; Student's t-test, t=6.21, df=5, p=0.0016). If no significant change could be seen for the mean amplitude (from 15.54 ± 3.27 to 22.39 ± 4.31 pA, n = 6; Student's t-test, t=1.77, df=5, p=0.13), a clear increase was observed for the frequency of occurrence (from 2.78 ± 0.32 to 5.21 ± 0.88 ms, n = 6; Student's t-test, t=3.65, df=5, p=0.015). In the case of EFX, potentiation was associated with an increase in the mean frequency of occurrence of spontaneously occurring $GABA_A$ IPSCs, of their amplitude and duration (see Figure 3 and Table). This corresponded to an overall increase in the inhibitory charge (e.g. increase of both amplitude and duration) carried by individual $GABA_A$ IPSCs from 222.6 ± 20.6 pA.ms to 334.9 ± 26.7 pA.ms (n = 17; One-way ANOVA, $F_{(3, 32)} = 6.344$, Tukey **$p=0.037$**). When applied to BLA slices and within the time course of a patch clamp recording (about 1 hour), we fail to see a proper washout of EFX. However, similar experiments done on slices collected from finasteride-treated mice revealed that EFX-increase of IPSC inhibitory charge was absent (Table). This was not the case for the transient increase in IPSC frequency which persisted in finasteride condition.

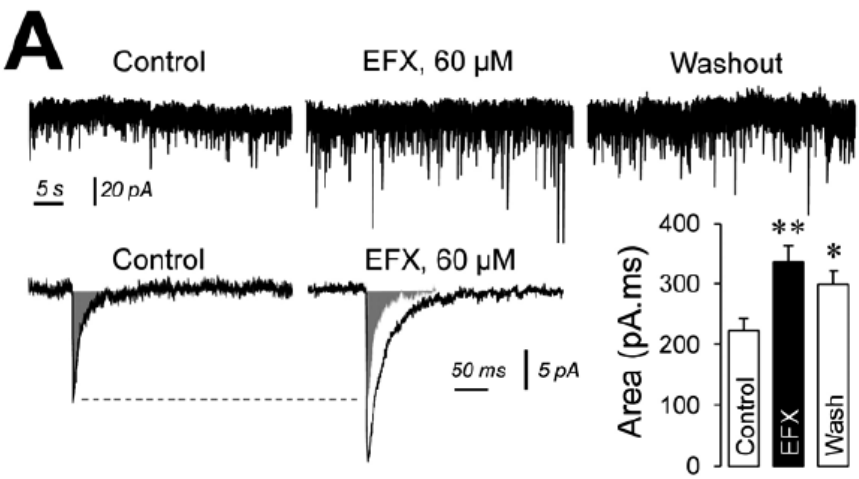


Figure 3: Properties of $GABA_A$ receptor-mediated IPSCs recorded in BLA neurons from 21-28 day-old mice amygdala slices using the whole cell patch clamp technique. As illustrated with the raw traces, bath-application of EFX increased the frequency of occurrence of IPSCs and their amplitudes (see also table 1). Histogram gives the mean inhibitory charge carried by the $GABA_AR$ IPSCs (area) in control, EFX and after washout of the drug. Note that during the course of the recording (maximum time recording of 40 minutes), increase in inhibitory charge was hardly reversible after EFX bath application. Statistical significance with Tukey posthoc test is shown on the histogram with the following code: $p < 0.01$ (**), $p < 0.05$ (*).

Conditions	Freq. (Hz)	Area (pA.ms)	Amp. (-pA)	Decay (ms)	N
Control	3.2 ± 0.5	222.6 ± 20.6	13.6 ± 1.2	17.3 ± 1.3	17
EFX (60µM)	**5.4 ± 0.8** ***	**334.9 ± 26.7** **	**18.3 ± 1.3** **	**21.0 ± 1.2** *	17
Washout	3.9 ± 0.5	**299.0 ± 22.6** *	15.1 ± 1.3	**21.3 ± 2.0** *	13
Control in FIN	2.8 ± 0.8	192.3 ± 27.8	15.3 ± 2.9	17.8 ± 1.2	8
EFX (60µM) in FIN	**5.6 ± 1.0** *	209.9 ± 33.5	14.5 ± 2.7	17.6 ± 1.2	8
Washout in FIN	2.5 ± 0.6	206.8 ± 31.8	16.6 ± 2.3	17.7 ± 1.6	7

Table 1: Changes in miniature GABAAR-mediated IPSCs after application of EFX (60 µM) in the absence (top three lines) and presence (bottom three lines) of the 5α-reductase inhibitor finasteride (FIN, 10 µM). Mean frequency of occurrence (Freq.), inhibitory charge carried by IPSCs (Area), absolute current amplitude (Amp.) and half decay time are given for the IPSCs in the two different conditions. Data in bold were found to be statistically different at (***) $p < 0.001$, (**) $p < 0.01$, and (*) $p < 0.05$ with the Tukey posthoc test after one-way ANOVA. Statistical analysis was performed on BLA neurons submitted to at least 10 minutes of EFX washout (i.e. 13 out of 17 in control; 7 out of 8 in finasteride). In finasteride condition (FIN), note that only changes in frequency persisted during the application of EFX.

To investigate, in vitro, the consequences of EFX on BLA network activity, we calculated in 23 cells, the E/I ratio in control condition (n=13) or in presence of BIC (n=4), EFX (n=6) or MK801 (n=6). In control conditions excitation was largely more important than inhibition, the mean E/I ratio is 2.62 (ranging from 0.99 to 6.71). Bicuculline fully suppressed inhibition. Etifoxine, as well as, MK801 reversed the ratio, but in different ways (mean EFX E/I ratio: 0.26 ranging from 0.025 to 0.48; mean MK801 E/I ratio: 0.31 ranging from 0.054 to 0.64). Etifoxine increased inhibitory charge by 66.51 % whereas excitatory charge sank (-605.72 %) due to the large overall network inhibition. For its part MK801, as expected, decreased the excitatory charge (-89.71 %) but also reduced the inhibitory charge (-15.93 %) to lead to a net imbalance in favor of inhibition.

Discussion

The BLA is the initial site of sensory convergence and integration in the amygdala. Indeed, infusion in the BLA of mu opioid receptor agonist decreases thermal nociceptive sensitivity (Helmstetter et al., 1995; McGaraughty & Heinricher, 2002). Moreover, BLA controls stress- and fear induced analgesia, which are both reduced by intra-BLA infusions of $GABA_A$ receptor agonist muscimol, (Rea et al., 2011) or by the allosteric modulator, diazepam (Helmstetter, 1993). Based on this experimental evidence, it can be concluded that GABAergic inhibition in BLA controls nociceptive responses as well as analgesia induced by fear or stress. Among many possibilities, BLA inhibition is likely to affect CeA neuronal activity, which has been shown to modulate pain behavior through projections to descending pain control centers in the brainstem (Neugebauer et al., 2009) and in the control of pain modulation systems (Helmstetter et al., 1998). To fully understand the involvement of BLA inhibition in pain modulation, we have also to take into account the excitatory/inhibitory balance regulating BLA network excitability and therefore its impact on downstream structures activity. To date, no studies have shown any modulation of excitation in BLA in pain conditions or in stress- or fear-induced analgesia. However, it has been shown that infusion of NMDA and non-NMDA receptor antagonists in BLA reduced anxiety (for review, see (Bergink et al., 2004), demonstrating that modulation of excitation in BLA can influence behavior. Accordingly our results show that altering BLA excitatory/inhibitory balance either alleviates neuropathic pain symptoms or induces pain. Indeed, a direct blockade of NMDA receptor suppressed mechanical allodynia whereas a blockade of GABAergic inhibition produced allodynia in the healthy paw. Based on these results and focusing on GABAergic transmission, we have explored the consequences of an increase of this neurotransmission on neuropathic induced allodynia. Previously, it has been shown that BLA infusion of diazepam attenuated stress-induced analgesia (Helmstetter, 1993) or produced antinociceptive effects (Jimenez-Velazquez et al., 2010). Our results confirmed that diazepam alleviates mechanical allodynia and produces analgesia in both neuropathic and healthy paws. In addition, we have used another allosteric modulator of GABAA receptor (i.e. EFX a non benzodiazepine anxiolytic) which has a different pharmacological profile and distinct binding sites from that of benzodiazepines

(Hamon et al., 2003). A single infusion of EFX produced a longer-lasting alleviation of neuropathic pain symptoms without effect on the healthy paw. As shown previously in a model of neuropathic pain, this effect is likely to be contributed by the action of EFX on neurosteroidogenesis through its action on mitochondrial translocator protein, TSPO, (Poisbeau et al., 2014). Indeed blockade of a key enzyme in the production of neurosteroid by finasteride, fully suppresses EFX anti-allodynic action. A similar mechanism has already been proposed by our group (Zell et al., 2014; Zell et al., 2015) to explain analgesia produced by high plasma corticosterone levels through the modulation of spinal GABAergic inhibition. We then may conclude that EFX, by increasing mitochondrial cholesterol entry, increases synthesis of neurosteroids that in turn are potent positive modulators of GABAergic synaptic transmission (Poisbeau et al., 1997) resulting in an increased inhibition within the BLA neuronal network.

To dissect EFX action further, we recorded GABAergic synaptic transmission on BLA output neurons and compared the effect of the well characterized benzodiazepine diazepam (DZP) with that of EFX. DZP prolonged decay time constant and increased amplitude and frequency of IPSC. Increase in IPSC duration and amplitude are mostly contributed by postsynaptic mechanisms (Vicini et al., 1986) whereas frequency increase generally results from a presynaptic mechanism as demonstrated for glycine receptors in rat spinal sacral dorsal commissural nucleus neurons (Jeong et al., 2003). Presynaptic GABAA receptors have been previously identified in the BLA where they produced excitation (Woodruff et al., 2006). Indeed, depolarization of the presynaptic terminal is expected to increase synaptic release and neuronal excitability, especially if the neurotransmitter is excitatory (Pugh & Jahr, 2011; Dellal et al., 2012). In comparison with DZP, The effects of EFX are likely to be similar, as seen by the increase in frequency, amplitude and duration of synaptic currents. Our results show that the latter two highly depend on EFX-induced neurosteroidogenesis, whereas the presynaptic increase of synaptic current frequency is not affected by finasteride. Accordingly, at the network level, the cellular effect of EFX on synaptic transmission impacts network excitability. Indeed, EFX increases network inhibition, which in turn drastically reduces network excitation leading to a change of network Excitatory/Inhibitory balance and a decrease in network excitability.

Altogether this overall increase of GABAergic inhibition impacts CeA neuronal activity. However, the nature of the impact on CeA neuronal activity is difficult to predict. There are many pathways between BLA and CeA, either direct from glutamatergic output BLA neurons or through a relay in intercalated mass (Veinante et al., 2013). In the former case, the working hypothesis will predict that a decrease in BLA excitatory drive will less activate the GABAergic CeA neuronal network. In the latter case, a decrease of the excitatory drive on inhibitory intercalated cells will reduce their feedforward inhibition on CeA neurons. To add layers of complexity, it has also been shown that feedforward inhibition is itself controlled by inhibition coming from neighboring intercalated cells (Royer et al., 1999; 2000) and that some specific intercalated cells may respond to noxious stimuli and project back on BLA interneurons (Bienvenu et al., 2015). Therefore, a large amount of work remains to be done in order to fully dissect BLA-CeA microcircuits. However, our in vivo experiments clearly demonstrate that stimulating endogenous GABAergic inhibition in BLA with DZP or EFX alleviates allodynia in neuropathic mice. This analgesic action is mediated by a direct and indirect (i.e. neurosteroid based) potentiation of GABAA receptor function at pre- and post-synaptic sites.

References

Benbouzid, M., Pallage, V., Rajalu, M., Waltisperger, E., Doridot, S., Poisbeau, P., Freund-Mercier, M.J. & Barrot, M. (2008) Sciatic nerve cuffing in mice: a model of sustained neuropathic pain. Eur J Pain, 12, 591-599.

Bergink, V., van Megen, H.J.G.M. & Westenberg, H.G.M. (2004) Glutamate and anxiety. Eur Neuropsychopharmacol, 14, 175-183. Bienvenu, T.C.M., Busti, D., Micklem, B.R., Mansouri, M., Magill, P.J., Ferraguti, F. & Capogna, M. (2015) Large Intercalated Neurons of Amygdala Relay Noxious Sensory Information. J Neurosci, 35, 2044-2057.

Chaplan, S.R., Bach, F.W., Pogrel, J.W., Chung, J.M. & Yaksh, T.L. (1994) Quantitative assessment of tactile allodynia in the rat paw. J Neurosci Methods, 53, 55-63.

Dellal, S.S., Luo, R. & Otis, T.S. (2012) GABA(A) receptors increase excitability and conduction velocity of cerebellar parallel fiber axons. J Neurophysiol, 107, 2958-2970.

Deyama, S., Yamamoto, J., Machida, T., Tanimoto, S., Nakagawa, T., Kaneko, S., Satoh, M. & Minami, M. (2007) Inhibition of glutamatergic transmission by morphine in the basolateral amygdaloid nucleus reduces pain-induced aversion. Neurosci Res, 59, 199-204.

Ehrlich, I., Humeau, Y., Grenier, F., Ciocchi, S., Herry, C. & Luthi, A. (2009) Amygdala inhibitory circuits and the control of fear memory. Neuron, 62, 757-771.

Gauriau, C. & Bernard, J.F. (2002) Pain pathways and parabrachial circuits in the rat. Exp Physiol, 87, 251-258.

Hamon, A., Morel, A., Hue, B., Verleye, M. & Gillardin, J.M. (2003) The modulatory effects of the anxiolytic etifoxine on GABA(A) receptors are mediated by the beta subunit. Neuropharmacology, 45, 293-303.

Helmstetter, F.J. (1993) Stress-induced hypoalgesia and defensive freezing are attenuated by application of diazepam to the amygdala. Pharmacol Biochem Behav, 44, 433-438.

Helmstetter, F.J., Bellgowan, P.S.F. & Poore, L.H. (1995) Microinfusion of Mu-Opioid but Not Delta- Opioid or Kappa-Opioid Agonists into the Basolateral Amygdala Results in Inhibition of the Tail-Flick Reflex in Pentobarbital-Anesthetized Rats. J Pharmacol Exp Ther, 275, 381-388.

Helmstetter, F.J., Tershner, S.A., Poore, L.H. & Bellgowan, P.S.F. (1998) Antinociception following opioid stimulation of the basolateral amygdala is expressed through the periaqueductal gray and rostral ventromedial medulla. Brain Research, 779, 104-118.

Hodges, H. & Green, S. (1987) Are the effects of benzodiazepines on discrimination and punishment dissociable? Physiol Behav, 41, 257-264.

Jeong, H.J., Jang, I.S., Moorhouse, A.J. & Akaike, N. (2003) Activation of presynaptic glycine receptors facilitates glycine release from presynaptic terminals synapsing onto rat spinal sacral dorsal commissural nucleus neurons. J Physiol (London), 550, 373-383.

Jimenez-Velazquez, G., Lopez-Munoz, F.J. & Fernandez-Guasti, A. (2010) Parallel anxiolytic-like and antinociceptive actions of diazepam in the anterior basolateral amygdala and dorsal periaqueductal gray. Brain Res, 1349, 11-20.

Li, Z., Wang, J., Chen, L., Zhang, M. & Wan, Y. (2013) Basolateral amygdala lesion inhibits the development of pain chronicity in neuropathic pain rats. PLoS One, 8, e70921.

Marowsky, A. & Vogt, K.E. (2014) Delta-subunit-containing GABAA-receptors mediate tonic inhibition in paracapsular cells of the mouse amygdala. Front Neural Circuits, 8, 27.

McGaraughty, S. & Heinricher, M.M. (2002) Microinjection of morphine into various amygdaloid nuclei differentially affects nociceptive responsiveness and RVM neuronal activity. Pain, 96, 153-162.

Nagy, J., Zambo, K. & Decsi, L. (1979) Anti-anxiety action of diazepam after intra-amygdaloid application in the rat. Neuropharmacol, 18, 573-576.

Neugebauer, V., Galhardo, V., Maione, S. & Mackey, S.C. (2009) Forebrain pain mechanisms. Brain Res Rev, 60, 226-242.

Niehoff, D.L. & Kuhar, M.J. (1983) Benzodiazepine receptors: localization in rat amygdala. J Neurosci, 3, 2091-2097.

Paxinos, G. & Watson, C. (1998) The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates, 4th edn. Academic Press, San Diego, CA.

Poisbeau, P., Feltz, P. & Schlichter, R. (1997) Modulation of GABA(A) receptor-mediated IPSCs by neuroactive steroids in a rat hypothalamo-hypophyseal coculture model. J Physiol (London), 500, 475-485.

Poisbeau, P., Keller, A.F., Aouad, M., Kamoun, N., Groyer, G. & Schumacher, M. (2014) Analgesic strategies aimed at stimulating the endogenous production of allopregnanolone. Front Cell Neurosci, 8, 174.

Pugh, J.R. & Jahr, C.E. (2011) Axonal GABA(A) Receptors Increase Cerebellar Granule Cell Excitability and Synaptic Activity. J Neurosci, 31, 565-574.

Rea, K., Roche, M. & Finn, D.P. (2011) Modulation of conditioned fear, fear-conditioned analgesia, and brain regional c-Fos expression following administration of muscimol into the rat basolateral amygdala. J Pain, 12, 712-721.

Royer, S., Martina, M. & Pare, D. (1999) An inhibitory interface gates impulse traffic between the input and output stations of the amygdala. J Neurosci, 19, 10575-10583.

Royer, S., Martina, M. & Pare, D. (2000) Polarized synaptic interactions between intercalated neurons of the amygdala. J Neurophysiol, 83, 3509-3518.

Sah, P., Faber, E.S.L., De Armentia, M.L. & Power, J. (2003) The amygdaloid complex: Anatomy and physiology. Physiol Rev, 83, 803-834.

Shibata, K., Kataoka, Y., Gomita, Y. & Ueki, S. (1982) Localization of the site of the anticonflict actionof benzodiazepines in the amygdaloid nucleus of rats. Brain Res, 234, 442-446.

Thomas, S.R., Lewis, M.E. & Iversen, S.D. (1985) Correlation of [3H]diazepam binding density with anxiolytic locus in the amygdaloid complex of the rat. Brain Res, 342, 85-90.

Veinante, P., Yalcin, I. & Barrot, M. (2013) The amygdala between sensation and affect: a role in pain. J Mol Psychiatry, 1, 9.

Veres, J.M., Nagy, G.A., Vereczki, V.K., Andrasi, T. & Hajos, N. (2014) Strategically positioned inhibitory synapses of axo-axonic cells potently control principal neuron spiking in the basolateral amygdala. J Neurosci, 34, 16194-16206.

Vicini, S., Alho, H., Costa, E., Mienville, J.M., Santi, M.R. & Vaccarino, F.M. (1986) Modulation of Gamma-Aminobutyric Acid-Mediated Inhibitory Synaptic Currents in Dissociated Cortical Cell-Cultures. Proc Natl Acad Sci USA, 83, 9269-9273.

Woodruff, A.R., Monyer, H. & Sah, P. (2006) GABAergic excitation in the basolateral amygdala. J Neurosci, 26, 11881-11887.

Zell, V., Hanesch, U., Poisbeau, P., Anton, F. & Darbon, P. (2014) Plasma glucocorticoids differentially modulate phasic and tonic GABA inhibition during early postnatal development in rat spinal lamina II. Neurosci Lett, 578, 39-43.

Zell, V., Juif, P.E., Hanesch, U., Poisbeau, P., Anton, F. & Darbon, P. (2015) Corticosterone analgesia is mediated by the spinal production of neuroactive metabolites that enhance GABAergic inhibitory transmission on dorsal horn rat neurons. Eur J Neurosci, 41, 390-397.

c.DISCUSSION GENERALE

1 Douleur et troubles anxiodépressifs

Il est difficile d'établir un lien de cause à effet lorsqu'on évoque douleur et humeur (Gambassi 2009). Qu'une douleur chronique déclenche un état dépressif semble acquis (Nadine Attal et al. 2011; Bair et al. 2003), l'inverse est encore sujet à controverses. Quelle qu'en soit la cause, la douleur chronique est aujourd'hui considérée comme un désordre du système nerveux central résultant d'un état complexe mettant en jeu processus génétiques, cognitifs et émotionnels (Melzack 2008; Smith, Macfarlane, and Torrance 2007). Cette centralisation permet d'envisager la douleur chronique comme entité neuropsychopathologique. Elle agit sur des voies spinales et sur des zones d'intégration supraspinales provoquant des douleurs spontanées et entrainant une exagération de la réponse à des stimuli douloureux (hyperalgie) et/ou non douloureux (allodynie). Cette entité intègre des états affectifs négatifs et des modifications comportementales (évitement ou recours à un traitement médicamenteux) visant à éliminer cette sensation douloureuse ; le retentissement psychologique et social est très important (Smith, Macfarlane, and Torrance 2007). La comorbidité entre pathologies anxio-dépressives et douleur touche plus de 60% des patients douloureux et la plainte douloureuse est retrouvée chez 75% des patients déprimés (Twillman 2007). Cette comorbidité est à l'origine de nombreuses difficultés que rencontrent les cliniciens qui restent souvent démunis pour proposer une thérapeutique efficace. Il est important de noter que dans le cas d'un épisode dépressif majeur, le patient peut avoir une interprétation alarmiste des sensations corporelles (« catastrophisme »), aboutissant à une amplification de la perception douloureuse (Rentsch et al. 2009). Chez ces patients, La tristesse de l'humeur constitue le premier signe avec perte du goût de vivre, perte du plaisir ou anhédonie, douleur morale, pessimisme, sentiment de culpabilité ou d'incurabilité parfois. À ces groupes de signes s'associent des angoisses matinales et des idées morbides parfois suicidaires. Il existe enfin des signes somatiques avec une insomnie classiquement matinale, une anorexie, un amaigrissement et diverses plaintes somatiques dont des douleurs (N. K. Y. Tang and Crane 2006).

Chez le rongeur, et malgré les nombreuses études explorant les mécanismes de la douleur chronique, peu d'entre elles se sont intéressées aux relations entre douleur et troubles affectifs, notamment l'anxiété. En 1999, Kontinen et collaborateurs n'ont

pas réussi à mettre en évidence des troubles anxieux deux semaines après l'induction d'une neuropathie part ligature des nerfs spinaux (Kontinen et al. 1999). Par contre, une autre étude a pu monter un états anxieux chez la souris 4 semaines après l'induction de la douleur par ligature du nerf sciatique ou par injection intraplantaire de CFA (Narita et al. 2006). Dans le modèle par compression du nerf sciatique chez la souris, un état anxieux semble se développer 4 à 6 semaines après la chirurgie (Yalcin et al. 2011). Ces études montrent qu'il existe aussi, chez le rongeur un lien de comorbidité entre la douleur chronique et les états anxieux, et que le facteur temps est important pour qu'une douleur chronique engendre l'anxiété. Les mécanismes cellulaires et moléculaires que sous-tend cette comorbidité sont encore mal connus, cependant certaines structures cérébrales communes sont maintenant identifiées. Des études chez l'homme montrent une activation de plusieurs zones cérébrales après stimulation douloureuse. Ces structures cérébrales comprennent entre autres, le cortex cingulaire antérieur, le cortex préfrontal, l'amygdale (Schneider et al., 2001), et la substance grise périaqueducale (Basbaum and Fields, 19984). Les structures comme l'amygdale, le cortex préfrontal et la substance grise périaqueducale (PAG) semblent aussi jouer un rôle dans le développement des symptômes liés à l'anxiété (Bishop 2007; Mathew and Ho 2006). En outre, l'amygdale et la PAG sont impliquées dans les voies descendantes régulant la réponse émotionnelle de la douleur (Craig 2003). La connivence fonctionnelle entre les structures d'intégration et de mise en forme des émotions et celles de la douleur pourrait facilement expliquer le bénéfice d'un traitement par les anxiolytiques sur la douleur chronique. Pourtant aucune donnée ne permet d'affirmer que ces molécules sont à même de soulager les douleurs chroniques (Enna and McCarson 2006).

2 Discussion sur le modèle « cuff »

2.1 Comparatif sur les symptômes douloureux

Pour avoir une idée de la pertinence du modèle cuff chez la souris, il faut comparer avec le tableau clinique décrit chez l'homme.

- La pose d'un corps étranger autour d'un nerf n'est pas une cause de neuropathie chez l'homme et a comparaison ne peut porter que sur les signes comportementaux et symptômes communs. C'est donc une limitation majeure du modèle utilisé.

- Une diminution du seuil de sensibilité mécanique est mise en évidence dans notre modèle dès les premiers jours après la chirurgie et persiste pendant trois mois. Le stimulus consiste en l'application statique de filaments de von Frey sur le côté inférieur de la patte des animaux. Chez l'Homme, c'est la stimulation mécanique dynamique qui est principalement perçue comme douloureuse. La mesure de la sensibilité à un tel stimulus ((Thibault et al. 2014), par effleurement de la face inférieure des pattes avec un pinceau est possible chez le rat mais reste difficile à mettre en œuvre chez la souris du fait de la petite taille des pattes des animaux et de leurs mouvements fréquents dans les boîtes de test.

- L'allodynie au froid est fréquente dans la plupart des neuropathies et pourtant elle n'a pas été testée dans ce modèle. Les réponses à un stimulus thermique froid peuvent être mesurées par le test de la plaque froide, mais ce test ne permet pas la différenciation entre la patte gauche et la patte droite. Le test à l'acétone, où une goutte d'acétone est appliquée indépendamment sur la face inférieure de chaque patte des animaux permet de faire cette distinction. Cependant, l'utilisation de ce test dans le modèle murin est sujette à caution car l'acétone est fortement aversive chez la souris contrairement au rat.

- Tous les tests mentionnés jusqu'ici mesurent la réponse des animaux à une douleur ou un stimulus provoqué par l'expérimentateur. Nous savons qu'en clinique, ces signes sont accompagnés de troubles de la sensibilité comme la dysesthésie et la paresthésie. Ces manifestations ne sont pas actuellement mesurables de manière fiable dans les modèles animaux.

- Enfin, les tests permettant la mesure de la composante aversive de la douleur spontanée ont été menés avec succès dans notre modèle (section résultats). La

pertinence et les difficultés rencontrées au cours de ces tests sont détaillées dans la partie suivante.

En résumé, le modèle du cuff permet de mettre en évidence les signes « positifs » de diminution du seuil de sensibilité mécanique et d'hyperalgésie thermique et la composante aversive de la douleur spontanée mais pas, à notre connaissance, les troubles de la sensibilité, les signes déficitaires ou la composante aversive de la douleur provoquée. Si la multiplication des signes retrouvés à la fois chez l'Homme et chez l'animal augmente la qualité du modèle animal, il n'est pas pour autant nécessaire de les retrouver en totalité pour que le modèle utilisé soit pertinent. Ceci est particulièrement vrai pour les douleurs neuropathiques où les signes cliniques sont très variables en fonction de l'étiologie (Baron, Binder, and Wasner 2010) et même entre des patients ayant des douleurs neuropathiques d'origines comparables (Defrin et al. 2001).

2.2 Comparatif sur les symptômes anxiodépressifs

Au cours du temps, des tests mesurant, non plus uniquement des réponses réflexes, mais aussi des comportements motivés ((Johansen, Fields, and Manning 2001; LaGraize et al. 2004) mettant en œuvre des processus corticaux plus complexes sont apparus. Ils ont permis la mise en évidence chez le rongeur de la composante aversive/motivationnelle de la douleur. Dans le cadre de la douleur neuropathique, la présence de douleurs spontanées est particulièrement handicapante pour les patients (Backonja and Stacey 2004). L'étude de cette composante a longtemps été ignorée chez les rongeurs du fait d'obstacles expérimentaux. Le développement de nouveaux tests a montré que la douleur spontanée est mesurable indirectement avec des protocoles de préférence de place (King et al. 2009) section résultats).

Nous avons parlé tout au long de ce travail de comportements de type anxiodépressif. Ce terme est utilisé car la dépression est une maladie humaine et il serait donc abusif de parler de souris dépressives. Nous utilisons le terme anxiodépressif car il est difficile chez le rongeur, dans la plupart des tests comportementaux, de dissocier la composante anxieuse de la composante dépressive (Cryan and Holmes 2005). Enfin, nous l'utilisons aussi car le test d'hyponéophagie dont nous nous servons, conçu initialement pour mesurer des

comportements de type anxieux, mesure en réalité un comportement mixte anxiodépressif. La composante dépressive a été mise en évidence par l'efficacité dans ce test de traitements chroniques par des antidépresseurs (L. Santarelli 2003).

La modélisation chez l'animal de comportements complexes comme les troubles anxieux et dépressifs est sujette à débat au sein de la communauté scientifique (Crabbe and Morris 2004). On peut en effet se demander si des processus psychologiques et cognitifs comme le sentiment d'impuissance, la culpabilité, le sentiment d'inutilité, le découragement, les ruminations, communément retrouvés chez les patients dépressifs peuvent être modélisés chez les rongeurs. Toutefois, même si ces questions sont pertinentes, il convient de souligner que des informations apportées par les modèles animaux (L. Santarelli 2003) ont été confirmées dans la recherche sur les troubles de l'humeur chez l'homme (Boldrini et al. 2009).

Comme les douleurs neuropathiques, les troubles de l'humeur regroupent une grande variété de causes et de manifestations cliniques tels que les troubles anxieux généralisés, le trouble de stress post-traumatique, le trouble obsessionnel compulsif, la dépression majeure pour en citer quelques uns. La nécessité de définir des critères de validité pour les modèles animaux utilisés est indiscutable. De nombreux travaux ont été consacrés à cette question (van der Staay, Arndt, and Nordquist 2009; Willner 1984)et les critères utilisés, du moins pour certains d'entre eux, varient entre les auteurs (Belzung and Lemoine 2011).

2.3 Implication de l'axe corticotrope

Les travaux d'Ipek Yalcin ont mis en évidence un aspect original du modèle. Il semble qu'il n'y a pas d'altération de l'axe corticotrope (Yalcin et al. 2011) montrant, si cela est confirmé, que ce modèle ne semble pas être associé à un stress chronique, et qu'il permet ainsi une modélisation spécifique des troubles de l'humeur liés à la douleur chronique. En effet, dans les modèles de dépression induits par le stress chronique, l'axe corticotrope est hyperactivé en lien avec une déficience du rétrocontrôle négatif (Krishnan and Nestler 2008). Ainsi des études cliniques mettent en évidence des concentrations élevées de glucocorticoïdes plasmatiques chez des patients souffrant de troubles dépressifs (Rubin et al. 1987). En parallèle, les

concentrations d'hormone corticotrope (« cortico-releasing hormone », CRH) dans le liquide céphalo-rachidien sont également élevées, ainsi que sa sécrétion vers le système limbique (Raadsheer et al. 1994).

2.4 Altérations anatomiques et structurales

D'autre études ont été effectuées sur ce modèle afin de voir s'il y a des changements morphologiques dans les fibres myélinisées et amyéliniques (Beaudry, Girard, and Vachon 2007; Mosconi and Kruger 1996). Ils montrent une perte des fibres myélinisées de gros calibre par contre il y a aucune changement pour les fibres amyéliniques Aδ et C.

3 Discussion sur la mesure de la douleur spontanée mesurée par le test du CPP

La douleur spontanée est très invalidante en clinique mais n'est mesurée que depuis peu en recherche fondamentale à travers une procédure de préférence de place analgésique. Comme nous l'avons vu dans la partie résultats, c'est la préférence des animaux pour un compartiment associé à un traitement analgésique parallèlement à une aversion pour le compartiment associé à la douleur qui met en évidence la composante aversive/motivationnelle de la douleur spontanée. Cette mise en évidence est donc indirecte car on ne mesure pas un niveau de douleur spontanée mais son expression comportementale. Ce test, simple en théorie, est très compliqué à mettre en œuvre, en particulier chez la souris.

Dans ce test développé chez le rat (King et al. 2009), les animaux montrent une préférence pour le compartiment associé à l'analgésique après une seule injection intrathécale (**i.t.**) de clonidine, démontrant que le conditionnement est extrêmement efficace. La morphine, substance récompensante classiquement utilisée, ne permet pas de conditionnement aussi rapide (Aguilar, Rodríguez-Arias, and Miñarro 2009). Chez le rat, l'injection i.t. est réalisée via un cathéter installé à demeure et permet une ou plusieurs injections successives chez l'animal vigile sans pratiquement de douleur. Chez la souris, l'espace intervertébral est moins favorable à la pose d'un cathéter, et l'injection i.t. doit se faire sous anesthésie gazeuse. Après le réveil qui survient dans les 30 secondes après l'injection, il est fort probable que les animaux ressentent la douleur due à l'injection. Cette douleur post-injection

risque de s'ajouter à la douleur spontanée que nous souhaitons mesurer et pourrait cacher ainsi l'effet analgésique de la clonidine. Ceci est en partie contrôlé par l'utilisation du groupe sham. En effet, si l'analgésie induite par la clonidine entraîne un soulagement de la douleur due aux injections i.t. alors le groupe sham présentera aussi une préférence pour le compartiment associé à la clonidine. Or, ce n'est pas le cas, ni dans notre modèle chez la souris, ni dans le modèle de « spinal nerve ligation » chez le rat (King et al. 2009).

Le fait que la pose d'un cathéter soit difficilement réalisable chez la souris entraîne un autre problème. Les injections i.t. sont traumatisantes et un tissu cicatriciel commence à se former après l'injection du matin augmentant le risque d'une injection inefficace l'après-midi. De plus, cela rend impossible les injections répétées sur plusieurs jours et donc nous ne pouvons pas augmenter les chances que les souris associent la drogue au contexte par des appariements successifs.

Afin de maximiser les chances d'apprentissage, nous avons choisi un protocole où les souris sont placées dans le compartiment immédiatement après l'injection i.t. pour une durée de 15 minutes, l'effet analgésique aigu de la clonidine diminuant au bout de 30 minutes. Après ce temps, les souris sont remises dans leurs cages. Pour que les animaux associent la clonidine à un soulagement, il faut que durant les 15 minutes où ils se trouvent dans le compartiment associé à la solution saline contrôle (i.e. le matin), les animaux aient un accès douloureux. Or, nous savons qu'en clinique, les patients souffrant de douleurs neuropathiques n'éprouvent pas de douleurs spontanées en continu mais qu'elles apparaissent de manière épisodique. La fréquence et la durée de ces épisodes ne sont pas connues dans notre modèle, et il est possible qu'ils ne surviennent chez les souris pas pendant la phase de conditionnement associé à la solution saline. Ainsi, lorsqu'elles seront placées dans le compartiment associé à la clonidine, même si elles ressentent un épisode de douleur spontanée et que l'injection de clonidine les soulage, elles ne pourront associer ce compartiment à un soulagement de la douleur, car elles n'auront pas ressenti de douleur dans l'autre compartiment.

Le choix de la clonidine se justifie par la nécessité d'avoir un analgésique d'action immédiate, sans propriété récompensante. L'injection i.t. est choisie pour éviter les effets cardiovasculaires de la clonidine administrée par voie générale.

Cependant, ces effets ne sont pas totalement absents lors d'une administration i.t. car on peut observer une hypotension, une bradycardie et une sédation lors d'une administration i.t. de clonidine chez le rat (Kawamata et al. 2003).

Une alternative à l'injection i.t. de clonidine est l'injection de lidocaïne (un bloqueur des canaux sodium) dans le bulbe rostro-ventral (RVM). En effet, chez le rat, l'hypersensibilité consécutive à une lésion nerveuse dépend d'un contrôle descendant facilitant provenant de cette structure (Burgess et al. 2002). Une préférence de place pour le compartiment associé à une injection de lidocaïne dans le RVM a ainsi été mise en évidence chez le rat (King et al. 2009). Cette alternative n'a pas été essayée dans notre laboratoire.

L'utilisation de ce test de préférence de place nécessite également un point de discussion. La préférence pour le compartiment associé à la clonidine résulte selon nous, d'une part de l'effet récompensant du soulagement de la douleur spontanée ressenti dans le compartiment associé à l'analgésique et d'autre part de l'effet aversif de la douleur spontanée ressentie dans le compartiment associé à la solution saline. Il n'est donc difficile de dissocier l'effet récompensant du soulagement de la douleur de l'effet aversif de la douleur.

4 Implication des voies monoaminergiques dans la sensibilité nociceptive et les comorbidités anxiodépressives

Les dosages effectués dans le tronc cérébral des souris traités par l'étifoxine montrent, par rapport aux échantillons contrôles, une normalisation des concentrations de noradrénaline et de sérotonine. L'adénosine dans le tronc cérébral est également fortement concentrée chez les souris traitées par l'étifoxine. Il semble que l'étifoxine produise un bénéfice durable chez les souris neuropathiques en supprimant durablement les symptômes douloureux, la douleur spontanée, et les troubles anxiodépressifs réactionnels. Ce bénéfice pourrait être expliqué par la normalisation des concentrations de sérotonine voir la stimulation des taux de noradrénaline et d'adénosine. Mais par quel mécanismes l'étifoxine augmente la quantité de ces neurotransmetteurs dans le tronc cérébrale et peut êtres dans certaines régions cérébrales particulières ?

Plusieurs hypothèses peuvent expliquer l'augmentation du niveau de ces neurotransmetteurs dans les synapses.

- Hypothèse 1 : L'étifoxine augmente la synthèse de ces neurotransmetteurs
- Hypothèse2 : Inhibe la monoamine oxydase, bloque cette enzyme, permettant ainsi à une plus grande quantité de sérotonine et de noradrénaline de demeurer disponible.
- Hypothèse 3 : Bloquant les pompes à recapture des synapses sérotoninergiques et noradrénergiques. Résultat : davantage de sérotonine ou de noradrénaline de disponible dans la fente synaptique

La figure suivante résume ces différentes hypothèses :

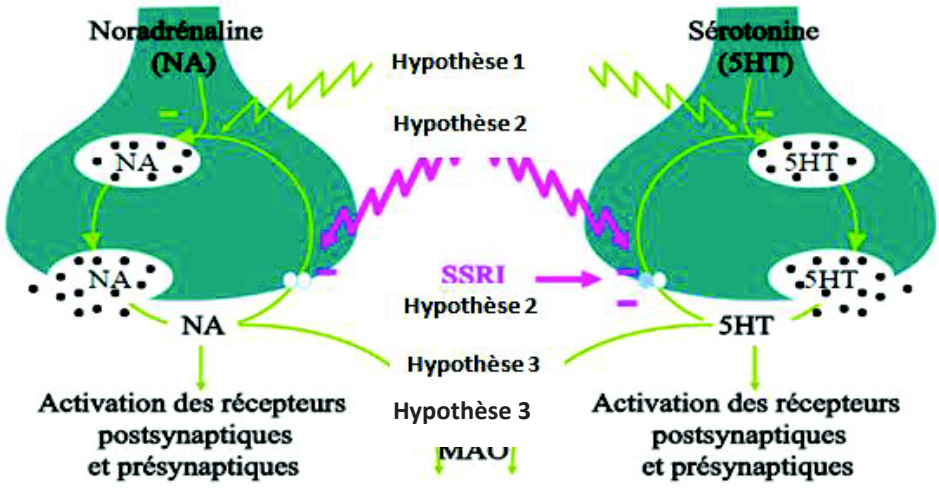


Figure 30 : Différentes hypothèses illustrant les différents mécanismes par lesquels l'étifoxine peut augmenter les niveaux des monoamines au niveau du Tronc cérébrale.

L'étifoxine exerce son effets analgésique (M Aouad et al. 2014; Maya Aouad et al. 2009, 2014) and anxiolytique (Servant et al., 1998; Verleye et al., 2005; Nguyen et al., 2006; Ugale et al., 2007) en stimulant la production cérébrale de 3α,5α-THP et en amplifiant l'activité GABAergique. 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 oestrogènes (ER). 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 (Figure x). Comme un effet exclusif passant pat les récepteurs GABAA ne permet pas d'expliquer totalement son effet sur les concentrations des monoamines, il semble donc que ce mécanisme repose sur la production des neurostéroïdes qui peuvent avoir un effet sur la transcription de gènes de biosynthèses des monoamines.

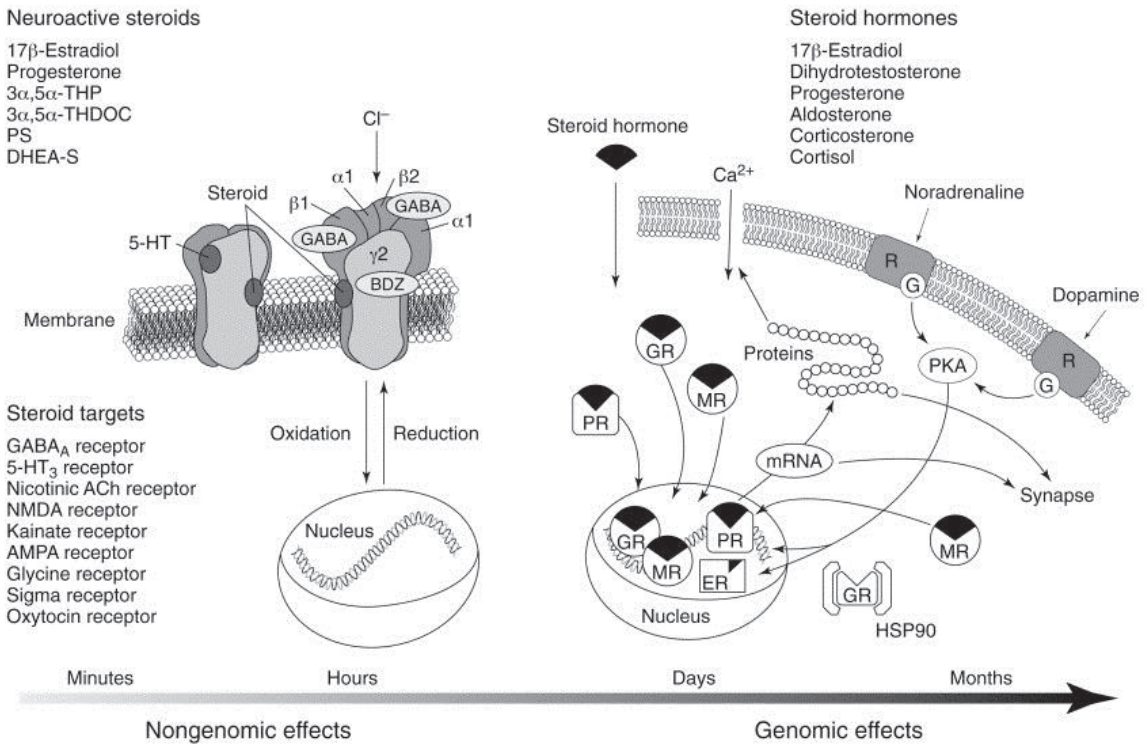
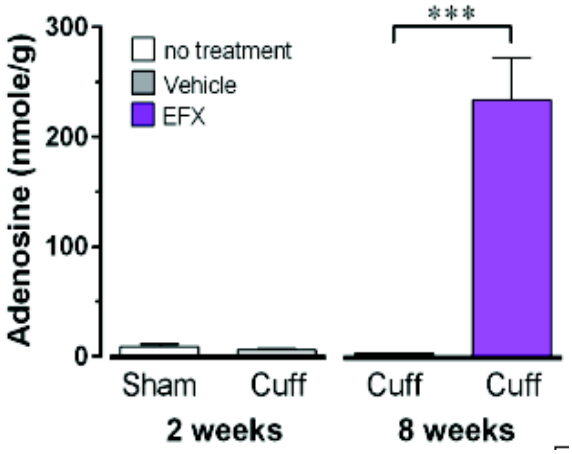


Figure 31 : Effets non génomiques et génomiques des principaux composés stéroïdes. Les neurostéroïdes, fabriqués par les neurones et les cellules gliales, agissent de manière paracrine ou autocrine sur les récepteurs membranaires des cellules nerveuses. Leurs effets s'effectuent dans une échelle de temps de l'ordre de la minute ou de l'heure. Lorsque ces mêmes molécules agissent par voie hormonale (fabriquées par les glandes endocrines et apportées par la circulation), on les qualifie d' »hormones stéroïdes ». Elles agissent via des récepteurs intracellulaires qui activent dans le noyau des cellules des facteurs de transcription, exerçant une action dite « génomique ». Ces effets sont plus longs à se mettre en place et peuvent durer plus longtemps (de quelques jours à plusieurs mois). BDZ : benzodiazépines ; DHEA-S : sulfate de déhydroépiandrostérone ; P-S : sulfate de prégnènolone ; THDOC : tétrahydro déoxycorticostérone ; THP : tétrahydroprogestérone ; R : récepteur ; ER : récepteur des oestrogènes ; (G) : protéine G ; GR : récepteur des glucocorticoïdes ; MR : récepteur des minéralocorticoïdes ; PR : récepteur de la progestérone ; HSP90 : Heat Shock Protein 90 ; PKA : protéine kinase A. (Adapté d'après Rupprecht & Holsboer, 1999).

4.1.1 Implication de l'Adénosine

L'adénosine, produite par la déphosphorylation rapide de l'ATP, est libérée avec la noradrénaline des fibres du système nerveux sympathique (von Kügelgen et al. 1994).

Une diminution des taux d'adénosine a été mesurée dans le sang et le liquide céphalo-rachidien de patients douloureux neuropathiques (Guieu et al. 1996). Ainsi, compenser ce déficit en adénosine fut une des solutions proposées dans la prise en charge de la douleur neuropathique (Guieu et al. 1996). L'adénosine pourrait participer à l'action des catécholamines dans la douleur neuropathique. En effet, la caféine, un antagoniste des récepteurs de l'adénosine, bloque l'effet d'une administration prolongée d'amitriptyline dans un modèle de douleur neuropathique (Ulugol et al. 2002). Toutefois, l'effet antalgique aigu de l'amitriptyline n'est pas altéré chez des souris déficientes pour le récepteur A1de l'adénosine dans le test de sensibilisation nociceptive inflammatoire par injection intraplantaire de formol (Sawynok, Reid, and Fredholm 2008), suggérant que ces récepteurs ne seraient pas nécessaires à l'effet thérapeutique des antidépresseurs. Le rôle éventuel de l'adénosine dans l'action des antidépresseurs reste tout de même à confirmer par d'autres études expérimentales.



4.1.2 Régulations neuro-immunes

L'inhibition de la recapture des monoamines apparaît souvent comme le mécanisme premier dans l'action antalgique des antidépresseurs. Nos travaux

montrent que la disparition des symptômes douloureux et antidépressifs chez la souris est associée à l'élévation des concentrations de monoamines dans le tronc cérébral. Nous avons vu dans un des chapitres de l'introduction que ces cytokines pourraient jouer un rôle de premier plan dans le développement et/ou le maintien de la douleur neuropathique. Il a donc été suggéré qu'une perturbation de la balance entre cytokines pro- et anti-inflammatoires soit impliquée dans de nombreuses pathologies dont la dépression (Sutcigil et al. 2007) et les douleurs chroniques. Réciproquement, un traitement antidépresseur a montré des propriétés anti-inflammatoires, notamment par la diminution de la synthèse de cytokines pro-inflammatoires (De Berardis et al.; Hashioka 2011). Une étude, en condition de douleur neuropathique, a également décrit une réduction de la production de TNF-α dans l'hippocampe et au niveau du nerf sciatique lésé: cette baisse est associée comportementalement à un bénéfice analgésique suite à une administration prolongée d'amitriptyline (Sud et al. 2008). Les auteurs de cette étude vont même plus loin en suggérant que l'administration prolongée d'antidépresseur faciliterait la transmission noradrénergique en inhibant la production de TNF-α (Reynolds et al. 2005). Ces données suggèrent que le TNF-α pourrait être un élément important du mécanisme thérapeutique des antidépresseurs dans la douleur neuropathique

5 Contribution des stéroïdes

Des fluctuations dans les concentrations sanguines et cérébrales de stéroïdes sont observées des plusieurs situations pathophysiologiques dont les douleurs chroniques. Des différences entre mâles et femelles sont aussi observées en lien avec ces concentrations. Par exemple les femmes expriment un sensibilité plus importante à la douleur que hommes face à une même stimulation (Fillingim et al. 2009), tout comme l'anxiété et la dépression qui touche en et plus les femmes que les homme (Reddy 2006) suggérant un rôle des stéroïdes gonadiques dans ces différences. Les travaux de Frye et Duncan (Frye and Duncan 1994), suivis par d'autres (dont ceux du laboratoire e.g. (Charlet et al. 2008), ont montré par la suite que l'action analgésique était médiée par la synthèse locale de neurostéroïdes réduits en position 3α comme l'allopregnanolone (AP) ou l'allotétrahydrodéoxy-corticostérone (THDOC). Le mode d'action principal implique la potentialisation de l'inhibition portée par les récepteurs GABAA (Schlichter et al, J Mol Neurosci 2006) mais également, en périphérie,

l'inhibition des canaux calcium de type T sur les neurones sensoriels (Jagodic et al. 2008). Par son mode d'action sur les récepteurs GABAA (voir introduction), l'étifoxine a fait l'objet de plusieurs études montrant son action analgésique dans les modèles de douleur chez le rat (M Aouad et al. 2014; Maya Aouad et al. 2009, 2014). L'action analgésique est de plus fortement portée par la production de neurostéroïdes dans le système nerveux central comme le montre les expériences sur des rats douloureux gonadectomisés et surrénalectomisés (Poisbeau et al. 2014)

- **Rôle du récepteur GABAA**

L'etifoxine est un anxiolytique dont les mécanismes d'action sur le récepteur GABAA est bien connus. Plusieurs études successives ont montré que cette molécule interagit directement avec les récepteurs GABAA en se fixant préférentiellement sur la sous-unités β (β2>β3) et qu'elle potentialise l'inhibition GABAergique, phasique (synaptique) et tonique (A. Hamon et al. 2003b; R Schlichter et al. 2000; M Verleye, Schlichter, and Gillardin 1999). Il a été montré également dans ces études que l'etifoxine stimule fortement la synthèse de neurostéroïdes endogènes, notamment les composés 3α-réduit. L'effet analgésique semble passer en grande partie par la production de composés 3α-réduits qui potentialisent l'inhibition porté par le récepteur GABAA (Charlet et al. 2008) et/ou inhibent les canaux T (Pathirathna et al. 2005). Les tests effectués 1h après injection i.p. d'etifoxine n'ont montré qu'un faible effet analgésique transitoire qui serait plutôt médié par l'action directe de l'etifoxine sur les récepteurs GABAA. Si le travail effectué dans ce travail de thèse montre que l'amygdale joue un rôle clé dans l'effet analgésique de l'étifoxine, il montre aussi qu'après une injection dan ce noyau, ce sont les neurostéroïdes qui exercent cette action.

6 Considérations pharmacologiques : Biodisponibilité de l'étifoxine dans les tissus

Au de ce travail nous avons majoritairement administré l'étifoxine par des injections intra-péritonéales qui permettent à la substance de diffuser facilement dans l'organisme et d'atteindre les tissus cibles. Les nerfs périphériques, la moelle épinière et le cerveau jouent chacun un rôle important dans la transduction, la modulation et l'intégration du message douloureux. Il serait donc intéressant de connaître la contribution de chaque étage du système nociceptif à l'effet analgésique

de l'étifoxine, bien que ceci soit difficile à évaluer avec ce mode d'injection. Des dosages d'étifoxine dans le plasma et le cerveau de rats mâles adultes ont été effectués par Verleye et collaborateurs en 2005 (Marc Verleye et al. 2005). Dans cette étude, les auteurs ont dosé l'étifoxine 15min, 30min et 1h après une injection intrapéritonéale unique de 50mg/kg d'étifoxine. Ils ont retrouvé en moyenne, l'équivalent de 17μM dans le plasma 15 min après l'injection et 8 μM après 1h. Dans le cerveau, la concentration moyenne d'étifoxine retrouvée est de 48 μM après 15 min et d'environ 22 μM, 1h après l'injection (Marc Verleye et al. 2005). Ces résultats montrent que l'étifoxine pénètre assez rapidement dans les tissus avec une concentration deux fois plus importante dans le cerveau par rapport au plasma et que sa demi-vie peut être estimée à 1h environ chez le rat.

L'étifoxine est une molécule qui peut traverser la barrière hémato-encéphalique. Il est donc fort possible de la retrouver aussi dans la moelle épinière. D'ailleurs, il a été montré par des expériences d'électrophysiologie sur des neurones dissociés de moelle épinière, un effet direct et un effet indirect de l'étifoxine, qui potentialise l'inhibition portée par les récepteurs $GABA_A$ (Juif, Melchior, and Poisbeau 2015; R Schlichter et al. 2000). La moelle épinière est le premier relais central pour la modulation et l'intégration de l'information nociceptive et douloureuse. On pourrait donc penser, qu'une partie de l'effet analgésique de l'étifoxine passerait par son action dans la moelle. Les expériences sur la moelle ont été faites après application directe d'une solution d'étifoxine sur les neurones enregistrés mais aucune donnée de la littérature n'existe concernant la présence ou pas d'étifoxine dans la moelle épinière après injection systémique. Pour essayer de connaître la concentration d'étifoxine dans la moelle et dans le cerveau après un traitement de 10 injections, au laboratoire, des dosages par HPLC ont été effectués en utilisant la moelle épinière lombaire et le cerveau de rats rendus neuropathiques par une compression chronique du nerf sciatique (M Aouad et al. 2014). Les résultats obtenus en HPLC, 3 jours après l'arrêt de traitement (10 injections de mg/kg I.P), n'indiquent aucune trace d'étifoxine dans le cerveau et la moelle. Ces résultats semblent en accord avec ceux obtenus par Verleye (Marc Verleye et al. 2005) après une injection unique et confirment la demi-vie courte de l'étifoxine chez le rongeur. Ceci ne veut pas dire que l'étifoxine ne serait pas présente dans la moelle si on effectuait les dosages, maximum 1h après la dernière injection. Comme indiqué précédemment, l'étifoxine n'est pas

détectable par HPLC dans la moelle et le cerveau par contre une faible quantité de l'ordre de 613 pmole a pu retrouvée dans le cerveau par spectrométrie de masse Cette concentration est largement insuffisante pour que l'étifoxine puisse agir en se fixant au TSPO ou au récepteur $GABA_A$ avec une IC50 de 7µM (Marc Verleye et al. 2005). Donc, il est fort probable que la persistance de l'effet analgésique de l'étifoxine longtemps après l'arrêt du traitement ne soit pas due à sa présence à des concentrations efficaces dans les tissus nerveux.

7 Effet neuro protecteur /neuro régénérateur sur les nerfs périphériques lésés

7.1.1 Données expérimentales

L'étude de Girard en 2008 montre que l'étifoxine favorise la régénération axonale après cryolésion du nerf sciatique chez le rat (C. Girard et al. 2008) qui permet une récupération fonctionnelle plus rapide du nerf sciatique. Dans cette étude, l'effet analgésique de l'etifoxine n'a pas été testé cependant. Il a été montré *in vivo* sur le nerf sciatique de rat et in vitro dans des cultures de cellules de Schwann de rat que la progestérone, la dihydroprogestérone et l'allopregnanolone stimulaient l'expression de gènes codant pour les protéines PMP22 de la myéline (Roberto C Melcangi et al. 2005). Dans le cas de la glycoprotéine Po, le rôle des récepteurs nucléaires de la progestérone est confirmée car le blocage de ces récepteurs par la mifepristone bloque la stimulation de sa synthèse par la progestérone, la 5 alpha-DHP et l'allopregnanolone (R C Melcangi et al. 2003). Par contre l'expression de PMP22 semble être régulée par le récepteur GABAA (Roberto C Melcangi et al. 2005) puisque l'utilisation de la bicuculline, un antagoniste de ce récepteur, supprime complètement la stimulation de l'expression de PMP22 par l'allopregnanolone dans les cellules de Schwann en culture. Toutes ces données de la littérature peuvent nous amener à penser que même si l'effet analgésique de l'étifoxine passe principalement par les composés de bout de chaines, c'est-à- dire les composées 3 -réduits, d'autre stéroïdes intermédiaires pourraient contribuer à la protection et la régénération des nerfs périphériques. Ceci pourrait évidement avoir un impact positif sur la transmission de l'information nociceptive avec probablement une baisse de l'excitabilité et de l'intensité des symptômes douloureux associés. Par ailleurs, l'étifoxine pourrait

limiter la plasticité pathologique des circuits sensori-spinaux et/ou accélérer la récupération fonctionnelle du nerf lésé par la lésion neuropathique.

7.1.2 Rôle de la mitochondrie

Quelques études montrent que les mitochondries, en particulier celles présentes dans les axones, sont profondément altérés morphologiquement (vacuoles) et potentiellement responsable de l'apparition des douleurs à la suite d'un traitement vincristine chez l'homme (Thant et al. 1982) ou paclitaxel chez le rat (Jin et al. 2008). Si les mitochondries sont altérés sur le plan morphologique, elles semblent pourtant garder une capacité de neurostéroidogenèse intacte dans les modèles Paclitaxel (Voir annexe et Poisbeau et al, Front Cell Neurosci 2013) ou vincristine (Maya Aouad et al. 2009) puisque les neurostéroïdes endogènes (périphérique ou centraux) semblent garder une efficacité thérapeutique pour limiter les symptômes douloureux. Une alternative, également possible, mais pas démontrée à ce jour, serait que l'étape mitochondriale de neurostéroïdogenèse soit court-circuitée par une quantité importante de précurseurs stéroïdes du stress (corticostérone) ou des gonades (progestérone, testostérone). Ceci est également théoriquement possible si les précurseurs sont fournis de manière exogène.

La mitochondrie est un organite intracellulaire important pour la survie de la cellule. Elle est responsable en premier lieu de la respiration cellulaire et de la production d'énergie sous forme d'ATP. Le dysfonctionnement de la mitochondrie est impliqué dans de nombreuses pathologies neurodégénératives du système nerveux et inflammatoires (Joseph and Levine 2006). Plusieurs études ont essayé de mettre en évidence en cause un dysfonctionnement de la mitochondrie dans les neuropathies. Ainsi, le mETC (mitochondrial électron transport chain) qui permet le transport des électrons dans la mitochondrie et la production d'ATP et de ROS (reactive oxygen species) semble impliqué dans la genèse de symptômes douloureux chez le rat. Ceci serait dû à une augmentation de la production d'ATP et de ROS. L'inhibition de mETC réduit fortement l'hyperalgésie mécanique et thermique induite par le traitement à la vincristine, l'oxaliplatine et le streptozocine (Joseph and Levine 2009). Un autre composant de la mitochondrie, le mPTP (mitochondrial permeability transition pore) constitué entre autre du TSPO et de la VDAC est soupçonné d'être impliqué dans la dégénérescence axonale (Barrientos et al. 2011). Par exemple, à la suite d'une

neuropathie chimiotoxique, le pore s'ouvre avec pour conséquence une augmentation de la synthèse de ROS, un relargage de calcium dans la mitochondrie, la baisse de la quantité d'ATP et le gonflement de la mitochondrie (Bernardi et al. 2006). Ceci entraine une baisse de l'apport énergétique de l'axone qui peu à peu dégénère. L'inhibition de ce pore réduit la dégénérescence axonale observée dans le modèle vincristine. Si nos travaux confirment l'importance de la fonction mitochondriale dans l'effet analgésique de l'étifoxine, son rôle pourrait être étendu à la production d'adénosine à partir d'ATP puisque l'adénosine semble avoir un effet anxiolytique et antidépresseur marqué dans de nombreuses études.

A travers le TSPO, exprimé par le feuillet externe mitochondrial, plusieurs études récentes montrent que la protection de la mitochondrie semble réduire les symptômes douloureux. Ainsi un traitement à l'Acetyl L-carnitine (ALCAR), un dérivé d'acide aminé qui joue un rôle important dans le transport des acides gras à longue chaine lipidique dans la mitochondrie, protège la mitochondrie dans le modèle paclitaxel. Chez les rats soumis à un traitement préventif à l'ALCAR, les mitochondries présentes dans les axones des fibres C ne sont pas vacuolées contrairement à celles des rats traités au véhicule de l'ALCAR ; en parallèle les auteurs observent une disparition des symptômes douloureux mécaniques (Jin et al. 2008). Des ligands du TSPO mitochondrial semblent eux aussi avoir des effets neuroprotecteurs et analgésiques. Ainsi, l'olesoxime (ou cholest-4-en-3-one, oxime ; TRO19622), un ligand du TSPO possède lui aussi des propriétés analgésiques dans les modèles vincristine, paclitaxel ou streptozocine (Bordet et al. 2007; Xiao et al. 2009). La fixation l'olesoxime sur la TSPO entraine également des effets neuroprotecteurssur les motoneurones après un écrasement du nerf sciatique chez la souris (Bordet et al. 2007; Xiao et al. 2009). Ces différentes données peuvent nous laisser supposer que l'etifoxine pourrait voir un mode d'action qui serait similaire aux autres ligands de TSPO. Elle pourrait, de par sa fixation sur le TSPO, empêche le pore de s'ouvrir et par conséquent protège la mitochondrie des radicaux et autre molécules nocives

D. Annexe

1 Etifoxine & Inflammation

1.1 INFLAMMATION ET DOULEUR

L'inflammation est une réaction de défense des tissus contre des agents le plus souvent exogènes (bactéries), mais parfois endogènes (processus dégénératifs). L'inflammation fait intervenir des cellules, des vaisseaux, la matrice extracellulaire et de nombreux médiateurs chimiques qui peuvent être pro ou anti-inflammatoires et qui peuvent modifier ou entretenir la réponse inflammatoire (Rousselet et coll., 2005; Figure 1).

1.1.1 Inflammation aiguë

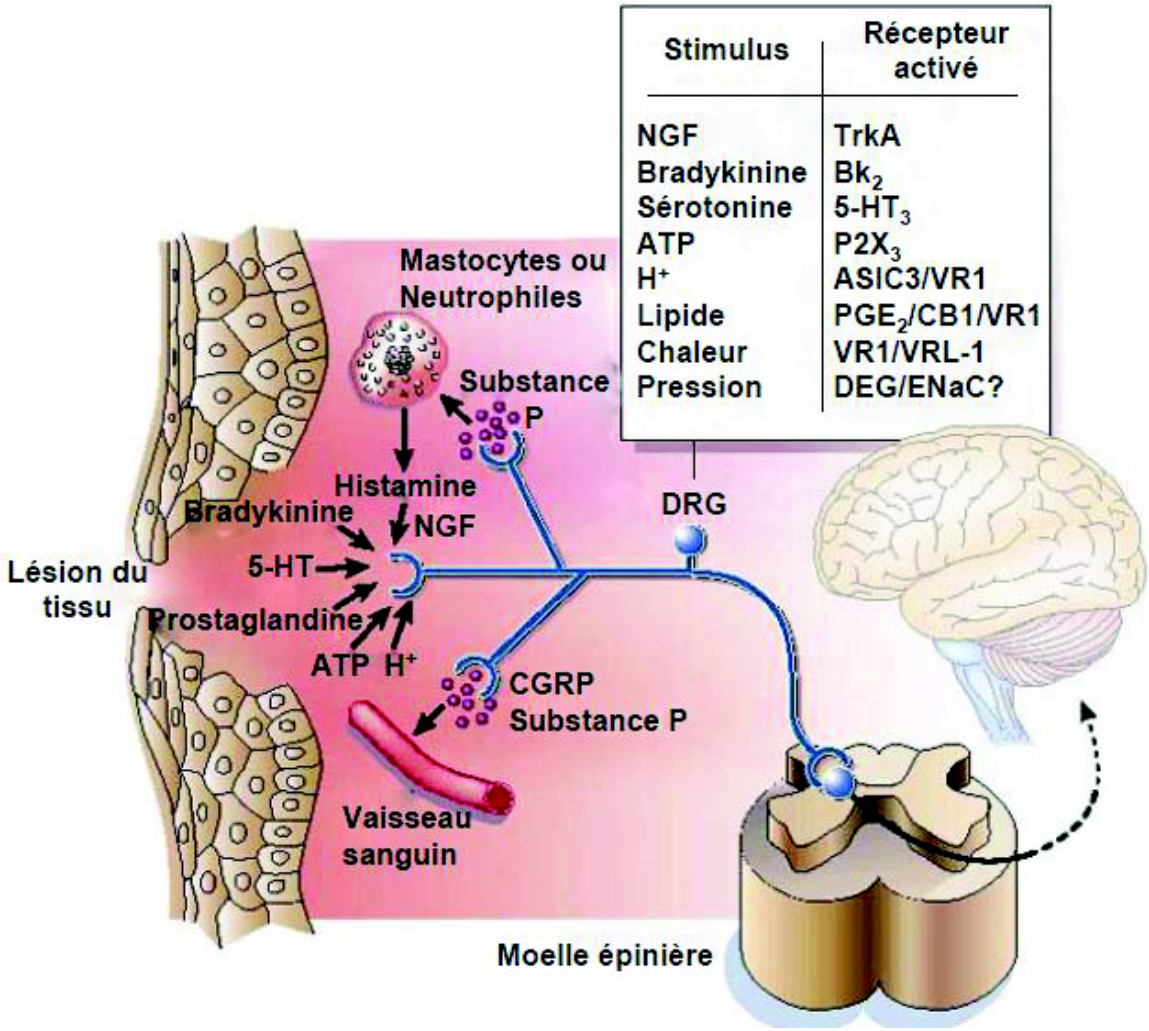
C'est la réponse immédiate à un agent agresseur. Elle est de courte durée (quelques jours ou semaines), d'installation souvent brutale et caractérisée par des phénomènes vasculo exsudatifs intenses. Les inflammations aiguës peuvent guérir spontanément ou non, mais dans les deux cas, elles peuvent laisser des séquelles si la destruction tissulaire est importante.

1.1.2 Inflammation chronique

C'est une inflammation qui n'a aucune tendance à la guérison spontanée et qui évolue en persistant ou en s'aggravant pendant plusieurs mois ou plusieurs années.

1.1.3 Réaction inflammatoire

Le déroulement de la réaction inflammatoire comporte initialement une phase locale ou vasculaire immédiate mettant en jeu des phénomènes cellulaires, humoraux et vasculaires. Dans certains cas, après mise en jeu de ces phénomènes, il existe une phase générale ou cellulaire comportant des perturbations protéiques, hormonales et hématologiques. L'ensemble de ces phénomènes contribue à la phase terminale de réparation et de cicatrisation. Ce type d'inflammation est responsable de plusieurs états de douleur persistante tels que l'arthrite, le mal de dos et la douleur temporo-mandibulaire. La phase vasculaire constitue la tétrade classique de Celsus (douleur, rougeur, chaleur et tuméfaction) qui correspond à l'installation de deux phénomènes, la congestion et l'oedème. Cette réaction vasculaire est immédiate; en quelques secondes apparaît la rougeur associée à la douleur qui est liée à la congestion. Il s'agit d'une modification du calibre vasculaire qui apparaît très rapidement, après une brève vasoconstriction, et consiste en une vasodilatation



D'après Julius et Basbaum, 2001

Figure 1. « La soupe inflammatoire. » quelques médiateurs de l'inflammation libérés dans la zone de la lésion incluant: les peptides (bradykinine), lipides (prostaglandines), neurotransmetteurs (sérotonine) et neurotrophines (NGF).

1.2 Etude expérimentale de la douleur inflammatoire : le modèle carragénine

Il existe plusieurs modèles de douleur inflammatoire, utilisant différents agents tels que la formaline (Lam et al. 1996), la carragénine (Honoré et al. 2000), l'adjuvant de Freund (Goff et al. 1998) et le zymosan (Meller and Gebhart 1997).

La carragénine est un polysaccharide sulfaté, présent dans plusieurs espèces d'algues rouges (*Irish moss* ou *Chondrus crispus*; Figure 2), existant sous trois types: Kappa (κ), Iota (ι) et Lambda (λ). Les deux premiers types forment des gels utilisés principalement comme agents stabilisateurs dans les aliments tels que le fromage, la crème, le chocolat et la glace. La carragénine λ est proinflammatoire, elle provoque un œdème et elle est souvent utilisée dans les études pharmacologiques pour tester les agents anti-inflammatoires (WINTER, RISLEY, and NUSS 1962).

Figure 2 : Algues rouges Irish moss ou Chondrus crispus, d'où est extraite la carragénine

Nous avons choisi la carragénine comme agent d'inflammation pour les raisons suivantes:

1. Elle provoque rapidement une hyperalgésie (dans les premières minutes après l'injection (Hargreaves et al. 1988).
2. L'hyperalgésie produite est relativement stable pendant une durée qui

s’étend jusqu’à 7 jours. (López-Avila et al. 2004; T Suzuki, Kishimoto, and Misawa 1996).

Résultats:

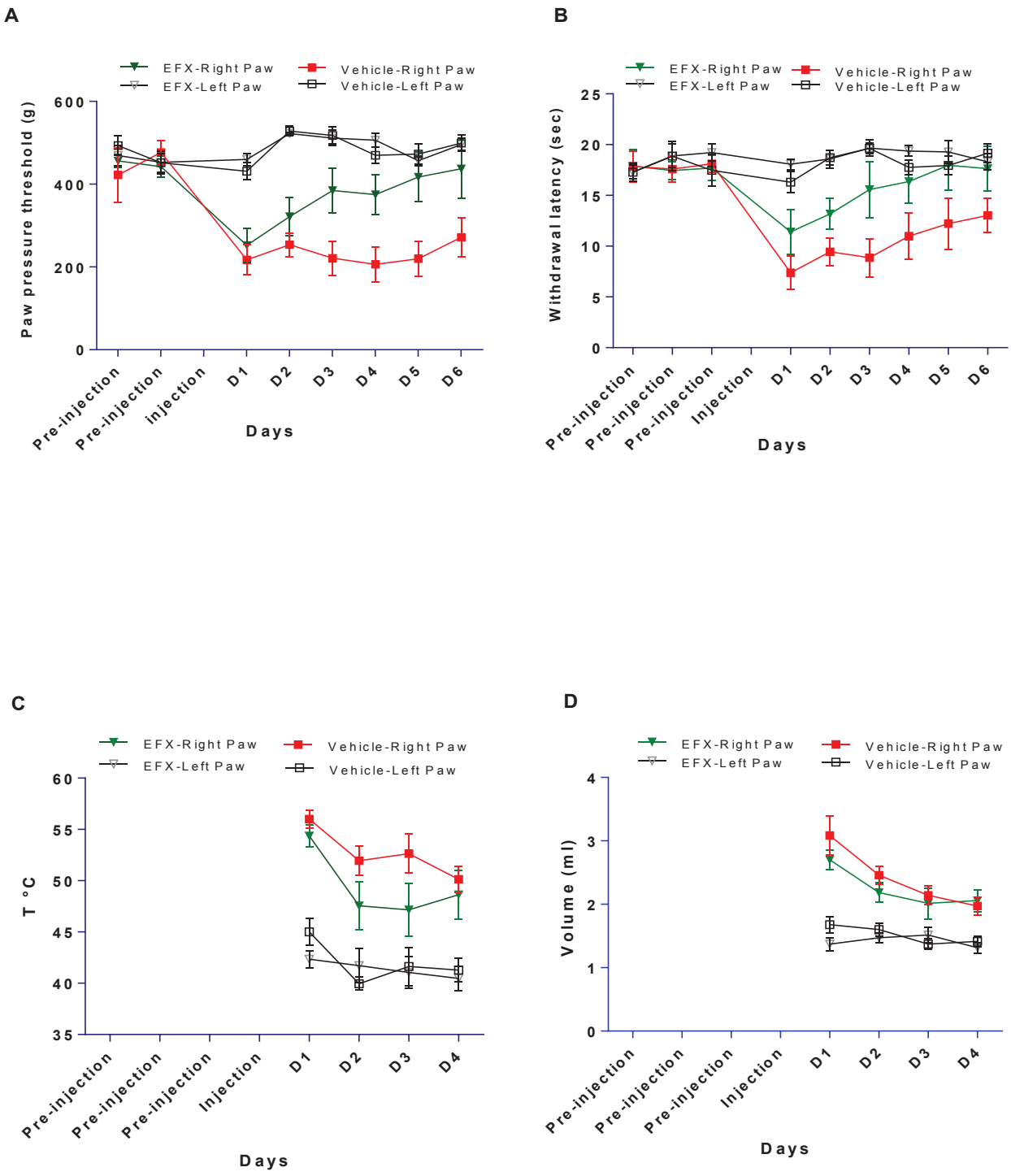


Figure 3: Effet de l'étifoxine sur l'inflammation induite par la carragénine λ. Les graphiques illustrent l'évolution des seuils nociceptifs mécaniques (graphique A), l'hyperalgésie thermique (graphique B), Température (graphique C) et l'œdème (graphique D).

Nous avons étudié l'effet de l'étifoxine sur la réponse inflammatoire en utilisant le modèle de la carragénine lambda. Une hyperalgésie mécanique est observée (baisses des seuils mécaniques de 400g à 200g). Le traitement étifoxine (EFX, 5 injections i.p. 50mg/kg) début après injections de la carragénine. Dès la 1ère injection une amélioration des symptômes est observée. Les animaux sous traitement étifoxine présentent une réduction de l'hyperalgie mécanique (**Figure 3** : Graphe **A**), l'hyperalgésie thermique (**Figure 3** : Graphe **B**) et la température (**Figure 3** : Graphe **C**). Ces résultats est en accord avec d'autres études déjà effectués au labo qui montrent l'efficacité de l'étifoxine dans la régulation de la réponse inflammatoire (Maya Aouad et al. 2009, 2014). En effet, L'étifoxine augmente l'expression des ARNm de TNF alpha, IL6, ILβ, Cox2 ainsi la synthèse de PGE2 dans la moelle épinière après l'inflammation périphérique du genou (Maya Aouad et al. 2014)

2 Revue

Analgesic strategies aimed at stimulating the endogenous production of allopregnanolone

frontiers in
CELLULAR NEUROSCIENCE

MINI REVIEW ARTICLE
published: 17 June 2014
doi: 10.3389/fncel.2014.00174

Analgesic strategies aimed at stimulating the endogenous production of allopregnanolone

Pierrick Poisbeau[1]*, Anne Florence Keller[1,2], Maya Aouad[1], Nisrine Kamoun[1], Ghislaine Groyer[3] and Michael Schumacher[3]

[1] Molecular Determinants of Pain, Institute for Cellular and Integrative Neurosciences (INCI), UPR Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS) 3212 and University of Strasbourg, Strasbourg, France
[2] Rhenovia Pharma, Mulhouse, France
[3] UMR 788 Neuroprotection and Neuroregeneration: Neuroactive Small Molecules, Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM) and University Paris-Sud, Kremlin-Bicêtre, France

Edited by:
Giulia Puja, Università degli Studi di Modena e Reggio Emilia, Italy

Reviewed by:
Marco Martina, Northwestern University, USA
Ping Liu, University of Connecticut Health Center, USA

***Correspondence:**
Pierrick Poisbeau, Molecular Determinants of Pain, Institute for Cellular and Integrative Neurosciences (INCI), UPR Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS) 3212 and University of Strasbourg, 5 Rue Blaise Pascal, 67084 Strasbourg Cedex, Strasbourg, France
e-mail: poisbeau@unistra.fr

A growing number of studies indicate that 3-alpha reduced neurosteroids are remarkable analgesics in various pain states. This is the case for allopregnanolone (AP), one of the most potent endogenous positive allosteric modulators of $GABA_A$ receptor function. From the pioneering work of Hans Selye, who described the sedative properties of steroids, synthetic compounds resembling the progesterone metabolite AP have been developed. If some of them have been used as anesthetics, it seems difficult to propose them as a therapeutic option for pain since they display several adverse side effects such as sedation, amnesia and functional tolerance. An alternative strategy, chosen by few laboratories around the world, is aimed at stimulating the local production of 3-alpha reduced neurosteroids in order to limit these well-known side effects. This pharmacological approach has the advantage of targeting specific structures, fully equipped with the necessary biosynthetic enzymatic machinery, where neurosteroids already act as endogenous pain modulators. The various pharmacological trials which attempted to treat pain symptoms by stimulating the production of 3-alpha reduced neurosteroids are reviewed here, as well as novel neurotransmitter systems possibly regulating their endogenous production.

Keywords: allodynia, hyperalgesia, nociception, pain, neurosteroids, etifoxine

INTRODUCTION

In 1941, Selye reported that intraperitoneal injections of high doses of progesterone produce anesthesia in the rat (Selye, 1941). Several years later, this led to the development of steroidal anesthetics (Child et al., 1971). Of particular interest are the 3α-reduced steroid compounds, such as alphaxalone, which display potent anesthetic properties. Indeed, they were found to selectively act as positive allosteric modulators of the inhibitory functions of $GABA_A$ receptors ($GABA_A$Rs), expressed either at extrasynaptic (Harrison and Simmonds, 1984) or synaptic sites (Poisbeau et al., 1997; Cooper et al., 1999). After two decades of research, two steroid binding sites on $GABA_A$Rs have been identified (Hosie et al., 2006). Modulation of $GABA_A$R function is observed after binding of a 3α-reduced steroid in a cavity formed by the α-subunit transmembrane domains. A direct activation of the receptor-channel is also observed at a higher concentration if the binding is effective at interfacial residues between α and β subunits. Interestingly, recent experiments strongly suggest that these binding sites are reached by steroids via lateral mobility in the cell membrane, and that they only affect $GABA_A$R function when accessing the intracellular part of the channel (Akk et al., 2005). This observation may help understanding the possible occlusion of steroid action when the receptor is submitted to intracellular phosphorylation by protein kinase C (Harney et al., 2003; Vergnano et al., 2007). Many other receptor-channels were found to be modulated by steroids (Schlichter et al., 2006) but, in most cases, this physiological action was only observed at micromolar concentrations. Without fully excluding elevated levels of steroids within specific neuronal microdomains, such concentrations are unlikely to occur in the central nervous system (CNS; Schumacher et al., 2003).

It is interesting to note at this stage that neuroactive steroids can be synthesized at the periphery (i.e., by gonads and adrenal glands), but also by neural cells in the nervous system. This discovery led Baulieu and collaborators to propose the term "neurosteroids" for neuroactive steroids produced by neural cells independently of the endocrine steroidogenic glands (Baulieu and Robel, 1990). In the brain, similarly to any steroid-synthesizing tissues, a mitochondrial protein complex called TSPO is necessary to initiate the synthesis of neuroactive steroids (Rupprecht et al., 2010). TSPO facilitates the translocation of cholesterol from the outer to the inner mitochondrial membrane, where the P450 side-chain cleavage enzyme is located. The intramitochondrial transport of cholesterol is considered as a rate-limiting step for neurosteroidogenesis. Of course, this complex metabolic step can

be bypassed if peripheral steroid hormones access the brain, as they easily cross the blood-brain barrier. In this case, circulating steroid hormones (i.e., progesterone, deoxycorticosterone, testosterone) may serve as precursors for neurosteroidogenic enzymes synthesizing $GABA_AR$ active steroids (**Figure 1A**).

The purpose of this topical review is to illustrate the current analgesic strategies aimed at stimulating the production of endogenous neurosteroid analgesics in animal models. Two major aspects will be covered: (i) the recent attempts to use TSPO agonists for the production of steroid analgesics; and (ii) the identification of endogenous signaling pathways which may regulate neurosteroidogenesis and could be targeted in the near future for therapeutic purposes.

WHAT ARE THE ENDOGENOUS STEROID ANALGESICS? LESSONS FROM EXOGENOUSLY-ADMINISTERED STEROIDS AND CURRENT HYPOTHESIS FOR SEX-SPECIFIC PAIN ISSUES

Since the early reports of Selye, several groups have characterized the analgesic efficacy of steroid hormones, when administered systemically, into cavities of the CNS (intracerebroventricular, i.c.v. or intrathecally) or directly into rodent brain structures. These observations also raised critical issues linked to the well-known sex-specific differences in pain responses (Greenspan et al., 2007). From many experiments, it is clear that the administration of testosterone or progesterone to rodents induces antinociception and analgesia (Kavaliers and Wiebe, 1987; Frye and Duncan, 1994; Pednekar and Mulgaonker, 1995). Conversely, low levels of theses hormones, after gonadectomy for example, are associated with low nociceptive thresholds and pain hypersensitivity. Experimental evidences have also shown that the effects of testosterone and progesterone are mediated by their neuroactive metabolites, since analgesia is never observed in mice deficient for 5α-reductase (Frye et al., 2002, 2004). We recently contributed to this field by showing that the analgesic action of AP (3α-hydroxy-5α-pregnan-20-one or 3α,5α-tetrahydroprogesterone) is mediated by a direct allosteric positive modulation of $GABA_ARs$ in the spinal cord of rats displaying mechanical or thermal pain symptoms (Charlet et al., 2008). Coming back to the endocrine control of nociception by steroid hormones, it is interesting to note that the duration of miniature $GABA_AR$-mediated synaptic currents in the spinal cord is submitted to large variations during the female reproductive cycle (**Figure 1B**). We found these currents to be significantly longer in duration while recording from layer II spinal neurons of adult females during proestrus (i.e., during the progesterone surge) compared to those recorded in late estrus when circulating progesterone is low (mean decay time constant in proestrus: 31.9 ± 3.3 ms, $n = 10$ vs. estrus: 16.8 ± 2.9, $n = 14$; two-tailed unpaired Student's t-test, $p < 0.001$). Interestingly, glycinergic synapses during proestrus are also converted into mixed glycine/GABAergic synapses. Together, this led to an increased inhibitory control of layer II neurons processing pain informations and in a reduction in the intensity of pain symptoms, as previously demonstrated (Keller et al., 2001, 2004; Inquimbert et al., 2008). Since layer II neurons are fully equipped to synthesize AP from progesterone, it is likely that progesterone reaching the spinal cord is converted to AP, which potentiates the affinity of $GABA_ARs$ for GABA at individual synapses. This is fully in agreement with previous studies indicating that female pain thresholds are controlled by the levels of circulating gonadal steroids and, among them, progesterone (Greenspan et al., 2007).

Based on these observations, several groups around the world, including ours, have demonstrated the efficacy of administering AP for alleviating pain symptoms (Kavaliers and Wiebe, 1987; Frye and Duncan, 1994; Charlet et al., 2008; Meyer et al., 2008, 2011). This strategy, although very efficient in the short-term, has major disadvantages since a systemic/oral administration of AP-like steroids may generates negative side effects such as sedation, fatigue, nausea and functional tolerance. If the treatment is stopped or not properly controlled, it may also give rise to severe withdrawal symptoms (Smith, 2001, 2002; Gulinello and Smith, 2003). It remains that AP has an interesting therapeutic potential as pain killer in pathological pain states. Interestingly, endogenous concentrations of AP are affected in various neuropathologies including peripheral neuropathies (Melcangi et al., 2011). For example, AP concentrations were found particularly low in the distal portion of an injured sciatic nerve and correlated with low expression levels of 5α-reductase (Roglio et al., 2008). In apparent contradiction, 5α-reductase activity is high in the spinal cord of rats exhibiting inflammatory pain symptoms (Poisbeau et al., 2005). Since pain responses are exacerbated after inhibition of 5α-reductase activity, this demonstrates that the synthesis of AP-like steroids may limit pain symptoms. More recently, 3α-HSOR expression and activity were also found to be elevated in the spinal cord dorsal horns of neuropathic rats (Meyer et al., 2008).

Taken together, these results show that AP-like compounds, exogenously administered, are particularly efficient for limiting pain symptoms. Several reports also indicate that they may exert a general neuroprotective action. In peripheral nerves, in the spinal cord and in various supraspinal structures, there is a significant production of these putative pain killers (Caruso et al., 2013). A straightforward strategy would be to stimulate this widespread endogenous analgesic system. This has, at least, one major advantage: to limit the possible unwanted side effects seen when AP is given *per os* or via the general circulation.

STIMULATING THE SYNTHESIS OF ALLOPREGNANOLONE FOR PRODUCING ANALGESIA

The mitochondrial TSPO complex is the main molecular target exploited so far to efficiently stimulate neurosteroidogenesis (Rupprecht et al., 2009). Many TSPO ligands have been developed and tested successfully as neurotherapeutics in experimental models of painful diabetic and chemotherapy-induced neuropathy (Bordet et al., 2008; Aouad et al., 2009), mononeuropathy after chronic nerve constriction (Aouad et al., 2014a) and monoarthritis induced by persistent knee inflammation (Aouad et al., 2014b).

When we first attempted to stimulate the production of 3α-reduced neurosteroids in the spinal cord, we incubated the slices in the presence of the classical benzodiazepine diazepam and of flumazenil, a silent antagonist of the benzodiazepine site on $GABA_ARs$ (Keller et al., 2004). This favored the binding of

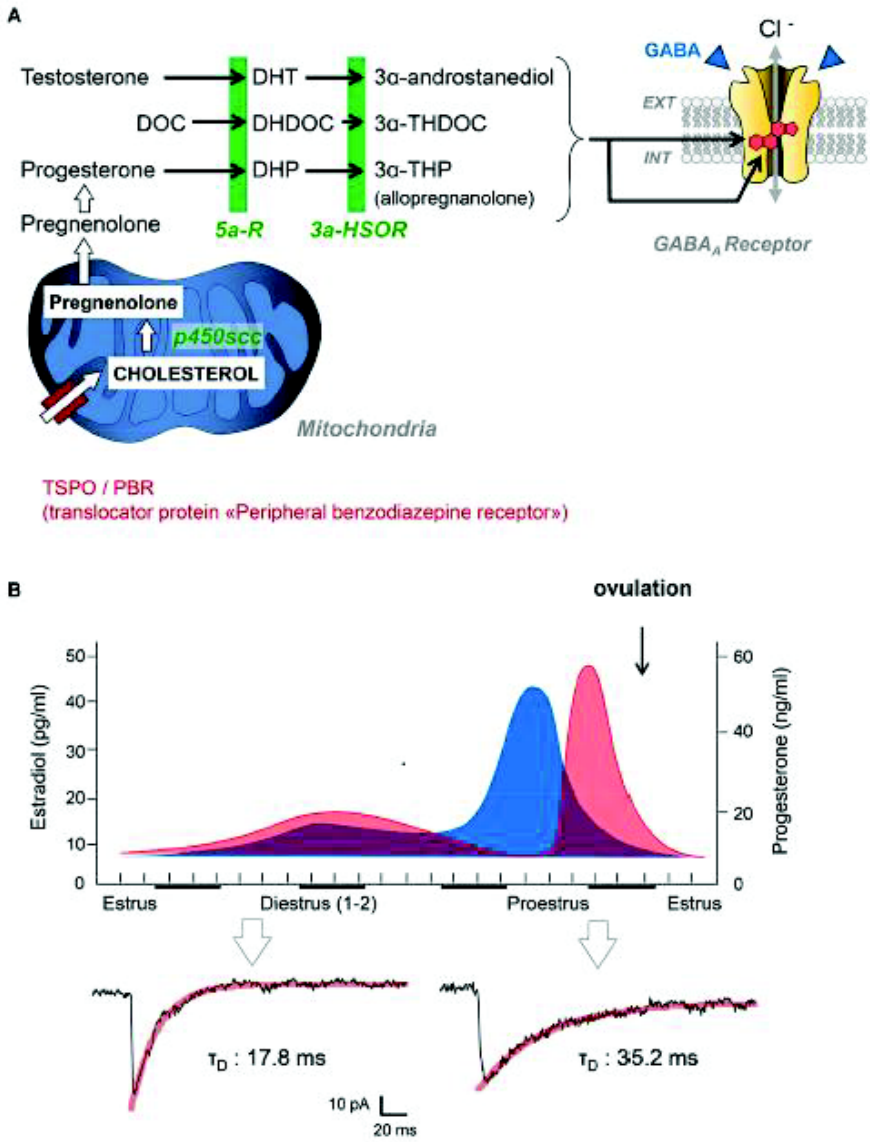


FIGURE 1 | (A) Simplified diagram summarizing the key steps of neurosteroidogenesis from cholesterol precursors to 3α-reduced neurosteroids (3α-androstanediol, 3α-THDOC, 3α-THP). These end-chain metabolites are potent positive allosteric modulators of GABA$_A$Rs after binding to specific binding sites. Abbreviations: DOC, deoxycorticosterone; DHDOC, 5α-dihydrodeoxycorticosterone; THDOC, 3α,5α-tetrahydrodeoxycorticosterone; DHP, 5alpha-dihydroprogesterone; THP, 3α,5α-tetrahydroprogesterone (= AP); 5α-R, 5α-reductase; 5α-HSOR, 3α-hydroxysteroid oxydoreductase; P450scc, P450 side-chain cleavage enzyme. **(B)** Top graphs summarize the global changes in blood estradiol (blue) and progesterone (red) during different phases of the reproductive cycle in female rats. Patch clamp traces below are representative of inhibitory postsynaptic currents mediated by GABA$_A$Rs in the spinal cord of female Sprague-Dawley rats during estrus and proestrus (i.e., when progesterone levels are low and high, respectively). Adapted from Keller (2002).

diazepam on the mitochondrial TSPO and promoted the local synthesis of AP-like neurosteroids. Indeed, GABA$_A$R-mediated synaptic currents were longer in duration, suggesting an increased affinity of the receptor-channel for GABA. We further confirmed 3α-reduced neurosteroids to be responsible for this increased spinal inhibition by blocking this effect with the TSPO inhibitor PK11195 or the 3α-reductase inhibitor finasteride (Keller et al., 2004). Apart from characterizing the key role of neurosteroids in the developmental maturation of inhibitory spinal synapses, the increased spinal inhibition was found to be responsible for the limitation of thermal hyperalgesia in a rodent model of inflammatory pain (Poisbeau et al., 2005). Beside GABA$_A$Rs,

note here that 3α-reduced neurosteroids may also inhibit T-type calcium channels to produce analgesia as previously published (Pathirathna et al., 2005). As mentioned earlier, it is difficult to use exogenous administration of AP-like steroids or benzodiazepines *in vivo* (see however Brinton, 2013). We thus tried to use a TSPO ligand to achieve similar goals. We choose etifoxine (EFX) because its properties had been already characterized on primary culture of hypothalamic neurons and on freshly-dissociated neonatal spinal neurons (Schlichter et al., 2000).

EFX (2-ethylamino-6-chloro-4-méthyl-4-phényl-4H-3,1-benzoxazine chlorhydrate) is prescribed in several countries as a non-benzodiazepine anxiolytic (Servant et al., 1998; Nguyen et al., 2006). At an efficient anxiolytic dose in human, it can be used safely (e.g., no functional tolerance and no physical dependence after treatment cessation) and displays limited adverse side effects on cognitive functions and vigilance (Micallef et al., 2001). EFX preferentially binds and modulates $GABA_A$Rs containing β2/3 subunits, at a site close to the chloride channel and distinct from that of benzodiazepines (Verleye et al., 1999, 2002; Hamon et al., 2003). Beside this direct effect on $GABA_A$Rs, EFX also binds to TSPO with an apparent affinity of about 20 μM (Verleye et al., 2005). If rats are sacrificed 30 min after a single injection of EFX of the reference anxiolytic dose of 50 mg/kg i.p., the plasmatic and brain concentrations of AP are increased by 2–4 times (Verleye et al., 2005). An increase in AP was also seen in EFX-treated male rats in the absence of gonads and adrenal glands. Because AP is a potent allosteric positive modulator of $GABA_A$Rs, this molecular mechanisms is referred to as "indirect" on $GABA_A$R function. While studying the functional consequence of EFX on hypothalamic primary cultures, we found that it strongly affected the tonic inhibition mediated by extrasynaptic receptors (Schlichter et al., 2000). More recently, we also found that the indirect neurosteroid-mediated effect of EFX prolonged $GABA_A$R-mediated synaptic currents in layer II neurons of the spinal cord (Aouad et al., 2014b).

Spinal inhibition, when reduced, gives rise to pathological pain symptoms and it is then crucial to maintain or to increase inhibitory controls to limit pain states. Because EFX may theoretically increase inhibitory controls mediated by $GABA_A$Rs, directly or indirectly, we choose to administer EFX (50 mg/kg, five daily injections i.p.) to animals exhibiting generalized neuropathic pain symptoms after chemotherapy with vincristine (VCR) sulphate, oxaliplatin or paclitaxel (**Figure 2**). The very low values for mechanical thresholds after chemotherapy were consistent with the presence of mechanical allodynia in all rat groups and models. Normal mechanical thresholds were, however, restored after EFX treatment, except if rats were pre-treated with an inhibitor of 3α-HSOR (depo-provera = medroxyprogesterone acetate) as shown in **Figure 2** (orange bar). Interestingly, EFX analgesia persisted even if the gonads and adrenals were removed (**Figure 2**, right graph). This strongly suggests that EFX analgesia is almost exclusively carried by the production of AP-like neurosteroids.

TSPO EXPRESSION, POSSIBLE CELL COOPERATION AND SIGNALING MECHANISMS

The above results, combined with recently published data (Aouad et al., 2010, 2014a,b), raise several critical questions regarding the TSPO-mediated mode of action of EFX. First, EFX clearly displays anti-allodynic/hyperalgesic properties but does not modify basal nociceptive thresholds of symptom-free animals (or body parts; e.g., sham-operated paw or contralateral territories to the lesion site). The second important observation is related to the efficacy of the effect, which not only fully alleviates pain symptoms, but also prevents their re-appearance after cessation of the treatment. In the model of rat sciatic nerve constriction, we failed to observe any pain symptoms for about 90 days after the treatment (Aouad et al., 2014a). As highlighted in a Pain editorial, there is thus an urgent need for a clinical trial testing the translational interest of this molecule in human pain pathologies (Zeilhofer, 2009). In addition, the molecular and cellular mechanisms recruited by EFX need to be identified and will require complementary experiments. Beside the sensori-discriminative component of pain responses, the real action of EFX on the affectivo-emotional component need, for example, to be clarified. This will require studying the supraspinal action of EFX in brain structures processing nociceptive informations and setting the emotional pain responses.

Of particular interest are the neuroregenerative and neuroprotective effects of the molecule described in a model of sciatic nerve lesion (Girard et al., 2008) or of diabetic neuropathy (Giatti et al., 2009). After cryolesion of the rat sciatic nerve, EFX therapy not only accelerated but also improved the quality of axonal regeneration and functional recovery (Girard et al., 2008). This was an important observation, as poor regeneration of axons may result in chronic neuropathic pain. Once again, little is known regarding the molecular mechanisms recruited to protect and promote peripheral nerve recovery, and there is so far little information concerning the cellular targets of EFX. Within the peripheral nervous system, TSPO is upregulated in macrophages, Schwann cells and dorsal root ganglia (DRG) sensory neurons in response to injury and disease (Karchewski et al., 2004; Rupprecht et al., 2010). A synergistic cooperation between these different cell types could be of utmost importance for neuroregenerative processes as well as pain-related neuropathologies.

Indeed, TSPO protein levels are upregulated in the ipsilateral spinal cord in rats displaying inflammatory pain symptoms after knee injection of complete Freund's adjuvant (Hernstadt et al., 2009). A recent study also reports an increase in the number of TSPO binding sites (e.g., using [^{3}H] PK11195, a well known TSPO ligand) in the spinal cord of rats, exhibiting neuropathic and osteoarthritic pain symptoms (Miller et al., 2013). According to this study, the increase in [^{3}H] PK11195 binding in the spinal cord seems to occur in microglial cells. TSPO is strongly expressed in activated microglia (Benavides et al., 1983; Moynagh et al., 1991; Itzhak et al., 1993; Park et al., 1996; Karchewski et al., 2004; Hernstadt et al., 2009; Varga et al., 2009). Microglial TSPO requires a particular attention due the key role of this cell type in the initiation and maintenance of chronic pain states (Tsuda et al., 2005). The recruitment of TSPO signaling is also of interest while dealing with pain models associated with lesions during the process of recovery. For example, regulation of the expression of TSPO and of their endogenous ligands have been well studied during rat sciatic nerve degeneration and regeneration (Rupprecht et al., 2010). After nerve freezing lesion or chronic

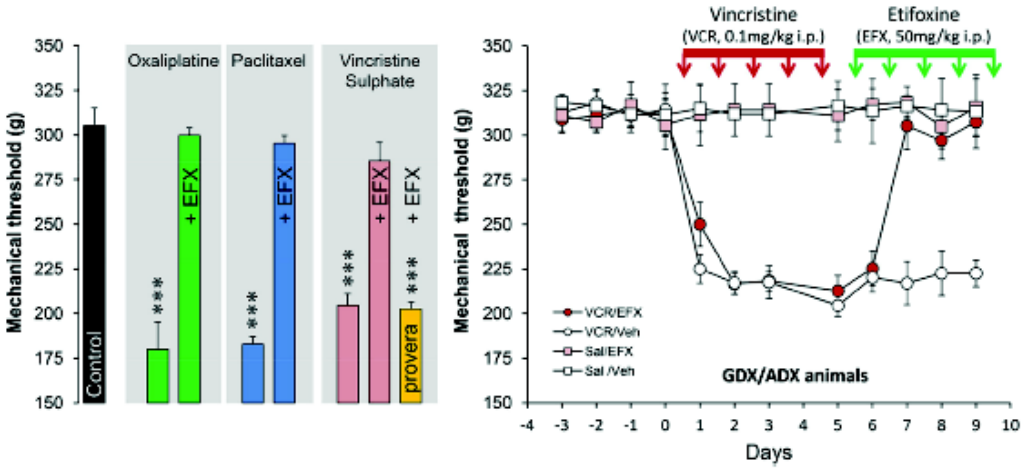


FIGURE 2 | Histogram on the left illustrates the mechanical nociceptive threshold measured with a calibrated forceps in control (black bar, treated with the vehicles) and after treatment with oxaliplatin (green bars; 2 mg/kg, injection i.p. twice-weekly for four-and-a-half consecutive weeks), paclitaxel (blue bars; 2 mg/kg i.p. on four alternate days: day 1,3,5,7), vincristine sulphate (pink bars; 0.1 mg/kg, five daily injections i.p.). Note that all rats exhibited low mechanical thresholds after chemotherapy (Tukey, $p < 0.001$; $n = 6–8$ rats per groups) but normal thresholds were restored after five daily injections with etifoxine (EFX, 50 mg/kg i.p.). EFX analgesia was abolished in animals pre-treated for 1 week before VCR with depo-provera (orange bar; inhibitor of 3α-HSOR, five daily injections of 5 mg/kg s.c.). Graph on the right illustrates the time course of mechanical threshold in gonadectomized/adrenalectomized (GDX/ADX) rats, submitted to VCR chemotherapy (or saline) and treated for their mechanical allodynia with EFX (or vehicle). Note that EFX analgesia persisted even in the absence of peripheral source of steroids. Abbreviations: EFX: etifoxine, Sal: saline, VCR: vincristine, Veh: vehicle. Adapted from Aouad et al. (2010).

denervation, a clear over-expression of TSPO and octadecaneuropeptide (ODN) is observed in Schwann cells and macrophages, suggesting their crucial role during regenerative processes (Lacor et al., 1996). Axonal injury-dependent induction of TSPO has been also observed in small-diameter adult rat primary sensory neurons (Karchewski et al., 2004).

ENDOGENOUS CONTROL OF ALLOPREGNANOLONE SYNTHESIS AND ANALGESIC FUNCTION

Many endogenous ligands of TSPO have been identified and are described in detail in a recent review (Rupprecht et al., 2010). If their binding characteristics and neurosteroidogenic activities are well understood, very little is known regarding their role in brain functions and pathologies (Rupprecht et al., 2010). Cholesterol and porphyrins are important endogenous ligands of TSPO and display nanomolar to micromolar affinities, respectively. Endozepines, discovered at the end of the 80 s, are peptidergic ligands capable of displacing the binding of classical benzodiazepines at their $GABA_AR$ binding sites (Costa and Guidotti, 1991). The endozepine diazepam-binding inhibitor (DBI) and its metabolites were later shown to stimulate neurosteroidogenesis after binding to TSPO (Papadopoulos et al., 1991; Do-Rego et al., 1998). Few reports are available suggesting their implication in pain. An antinociceptive effect of DBI on thermal and mechanical thresholds has been reported after intrathecal or i.c.v. infusion of DBI (Wang et al., 2002). In line, i.c.v. injection of a bovine endozepine potentiated morphine analgesia in mice (Chen et al., 1991). In apparent contradiction, the DBI-derived ODN was shown to increase aggressive interactions in mice and, surprisingly, to reduce defeat-induced analgesia (Kavaliers and Hirst, 1986). In summary, these rare reports suggest a role for endogenous TSPO ligands in the control of nociception. The real expression levels of endogenous TSPO ligands, their cellular localization and changes in pain pathologies are, however, still largely unknown. This is in sharp contrast with TSPO expression which has been found to be increased in several neuropathologies including in pain models.

Beside TSPO ligands, we showed that oxytocin, a neuropeptide released by hypothalamic neurons projecting onto spinal nociceptive neurons, is exerting its long-lasting analgesic effect by stimulating the production of AP (Juif et al., 2013). Apart from its fast antinociceptive action in the spinal cord which increases GABAergic inhibitory transmission and reduces neuronal excitability (Breton et al., 2008, 2009), the tonic activation of spinal oxytocin receptors in inflammatory pain states also stimulates AP synthesis via ERK (for extracellular signal-regulated kinase) signaling pathways, resulting in the potentiation of GABAergic inhibition and limitation of pain symptoms (Juif et al., 2013). It is not excluded at this stage that other descending inhibitory controls may also exert their antinociceptive action by modulating neurosteroid synthesis, but this remains to be demonstrated. Another example is related to substance P secretion by nociceptive primary afferents which may inhibit the production of AP through its NK1 receptor, as previously demonstrated (Patte-Mensah et al., 2005). Taken into account this result, we may speculate the diffuse AP-based analgesic system to be under the control of

a balance of stimulating and inhibiting neuropeptides in the spinal cord. This hypothesis requires to be tested in order to identify the most promising peptides for future therapeutic interventions.

CONCLUSIVE REMARKS

In conclusion, there are now several convergent experimental evidences demonstrating that the local production of AP-like steroids in the nociceptive system constitutes a diffuse analgesic system. The development of numerous TSPO ligands capable of stimulating this system is on the way, but little is known regarding other possible physiological stimulators. In line with this idea, neuropeptides could play a key role.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors thanks the following institutions for their support: Centre National de la Recherche scientifique, Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, Fondation pour la Recherche Médicale, Institut Universitaire de France.

REFERENCES

Akk, G., Shu, H. J., Wang, C., Steinbach, J. H., Zorumski, C. F., Covey, D. F., et al. (2005). Neurosteroid access to the GABAA receptor. *J. Neurosci.* 25, 11605–11613. doi: 10.1523/jneurosci.4173-05.2005

Aouad, M., Charlet, A., Rodeau, J. L., and Poisbeau, P. (2009). Reduction and prevention of vincristine-induced neuropathic pain symptoms by the non-benzodiazepine anxiolytic etifoxine are mediated by 3alpha-reduced neurosteroids. *Pain* 147, 54–59. doi: 10.1016/j.pain.2009.08.001

Aouad, M., Petit-Demouliere, N., Goumon, Y., and Poisbeau, P. (2014a). Etifoxine stimulates allopregnanolone synthesis in the spinal cord to produce analgesia in experimental mononeuropathy. *Eur. J. Pain* 18, 258–268. doi: 10.1002/j.1532-2149.2013.00367.x

Aouad, M., Petit-Demouliere, N., and Poisbeau, P. (2010). Anti-hyperalgesic/allodynic properties of the non benzodiazepine anxiolytic etifoxine in inflammatory and neuropathic pain models. Proceedings of the 13th world congress of pain (IASP press) 46.

Aouad, M., Zell, V., Juif, P. E., Lacaud, A., Goumon, Y., Darbon, P., et al. (2014b). Etifoxine analgesia in experimental monoarthritis: a combined action that protects spinal inhibition and limits central inflammatory processes. *Pain* 155, 403–412. doi: 10.1016/j.pain.2013.11.003

Baulieu, E. E., and Robel, P. (1990). Neurosteroids: a new brain function? *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 37, 395–403. doi: 10.1016/0960-0760(90)90490-c

Benavides, J., Quarteronet, D., Imbault, F., Malgouris, C., Uzan, A., Renault, C., et al. (1983). Labelling of "peripheral-type" benzodiazepine binding sites in the rat brain by using [3H]PK 11195, an isoquinoline carboxamide derivative: kinetic studies and autoradiographic localization. *J. Neurochem.* 41, 1744–1750. doi: 10.1111/j.1471-4159.1983.tb00888.x

Bordet, T., Buisson, B., Michaud, M., Abitbol, J. L., Marchand, F., Grist, J., et al. (2008). Specific antinociceptive activity of cholest-4-en-3-one, oxime (TRO19622) in experimental models of painful diabetic and chemotherapy-induced neuropathy. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 326, 623–632. doi: 10.1124/jpet.108.139410

Breton, J. D., Poisbeau, P., and Darbon, P. (2009). Antinociceptive action of oxytocin involves inhibition of potassium channel currents in lamina II neurons of the rat spinal cord. *Mol. Pain* 5:63. doi: 10.1186/1744-8069-5-63

Breton, J. D., Veinante, P., Uhl-Bronner, S., Vergnano, A. M., Freund-Mercier, M. J., Schlichter, R., et al. (2008). Oxytocin-induced antinociception in the spinal cord is mediated by a subpopulation of glutamatergic neurons in lamina I-II which amplify GABAergic inhibition. *Mol. Pain* 4:19. doi: 10.1186/1744-8069-4-19

Brinton, R. D. (2013). Neurosteroids as regenerative agents in the brain: therapeutic implications. *Nat. Rev. Endocrinol.* 9, 241–250. doi: 10.1038/nrendo.2013.31

Caruso, D., Pesaresi, M., Abbiati, F., Calabrese, D., Giatti, S., Garcia-Segura, L. M., et al. (2013). Comparison of plasma and cerebrospinal fluid levels of neuroactive steroids with their brain, spinal cord and peripheral nerve levels in male and female rats. *Psychoneuroendocrinology* 38, 2278–2290. doi: 10.1016/j.psyneuen.2013.04.016

Charlet, A., Lasbennes, F., Darbon, P., and Poisbeau, P. (2008). Fast non-genomic effects of progesterone-derived neurosteroids on nociceptive thresholds and pain symptoms. *Pain* 139, 603–609. doi: 10.1016/j.pain.2008.06.016

Chen, Y. H., Wang, J. Y., Zhou, S., and Shoyab, M. (1991). Bovine endozepine potentiates morphine analgesia in mice. *Life Sci.* 48, PL79–PL83. doi: 10.1016/0024-3205(91)90129-y

Child, K. J., Currie, J. P., Dis, B., Dodds, M. G., Pearce, D. R., and Twissell, D. J. (1971). The pharmacological properties in animals of CT1341–a new steroid anaesthetic agent. *Br. J. Anaesth.* 43, 2–13. doi: 10.1093/bja/43.1.2-a

Cooper, E. J., Johnston, G. A., and Edwards, F. A. (1999). Effects of a naturally occurring neurosteroid on GABAA IPSCs during development in rat hippocampal or cerebellar slices. *J. Physiol.* 521(Pt. 2), 437–449. doi: 10.1111/j.1469-7793.1999.00437.x

Costa, E., and Guidotti, A. (1991). Diazepam binding inhibitor (DBI): a peptide with multiple biological actions. *Life Sci.* 49, 325–344. doi: 10.1016/0024-3205(91)90440-m

Do-Rego, J. L., Mensah-Nyagan, A. G., Feuilloley, M., Ferrara, P., Pelletier, G., and Vaudry, H. (1998). The endozepine triakontatetraneuropeptide diazepam-binding inhibitor [1750] stimulates neurosteroid biosynthesis in the frog hypothalamus. *Neuroscience* 83, 555–570. doi: 10.1016/s0306-4522(97)00362-x

Frye, C. A., and Duncan, J. E. (1994). Progesterone metabolites, effective at the GABAA receptor complex, attenuate pain sensitivity in rats. *Brain Res.* 643, 194–203. doi: 10.1016/0006-8993(94)90025-6

Frye, C. A., Rhodes, M. E., Walf, A., and Harney, J. P. (2002). Testosterone enhances aggression of wild-type mice but not those deficient in type I 5alpha-reductase. *Brain Res.* 948, 165–170. doi: 10.1016/s0006-8993(02)03076-7

Frye, C. A., Walf, A. A., Rhodes, M. E., and 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. doi: 10.1016/j.brainres.2004.01.020

Giatti, S., Pesaresi, M., Cavaletti, G., Bianchi, R., Carozzi, V., Lombardi, R., et al. (2009). Neuroprotective effects of a ligand of translocator protein-18 kDa (Ro54864) in experimental diabetic neuropathy. *Neuroscience* 164, 520–529. doi: 10.1016/j.neuroscience.2009.08.005

Girard, C., Liu, S., Cadepond, F., Adams, D., Lacroix, C., Verleye, M., et al. (2008). Etifoxine improves peripheral nerve regeneration and functional recovery. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 105, 20505–20510. doi: 10.1073/pnas.0811201106

Greenspan, J. D., Craft, R. M., LeResche, L., Arendt-Nielsen, L., Berkley, K. J., Fillingim, R. B., et al. (2007). Studying sex and gender differences in pain and analgesia: a consensus report. *Pain* 132(Suppl. 1), S26–S45. doi: 10.1016/j.pain.2007.10.014

Gulinello, M., and Smith, S. S. (2003). Anxiogenic effects of neurosteroid exposure: sex differences and altered GABAA receptor pharmacology in adult rats. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 305, 541–548. doi: 10.1124/jpet.102.045120

Hamon, A., Morel, A., Hue, B., Verleye, M., and Gillardin, J. M. (2003). The modulatory effects of the anxiolytic etifoxine on GABA(A) receptors are mediated by the beta subunit. *Neuropharmacology* 45, 293–303. doi: 10.1016/s0028-3908(03)00187-4

Harney, S. C., Frenguelli, B. G., and Lambert, J. J. (2003). Phosphorylation influences neurosteroid modulation of synaptic GABAA receptors in rat CA1 and dentate gyrus neurones. *Neuropharmacology* 45, 873–883. doi: 10.1016/s0028-3908(03)00251-x

Harrison, N. L., and Simmonds, M. A. (1984). Modulation of the GABA receptor complex by a steroid anaesthetic. *Brain Res.* 323, 287–292. doi: 10.1016/0006-8993(84)90299-3

Hernstadt, H., Wang, S., Lim, G., and Mao, J. (2009). Spinal translocator protein (TSPO) modulates pain behavior in rats with CFA-induced monoarthritis. *Brain Res.* 1286, 42–52. doi: 10.1016/j.brainres.2009.06.043

Hosie, A. M., Wilkins, M. E., da Silva, H. M., and Smart, T. G. (2006). Endogenous neurosteroids regulate GABAA receptors through two discrete transmembrane sites. *Nature* 444, 486–489. doi: 10.1038/nature05324

Inquimbert, P., Rodeau, J. L., and Schlichter, R. (2008). Regional differences in the decay kinetics of GABA(A) receptor-mediated miniature IPSCs in the dorsal horn of the rat spinal cord are determined by mitochondrial transport

of cholesterol. *J. Neurosci.* 28, 3427–3437. doi: 10.1523/JNEUROSCI.5076-07.2008

Itzhak, Y., Baker, L., and Norenberg, M. D. (1993). Characterization of the peripheral-type benzodiazepine receptors in cultured astrocytes: evidence for multiplicity. *Glia* 9, 211–218. doi: 10.1002/glia.440090306

Juif, P. E., Breton, J. D., Rajalu, M., Charlet, A., Goumon, Y., and Poisbeau, P. (2013). Long-lasting spinal oxytocin analgesia is ensured by the stimulation of allopregnanolone synthesis which potentiates GABA(A) receptor-mediated synaptic inhibition. *J. Neurosci.* 33, 16617–16626. doi: 10.1523/JNEUROSCI.3084-12.2013

Karchewski, L. A., Bloechlinger, S., and Woolf, C. J. (2004). Axonal injury-dependent induction of the peripheral benzodiazepine receptor in small-diameter adult rat primary sensory neurons. *Eur. J. Neurosci.* 20, 671–683. doi: 10.1111/j.1460-9568.2004.03530.x

Kavaliers, M., and Hirst, M. (1986). An octadecaneuropeptide (ODN) derived from diazepam binding inhibitor increases aggressive interactions in mice. *Brain Res.* 383, 343–349. doi: 10.1016/0006-8993(86)90037-5

Kavaliers, M., and Wiebe, J. P. (1987). Analgesic effects of the progesterone metabolite, 3 alpha-hydroxy-5 alpha-pregnan-20-one and possible modes of action in mice. *Brain Res.* 415, 393–398. doi: 10.1016/0006-8993(87)90228-9

Keller, A. F. (2002). "Synaptic plasticity of inhibitory controls during postnatal development and inflammatory pain states in the rat spinal nociceptive system," in *Health and Life Sciences*, (Strasbourg: University of Strasbourg Press), 161. (PUS; Thesis.fr).

Keller, A. F., Breton, J. D., Schlichter, R., and Poisbeau, P. (2004). Production of 5alpha-reduced neurosteroids is developmentally regulated and shapes GABA(A) miniature IPSCs in lamina II of the spinal cord. *J. Neurosci.* 24, 907–915. doi: 10.1523/jneurosci.4642-03.2004

Keller, A. F., Coull, J. A., Chery, N., Poisbeau, P., and De Koninck, Y. (2001). Region-specific developmental specialization of GABA-glycine cosynapses in laminas I-II of the rat spinal dorsal horn. *J. Neurosci.* 21, 7871–7880.

Lacor, P., Benavides, J., and Ferzaz, B. (1996). Enhanced expression of the peripheral benzodiazepine receptor (PBR) and its endogenous ligand octadecaneuropeptide (ODN) in the regenerating adult rat sciatic nerve. *Neurosci. Lett.* 220, 61–65. doi: 10.1016/s0304-3940(96)13187-6

Melcangi, R. C., Giatti, S., Pesaresi, M., Calabrese, D., Mitro, N., Caruso, D., et al. (2011). Role of neuroactive steroids in the peripheral nervous system. *Front. Endocrinol. (Lausanne)* 2:104. doi: 10.3389/fendo.2011.00104

Meyer, L., Patte-Mensah, C., Taleb, O., and Mensah-Nyagan, A. G. (2011). Allopregnanolone prevents and suppresses oxaliplatin-evoked painful neuropathy: multi-parametric assessment and direct evidence. *Pain* 152, 170–181. doi: 10.1016/j.pain.2010.10.015

Meyer, L., Venard, C., Schaeffer, V., Patte-Mensah, C., and Mensah-Nyagan, A. G. (2008). The biological activity of 3alpha-hydroxysteroid oxido-reductase in the spinal cord regulates thermal and mechanical pain thresholds after sciatic nerve injury. *Neurobiol. Dis.* 30, 30–41. doi: 10.1016/j.nbd.2007.12.001

Micallef, J., Soubrouillard, C., Guet, F., Le Guern, M. E., Alquier, C., Bruguerolle, B., et al. (2001). A double blind parallel group placebo controlled comparison of sedative and mnesic effects of etifoxine and lorazepam in healthy subjects [corrected]. *Fundam. Clin. Pharmacol.* 15, 209–216. doi: 10.1046/j.1472-8206.2001.00025.x

Miller, T. R., Wetter, J. B., Jarvis, M. F., and Bitner, R. S. (2013). Spinal microglial activation in rat models of neuropathic and osteoarthritic pain: an autoradiographic study using [3H]PK11195. *Eur. J. Pain* 17, 692–703. doi: 10.1002/j.1532-2149.2012.00232.x

Moynagh, P. N., Bailey, C. J., Boyce, S. J., and Williams, D. C. (1991). Immunological studies on the rat peripheral-type benzodiazepine acceptor. *Biochem. J.* 275(Pt. 2), 419–425.

Nguyen, N., Fakra, E., Pradel, V., Jouve, E., Alquier, C., Le Guern, M. E., et al. (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. doi: 10.1002/hup.814

Papadopoulos, V., Berkovich, A., Krueger, K. E., Costa, E., and 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. doi: 10.1210/endo-129-3-1481

Park, C. H., Carboni, E., Wood, P. L., and Gee, K. W. (1996). Characterization of peripheral benzodiazepine type sites in a cultured murine BV-2 microglial cell line. *Glia* 16, 65–70. doi: 10.1002/(sici)1098-1136(199601)16:1<65::aid-glia7>3.0.co;2-a

Pathirathna, S., Brimelow, B. C., Jagodic, M. M., Krishnan, K., Jiang, X., Zorumski, C. F., et al. (2005). New evidence that both T-type calcium channels and GABAA channels are responsible for the potent peripheral analgesic effects of 5alpha-reduced neuroactive steroids. *Pain* 114, 429–443. doi: 10.1016/j.pain.2005.01.009

Patte-Mensah, C., Kibaly, C., and 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. doi: 10.1073/pnas.0502968102

Pednekar, J. R., and Mulgaonker, V. K. (1995). Role of testosterone on pain threshold in rats. *Indian J. Physiol. Pharmacol.* 39, 423–424.

Poisbeau, P., Feltz, P., and Schlichter, R. (1997). Modulation of GABAA receptor-mediated IPSCs by neuroactive steroids in a rat hypothalamo-hypophyseal coculture model. *J. Physiol.* 500(Pt. 2), 475–485.

Poisbeau, P., Patte-Mensah, C., Keller, A. F., Barrot, M., Breton, J. D., Luis-Delgado, O. E., et al. (2005). Inflammatory pain upregulates spinal inhibition via endogenous neurosteroid production. *J. Neurosci.* 25, 11768–11776. doi: 10.1523/jneurosci.3841-05.2005

Roglio, I., Bianchi, R., Gotti, S., Scurati, S., Giatti, S., Pesaresi, M., et al. (2008). Neuroprotective effects of dihydroprogesterone and progesterone in an experimental model of nerve crush injury. *Neuroscience* 155, 673–685. doi: 10.1016/j.neuroscience.2008.06.034

Rupprecht, R., Rammes, G., Eser, D., Baghai, T. C., Schüle, C., Nothdurfter, C., et al. (2009). Translocator protein (18 kD) as target for anxiolytics without benzodiazepine-like side effects. *Science* 325, 490–493. doi: 10.1126/science.1175055

Rupprecht, R., Papadopoulos, V., Rammes, G., Baghai, T. C., Fan, J., Akula, N., et al. (2010). Translocator protein (18 kDa) (TSPO) as a therapeutic target for neurological and psychiatric disorders. *Nat. Rev. Drug Discov.* 9, 971–988. doi: 10.1038/nrd3295

Schlichter, R., Keller, A. F., De Roo, M., Breton, J. D., Inquimbert, P., and Poisbeau, P. (2006). Fast nongenomic effects of steroids on synaptic transmission and role of endogenous neurosteroids in spinal pain pathways. *J. Mol. Neurosci.* 28, 33–51. doi: 10.1385/jmn:28:1:33

Schlichter, R., Rybalchenko, V., Poisbeau, P., Verleye, M., and Gillardin, J. (2000). Modulation of GABAergic synaptic transmission by the non-benzodiazepine anxiolytic etifoxine. *Neuropharmacology* 39, 1523–1535. doi: 10.1016/s0028-3908(99)00253-1

Schumacher, M., Weill-Engerer, S., Liere, P., Robert, F., Franklin, R. J., Garcia-Segura, L. M., et al. (2003). Steroid hormones and neurosteroids in normal and pathological aging of the nervous system. *Prog. Neurobiol.* 71, 3–29. doi: 10.1016/j.pneurobio.2003.09.004

Selye, H. (1941). Anaesthetic effects of steroid hormones. *Proc. Soc. Exp. Biol.* 46, 116–121. doi: 10.3181/00379727-46-11907

Servant, D., Graziani, P. L., Moyse, D., and Parquet, P. J. (1998). Treatment of adjustment disorder with anxiety: efficacy and tolerance of etifoxine in a double-blind controlled study. *Encephale* 24, 569–574.

Smith, S. S. (2001). Pre-menstrual steroids. *Cell. Mol. Life Sci.* 58, 1263–1275. doi: 10.1007/pl00000938

Smith, S. S. (2002). Withdrawal properties of a neuroactive steroid: implications for GABA(A) receptor gene regulation in the brain and anxiety behavior. *Steroids* 67, 519–528. doi: 10.1016/s0039-128x(01)00170-2

Tsuda, M., Inoue, K., and Salter, M. W. (2005). Neuropathic pain and spinal microglia: a big problem from molecules in "small" glia. *Trends Neurosci.* 28, 101–107. doi: 10.1016/j.tins.2004.12.002

Varga, B., Marko, K., Hadinger, N., Jelitai, M., Demeter, K., Tihanyi, K., et al. (2009). Translocator protein (TSPO 18kDa) is expressed by neural stem and neuronal precursor cells. *Neurosci. Lett.* 462, 257–262. doi: 10.1016/j.neulet.2009.06.051

Vergnano, A. M., Schlichter, R., and Poisbeau, P. (2007). PKC activation sets an upper limit to the functional plasticity of GABAergic transmission induced by endogenous neurosteroids. *Eur. J. Neurosci.* 26, 1173–1182. doi: 10.1111/j.1460-9568.2007.05746.x

Verleye, M., Akwa, Y., Liere, P., Ladurelle, N., Pianos, A., Eychenne, B., et al. (2005). The anxiolytic etifoxine activates the peripheral benzodiazepine receptor and

increases the neurosteroid levels in rat brain. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 82, 712–720. doi: 10.1016/j.pbb.2005.11.013

Verleye, M., Pansart, Y., and Gillardin, J. (2002). Effects of etifoxine on ligand binding to GABA(A) receptors in rodents. *Neurosci. Res.* 44, 167–172. doi: 10.1016/s0168-0102(02)00121-9

Verleye, M., Schlichter, R., and Gillardin, J. M. (1999). Interactions of etifoxine with the chloride channel coupled to the GABA(A) receptor complex. *Neuroreport* 10, 3207–3210. doi: 10.1097/00001756-199910190-00015

Wang, W., Wu, D. C., Chen, Y. H., He, W., and Yu, L. C. (2002). Antinociceptive effects of diazepam binding inhibitor in the central nervous system of rats. *Brain Res.* 956, 393–397. doi: 10.1016/s0006-8993(02)03613-2

Zeilhofer, H. U. (2009). Etifoxine (Stresam) for chemotherapy-induced pain? *Pain* 147, 9–10. doi: 10.1016/j.pain.2009.09.021

Conflict of Interest Statement: Pierrick Poisbeau is currently collaborating with Biocodex laboratories to decipher etifoxine action.

Received: 03 May 2014; accepted: 05 June 2014; published online: 17 June 2014.
Citation: Poisbeau P, Keller AF, Aouad M, Kamoun N, Groyer G and Schumacher M (2014) Analgesic strategies aimed at stimulating the endogenous production of allopregnanolone. Front. Cell. Neurosci. ***8****:174. doi: 10.3389/fncel.2014.00174*
This article was submitted to the journal Frontiers in Cellular Neuroscience.
Copyright © 2014 Poisbeau, Keller, Aouad, Kamoun, Groyer and Schumacher. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) or licensor are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

E. GLOSSAIRE

1 GLOSSAIRE

Affectif : qui concerne les états de plaisir ou de douleur (simples : affects, sensations ; ou complexes : émotions, passions, sentiments).

Algogène: qui provoque la douleur.

Allodynie: douleur causée par une stimulation qui n'est pas normalement douloureuse.

Analgésie: absence de douleur en réponse à un stimulus normalement douloureux.

Anesthésie: absence de toute modalité sensorielle.

Champ récepteur: territoire cutané susceptible de déterminer l'excitation de un récepteur.

Cognitif: qualifie les processus par lesquels un organisme acquiert des informations sur l'environnement et les élabore pour régler son comportement : perception, formation de concepts, raisonnement, langage, décision, pensée.

Comportement: ensemble des réactions objectivement observables.

Douleur: expérience sensorielle et émotionnelle désagréable, liée à une lésion tissulaire existante ou potentielle, ou écrite en termes évoquant une telle lésion.

Douleur chez l'animal: expérience sensorielle aversive, qu'évoque dans la conscience de l'animal le danger ou la menace à l'intégrité de ses tissues. Ce que changes la physiologie et le comportement de l'animal pour éviter ou réduire la lésion, en diminuant la probabilité de son occurrence et en promouvant la guérison.

Douleur centrale: douleur provenant ou causée par une lésion ou un dysfonctionnement du système nerveux central.

Douleur de neuropathie: douleur provenant ou causée par une lésion ou un dysfonctionnement situés au niveau du système nerveux central ou périphérique.

Douleur somatique: douleur provenant du corps, peau, os, muscles et tendons.

Douleur viscérale: douleur provenant des organes internes, cœur, poumons, foie, intestins, organes de la reproduction

Emotion: état affectif intense, caractérisé par une brusque perturbation physique et mentale où sont abolies, en présence de certaines excitations ou représentation très vives, les réactions appropriées d'adaptation à

l'événement.

Fibromyalgie: Syndrome associant des douleurs diffuses chroniques, mobiles avec enraidissement matinal et à prédominance axiale, touchant surtout les insertions tendineuses et les muscles.

Hyperalgésie: réponse douloureuse exagérée à un stimulus normalement douloureux.

Hyperalgésie primaire: se caractérise par un seuil à la douleur bas, sensibilité augmenté à la stimulation sus-seuil et douleur spontanée dans le site de la lésion.

Hyperalgésie secondaire: se caractérise par la présence d'hyperalgésie et allodynie dans une plus grande aire qui entoure le site de la lésion.

Hyperesthésie: sensibilité exagérée à une stimulation, à l'exception des sensations spécifiques.

Hyperpathie: syndrome douloureux caractérisé par une réaction anormalement douloureuse à un stimulus et dont le seuil est augmenté.

Hypoalgésie: réponse douloureuse diminuée à un stimulus normalement douloureux.

Myofascial: en rhumatologie point douloureux qui se rapporte à un muscle et à une aponévrose.

Neuropathie: perturbation de la fonction ou modification pathologique d'un nerf du système neveux périphérique. Au niveau d'un seul nerf = mononeuropathie, au niveau de plusieurs nerfs = mononeuropathie multiple, en cas d'atteinte diffuse ou bilatérale = polyneuropathie

Névralgie : douleur survenant dans un ou plusieurs territoires nerveux.

Névrite : inflammation d'un ou plusieurs nerfs.

Niveau de tolérance à la douleur: le niveau plus haut de douleur qu'un sujet est préparé à tolérer.

Nocicepteur: récepteur préférentiellement sensible à un stimulus capable de produire une lésion tissulaire ou que devient délétère s'il est prolongé.

Nociceptif, ive: se dit d'une excitation nerveuse qui provoque une sensation douloureuse, ou de la réaction provoquée par une telle excitation.

Nociception: sensibilité aux stimulations d'intensité élevée, susceptibles de menacer l'intégrité physique de l'organisme.

Plasticité: désigne des changements fonctionnels ou structuraux du système nerveux.

Récepteur: structure cellulaire spécialisée qui sert d'interface entre l'énergie physique du stimulus et le système sensoriel.

Sensibilité au changement: qualité d'un instrument d'évaluation dont le score, chez un sujet donné, varie nettement lorsque le phénomène mesuré change.

Sensibilisation: se caractérise par une sensibilité accrue des terminaisons nerveuses, due à la stimulation répétée. Elle se traduit par une baisse du seuil à la stimulation et réponse augmenté et prolongé à la stimulation après décharge.

Sensori-discriminatif: correspond au caractère qualitatif de la douleur (piqûre, brûlure, torsion) mais aussi à sa durée, son intensité et sa localisation.

Seuil douloureux: expérience douloureuse la plus faible qu'un sujet puisse identifier comme telle.

Souffrance: état de détresse sévère associée à des événements qui menacent l'intégrité de la personne ou considéré comme tels. Il peut être ou non associe à la douleur.

Validation: processus général d'étude des différentes qualités métrologiques d'un instrument : validité, fidélité, sensibilité au changement. Le processus de validation aboutit à décréter qu'un instrument est validé ou non.

Validé (instrument): se dit d'un instrument dont a vérifié les trois qualités métrologiques (validité, fidélité, sensibilité au changement)

F. References bibliographiques

Aguilar, Maria A, Marta Rodríguez-Arias, and Jose Miñarro. 2009. "Neurobiological Mechanisms of the Reinstatement of Drug-Conditioned Place Preference." *Brain research reviews* 59(2): 253–77. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18762212 (March 2, 2016).

Ahlgren, S C, and J D Levine. 1994. "Protein Kinase C Inhibitors Decrease Hyperalgesia and C-Fiber Hyperexcitability in the Streptozotocin-Diabetic Rat." *Journal of neurophysiology* 72(2): 684–92. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7983528 (February 15, 2016).

Ahlgren, S C, D M White, and J D Levine. 1992. "Increased Responsiveness of Sensory Neurons in the Saphenous Nerve of the Streptozotocin-Diabetic Rat." *Journal of neurophysiology* 68(6): 2077–85. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1491258 (February 15, 2016).

Alexandre, Chloé et al. 2006. "Early Life Blockade of 5-Hydroxytryptamine 1A Receptors Normalizes Sleep and Depression-like Behavior in Adult Knock-out Mice Lacking the Serotonin Transporter." *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 26(20): 5554–64. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16707806 (February 21, 2016).

Alheid, GF, J De Olmos, and CA Beltramino. 1995. "Amygdala and Extended Amygdala." In *The Rat Nervous System*, eds. G Paxinos and FL Orlando. San Diego, CA: Academic Press, 495–578.

Allen, G V, C B Saper, K M Hurley, and D F Cechetto. 1991. "Organization of Visceral and Limbic Connections in the Insular Cortex of the Rat." *The Journal of comparative neurology* 311(1): 1–16. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1719041 (January 28, 2016).

Alvarez, Ruben P et al. 2008. "Contextual Fear Conditioning in Humans: Cortical-Hippocampal and Amygdala Contributions." *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 28(24): 6211–19. http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2475649&tool=pmcentrez&rendertype=abstract (February 17, 2016).

Anand, K J S, and Kenneth D Craigb. 1996. "Editorial New Perspectives on the Definition of Pain." 67: 3–6.

Anthony, J P, T J Sexton, and J F Neumaier. 2000. "Antidepressant-Induced Regulation of 5-HT(1b) mRNA in Rat Dorsal Raphe Nucleus Reverses Rapidly after Drug Discontinuation." *Journal of neuroscience research* 61(1): 82–87. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10861803 (February 21, 2016).

Aouad, M, N Petit-Demoulière, Y Goumon, and P Poisbeau. 2014. "Etifoxine Stimulates Allopregnanolone Synthesis in the Spinal Cord to Produce Analgesia in Experimental Mononeuropathy." *European journal of pain (London, England)* 18(2): 258–68. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23881562.

Aouad, Maya et al. 2014. "Etifoxine Analgesia in Experimental Monoarthritis: A Combined Action That Protects Spinal Inhibition and Limits Central Inflammatory Processes." *Pain* 155(2): 403–12. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24239672.

Aouad, Maya, Alexandre Charlet, Jean-Luc Rodeau, and Pierrick Poisbeau. 2009. "Reduction and Prevention of Vincristine-Induced Neuropathic Pain Symptoms by the Non-Benzodiazepine Anxiolytic Etifoxine Are Mediated by 3alpha-Reduced Neurosteroids." *Pain* 147(1-3): 54–59. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19786322.

Arango, V et al. 2001. "Serotonin 1A Receptors, Serotonin Transporter Binding and Serotonin Transporter mRNA Expression in the Brainstem of Depressed Suicide

Victims." *Neuropsychopharmacology : official publication of the American College of Neuropsychopharmacology* 25(6): 892–903. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11750182 (February 21, 2016).

Arborelius, L et al. 1996. "The 5-HT1A Receptor Antagonist (S)-UH-301 Augments the Increase in Extracellular Concentrations of 5-HT in the Frontal Cortex Produced by Both Acute and Chronic Treatment with Citalopram." *Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology* 353(6): 630–40. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8738296 (February 21, 2016).

Artigas, F, L Romero, C de Montigny, and P Blier. 1996. "Acceleration of the Effect of Selected Antidepressant Drugs in Major Depression by 5-HT1A Antagonists." *Trends in neurosciences* 19(9): 378–83. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8873352 (February 29, 2016).

Attal, N et al. 2008. "Neuropathic Pain: Are There Distinct Subtypes Depending on the Aetiology or Anatomical Lesion?" *Pain* 138(2): 343–53. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18289791 (March 4, 2016).

Attal, Nadine et al. 2011. "The Specific Disease Burden of Neuropathic Pain: Results of a French Nationwide Survey." *Pain* 152(12): 2836–43. http://dx.doi.org/10.1016/j.pain.2011.09.014.

Audinot, Valérie et al. 2003. "New Selective Ligands of Human Cloned Melatonin MT1 and MT2 Receptors." *Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology* 367(6): 553–61. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12764576 (February 21, 2016).

Austin, M C et al. 2002. "Localized Decrease in Serotonin Transporter-Immunoreactive Axons in the Prefrontal Cortex of Depressed Subjects Committing Suicide." *Neuroscience* 114(3): 807–15. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12220580 (February 29, 2016).

Authier, N et al. 2000. "Description of a Short-Term Taxol-Induced Nociceptive Neuropathy in Rats." *Brain research* 887(2): 239–49. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11134612 (March 2, 2016).

Authier, Nicolas et al. 2003. "A New Animal Model of Vincristine-Induced Nociceptive Peripheral Neuropathy." *Neurotoxicology* 24(6): 797–805. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14637374 (March 2, 2016).

Backonja, Misha-Miroslav, and Brett Stacey. 2004. "Neuropathic Pain Symptoms Relative to Overall Pain Rating." *The journal of pain : official journal of the American Pain Society* 5(9): 491–97. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15556827 (February 28, 2016).

Bair, M J, R L Robinson, Wayne K, and K Kroenke. 2003. "Depression and Pain Comorbidity: A Literature Review." *Archives of Internal Medicine* 163: 2433–45.

Bannerman, D M et al. 2002. "Double Dissociation of Function within the Hippocampus: Spatial Memory and Hyponeophagia." *Behavioral neuroscience* 116(5): 884–901. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12369808 (February 28, 2016).

———. 2003. "Ventral Hippocampal Lesions Affect Anxiety but Not Spatial Learning." *Behavioural brain research* 139(1-2): 197–213. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12642189 (February 17, 2016).

Barbaccia, M L et al. 2002. "GABA(B) Receptor-Mediated Increase of Neurosteroids by Gamma-Hydroxybutyric Acid." *Neuropharmacology* 42(6): 782–91. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12015204 (March 1, 2016).

Barbaccia, Maria Luisa. 2004. "Neurosteroidogenesis: Relevance to Neurosteroid Actions in Brain and Modulation by Psychotropic Drugs." *Critical reviews in neurobiology* 16(1-2): 67–74. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15581401 (March 1, 2016).

Baron, Ralf, Andreas Binder, and Gunnar Wasner. 2010. "Neuropathic Pain: Diagnosis, Pathophysiological Mechanisms, and Treatment." *The Lancet. Neurology* 9(8): 807–19. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20650402 (November 10, 2015).

Barrientos, Sebastian A et al. 2011. "Axonal Degeneration Is Mediated by the Mitochondrial Permeability Transition Pore." *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 31(3): 966–78. http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3245862&tool=pmcentrez&rendertype=abstract (January 19, 2016).

Le Bars, D, M Gozariu, and S W Cadden. 2001. "Animal Models of Nociception." *Pharmacological reviews* 53(4): 597–652. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11734620 (February 28, 2016).

Basbaum, Allan I., Diana M. Bautista, Grégory Scherrer, and David Julius. 2009. "Cellular and Molecular Mechanisms of Pain." *Cell* 139(2): 267–84.

Beaudry, Francis, Christiane Girard, and Pascal Vachon. 2007. "Early Dexamethasone Treatment after Implantation of a Sciatic-Nerve Cuff Decreases the Concentration of Substance P in the Lumbar Spinal Cord of Rats with Neuropathic Pain." *Canadian Journal of Veterinary Research* 71(2): 90–97.

Beekman, A T et al. 2000. "Anxiety and Depression in Later Life: Co-Occurrence and Communality of Risk Factors." *The American journal of psychiatry* 157(1): 89–95. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10618018 (February 17, 2016).

Behbehani, M M. 1995. "Functional Characteristics of the Midbrain Periaqueductal Gray." *Progress in neurobiology* 46(6): 575–605.

Belzung, Catherine, and Maël Lemoine. 2011. "Criteria of Validity for Animal Models of Psychiatric Disorders: Focus on Anxiety Disorders and Depression." *Biology of mood & anxiety disorders* 1(1): 9. http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3384226&tool=pmcentrez&rendertype=abstract (February 26, 2016).

Benbouzid, Malika et al. 2008. "Sciatic Nerve Cuffing in Mice: A Model of Sustained Neuropathic Pain." *European journal of pain (London, England)* 12(5): 591–99. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18006342.

Benca, Ruth M, and Michael J Peterson. 2008. "Insomnia and Depression." *Sleep medicine* 9 Suppl 1: S3–9. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18929317 (February 21, 2016).

Bennett, G J, and Y K Xie. 1988. "A Peripheral Mononeuropathy in Rat That Produces Disorders of Pain Sensation like Those Seen in Man." *Pain* 33(1): 87–107. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2837713 (January 21, 2016).

De Berardis, D et al. "The Effect of Newer Serotonin-Noradrenalin Antidepressants on Cytokine Production: A Review of the Current Literature." *International journal of immunopathology and pharmacology* 23(2): 417–22. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20646337 (March 2, 2016).

Berger, Julie V et al. 2011. "Cellular and Molecular Insights into Neuropathy-Induced Pain Hypersensitivity for Mechanism-Based Treatment Approaches." *Brain research reviews* 67(1-2): 282–310. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21440003 (February 13, 2016).

Berman, D, and B E Rodin. 1982. "The Influence of Housing Condition on Autotomy Following Dorsal Rhizotomy in Rats." *Pain* 13(3): 307–11. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6889723 (February 28, 2016).

Bernard, J F, M Alden, and J M Besson. 1993. "The Organization of the Efferent Projections from the Pontine Parabrachial Area to the Amygdaloid Complex: A Phaseolus

Vulgaris Leucoagglutinin (PHA-L) Study in the Rat." *The Journal of comparative neurology* 329(2): 201–29.
Bernard, J F, M Peschanski, and J M Besson. 1989. "A Possible Spino (trigemino)-Ponto-Amygdaloid Pathway for Pain." *Neuroscience letters* 100(1-3): 83–88.
Bernardi, Paolo et al. 2006. "The Mitochondrial Permeability Transition from in Vitro Artifact to Disease Target." *The FEBS journal* 273(10): 2077–99. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16649987 (March 2, 2016).
Bertaina-Anglade, Valérie, Christophe Drieu la Rochelle, Pierre-Alain Boyer, and Elisabeth Mocaër. 2006. "Antidepressant-like Effects of Agomelatine (S 20098) in the Learned Helplessness Model." *Behavioural pharmacology* 17(8): 703–13. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17110796 (February 21, 2016).
Berton, Olivier, and Eric J Nestler. 2006. "New Approaches to Antidepressant Drug Discovery: Beyond Monoamines." *Nature reviews. Neuroscience* 7(2): 137–51.
Bessa, J M et al. 2008. "The Mood-Improving Actions of Antidepressants Do Not Depend on Neurogenesis but Are Associated with Neuronal Remodeling." *Molecular Psychiatry* 14(8): 764–73. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18982002 (January 19, 2016).
Biggio, Giovanni et al. 2007. "Stress, Ethanol, and Neuroactive Steroids." *Pharmacology & therapeutics* 116(1): 140–71. http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3000046&tool=pmcentrez&rendertype=abstract (March 1, 2016).
Bishop, Sonia J. 2007. "Neurocognitive Mechanisms of Anxiety: An Integrative Account." *Trends in cognitive sciences* 11(7): 307–16. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17553730 (March 2, 2016).
Bitran, D, M Shiekh, and M McLeod. 1995. "Anxiolytic Effect of Progesterone Is Mediated by the Neurosteroid Allopregnanolone at Brain GABAA Receptors." *Journal of neuroendocrinology* 7(3): 171–77. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7606242 (March 1, 2016).
Black, J A et al. 1999. "Upregulation of a Silent Sodium Channel after Peripheral, but Not Central, Nerve Injury in DRG Neurons." *Journal of neurophysiology* 82(5): 2776–85. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10561444 (February 15, 2016).
Blair, Karina et al. 2008. "Response to Emotional Expressions in Generalized Social Phobia and Generalized Anxiety Disorder: Evidence for Separate Disorders." *The American journal of psychiatry* 165(9): 1193–1202. http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2855133&tool=pmcentrez&rendertype=abstract (February 17, 2016).
de Bodinat, Christian et al. 2010. "Agomelatine, the First Melatonergic Antidepressant: Discovery, Characterization and Development." *Nature reviews. Drug discovery* 9(8): 628–42. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20577266 (January 14, 2016).
Boldrini, Maura et al. 2009. "Antidepressants Increase Neural Progenitor Cells in the Human Hippocampus." *Neuropsychopharmacology* 34(11): 2376–89. http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2743790&tool=pmcentrez&rendertype=abstract (November 24, 2015).
Boldrini, Maura, Mark D Underwood, J John Mann, and Victoria Arango. 2008. "Serotonin-1A Autoreceptor Binding in the Dorsal Raphe Nucleus of Depressed Suicides." *Journal of psychiatric research* 42(6): 433–42. http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2268626&tool=pmcentrez&rendertype=abstract (February 21, 2016).
Bordet, Thierry et al. 2007. "Identification and Characterization of Cholest-4-En-3-One,

Oxime (TRO19622), a Novel Drug Candidate for Amyotrophic Lateral Sclerosis." *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* 322(2): 709–20. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17496168 (March 2, 2016).

Bordi, F, and J E LeDoux. 1994. "Response Properties of Single Units in Areas of Rat Auditory Thalamus That Project to the Amygdala. II. Cells Receiving Convergent Auditory and Somatosensory Inputs and Cells Antidromically Activated by Amygdala Stimulation." *Experimental brain research. Experimentelle Hirnforschung. Expérimentation cérébrale* 98(2): 275–86.

Bouhassira, Didier et al. 2005. "Comparison of Pain Syndromes Associated with Nervous or Somatic Lesions and Development of a New Neuropathic Pain Diagnostic Questionnaire (DN4)." *Pain* 114(1-2): 29–36. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15733628 (January 14, 2016).

———. 2008. "Prevalence of Chronic Pain with Neuropathic Characteristics in the General Population." *Pain* 136(3): 380–87. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17888574 (January 24, 2016).

BOUREAU, Francois, Philippe DUPAIN, and Marie-Claire GAY. 2000. "Le modèle multidimensionnel biopsychosocial de la douleur chronique : Douleurs et souffrances." *Champ psychosomatique* (19): 13–23. http://cat.inist.fr/?aModele=afficheN&cpsidt=1480266 (February 14, 2016).

Bouwknecht, J A et al. 2001. "Absence of 5-HT(1B) Receptors Is Associated with Impaired Impulse Control in Male 5-HT(1B) Knockout Mice." *Biological psychiatry* 49(7): 557–68. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11297712 (February 21, 2016).

Bowley, Michael P, Wayne C Drevets, Dost Ongür, and Joseph L Price. 2002. "Low Glial Numbers in the Amygdala in Major Depressive Disorder." *Biological psychiatry* 52(5): 404–12. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12242056 (February 28, 2016).

Brambilla, Paolo et al. 2002. "Anatomical MRI Study of Subgenual Prefrontal Cortex in Bipolar and Unipolar Subjects." *Neuropsychopharmacology : official publication of the American College of Neuropsychopharmacology* 27(5): 792–99. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12431853 (February 17, 2016).

Bridges, D, S W Thompson, and A S Rice. 2001. "Mechanisms of Neuropathic Pain." *British journal of anaesthesia* 87(1): 12–26. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11460801 (February 15, 2016).

Britton, Jennifer C et al. 2006. "Neural Correlates of Social and Nonsocial Emotions: An fMRI Study." *NeuroImage* 31(1): 397–409. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16414281 (February 17, 2016).

Brown, T A et al. 2001. "Current and Lifetime Comorbidity of the DSM-IV Anxiety and Mood Disorders in a Large Clinical Sample." *Journal of abnormal psychology* 110(4): 585–99. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11727948 (February 17, 2016).

Burgess, Shannon E et al. 2002. "Time-Dependent Descending Facilitation from the Rostral Ventromedial Medulla Maintains, but Does Not Initiate, Neuropathic Pain." *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 22(12): 5129–36. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12077208 (March 2, 2016).

Callahan, Brandy L, Alexis S C Gil, Audrey Levesque, and Jeffrey S Mogil. 2008. "Modulation of Mechanical and Thermal Nociceptive Sensitivity in the Laboratory Mouse by Behavioral State." *The journal of pain : official journal of the American Pain Society* 9(2): 174–84. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18088557 (February 28, 2016).

Calvino, B. 2006. "[Neural Basis of Pain]." *Psychol Neuropsychiatr Vieil* 4(1): 7–20. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16556514.

Canteras, N S, and L W Swanson. 1992. "Projections of the Ventral Subiculum to the Amygdala, Septum, and Hypothalamus: A PHAL Anterograde Tract-Tracing Study in the Rat." *The Journal of comparative neurology* 324(2): 180–94.

Cantí, C et al. 2005. "The Metal-Ion-Dependent Adhesion Site in the Von Willebrand Factor-A Domain of alpha2delta Subunits Is Key to Trafficking Voltage-Gated Ca2+ Channels." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102(32): 11230–35. http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1183569&tool=pmcentrez&rendertype=abstract (February 15, 2016).

Cardinali, Daniel P et al. 2011. "Disrupted Chronobiology of Sleep and Cytoprotection in Obesity: Possible Therapeutic Value of Melatonin." *Neuro endocrinology letters* 32(5): 588–606. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22167135 (February 21, 2016).

Carney, Regina M, and Richard C Shelton. 2011. "Agomelatine for the Treatment of Major Depressive Disorder." *Expert opinion on pharmacotherapy* 12(15): 2411–19. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21916789 (February 21, 2016).

Carr, G D, A G Phillips, and H C Fibiger. 1988. "Independence of Amphetamine Reward from Locomotor Stimulation Demonstrated by Conditioned Place Preference." *Psychopharmacology* 94(2): 221–26. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3127848 (March 4, 2016).

Cassell, M D, L J Freedman, and C Shi. 1999. "The Intrinsic Organization of the Central Extended Amygdala." *Annals of the New York Academy of Sciences* 877: 217–41.

Cerdá, M, A Sagdeo, J Johnson, and S Galea. 2010. "Genetic and Environmental Influences on Psychiatric Comorbidity: A Systematic Review." *Journal of affective disorders* 126(1-2): 14–38. http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2888715&tool=pmcentrez&rendertype=abstract (February 17, 2016).

Chaplan, S R et al. 1994. "Quantitative Assessment of Tactile Allodynia in the Rat Paw." *Journal of neuroscience methods* 53(1): 55–63.

Charlet, Alexandre, François Lasbennes, Pascal Darbon, and Pierrick Poisbeau. 2008. "Fast Non-Genomic Effects of Progesterone-Derived Neurosteroids on Nociceptive Thresholds and Pain Symptoms." *Pain* 139(3): 603–9. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18614289 (March 2, 2016).

Chi, Xian Xuan, Xin Jiang, and G D Nicol. 2007. "ATP-Sensitive Potassium Currents Reduce the PGE2-Mediated Enhancement of Excitability in Adult Rat Sensory Neurons." *Brain research* 1145: 28–40. http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1890028&tool=pmcentrez&rendertype=abstract (February 15, 2016).

Chung, L, and S D Moore. 2009. "Neuropeptides Modulate Compound Postsynaptic Potentials in Basolateral Amygdala." *Neuroscience* 164(4): 1389–97. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19786076 (February 28, 2016).

Coggeshall, R E, and S M Carlton. 1997. "Receptor Localization in the Mammalian Dorsal Horn and Primary Afferent Neurons." *Brain research. Brain research reviews* 24(1): 28–66. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9233541 (February 13, 2016).

Cole, Michael W, Nick Yeung, Winrich A Freiwald, and Matthew Botvinick. 2009. "Cingulate Cortex: Diverging Data from Humans and Monkeys." *Trends in neurosciences* 32(11): 566–74. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19781794

(February 17, 2016).
Conner, J M et al. 1997. "Distribution of Brain-Derived Neurotrophic Factor (BDNF) Protein and mRNA in the Normal Adult Rat CNS: Evidence for Anterograde Axonal Transport." *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 17(7): 2295–2313. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9065491 (December 13, 2015).
Cory, A H, D H Hickerson, and J G Cory. "Apoptosis Induced by Inhibitors of Nucleotide Synthesis in Deoxyadenosine-Resistant Leukemia L1210 Cells That Lack p53 Expression." *Anticancer research* 20(6B): 4171–78. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11205244 (February 15, 2016).
Costall, B, M E Kelly, R J Naylor, and E S Onaivi. 1988. "Actions of Buspirone in a Putative Model of Anxiety in the Mouse." *The Journal of pharmacy and pharmacology* 40(7): 494–500. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2904990 (February 21, 2016).
Costigan, Michael, Joachim Scholz, and Clifford J Woolf. 2009. "Neuropathic Pain: A Maladaptive Response of the Nervous System to Damage." *Annual review of neuroscience* 32: 1–32. http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2768555&tool=pmcentrez&rendertype=abstract (September 7, 2015).
Cotter, D et al. 2001. "Reduced Glial Cell Density and Neuronal Size in the Anterior Cingulate Cortex in Major Depressive Disorder." *Archives of general psychiatry* 58(6): 545–53. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11386983 (February 17, 2016).
Courteix, C, A Eschalier, and J Lavarenne. 1993. "Streptozocin-Induced Diabetic Rats: Behavioural Evidence for a Model of Chronic Pain." *Pain* 53(1): 81–88. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8316394 (February 15, 2016).
Cox, James J et al. 2006. "An SCN9A Channelopathy Causes Congenital Inability to Experience Pain." *Nature* 444(7121): 894–98. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17167479 (December 6, 2015).
Crabbe, John C, and Richard G M Morris. 2004. "Festina Lente: Late-Night Thoughts on High-Throughput Screening of Mouse Behavior." *Nature neuroscience* 7(11): 1175–79. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15508013 (March 2, 2016).
Craft, Rebecca M. 2003. "Sex Differences in Drug- and Non-Drug-Induced Analgesia." *Life sciences* 72(24): 2675–88. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12679185 (February 28, 2016).
Craig, A D Bud. 2003. "Pain Mechanisms: Labeled Lines versus Convergence in Central Processing." *Annual review of neuroscience* 26: 1–30. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12651967 (December 14, 2015).
Cremers, T I et al. 2000. "Augmentation with a 5-HT(1A), but Not a 5-HT(1B) Receptor Antagonist Critically Depends on the Dose of Citalopram." *European journal of pharmacology* 397(1): 63–74. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10844100 (February 21, 2016).
Cryan, John F, and Andrew Holmes. 2005. "The Ascent of Mouse: Advances in Modelling Human Depression and Anxiety." *Nature reviews. Drug discovery* 4(9): 775–90.
Daftary, S S, G Calderon, and M Rios. 2012. "Essential Role of Brain-Derived Neurotrophic Factor in the Regulation of Serotonin Transmission in the Basolateral Amygdala." *Neuroscience* 224: 125–34. http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3475413&tool=pmcentrez&rendertype=abstract (February 14, 2016).
Dahlström, A, and K Fuxe. 1964. "Localization of Monoamines in the Lower Brain Stem."

Experientia 20(7): 398–99. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/5856530 (February 17, 2016).

Davis, M, D Rainnie, and M Cassell. 1994. "Neurotransmission in the Rat Amygdala Related to Fear and Anxiety." *Trends in neurosciences* 17(5): 208–14.

Dawson, L A, H Q Nguyen, D L Smith, and L E Schechter. 2002. "Effect of Chronic Fluoxetine and WAY-100635 Treatment on Serotonergic Neurotransmission in the Frontal Cortex." *Journal of psychopharmacology (Oxford, England)* 16(2): 145–52. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12095073 (February 21, 2016).

Decosterd, I, and C J Woolf. 2000. "Spared Nerve Injury: An Animal Model of Persistent Peripheral Neuropathic Pain." *Pain* 87(2): 149–58. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10924808 (November 15, 2015).

Dedovic, Katarina et al. 2009. "The Brain and the Stress Axis: The Neural Correlates of Cortisol Regulation in Response to Stress." *NeuroImage* 47(3): 864–71. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19500680 (October 10, 2015).

Defrin, R, A Ohry, N Blumen, and G Urca. 2001. "Characterization of Chronic Pain and Somatosensory Function in Spinal Cord Injury Subjects." *Pain* 89(2-3): 253–63. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11166482 (March 2, 2016).

Delaney, A J, and P Sah. 1999. "GABA Receptors Inhibited by Benzodiazepines Mediate Fast Inhibitory Transmission in the Central Amygdala." *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 19(22): 9698–9704. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10559379 (February 14, 2016).

Demertzis, Kristen Hope, and Michelle G Craske. 2006. "Anxiety in Primary Care." *Current psychiatry reports* 8(4): 291–97. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16879793 (February 17, 2016).

Derchansky, M et al. 2008. "Transition to Seizures in the Isolated Immature Mouse Hippocampus: A Switch from Dominant Phasic Inhibition to Dominant Phasic Excitation." *The Journal of physiology* 586(2): 477–94. http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2375580&tool=pmcentrez&rendertype=abstract (February 14, 2016).

Dersh, Jeffrey, Peter B Polatin, and Robert J Gatchel. 2002. "Chronic Pain and Psychopathology: Research Findings and Theoretical Considerations." *Psychosomatic medicine* 64(5): 773–86.

Devor, M, P D Wall, and N Catalan. 1992. "Systemic Lidocaine Silences Ectopic Neuroma and DRG Discharge without Blocking Nerve Conduction." *Pain* 48(2): 261–68. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1589245 (February 15, 2016).

Dityatev, Alexander E, and Vadim Y Bolshakov. 2005. "Amygdala, Long-Term Potentiation, and Fear Conditioning." *The Neuroscientist : a review journal bringing neurobiology, neurology and psychiatry* 11(1): 75–88. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15632280 (February 14, 2016).

Dong, H W, G D Petrovich, and L W Swanson. 2001. "Topography of Projections from Amygdala to Bed Nuclei of the Stria Terminalis." *Brain research. Brain research reviews* 38(1-2): 192–246.

Dong, X-W et al. 2007. "Small Interfering RNA-Mediated Selective Knockdown of Na(V)1.8 Tetrodotoxin-Resistant Sodium Channel Reverses Mechanical Allodynia in Neuropathic Rats." *Neuroscience* 146(2): 812–21. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17367951 (January 21, 2016).

Drevets, Wayne C et al. 2007. "Serotonin-1A Receptor Imaging in Recurrent Depression: Replication and Literature Review." *Nuclear medicine and biology* 34(7): 865–77. http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2702715&tool=pmcen

trez&rendertype=abstract (February 21, 2016).
Dubrovsky, Bernardo. 2006. "Neurosteroids, Neuroactive Steroids, and Symptoms of Affective Disorders." *Pharmacology, biochemistry, and behavior* 84(4): 644–55. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16962651 (March 1, 2016).
Dutar, P, and R A Nicoll. 1988. "Pre- and Postsynaptic GABAB Receptors in the Hippocampus Have Different Pharmacological Properties." *Neuron* 1(7): 585–91. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2856099 (February 14, 2016).
Earnheart, John C et al. 2007. "GABAergic Control of Adult Hippocampal Neurogenesis in Relation to Behavior Indicative of Trait Anxiety and Depression States." *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 27(14): 3845–54. https://www.researchgate.net/publication/6413207_GABAergic_Control_of_Adult_Hippocampal_Neurogenesis_in_Relation_to_Behavior_Indicative_of_Trait_Anxiety_and_Depression_States (February 17, 2016).
England, J D et al. 1996. "Sodium Channel Accumulation in Humans with Painful Neuromas." *Neurology* 47(1): 272–76. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8710095 (January 12, 2016).
Enna, S J, and Kenneth E McCarson. 2006. "The Role of GABA in the Mediation and Perception of Pain." *Advances in pharmacology (San Diego, Calif.)* 54: 1–27. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17175808 (March 2, 2016).
Esmaeili, Abolghasem, Joseph W Lynch, and Pankaj Sah. 2009. "GABAA Receptors Containing gamma1 Subunits Contribute to Inhibitory Transmission in the Central Amygdala." *Journal of neurophysiology* 101(1): 341–49. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19004994 (February 14, 2016).
Fanselow, Michael S, and Hong-Wei Dong. 2010. "Are the Dorsal and Ventral Hippocampus Functionally Distinct Structures?" *Neuron* 65(1): 7–19. http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2822727&tool=pmcentrez&rendertype=abstract (July 10, 2014).
Feighner, J P, and W F Boyer. 1989. "Serotonin-1A Anxiolytics: An Overview." *Psychopathology* 22 Suppl 1: 21–26. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2567039 (February 29, 2016).
Fertleman, Caroline R et al. 2006. "SCN9A Mutations in Paroxysmal Extreme Pain Disorder: Allelic Variants Underlie Distinct Channel Defects and Phenotypes." *Neuron* 52(5): 767–74. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17145499 (December 6, 2015).
Fiddick, Laurence. 2011. "There Is More than the Amygdala: Potential Threat Assessment in the Cingulate Cortex." *Neuroscience and biobehavioral reviews* 35(4): 1007–18. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20950644 (February 15, 2016).
Field, Mark J et al. 2006. "Identification of the alpha2-Delta-1 Subunit of Voltage-Dependent Calcium Channels as a Molecular Target for Pain Mediating the Analgesic Actions of Pregabalin." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103(46): 17537–42. http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1859964&tool=pmcentrez&rendertype=abstract (February 15, 2016).
Fillingim, Roger B et al. 2009. "Sex, Gender, and Pain: A Review of Recent Clinical and Experimental Findings." *The journal of pain : official journal of the American Pain Society* 10(5): 447–85. http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2677686&tool=pmcentrez&rendertype=abstract (July 14, 2015).

FitzGerald, Mary P. 2005. "Can Chronic Pelvic Pain in Men Be Treated with Myofascial Trigger Point Release and Paradoxical Relaxation Training?" *Nature clinical practice. Urology* 2(11): 534–35. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16474595 (February 14, 2016).

Flatters, S. J L, and Gary J. Bennett. 2006. "Studies of Peripheral Sensory Nerves in Paclitaxel-Induced Painful Peripheral Neuropathy: Evidence for Mitochondrial Dysfunction." *Pain* 122(3): 245–57.

Forman, L J, S Estilow, M Lewis, and P Vasilenko. 1986. "Streptozocin Diabetes Alters Immunoreactive Beta-Endorphin Levels and Pain Perception after 8 Wk in Female Rats." *Diabetes* 35(12): 1309–13. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2945745 (February 15, 2016).

Fox, R J, and C A Sorenson. 1994. "Bilateral Lesions of the Amygdala Attenuate Analgesia Induced by Diverse Environmental Challenges." *Brain research* 648(2): 215–21. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7922536 (February 27, 2016).

Frye, C A, and J E Duncan. 1994. "Progesterone Metabolites, Effective at the GABAA Receptor Complex, Attenuate Pain Sensitivity in Rats." *Brain research* 643(1-2): 194–203. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8032914 (March 2, 2016).

Furmark, Tomas et al. 2009. "Genotype over-Diagnosis in Amygdala Responsiveness: Affective Processing in Social Anxiety Disorder." *Journal of psychiatry & neuroscience : JPN* 34(1): 30–40. http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2612081&tool=pmcentrez&rendertype=abstract (February 17, 2016).

FUXE, K. 1965. "EVIDENCE FOR THE EXISTENCE OF MONOAMINE NEURONS IN THE CENTRAL NERVOUS SYSTEM. 3. THE MONOAMINE NERVE TERMINAL." *Zeitschrift für Zellforschung und mikroskopische Anatomie (Vienna, Austria : 1948)* 65: 573–96. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14263017 (February 17, 2016).

Gallagher, R M, P Moore, and I Chernoff. 1995. "The Reliability of Depression Diagnosis in Chronic Low Back Pain. A Pilot Study." *General hospital psychiatry* 17(6): 399–413. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8714800 (February 13, 2016).

Gambassi, G. 2009. "Pain and Depression: The Egg and the Chicken Story Revisited." *Archives of gerontology and geriatrics* 49 Suppl 1: 103–12. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19836622 (March 2, 2016).

Gammans, R E et al. 1992. "Use of Buspirone in Patients with Generalized Anxiety Disorder and Coexisting Depressive Symptoms. A Meta-Analysis of Eight Randomized, Controlled Studies." *Neuropsychobiology* 25(4): 193–201. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1454160 (March 1, 2016).

Gardier, A M et al. 1996. "Role of 5-HT1A Autoreceptors in the Mechanism of Action of Serotoninergic Antidepressant Drugs: Recent Findings from in Vivo Microdialysis Studies." *Fundamental & clinical pharmacology* 10(1): 16–27. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8900496 (February 29, 2016).

———. 2001. "[5-HT1B Serotonin Receptors and Antidepressant Effects of Selective Serotonin Reuptake Inhibitors]." *Comptes rendus de l'Académie des sciences. Série III, Sciences de la vie* 324(5): 433–41. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11417564 (February 28, 2016).

———. 2003. "Effects of Chronic Paroxetine Treatment on Dialysate Serotonin in 5-HT1B Receptor Knockout Mice." *Journal of neurochemistry* 86(1): 13–24. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12807420 (February 29, 2016).

Gauriau, Caroline, and Jean-François Bernard. 2002. "Pain Pathways and Parabrachial Circuits in the Rat." *Experimental physiology* 87(2): 251–58.

Gautron, M et al. 1990. "Alterations in Myelinated Fibres in the Sciatic Nerve of Rats after Constriction: Possible Relationships between the Presence of Abnormal Small Myelinated Fibres and Pain-Related Behaviour." *Neuroscience letters* 111(1-2): 28–33. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2336189 (February 15, 2016).

Gerner, R H, and T A Hare. 1981. "CSF GABA in Normal Subjects and Patients with Depression, Schizophrenia, Mania, and Anorexia Nervosa." *The American journal of psychiatry* 138(8): 1098–1101. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7258390 (February 17, 2016).

Giesbrecht, Chantelle J et al. 2010. "Countervailing Modulation of Ih by Neuropeptide Y and Corticotrophin-Releasing Factor in Basolateral Amygdala as a Possible Mechanism for Their Effects on Stress-Related Behaviors." *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 30(50): 16970–82. http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3432911&tool=pmcentrez&rendertype=abstract (February 14, 2016).

Gingrich, J A, and R Hen. 2001. "Dissecting the Role of the Serotonin System in Neuropsychiatric Disorders Using Knockout Mice." *Psychopharmacology* 155(1): 1–10. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11374326 (February 17, 2016).

Girard, Christelle et al. 2008. "Etifoxine Improves Peripheral Nerve Regeneration and Functional Recovery." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105(51): 20505–10. http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2629330&tool=pmcentrez&rendertype=abstract (March 1, 2016).

Girard, Philippe, Yannick Pansart, and Jean-Marie Gillardin. 2009. "Preventive and Curative Effects of Etifoxine in a Rat Model of Brain Oedema." *Clinical and experimental pharmacology & physiology* 36(7): 655–61. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19076164 (March 1, 2016).

Goettl, Virginia M, Yan Huang, Kevin V Hackshaw, and Robert L Stephens. 2002. "Reduced Basal Release of Serotonin from the Ventrobasal Thalamus of the Rat in a Model of Neuropathic Pain." *Pain* 99(1-2): 359–66. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12237215 (February 16, 2016).

Goff, J R, A R Burkey, D J Goff, and L Jasmin. 1998. "Reorganization of the Spinal Dorsal Horn in Models of Chronic Pain: Correlation with Behaviour." *Neuroscience* 82(2): 559–74. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9466461 (March 4, 2016).

Gonçalves, Leonor et al. 2008. "Neuropathic Pain Is Associated with Depressive Behaviour and Induces Neuroplasticity in the Amygdala of the Rat." *Experimental Neurology* 213(1): 48–56.

Gonçalves, Leonor, Armando Almeida, and Antti Pertovaara. 2007. "Pronociceptive Changes in Response Properties of Rostroventromedial Medullary Neurons in a Rat Model of Peripheral Neuropathy." *The European journal of neuroscience* 26(8): 2188–95. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17892482 (February 28, 2016).

Gonzalez, L E, N Andrews, and S E File. 1996. "5-HT1A and Benzodiazepine Receptors in the Basolateral Amygdala Modulate Anxiety in the Social Interaction Test, but Not in the Elevated plus-Maze." *Brain research* 732(1-2): 145–53. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8891278 (February 17, 2016).

Göthert, M, and E Schlicker. 1990. "Identification and Classification of 5-HT1 Receptor Subtypes." *Journal of cardiovascular pharmacology* 15 Suppl 7: S1–7. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1702482 (February 21, 2016).

Greenspan, Joel D et al. 2007. "Studying Sex and Gender Differences in Pain and Analgesia: A Consensus Report." *Pain* 132 Suppl : S26–45.

Groninger, E et al. 2002. “Vincristine Induced Apoptosis in Acute Lymphoblastic Leukaemia Cells: A Mitochondrial Controlled Pathway Regulated by Reactive Oxygen Species?” *International journal of oncology* 21(6): 1339–45. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12429986 (February 15, 2016).

Gross, Cornelius et al. 2002. “Serotonin1A Receptor Acts during Development to Establish Normal Anxiety-like Behaviour in the Adult.” *Nature* 416(6879): 396–400. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11919622 (February 21, 2016).

Grozdanovic, Z, and H G Baumgarten. 1996. “Colocalisation of NADPH-Diaphorase with Neuropeptides in the Ureterovesical Ganglia of Humans.” *Acta histochemica* 98(3): 245–53. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8863854 (February 29, 2016).

Gu, J G, C Albuquerque, C J Lee, and A B MacDermott. 1996. “Synaptic Strengthening through Activation of Ca2+-Permeable AMPA Receptors.” *Nature* 381(6585): 793–96. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8657283 (February 16, 2016).

Guelfi, J D. 1993. “[Comorbidity of Anxiety-Depression and Its Treatment].” *L’Encéphale* 19 Spec No: 397–404. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7904238 (February 17, 2016).

Guieu, R et al. 1996. “Adenosine and Neuropathic Pain.” *Pain* 68(2-3): 271–74. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9121814 (March 2, 2016).

Guilloux, Jean-Philippe et al. 2006. “Blockade of 5-HT1A Receptors by (+/-)-Pindolol Potentiates Cortical 5-HT Outflow, but Not Antidepressant-like Activity of Paroxetine: Microdialysis and Behavioral Approaches in 5-HT1A Receptor Knockout Mice.” *Neuropsychopharmacology : official publication of the American College of Neuropsychopharmacology* 31(10): 2162–72. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16452992 (February 21, 2016).

———. 2011. “Characterization of 5-HT(1A/1B)-/- Mice: An Animal Model Sensitive to Anxiolytic Treatments.” *Neuropharmacology* 61(3): 478–88. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21333660 (February 17, 2016).

Gustorff, B. et al. 2008. “Prevalence of Self-Reported Neuropathic Pain and Impact on Quality of Life: A Prospective Representative Survey.” *Acta Anaesthesiologica Scandinavica* 52(1): 132–36.

Haefely, W. 1984. “Benzodiazepine Interactions with GABA Receptors.” *Neuroscience letters* 47(3): 201–6. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6147796 (February 14, 2016).

Hamani, Clement et al. 2011. “The Subcallosal Cingulate Gyrus in the Context of Major Depression.” *Biological psychiatry* 69(4): 301–8. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21145043 (February 9, 2016).

Hamidi, Massihullah, Wayne C Drevets, and Joseph L Price. 2004. “Glial Reduction in Amygdala in Major Depressive Disorder Is due to Oligodendrocytes.” *Biological psychiatry* 55(6): 563–69. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15013824 (February 17, 2016).

HAMILTON, M. 1960. “A Rating Scale for Depression.” *Journal of neurology, neurosurgery, and psychiatry* 23: 56–62. http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=495331&tool=pmcentrez&rendertype=abstract (December 21, 2014).

Hamon, Alain et al. 2003a. “The Modulatory Effects of the Anxiolytic Etifoxine on GABA(A) Receptors Are Mediated by the Beta Subunit.” *Neuropharmacology* 45(3): 293–303. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12871647 (March 1, 2016).

———. 2003b. “The Modulatory Effects of the Anxiolytic Etifoxine on GABAA Receptors Are Mediated by the ?? Subunit.” *Neuropharmacology* 45(3): 293–303.

Hamon, M. 1995a. "[Is It Feasible to Develop a 5-HT Basis for the Treatment of Depression?]." *L'Encéphale* 21 Spec No: 27–32. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8808343 (February 17, 2016).

———. 1995b. "[New Perspectives in the Serotoninergic Treatment for Depression]." *Thérapie* 50(6): 505–9. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8745948 (March 4, 2016).

Hasanein, Parisa, Naser Mirazi, and Kazem Javanmardi. 2008. "GABAA Receptors in the Central Nucleus of Amygdala (CeA) Affect on Pain Modulation." *Brain research* 1241: 36–41. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18838064 (February 13, 2016).

Hasanein, Parisa, Mohsen Parviz, Mansoor Keshavarz, and Kazem Javanmardi. 2007. "CB1 Receptor Activation in the Basolateral Amygdala Produces Antinociception in Animal Models of Acute and Tonic Nociception." *Clinical and experimental pharmacology & physiology* 34(5-6): 439–49. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17439413 (February 14, 2016).

Hashioka, S. 2011. "Antidepressants and Neuroinflammation: Can Antidepressants Calm Glial Rage Down?" *Mini reviews in medicinal chemistry* 11(7): 555–64. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21699486 (March 2, 2016).

Hasnie, F S et al. 2007. "Mechanical and Cold Hypersensitivity in Nerve-Injured C57BL/6J Mice Is Not Associated with Fear-Avoidance- and Depression-Related Behaviour." *British journal of anaesthesia* 98(6): 816–22. http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2656645&tool=pmcentrez&rendertype=abstract.

Hathway, Gareth et al. 2006. "A Postnatal Switch in GABAergic Control of Spinal Cutaneous Reflexes." *The European journal of neuroscience* 23(1): 112–18. http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1885206&tool=pmcentrez&rendertype=abstract (February 14, 2016).

Heisler, L K et al. 1998. "Elevated Anxiety and Antidepressant-like Responses in Serotonin 5-HT1A Receptor Mutant Mice." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95(25): 15049–54. http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=24573&tool=pmcentrez&rendertype=abstract (February 21, 2016).

Heldt, Scott A, and Kerry J Ressler. 2007. "Training-Induced Changes in the Expression of GABAA-Associated Genes in the Amygdala after the Acquisition and Extinction of Pavlovian Fear." *The European journal of neuroscience* 26(12): 3631–44. http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2443698&tool=pmcentrez&rendertype=abstract (February 14, 2016).

Helmstetter, F J, S A Tershner, L H Poore, and P S Bellgowan. 1998. "Antinociception Following Opioid Stimulation of the Basolateral Amygdala Is Expressed through the Periaqueductal Gray and Rostral Ventromedial Medulla." *Brain research* 779(1-2): 104–18. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9473612 (February 13, 2016).

Hendrich, Jan et al. 2008. "Pharmacological Disruption of Calcium Channel Trafficking by the alpha2delta Ligand Gabapentin." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105(9): 3628–33. http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2265195&tool=pmcentrez&rendertype=abstract (February 15, 2016).

Herman, James P, Michelle M Ostrander, Nancy K Mueller, and Helmer Figueiredo. 2005. "Limbic System Mechanisms of Stress Regulation: Hypothalamo-Pituitary-Adrenocortical Axis." *Progress in neuro-psychopharmacology & biological psychiatry* 29(8): 1201–13. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16271821 (February 17,

2016).
Hill, R. 2000. "NK1 (substance P) Receptor Antagonists--Why Are They Not Analgesic in Humans?" *Trends in pharmacological sciences* 21(7): 244–46. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10871891 (February 28, 2016).
Hökfelt, T, X Zhang, and Z Wiesenfeld-Hallin. 1994. "Messenger Plasticity in Primary Sensory Neurons Following Axotomy and Its Functional Implications." *Trends in neurosciences* 17(1): 22–30. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7511846 (February 16, 2016).
Honoré, P et al. 2000. "Neurochemical Plasticity in Persistent Inflammatory Pain." *Progress in brain research* 129: 357–63. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11098703 (March 4, 2016).
Hoover, Walter B, and Robert P Vertes. 2007. "Anatomical Analysis of Afferent Projections to the Medial Prefrontal Cortex in the Rat." *Brain structure & function* 212(2): 149–79. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17717690 (February 28, 2016).
Hutchison, W D et al. 1999. "Pain-Related Neurons in the Human Cingulate Cortex." *Nature neuroscience* 2(5): 403–5. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10321241 (February 17, 2016).
Hylden, J L, and G L Wilcox. 1980. "Intrathecal Morphine in Mice: A New Technique." *European journal of pharmacology* 67(2-3): 313–16. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6893963 (March 1, 2016).
Ikeda, Hiroshi, Makoto Tsuda, Kazuhide Inoue, and Kazuyuki Murase. 2007. "Long-Term Potentiation of Neuronal Excitation by Neuron-Glia Interactions in the Rat Spinal Dorsal Horn." *The European journal of neuroscience* 25(5): 1297–1306. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17425556 (February 13, 2016).
Imbe, Hiroki, Yasutomo Iwai-Liao, and Emiko Senba. 2006. "Stress-Induced Hyperalgesia: Animal Models and Putative Mechanisms." *Frontiers in bioscience : a journal and virtual library* 11: 2179–92. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16720304 (January 18, 2016).
Jacobson, Laura H, Bernhard Bettler, Klemens Kaupmann, and John F Cryan. 2007. "Behavioral Evaluation of Mice Deficient in GABA(B(1)) Receptor Isoforms in Tests of Unconditioned Anxiety." *Psychopharmacology* 190(4): 541–53.
Jagodic, Miljen M et al. 2008. "Upregulation of the T-Type Calcium Current in Small Rat Sensory Neurons after Chronic Constrictive Injury of the Sciatic Nerve." *Journal of neurophysiology* 99(6): 3151–56. http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2667888&tool=pmcentrez&rendertype=abstract (February 15, 2016).
Jansson, A et al. 1998. "On the Relationship of 5-Hydroxytryptamine Neurons to 5-Hydroxytryptamine 2A Receptor-Immunoreactive Neuronal Processes in the Brain Stem of Rats. A Double Immunolabelling Analysis." *Neuroreport* 9(11): 2505–11. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9721923 (February 17, 2016).
Jeon, Daejong et al. 2010. "Observational Fear Learning Involves Affective Pain System and Cav1.2 Ca2+ Channels in ACC." *Nature neuroscience* 13(4): 482–88. http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2958925&tool=pmcentrez&rendertype=abstract (January 26, 2016).
Jevtovic-Todorovic, Vesna, and Slobodan M Todorovic. 2006. "The Role of Peripheral T-Type Calcium Channels in Pain Transmission." *Cell calcium* 40(2): 197–203. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16777222 (February 15, 2016).
Jiménez-Velázquez, Guadalupe, Francisco Javier López-Muñoz, and Alonso Fernández-Guasti. 2010. "Parallel Anxiolytic-like and Antinociceptive Actions of Diazepam in the

Anterior Basolateral Amygdala and Dorsal Periaqueductal Gray." *Brain research* 1349: 11–20. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20599842 (February 14, 2016).

Jin, Hai Wei et al. 2008. "Prevention of Paclitaxel-Evoked Painful Peripheral Neuropathy by Acetyl-L-Carnitine: Effects on Axonal Mitochondria, Sensory Nerve Fiber Terminal Arbors, and Cutaneous Langerhans Cells." *Experimental neurology* 210(1): 229–37. http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2323600&tool=pmcentrez&rendertype=abstract (January 18, 2016).

Johansen, J P, H L Fields, and B H Manning. 2001. "The Affective Component of Pain in Rodents: Direct Evidence for a Contribution of the Anterior Cingulate Cortex." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98(14): 8077–82. http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=35470&tool=pmcentrez&rendertype=abstract (January 19, 2016).

Jolkkonen, E, and A Pitkänen. 1998. "Intrinsic Connections of the Rat Amygdaloid Complex: Projections Originating in the Central Nucleus." *The Journal of comparative neurology* 395(1): 53–72.

Jongsma, Minke E et al. 2005. "The Effect of Chronic Selective Serotonin Reuptake Inhibitor Treatment on Serotonin 1B Receptor Sensitivity and HPA Axis Activity." *Progress in neuro-psychopharmacology & biological psychiatry* 29(5): 738–44. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15961207 (February 21, 2016).

Joseph, Elizabeth K, and Jon D Levine. 2004. "Caspase Signalling in Neuropathic and Inflammatory Pain in the Rat." *The European journal of neuroscience* 20(11): 2896–2902. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15579143 (February 15, 2016).

———. 2006. "Mitochondrial Electron Transport in Models of Neuropathic and Inflammatory Pain." *Pain* 121(1-2): 105–14. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16472913 (March 2, 2016).

———. 2009. "Comparison of Oxaliplatin- and Cisplatin-Induced Painful Peripheral Neuropathy in the Rat." *The journal of pain : official journal of the American Pain Society* 10(5): 534–41. http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2741410&tool=pmcentrez&rendertype=abstract (March 2, 2016).

Juif, P E, M Melchior, and P Poisbeau. 2015. "Characterization of the Fast GABAergic Inhibitory Action of Etifoxine during Spinal Nociceptive Processing in Male Rats." *Neuropharmacology* 91: 117–22. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25545681 (March 1, 2016).

Julius, D. 2001. "Molecular Mechanisms of Nociception ." *Nature* 413(September): 203–10.

Kajander, K C, and G J Bennett. 1992. "Onset of a Painful Peripheral Neuropathy in Rat: A Partial and Differential Deafferentation and Spontaneous Discharge in A Beta and A Delta Primary Afferent Neurons." *Journal of neurophysiology* 68(3): 734–44. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1331353 (February 15, 2016).

Kalivas, P W, B A Gau, C B Nemeroff, and A J Prange. 1982. "Antinociception after Microinjection of Neurotensin into the Central Amygdaloid Nucleus of the Rat." *Brain research* 243(2): 279–86. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7104740 (February 13, 2016).

Kauppila, T, V K Kontinen, and A Pertovaara. 1998. "Influence of Spinalization on Spinal Withdrawal Reflex Responses Varies Depending on the Submodality of the Test Stimulus and the Experimental Pathophysiological Condition in the Rat." *Brain*

research 797(2): 234–42. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9666138 (February 28, 2016).

Kauppila, T, and X J Xu. 1996. "Sciatic Nerve Section Induces Mechanical Hyperalgesia in Skin Adjacent to the Deafferented Region in Rats: Lack of Correlation with Autotomy Behavior." *Neuroscience letters* 211(1): 65–67. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8809849 (February 15, 2016).

Kawamata, Tomoyuki et al. 2003. "Antihyperalgesic and Side Effects of Intrathecal Clonidine and Tizanidine in a Rat Model of Neuropathic Pain." *Anesthesiology* 98(6): 1480–83. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12766661 (March 2, 2016).

Kawano, T et al. 2009. "ATP-Sensitive Potassium Currents in Rat Primary Afferent Neurons: Biophysical, Pharmacological Properties, and Alterations by Painful Nerve Injury." *Neuroscience* 162(2): 431–43. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19422886 (February 15, 2016).

Keller, A Florence, Jean-Didier Breton, Rémy Schlichter, and Pierrick Poisbeau. 2004. "Production of 5alpha-Reduced Neurosteroids Is Developmentally Regulated and Shapes GABA(A) Miniature IPSCs in Lamina II of the Spinal Cord." *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 24(4): 907–15. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14749435 (March 1, 2016).

Kendler, Kenneth S, Carol A Prescott, John Myers, and Michael C Neale. 2003. "The Structure of Genetic and Environmental Risk Factors for Common Psychiatric and Substance Use Disorders in Men and Women." *Archives of general psychiatry* 60(9): 929–37. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12963675 (February 17, 2016).

Kessler, Ronald C et al. 2005. "Prevalence and Treatment of Mental Disorders, 1990 to 2003." *The New England journal of medicine* 352(24): 2515–23. http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2847367&tool=pmcentrez&rendertype=abstract (January 29, 2016).

Kim, S H, and J M Chung. 1992. "An Experimental Model for Peripheral Neuropathy Produced by Segmental Spinal Nerve Ligation in the Rat." *Pain* 50(3): 355–63. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1333581 (November 15, 2015).

King, Tamara et al. 2009. "Unmasking the Tonic-Aversive State in Neuropathic Pain." *Nature neuroscience* 12(11): 1364–66.

Kjelstrup, Kirsten G et al. 2002. "Reduced Fear Expression after Lesions of the Ventral Hippocampus." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99(16): 10825–30. http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=125057&tool=pmcentrez&rendertype=abstract (December 2, 2015).

Klusáková, Ilona, and Petr Dubový. 2009. "Experimental Models of Peripheral Neuropathic Pain Based on Traumatic Nerve Injuries - an Anatomical Perspective." *Annals of anatomy = Anatomischer Anzeiger : official organ of the Anatomische Gesellschaft* 191(3): 248–59. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19403284 (February 28, 2016).

Knight, David C et al. 2004. "Neural Substrates Mediating Human Delay and Trace Fear Conditioning." *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 24(1): 218–28. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14715954 (February 17, 2016).

Kober, Hedy et al. 2008. "Functional Grouping and Cortical–subcortical Interactions in Emotion: A Meta-Analysis of Neuroimaging Studies." *NeuroImage* 42(2): 998–1031. http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2752702&tool=pmcentrez&rendertype=abstract (October 9, 2015).

Kohno, Tatsuro et al. 2005. “Peripheral Axonal Injury Results in Reduced μ Opioid Receptor Pre- and Post-Synaptic Action in the Spinal Cord☆.” *Pain* 117(1): 77–87. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16098668 (January 7, 2016).

Koltzenburg, M, H E Torebjörk, and L K Wahren. 1994. “Nociceptor Modulated Central Sensitization Causes Mechanical Hyperalgesia in Acute Chemogenic and Chronic Neuropathic Pain.” *Brain : a journal of neurology* 117 (Pt 3: 579–91. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8032867 (February 15, 2016).

Konarski, Jakub Z et al. 2009. “Predictors of Nonresponse to Cognitive Behavioural Therapy or Venlafaxine Using Glucose Metabolism in Major Depressive Disorder.” *Journal of psychiatry & neuroscience : JPN* 34(3): 175–80. http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2674969&tool=pmcentrez&rendertype=abstract (March 2, 2016).

Kontinen, Vesa K. et al. 1999. “Behavioural Measures of Depression and Anxiety in Rats with Spinal Nerve Ligation-Induced Neuropathy.” *Pain* 80: 341–46.

van der Kooy, D et al. 1984. “The Organization of Projections from the Cortex, Amygdala, and Hypothalamus to the Nucleus of the Solitary Tract in Rat.” *The Journal of comparative neurology* 224(1): 1–24.

Koresh, Ori et al. 2012. “The Long-Term Abnormalities in Circadian Expression of Period 1 and Period 2 Genes in Response to Stress Is Normalized by Agomelatine Administered Immediately after Exposure.” *European neuropsychopharmacology : the journal of the European College of Neuropsychopharmacology* 22(3): 205–21. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21925847 (February 21, 2016).

Krishnan, Vaishnav, and Eric J Nestler. 2008. “The Molecular Neurobiology of Depression.” *Nature* 455(7215): 894–902. http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2721780&tool=pmcentrez&rendertype=abstract (July 10, 2014).

von Kügelgen, I, C Allgaier, A Schobert, and K Starke. 1994. “Co-Release of Noradrenaline and ATP from Cultured Sympathetic Neurons.” *Neuroscience* 61(2): 199–202. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7969901 (March 2, 2016).

Kusserow, Heike et al. 2004. “Reduced Anxiety-Related Behaviour in Transgenic Mice Overexpressing Serotonin 1A Receptors.” *Brain research. Molecular brain research* 129(1-2): 104–16. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15469887 (January 18, 2016).

Lacroix-Fralish, Michael L, and Jeffrey S Mogil. 2009. “Progress in Genetic Studies of Pain and Analgesia.” *Annual review of pharmacology and toxicology* 49: 97–121. http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2730377&tool=pmcentrez&rendertype=abstract (February 28, 2016).

Lader, M, and J C Scotto. 1998. “A Multicentre Double-Blind Comparison of Hydroxyzine, Buspirone and Placebo in Patients with Generalized Anxiety Disorder.” *Psychopharmacology* 139(4): 402–6. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9809861 (March 1, 2016).

LaGraize, Stacey C et al. 2004. “Differential Effect of Anterior Cingulate Cortex Lesion on Mechanical Hypersensitivity and Escape/avoidance Behavior in an Animal Model of Neuropathic Pain.” *Experimental neurology* 188(1): 139–48. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15191810 (March 2, 2016).

Lam, H H et al. 1996. “Induction of Spinal Cord Neuronal Nitric Oxide Synthase (NOS) after Formalin Injection in the Rat Hind Paw.” *Neuroscience letters* 210(3): 201–4. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8805130 (March 4, 2016).

Landry, Marc et al. 2004. “Expression of Vesicular Glutamate Transporters in Rat Lumbar

Spinal Cord, with a Note on Dorsal Root Ganglia." *The Journal of comparative neurology* 468(3): 380–94. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14681932 (February 29, 2016).

Langford, Dale J et al. 2006. "Social Modulation of Pain as Evidence for Empathy in Mice." *Science (New York, N.Y.)* 312(5782): 1967–70. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16809545 (February 10, 2016).

Langley, C K et al. 2008. "Volunteer Studies in Pain Research--Opportunities and Challenges to Replace Animal Experiments: The Report and Recommendations of a Focus on Alternatives Workshop." *NeuroImage* 42(2): 467–73. https://www.researchgate.net/publication/257472457_Volunteer_studies_in_pain_research_-_Opportunities_and_challenges_to_replace_animal_experiments_The_report_and_recommendations_of_a_Focus_on_Alternatives_workshop (February 15, 2016).

Lanuza, E, J Moncho-Bogani, and J E Ledoux. 2008. "Unconditioned Stimulus Pathways to the Amygdala: Effects of Lesions of the Posterior Intralaminar Thalamus on Foot-Shock-Induced c-Fos Expression in the Subdivisions of the Lateral Amygdala." *Neuroscience* 155(3): 959–68. http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2587439&tool=pmcentrez&rendertype=abstract (February 13, 2016).

LeDoux, J E. 1992. "Brain Mechanisms of Emotion and Emotional Learning." *Current opinion in neurobiology* 2(2): 191–97. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1638153 (February 17, 2016).

———. 2000. "Emotion Circuits in the Brain." *Annual review of neuroscience* 23: 155–84. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10845062 (December 5, 2014).

LeDoux, J E, C R Farb, and L M Romanski. 1991. "Overlapping Projections to the Amygdala and Striatum from Auditory Processing Areas of the Thalamus and Cortex." *Neuroscience letters* 134(1): 139–44.

LeDoux, J E, C Farb, and D A Ruggiero. 1990. "Topographic Organization of Neurons in the Acoustic Thalamus That Project to the Amygdala." *The Journal of neuroscience* 10(4): 1043–54.

LeDoux, J E, J Iwata, P Cicchetti, and D J Reis. 1988. "Different Projections of the Central Amygdaloid Nucleus Mediate Autonomic and Behavioral Correlates of Conditioned Fear." *The Journal of neuroscience* 8(7): 2517–29.

LeDoux, Joseph. 2003. "The Emotional Brain, Fear, and the Amygdala." *Cellular and molecular neurobiology* 23(4-5): 727–38.

Leonardo, E D et al. 2006. "Molecular Heterogeneity along the Dorsal-Ventral Axis of the Murine Hippocampal CA1 Field: A Microarray Analysis of Gene Expression." *Neuroscience* 137(1): 177–86. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16309847 (February 17, 2016).

Lesch, K P. 2001. "Serotonergic Gene Expression and Depression: Implications for Developing Novel Antidepressants." *Journal of affective disorders* 62(1-2): 57–76. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11172874 (February 21, 2016).

Lewis-Fernández, Roberto, Magdaliz Gorritz, et al. 2010. "Association of Trauma-Related Disorders and Dissociation with Four Idioms of Distress among Latino Psychiatric Outpatients." *Culture, medicine and psychiatry* 34(2): 219–43. http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4339099&tool=pmcentrez&rendertype=abstract (February 27, 2016).

Lewis-Fernández, Roberto, Devon E Hinton, et al. 2010. "Culture and the Anxiety Disorders: Recommendations for DSM-V." *Depression and anxiety* 27(2): 212–29.

http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4337390&tool=pmcentrez&rendertype=abstract (February 27, 2016).

Li, Chun-Ying et al. 2006. "Calcium Channel alpha2delta1 Subunit Mediates Spinal Hyperexcitability in Pain Modulation." *Pain* 125(1-2): 20–34. http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1635965&tool=pmcentrez&rendertype=abstract (February 3, 2016).

Li, Chun-Ying, Yan-Hua Song, Emiliano S Higuera, and Z David Luo. 2004. "Spinal Dorsal Horn Calcium Channel alpha2delta-1 Subunit Upregulation Contributes to Peripheral Nerve Injury-Induced Tactile Allodynia." *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 24(39): 8494–99. http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1635787&tool=pmcentrez&rendertype=abstract (February 15, 2016).

Li, Weidong, and Volker Neugebauer. 2004. "Differential Roles of mGluR1 and mGluR5 in Brief and Prolonged Nociceptive Processing in Central Amygdala Neurons." *Journal of neurophysiology* 91(1): 13–24. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/13679408 (February 13, 2016).

Li, Y et al. 2012. "Patterns of Co-Morbidity with Anxiety Disorders in Chinese Women with Recurrent Major Depression." *Psychological medicine* 42(6): 1239–48. http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3339636&tool=pmcentrez&rendertype=abstract (February 17, 2016).

Lifschytz, Tzuri, Eitan Gur, Bernard Lerer, and Michael E Newman. 2004. "Effects of Triiodothyronine and Fluoxetine on 5-HT1A and 5-HT1B Autoreceptor Activity in Rat Brain: Regional Differences." *Journal of neuroscience methods* 140(1-2): 133–39. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15589343 (February 21, 2016).

Löfgren, Magnus et al. 2006. "Progesterone Withdrawal Effects in the Open Field Test Can Be Predicted by Elevated plus Maze Performance." *Hormones and behavior* 50(2): 208–15. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16677649 (March 1, 2016).

Lombard, M C, and J M Besson. 1989. "Attempts to Gauge the Relative Importance of Pre- and Postsynaptic Effects of Morphine on the Transmission of Noxious Messages in the Dorsal Horn of the Rat Spinal Cord." *Pain* 37(3): 335–45. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2547189 (February 16, 2016).

Longone, Patrizia et al. "The Complex Roles of Neurosteroids in Depression and Anxiety Disorders." *Neurochemistry international* 52(4-5): 596–601. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17996986 (February 1, 2016).

López-Avila, Alberto et al. 2004. "Self-Injury Behaviour Induced by Intraplantar Carrageenan Infiltration: A Model of Tonic Nociception." *Brain research. Brain research protocols* 13(1): 37–44. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15063839 (March 4, 2016).

López-Figueroa, Antonio L et al. 2004. "Serotonin 5-HT1A, 5-HT1B, and 5-HT2A Receptor mRNA Expression in Subjects with Major Depression, Bipolar Disorder, and Schizophrenia." *Biological psychiatry* 55(3): 225–33. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14744462 (February 21, 2016).

Lu, Chunming et al. 2010. "Altered Effective Connectivity and Anomalous Anatomy in the Basal Ganglia-Thalamocortical Circuit of Stuttering Speakers." *Cortex; a journal devoted to the study of the nervous system and behavior* 46(1): 49–67. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19375076 (January 27, 2016).

Luskin, M B, and J L Price. 1983. "The Topographic Organization of Associational Fibers of the Olfactory System in the Rat, Including Centrifugal Fibers to the Olfactory Bulb." *The Journal of comparative neurology* 216(3): 264–91.

Luukko, M, and A Pertovaara. 1993. "Influence of an Experimental Peripheral Mononeuropathy on the Responses of Medial Bulboreticular Neurons to Noxious Skin Stimulation and the Modulation of the Responses by an Alpha 2-Adrenoceptor Agonist in the Rat." *Experimental neurology* 124(2): 390–94. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7904570 (February 16, 2016).

Lydiard, R Bruce. 2003. "The Role of GABA in Anxiety Disorders." *The Journal of clinical psychiatry* 64 Suppl 3: 21–27. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12662130 (March 1, 2016).

Maayan, Rachel et al. 2006. "The Protective Effect of Frontal Cortex Dehydroepiandrosterone in Anxiety and Depressive Models in Mice." *Pharmacology, biochemistry, and behavior* 85(2): 415–21. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17109944 (March 1, 2016).

Mahanty, N K, and P Sah. 1999. "Excitatory Synaptic Inputs to Pyramidal Neurons of the Lateral Amygdala." *The European journal of neuroscience* 11(4): 1217–22. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10103117 (February 14, 2016).

Malberg, J E, A J Eisch, E J Nestler, and R S Duman. 2000. "Chronic Antidepressant Treatment Increases Neurogenesis in Adult Rat Hippocampus." *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 20(24): 9104–10. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11124987 (August 26, 2015).

Mantyh, P W et al. 1997. "Inhibition of Hyperalgesia by Ablation of Lamina I Spinal Neurons Expressing the Substance P Receptor." *Science (New York, N.Y.)* 278(5336): 275–79. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9323204 (February 13, 2016).

Mantyh, Patrick. 2013. "Bone Cancer Pain: Causes, Consequences, and Therapeutic Opportunities." In *Pain*,.

Mao, J, D J Mayer, and D D Price. 1993. "Patterns of Increased Brain Activity Indicative of Pain in a Rat Model of Peripheral Mononeuropathy." *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 13(6): 2689–2702. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8388924 (February 16, 2016).

Marowsky, Anne, Jean-Marc Fritschy, and Kaspar E Vogt. 2004. "Functional Mapping of GABA A Receptor Subtypes in the Amygdala." *The European journal of neuroscience* 20(5): 1281–89. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15341600 (February 14, 2016).

Martinet, L, B Guardiola-Lemaitre, and E Mocaer. 1996. "Entrainment of Circadian Rhythms by S-20098, a Melatonin Agonist, Is Dose and Plasma Concentration Dependent." *Pharmacology, biochemistry, and behavior* 54(4): 713–18. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8853194 (January 29, 2016).

Martinez, Valéria, Nadine Attal, Didier Bouhassira, and Michel Lantéri-Minet. 2010. "Les Douleurs Neuropathiques Chroniques : Diagnostic, évaluation et Traitement En Médecine Ambulatoire. Recommandations Pour La Pratique Clinique de La Société Française D'étude et de Traitement de La Douleur." *Douleurs : Evaluation - Diagnostic - Traitement* 11(1): 3–21. http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1624568709003503 (February 14, 2016).

Mascagni, F, A J McDonald, and J R Coleman. 1993. "Corticoamygdaloid and Corticocortical Projections of the Rat Temporal Cortex: A Phaseolus Vulgaris Leucoagglutinin Study." *Neuroscience* 57(3): 697–715.

Mathew, Sanjay J, and Stephanie Ho. 2006. "Etiology and Neurobiology of Social Anxiety Disorder." *The Journal of clinical psychiatry* 67 Suppl 1: 9–13. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17092190 (March 2, 2016).

Matthies, B K, and K B Franklin. 1992. “Formalin Pain Is Expressed in Decerebrate Rats but Not Attenuated by Morphine.” *Pain* 51(2): 199–206. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1484716 (February 28, 2016).

McDonald, A J. 1991. “Topographical Organization of Amygdaloid Projections to the Caudatoputamen, Nucleus Accumbens, and Related Striatal-like Areas of the Rat Brain.” *Neuroscience* 44(1): 15–33.

———. 1998. “Cortical Pathways to the Mammalian Amygdala.” *Progress in neurobiology* 55(3): 257–332.

McDonald, A J, and F Mascagni. 1997. “Projections of the Lateral Entorhinal Cortex to the Amygdala: A Phaseolus Vulgaris Leucoagglutinin Study in the Rat.” *Neuroscience* 77(2): 445–59.

Mcdonald, A J, F Mascagni, and L Guo. 1996. “Projections of the Medial and Lateral Prefrontal Cortices to the Amygdala: A Phaseolus Vulgaris Leucoagglutinin Study in the Rat.” *Neuroscience* 71(1): 55–75.

McNaughton, N, and J A Gray. 2000. “Anxiolytic Action on the Behavioural Inhibition System Implies Multiple Types of Arousal Contribute to Anxiety.” *Journal of affective disorders* 61(3): 161–76. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11163419 (March 2, 2016).

Melcangi, R C et al. 2003. “Neuroactive Steroids Influence Peripheral Myelination: A Promising Opportunity for Preventing or Treating Age-Dependent Dysfunctions of Peripheral Nerves.” *Progress in neurobiology* 71(1): 57–66. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14611868 (March 2, 2016).

Melcangi, Roberto C et al. 2005. “Peripheral Nerves: A Target for the Action of Neuroactive Steroids.” *Brain research. Brain research reviews* 48(2): 328–38. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15850671 (March 2, 2016).

Meller, S T, and G F Gebhart. 1997. “Intraplantar Zymosan as a Reliable, Quantifiable Model of Thermal and Mechanical Hyperalgesia in the Rat.” *European journal of pain (London, England)* 1(1): 43–52. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15102428 (March 4, 2016).

Melzack, Ronald. 2008. “The Future of Pain.” *Nature reviews. Drug discovery* 7(8): 629. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18677804 (January 19, 2016).

Le Merrer, Julie, Jérôme A J Becker, Katia Befort, and Brigitte L Kieffer. 2009. “Reward Processing by the Opioid System in the Brain.” *Physiological reviews* 89(4): 1379–1412. http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4482114&tool=pmcentrez&rendertype=abstract (January 7, 2016).

Merskey, H, and N Bogduk (Eds). 1994. IASP Press *Classification of Chronic Pain. Descriptions of Chronic Pain Syndromes and Definitions of Pain Terms*.

Mestre, C et al. 1994. “A Method to Perform Direct Transcutaneous Intrathecal Injection in Rats.” *Journal of pharmacological and toxicological methods* 32(4): 197–200. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7881133 (March 1, 2016).

Meyer-Rosberg, K et al. 2001. “Peripheral Neuropathic Pain--a Multidimensional Burden for Patients.” *European journal of pain (London, England)* 5(4): 379–89. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11743704.

Micallef, J et al. 2001. “A Double Blind Parallel Group Placebo Controlled Comparison of Sedative and Mnesic Effects of Etifoxine and Lorazepam in Healthy Subjects [corrected].” *Fundamental & clinical pharmacology* 15(3): 209–16. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11468032 (March 1, 2016).

Millan, M J et al. 1997. “S 15535, a Novel Benzodioxopiperazine Ligand of Serotonin (5-

HT)1A Receptors: I. Interaction with Cloned Human (h)5-HT1A, Dopamine hD2/hD3 and H alpha2A-Adrenergic Receptors in Relation to Modulation of Cortical Monoamine Release and Activity in Models of." *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* 282(1): 132–47. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9223549 (February 28, 2016).

———. 1999. "The Induction of Pain: An Integrative Review." *Progress in neurobiology* 57(1): 1–164. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9987804 (February 13, 2016).

———. 2003. "The Novel Melatonin Agonist Agomelatine (S20098) Is an Antagonist at 5-hydroxytryptamine2C Receptors, Blockade of Which Enhances the Activity of Frontocortical Dopaminergic and Adrenergic Pathways." *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* 306(3): 954–64. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12750432 (February 19, 2016).

Millan, Mark J. 2002. "Descending Control of Pain." *Progress in neurobiology* 66(6): 355–474.

Milner, B, L R Squire, and E R Kandel. 1998. "Cognitive Neuroscience and the Study of Memory." *Neuron* 20(3): 445–68.

Moga, M M et al. 1990. "Organization of Cortical, Basal Forebrain, and Hypothalamic Afferents to the Parabrachial Nucleus in the Rat." *The Journal of comparative neurology* 295(4): 624–61.

Mogil, J S et al. 2000. "Sex Differences in Thermal Nociception and Morphine Antinociception in Rodents Depend on Genotype." *Neuroscience and biobehavioral reviews* 24(3): 375–89. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10781697 (February 28, 2016).

Mogil, Jeffrey S et al. 2006. "Screening for Pain Phenotypes: Analysis of Three Congenic Mouse Strains on a Battery of Nine Nociceptive Assays." *Pain* 126(1-3): 24–34. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16842916 (February 15, 2016).

Mogil, Jeffrey S, Kent Simmonds, and Maureen J Simmonds. 2009. "Pain Research from 1975 to 2007: A Categorical and Bibliometric Meta-Trend Analysis of Every Research Paper Published in the Journal, Pain." *Pain* 142(1-2): 48–58. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19111989 (December 18, 2015).

Möhler, H. 2006. "GABA(A) Receptor Diversity and Pharmacology." *Cell and tissue research* 326(2): 505–16. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16937111 (February 14, 2016).

Möhler, Hanns. 2012. "The GABA System in Anxiety and Depression and Its Therapeutic Potential." *Neuropharmacology* 62(1): 42–53. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21889518 (March 2, 2016).

Mosconi, T, and L Kruger. 1996. "Fixed-Diameter Polyethylene Cuffs Applied to the Rat Sciatic Nerve Induce a Painful Neuropathy: Ultrastructural Morphometric Analysis of Axonal Alterations." *Pain* 64(1): 37–57.

Moser, M B, and E I Moser. 1998. "Functional Differentiation in the Hippocampus." *Hippocampus* 8(6): 608–19. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9882018 (December 15, 2015).

Moses-Kolko, Eydie L et al. 2008. "Serotonin 1A Receptor Reductions in Postpartum Depression: A Positron Emission Tomography Study." *Fertility and sterility* 89(3): 685–92. http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2410091&tool=pmcentrez&rendertype=abstract (February 21, 2016).

Munglani, R, M J Hudspith, and S P Hunt. 1996. "The Therapeutic Potential of Neuropeptide Y. Analgesic, Anxiolytic and Antihypertensive." *Drugs* 52(3): 371–89.

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8875128 (February 13, 2016).
Munro, Gordon, Rikke R. Hansen, and Naheed R. Mirza. 2013. "GABAa Receptor Modulation: Potential to Deliver Novel Pain Medicines?" *European Journal of Pharmacology* 716(1-3): 17–23.
Murrough, James W, and Alexander Neumeister. 2011. "The Serotonin 1B Receptor: A New Target for Depression Therapeutics?" *Biological psychiatry* 69(8): 714–15. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21447414 (February 21, 2016).
N. Attal, D. Bouhassira. 2000. 53 Journal of Chemical Information and Modeling *Les Douleurs Neuropathiques*.
Nagy, J, K Zámbó, and L Decsi. 1979. "Anti-Anxiety Action of Diazepam after Intra-Amygdaloid Application in the Rat." *Neuropharmacology* 18(6): 573–76. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/39271 (February 17, 2016).
Nakashima, M et al. 2000. "An Anterograde and Retrograde Tract-Tracing Study on the Projections from the Thalamic Gustatory Area in the Rat: Distribution of Neurons Projecting to the Insular Cortex and Amygdaloid Complex." *Neuroscience research* 36(4): 297–309.
Narita, Minoru et al. 2006. "Chronic Pain Induces Anxiety with Concomitant Changes in Opioidergic Function in the Amygdala." *Neuropsychopharmacology : official publication of the American College of Neuropsychopharmacology* 31(4): 739–50. http://www.nature.com/npp/journal/v31/n4/full/1300858a.html#close (March 1, 2016).
Neumaier, J F, D C Root, and M W Hamblin. 1996. "Chronic Fluoxetine Reduces Serotonin Transporter mRNA and 5-HT1B mRNA in a Sequential Manner in the Rat Dorsal Raphe Nucleus." *Neuropsychopharmacology : official publication of the American College of Neuropsychopharmacology* 15(5): 515–22. http://dx.doi.org/10.1016/S0893-133X(96)00095-4 (February 21, 2016).
Neumann, Jens et al. 2008. "Microglia Cells Protect Neurons by Direct Engulfment of Invading Neutrophil Granulocytes: A New Mechanism of CNS Immune Privilege." *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 28(23): 5965–75. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18524901 (February 13, 2016).
Newman, Michael E et al. 2004. "Chronic Fluoxetine-Induced Desensitization of 5-HT1A and 5-HT1B Autoreceptors: Regional Differences and Effects of WAY-100635." *European journal of pharmacology* 486(1): 25–30. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14751404 (February 21, 2016).
Nguyen, N et al. 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." *Human psychopharmacology* 21(3): 139–49. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16625522 (February 27, 2016).
Nicolas, Laurent B., Yeter Kolb, and Eric P M Prinssen. 2006. "A Combined Marble Burying-Locomotor Activity Test in Mice: A Practical Screening Test with Sensitivity to Different Classes of Anxiolytics and Antidepressants." *European Journal of Pharmacology* 547(1-3): 106–15.
Niehoff, D L, and M J Kuhar. 1983. "Benzodiazepine Receptors: Localization in Rat Amygdala." *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 3(10): 2091–97. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6311996 (February 17, 2016).
Nitecka, L, and Y Ben-Ari. 1987. "Distribution of GABA-like Immunoreactivity in the Rat Amygdaloid Complex." *The Journal of comparative neurology* 266(1): 45–55. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3429715 (February 4, 2016).

Nobler, M S et al. 2001. "Decreased Regional Brain Metabolism after Ect." *The American journal of psychiatry* 158(2): 305–8. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11156816 (February 17, 2016).

Noguchi, K et al. 1994. "Axotomy Induces Preprotachykinin Gene Expression in a Subpopulation of Dorsal Root Ganglion Neurons." *Journal of neuroscience research* 37(5): 596–603. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7518007 (February 16, 2016).

Nowak, L et al. "Magnesium Gates Glutamate-Activated Channels in Mouse Central Neurones." *Nature* 307(5950): 462–65. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6320006 (January 14, 2016).

Obrosova, Irina G et al. 2002. "An Aldose Reductase Inhibitor Reverses Early Diabetes-Induced Changes in Peripheral Nerve Function, Metabolism, and Antioxidative Defense." *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 16(1): 123–25. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11709499 (February 15, 2016).

Olausson, Håkan et al. 2008. "Functional Role of Unmyelinated Tactile Afferents in Human Hairy Skin: Sympathetic Response and Perceptual Localization." *Experimental Brain Research* 184(1): 135–40.

Olivier, Berend, and Ruud van Oorschot. 2005. "5-HT1B Receptors and Aggression: A Review." *European journal of pharmacology* 526(1-3): 207–17. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16310769 (February 29, 2016).

Olsen, R W, and A J Tobin. 1990. "Molecular Biology of GABAA Receptors." *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 4(5): 1469–80. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2155149 (February 14, 2016).

PAOLI, F, G DARCOURT, and P COSSA. 1960. "[Preliminary Note on the Action of Imipramine in Painful States]." *Revue neurologique* 102: 503–4. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/13732553 (March 4, 2016).

Papez, J W. 1995. "A Proposed Mechanism of Emotion. 1937." *The Journal of neuropsychiatry and clinical neurosciences* 7(1): 103–12. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7711480 (January 7, 2016).

Parks, C L et al. 1998. "Increased Anxiety of Mice Lacking the serotonin1A Receptor." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95(18): 10734–39. http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=27964&tool=pmcentrez&rendertype=abstract (February 21, 2016).

Pathirathna, Sriyani et al. 2005. "New Evidence That Both T-Type Calcium Channels and GABAA Channels Are Responsible for the Potent Peripheral Analgesic Effects of 5alpha-Reduced Neuroactive Steroids." *Pain* 114(3): 429–43. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15777868 (March 2, 2016).

Paxinos, G, and C Watson. 2001. *The Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates*. Second edi. Academic Press, Sydney.

Pérez, Jordi et al. 2005. "Dietary Omega-3 Fatty Acids May Be Associated with Increased Neuropathic Pain in Nerve-Injured Rats." *Anesthesia and analgesia* 101(2): 444–48, table of contents. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16037160 (February 28, 2016).

Perl, Edward R. 2007. "Ideas about Pain, a Historical View." *Nature reviews. Neuroscience* 8(1): 71–80.

Pertovaara, A, and T Kauppila. 1989. "Effect of Chronic Sciatic Nerve Section on

Saphenous Nerve Input to Midline Bulboreticular Formation in the Rat." *Neuroscience letters* 105(1-2): 68–72. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2485888 (February 16, 2016).

Petrou, Myria et al. 2012. "Altered Excitation-Inhibition Balance in the Brain of Patients with Diabetic Neuropathy." *Academic radiology* 19(5): 607–12. http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3374728&tool=pmcentrez&rendertype=abstract (February 14, 2016).

Petrovich, G D, N S Canteras, and L W Swanson. 2001. "Combinatorial Amygdalar Inputs to Hippocampal Domains and Hypothalamic Behavior Systems." *Brain research. Brain research reviews* 38(1-2): 247–89.

Petty, F, and M A Schlesser. 1981. "Plasma GABA in Affective Illness. A Preliminary Investigation." *Journal of affective disorders* 3(4): 339–43. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6459350 (February 10, 2016).

Petty, F, and A D Sherman. 1984. "Plasma GABA Levels in Psychiatric Illness." *Journal of affective disorders* 6(2): 131–38. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6233345 (February 10, 2016).

Peyron, C et al. 1998. "Neurons Containing Hypocretin (orexin) Project to Multiple Neuronal Systems." *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 18(23): 9996–10015. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9822755 (March 4, 2016).

Pico-Alfonso, Maria A et al. 2004. "Changes in Cortisol and Dehydroepiandrosterone in Women Victims of Physical and Psychological Intimate Partner Violence." *Biological psychiatry* 56(4): 233–40. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15312810 (March 1, 2016).

Pignone, Michael P. 2002. "Screening for Depression in Adults: A Summary of the Evidence for the U.S. Preventive Services Task Force." *Annals of Internal Medicine* 136(10): 765. http://annals.org/article.aspx?articleid=715293 (November 11, 2015).

Piñeyro, G, and P Blier. 1999. "Autoregulation of Serotonin Neurons: Role in Antidepressant Drug Action." *Pharmacological reviews* 51(3): 533–91. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10471417 (February 21, 2016).

Pitcher, G M, J Ritchie, and J L Henry. 1999. "Paw Withdrawal Threshold in the von Frey Hair Test Is Influenced by the Surface on Which the Rat Stands." *Journal of neuroscience methods* 87(2): 185–93. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11230815 (February 18, 2016).

Pitkänen, A et al. 1995. "Intrinsic Connections of the Rat Amygdaloid Complex: Projections Originating in the Lateral Nucleus." *The Journal of comparative neurology* 356(2): 288–310.

———. 2000. "Connectivity of the Rat Amygdaloid Complex." In *The Amygdala: A Functional Analysis*, ed. JP Aggleton. Oxford, UK: Oxford University Press, 31–115.

Pitkänen, A, V Savander, and J E LeDoux. 1997. "Organization of Intra-Amygdaloid Circuitries in the Rat: An Emerging Framework for Understanding Functions of the Amygdala." *Trends in neurosciences* 20(11): 517–23.

Poisbeau, Pierrick et al. 2014. "Analgesic Strategies Aimed at Stimulating the Endogenous Production of Allopregnanolone." *Frontiers in Cellular Neuroscience* 8(June): 1–8.

Popa, Daniela et al. 2010. "A Longitudinal Study of 5-HT Outflow during Chronic Fluoxetine Treatment Using a New Technique of Chronic Microdialysis in a Highly Emotional Mouse Strain." *European journal of pharmacology* 628(1-3): 83–90. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19944680 (February 29, 2016).

Porsolt, R D, M Le Pichon, and M Jalfre. 1977. "Depression: A New Animal Model Sensitive to Antidepressant Treatments." *Nature* 266(5604): 730–32.

Pourmotabbed, T et al. 1996. "Treatment, Discontinuation, and Psychomotor Effects of Diazepam in Women with Generalized Anxiety Disorder." *Journal of clinical psychopharmacology* 16(3): 202–7. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8784650 (March 1, 2016).

Price, D D. 2000. "Psychological and Neural Mechanisms of the Affective Dimension of Pain." *Science (New York, N.Y.)* 288(5472): 1769–72.

Price, Donald D, Joel D Greenspan, and Ronald Dubner. 2003. "Neurons Involved in the Exteroceptive Function of Pain." *Pain* 106(3): 215–19. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14659504 (February 13, 2016).

Price, Joseph L, and Wayne C Drevets. 2010. "Neurocircuitry of Mood Disorders." *Neuropsychopharmacology : official publication of the American College of Neuropsychopharmacology* 35(1): 192–216. http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3055427&tool=pmcentrez&rendertype=abstract (August 28, 2015).

Pritchett, D B et al. 1989. "Importance of a Novel GABAA Receptor Subunit for Benzodiazepine Pharmacology." *Nature* 338(6216): 582–85. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2538761 (February 23, 2016).

Pytliak, M, V Vargová, V Mechírová, and M Felšöci. 2011. "Serotonin Receptors - from Molecular Biology to Clinical Applications." *Physiological research / Academia Scientiarum Bohemoslovaca* 60(1): 15–25. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20945968 (February 21, 2016).

Raadsheer, F C et al. 1994. "Increased Numbers of Corticotropin-Releasing Hormone Expressing Neurons in the Hypothalamic Paraventricular Nucleus of Depressed Patients." *Neuroendocrinology* 60(4): 436–44. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7824085 (March 2, 2016).

Rainer, Quentin et al. 2012. "Beneficial Behavioural and Neurogenic Effects of Agomelatine in a Model of Depression/anxiety." *The international journal of neuropsychopharmacology / official scientific journal of the Collegium Internationale Neuropsychopharmacologicum (CINP)* 15(3): 321–35. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21473810 (February 27, 2016).

Rainnie, D G, E K Asprodini, and P Shinnick-Gallagher. 1991. "Inhibitory Transmission in the Basolateral Amygdala." *Journal of neurophysiology* 66(3): 999–1009. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1684384 (February 14, 2016).

Rainnie, D G, B J Fernhout, and P Shinnick-Gallagher. 1992. "Differential Actions of Corticotropin Releasing Factor on Basolateral and Central Amygdaloid Neurones, in Vitro." *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* 263(2): 846–58. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1331417 (February 14, 2016).

Rainville, P et al. 1997. "Pain Affect Encoded in Human Anterior Cingulate but Not Somatosensory Cortex." *Science (New York, N.Y.)* 277(5328): 968–71. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9252330 (January 18, 2016).

Ramboz, S et al. 1998. "Serotonin Receptor 1A Knockout: An Animal Model of Anxiety-Related Disorder." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95(24): 14476–81. http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=24398&tool=pmcentrez&rendertype=abstract (February 21, 2016).

Reddy, D.S. 2006. "Physiological Role of Adrenal Deoxycorticosterone-Derived Neuroactive Steroids in Stress-Sensitive Conditions." *Neuroscience* 138(3): 911–20.

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16325348 (January 4, 2016).
Rentsch, D et al. 2009. "[Chronic Pain and Depression]." *Revue médicale suisse* 5(208): 1364–66, 1368–69. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19626761 (March 2, 2016).
Restivo, Leonardo, Gisella Vetere, Bruno Bontempi, and Martine Ammassari-Teule. 2009. "The Formation of Recent and Remote Memory Is Associated with Time-Dependent Formation of Dendritic Spines in the Hippocampus and Anterior Cingulate Cortex." *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 29(25): 8206–14. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19553460 (February 12, 2016).
Reynolds, J L, T A Ignatowski, R Sud, and R N Spengler. 2005. "An Antidepressant Mechanism of Desipramine Is to Decrease Tumor Necrosis Factor-Alpha Production Culminating in Increases in Noradrenergic Neurotransmission." *Neuroscience* 133(2): 519–31. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15878644 (March 2, 2016).
Rice, Andrew S C et al. 2008. "Animal Models and the Prediction of Efficacy in Clinical Trials of Analgesic Drugs: A Critical Appraisal and Call for Uniform Reporting Standards." *Pain* 139(2): 243–47. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18814968 (February 28, 2016).
Richardson-Jones, Jesse W et al. 2011. "Serotonin-1A Autoreceptors Are Necessary and Sufficient for the Normal Formation of Circuits Underlying Innate Anxiety." *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 31(16): 6008–18. http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3102496&tool=pmcentrez&rendertype=abstract (February 21, 2016).
Rizvi, T A, M Ennis, M M Behbehani, and M T Shipley. 1991. "Connections between the Central Nucleus of the Amygdala and the Midbrain Periaqueductal Gray: Topography and Reciprocity." *The Journal of comparative neurology* 303(1): 121–31.
RJ, Leo. 2005. "Chronic Pain and Comorbid Depression." *Current treatment options in neurology* 7(5): 403–12.
Roberson-Nay, Roxann et al. 2006. "Increased Amygdala Activity during Successful Memory Encoding in Adolescent Major Depressive Disorder: An FMRI Study." *Biological psychiatry* 60(9): 966–73. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16603133 (December 17, 2015).
Roberts, G W, P L Woodhams, J M Polak, and T J Crow. 1982. "Distribution of Neuropeptides in the Limbic System of the Rat: The Amygdaloid Complex." *Neuroscience* 7(1): 99–131. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6176906 (February 28, 2016).
Robinson, Ian, Tom Dowdall, and Theo F Meert. 2004. "Development of Neuropathic Pain Is Affected by Bedding Texture in Two Models of Peripheral Nerve Injury in Rats." *Neuroscience letters* 368(1): 107–11. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15342144 (February 28, 2016).
Rosenkranz, J Amiel, and Anthony A Grace. 2002. "Dopamine-Mediated Modulation of Odour-Evoked Amygdala Potentials during Pavlovian Conditioning." *Nature* 417(6886): 282–87. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12015602 (January 31, 2016).
Rubin, R T et al. 1987. "Neuroendocrine Aspects of Primary Endogenous Depression. III. Cortisol Secretion in Relation to Diagnosis and Symptom Patterns." *Psychological medicine* 17(3): 609–19. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3628622 (March 2, 2016).

Sah, P, E S L Faber, M Lopez De Armentia, and J Power. 2003. "The Amygdaloid Complex: Anatomy and Physiology." *Physiological reviews* 83(3): 803–34.

Sahay, Amar, and Rene Hen. 2007. "Adult Hippocampal Neurogenesis in Depression." *Nature neuroscience* 10(9): 1110–15. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17726477 (September 29, 2015).

Sandkühler, J. 1996. "The Organization and Function of Endogenous Antinociceptive Systems." *Progress in neurobiology* 50(1): 49–81. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8931107 (February 13, 2016).

Sanna, Enrico et al. 2004. "Brain Steroidogenesis Mediates Ethanol Modulation of GABAA Receptor Activity in Rat Hippocampus." *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 24(29): 6521–30. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15269263 (March 1, 2016).

Santarelli, L. 2003. "Requirement of Hippocampal Neurogenesis for the Behavioral Effects of Antidepressants." *Science* 301(5634): 805–9. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12907793 (March 11, 2015).

Santarelli, Luca et al. 2003. "Requirement of Hippocampal Neurogenesis for the Behavioral Effects of Antidepressants." *Science* 301(5634): 805–9.

Saper, Clifford B., Thomas E. Scammell, and Jun Lu. 2005. "Hypothalamic Regulation of Sleep and Circadian Rhythms." *Nature* 437(7063): 1257–63. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16251950 (October 22, 2015).

Sartorius, N, T B Ustün, Y Lecrubier, and H U Wittchen. 1996. "Depression Comorbid with Anxiety: Results from the WHO Study on Psychological Disorders in Primary Health Care." *The British journal of psychiatry. Supplement* 168(30): 38–43. https://www.researchgate.net/publication/14342927_Depression_comorbid_with_anxiety_Results_from_the_WHO_study_on_Psychological_Disorders_in_Primary_Health_Care (February 17, 2016).

Savander, V, C G Go, J E LeDoux, and A Pitkänen. 1995. "Intrinsic Connections of the Rat Amygdaloid Complex: Projections Originating in the Basal Nucleus." *The Journal of comparative neurology* 361(2): 345–68.

Savander, V, R Miettinen, J E Ledoux, and A Pitkänen. 1997. "Lateral Nucleus of the Rat Amygdala Is Reciprocally Connected with Basal and Accessory Basal Nuclei: A Light and Electron Microscopic Study." *Neuroscience* 77(3): 767–81.

Sawynok, Jana, Allison R Reid, and Bertil B Fredholm. 2008. "Caffeine Reverses Antinociception by Amitriptyline in Wild Type Mice but Not in Those Lacking Adenosine A1 Receptors." *Neuroscience letters* 440(2): 181–84. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18562097 (March 2, 2016).

Scalia, F, and S S Winans. 1975. "The Differential Projections of the Olfactory Bulb and Accessory Olfactory Bulb in Mammals." *The Journal of comparative neurology* 161(1): 31–55.

Schlichter, R et al. 2000. "Modulation of GABAergic Synaptic Transmission by the Non-Benzodiazepine Anxiolytic Etifoxine." *Neuropharmacology* 39(9): 1523–35. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10854897 (March 1, 2016).

Schlichter, R??my et al. 2000. "Modulation of GABAergic Synaptic Transmission by the Non-Benzodiazepine Anxiolytic Etifoxine." *Neuropharmacology* 39(9): 1523–35.

Schloesser, Robert J, Keri Martinowich, and Husseini K Manji. 2012. "Mood-Stabilizing Drugs: Mechanisms of Action." *Trends in neurosciences* 35(1): 36–46. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22217451 (March 2, 2016).

Schmidt, R et al. 1995. "Novel Classes of Responsive and Unresponsive C Nociceptors in Human Skin." *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for*

Neuroscience 15(1 Pt 1): 333–41.
Scholz, Joachim, and Clifford J Woolf. 2002. "Can We Conquer Pain?" *Nature neuroscience* 5 Suppl(november): 1062–67.
Schönberger, Michael, Jennie Ponsford, Kate R Gould, and Lisa Johnston. 2011. "The Temporal Relationship between Depression, Anxiety, and Functional Status after Traumatic Brain Injury: A Cross-Lagged Analysis." *Journal of the International Neuropsychological Society : JINS* 17(5): 781–87. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21729404 (February 27, 2016).
Schweinhardt, Petra, and M Catherine Bushnell. 2010. "Pain Imaging in Health and Disease--How Far Have We Come?" *The Journal of clinical investigation* 120(11): 3788–97. http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2964988&tool=pmcentrez&rendertype=abstract (February 13, 2016).
Seltzer, Z, R Dubner, and Y Shir. 1990. "A Novel Behavioral Model of Neuropathic Pain Disorders Produced in Rats by Partial Sciatic Nerve Injury." *Pain* 43(2): 205–18. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1982347 (October 11, 2015).
Sequeira, Adolfo et al. 2009. "Global Brain Gene Expression Analysis Links Glutamatergic and GABAergic Alterations to Suicide and Major Depression." *PloS one* 4(8): e6585. http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2719799&tool=pmcentrez&rendertype=abstract (February 17, 2016).
Servant, D, P L Graziani, D Moyse, and P J Parquet. "[Treatment of Adjustment Disorder with Anxiety: Efficacy and Tolerance of Etifoxine in a Double-Blind Controlled Study]." *L'Encéphale* 24(6): 569–74. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9949940 (February 27, 2016).
Shackman, Alexander J et al. 2011. "The Integration of Negative Affect, Pain and Cognitive Control in the Cingulate Cortex." *Nature reviews. Neuroscience* 12(3): 154–67. http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3044650&tool=pmcentrez&rendertype=abstract (July 9, 2014).
Shen, Hui et al. 2010. "A Critical Role for alpha4betadelta GABAA Receptors in Shaping Learning Deficits at Puberty in Mice." *Science (New York, N.Y.)* 327(5972): 1515–18. http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2887350&tool=pmcentrez&rendertype=abstract (January 26, 2016).
Shi, C, and M Davis. 1999. "Pain Pathways Involved in Fear Conditioning Measured with Fear-Potentiated Startle: Lesion Studies." *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 19(1): 420–30. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9870970 (March 4, 2016).
———. 2001. "Visual Pathways Involved in Fear Conditioning Measured with Fear-Potentiated Startle: Behavioral and Anatomic Studies." *The Journal of neuroscience* 21(24): 9844–55.
Shi, C J, and M D Cassell. 1998. "Cortical, Thalamic, and Amygdaloid Connections of the Anterior and Posterior Insular Cortices." *The Journal of comparative neurology* 399(4): 440–68.
Shir, Y et al. 1998. "Neuropathic Pain Following Partial Nerve Injury in Rats Is Suppressed by Dietary Soy." *Neuroscience letters* 240(2): 73–76. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9486475 (February 28, 2016).
Shir, Y, and Z Seltzer. 2001. "Heat Hyperalgesia Following Partial Sciatic Ligation in Rats: Interacting Nature and Nurture." *Neuroreport* 12(4): 809–13. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11277588 (February 28, 2016).
Sieghart, W, and G Sperk. 2002. "Subunit Composition, Distribution and Function of

GABA(A) Receptor Subtypes." *Current topics in medicinal chemistry* 2(8): 795–816. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12171572 (February 14, 2016).

Sigel, E, and A Buhr. 1997. "The Benzodiazepine Binding Site of GABAA Receptors." *Trends in pharmacological sciences* 18(11): 425–29. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9426470 (February 14, 2016).

Smith, Blair H, Gary J Macfarlane, and Nicola Torrance. 2007. "Epidemiology of Chronic Pain, from the Laboratory to the Bus Stop: Time to Add Understanding of Biological Mechanisms to the Study of Risk Factors in Population-Based Research?" *Pain* 127(1-2): 5–10. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17140732 (March 2, 2016).

Snider, W D, and S B McMahon. 1998. "Tackling Pain at the Source: New Ideas about Nociceptors." *Neuron* 20(4): 629–32. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9581756 (January 28, 2016).

Söndergaard, Hans Peter, Lars-Olof Hansson, and Töres Theorell. "Elevated Blood Levels of Dehydroepiandrosterone Sulphate Vary with Symptom Load in Posttraumatic Stress Disorder: Findings from a Longitudinal Study of Refugees in Sweden." *Psychotherapy and psychosomatics* 71(5): 298–303. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12207110 (March 1, 2016).

Squire, Larry R., Craig E.L. Stark, and Robert E. Clark. 2004. "THE MEDIAL TEMPORAL LOBE*." *Annual Review of Neuroscience* 27(1): 279–306. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15217334 (February 1, 2016).

van der Staay, F Josef, Saskia S Arndt, and Rebecca E Nordquist. 2009. "Evaluation of Animal Models of Neurobehavioral Disorders." *Behavioral and brain functions : BBF* 5: 11. http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2669803&tool=pmcentrez&rendertype=abstract (March 2, 2016).

Stahl, Stephen M et al. 2010. "Agomelatine in the Treatment of Major Depressive Disorder: An 8-Week, Multicenter, Randomized, Placebo-Controlled Trial." *The Journal of clinical psychiatry* 71(5): 616–26. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20361916 (February 21, 2016).

Stanley, B G, K R Urstadt, J R Charles, and T Kee. 2011. "Glutamate and GABA in Lateral Hypothalamic Mechanisms Controlling Food Intake." *Physiology & behavior* 104(1): 40–46. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21550353 (February 14, 2016).

Van Steenwinckel, Juliette et al. 2008. "Role of Spinal Serotonin 5-HT2A Receptor in 2',3'-Dideoxycytidine-Induced Neuropathic Pain in the Rat and the Mouse." *Pain* 137(1): 66–80. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17888573 (February 15, 2016).

Stein, C, H Davidowa, and D Albrecht. 2000. "5-HT(1A) Receptor-Mediated Inhibition and 5-HT(2) as Well as 5-HT(3) Receptor-Mediated Excitation in Different Subdivisions of the Rat Amygdala." *Synapse (New York, N.Y.)* 38(3): 328–37. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11020236 (February 14, 2016).

Stockmeier, C A, P Wingenfeld, and G A Gudelsky. 1992. "Effects of Repeated Electroconvulsive Shock on serotonin1A Receptor Binding and Receptor-Mediated Hypothermia in the Rat." *Neuropharmacology* 31(11): 1089–94. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1475018 (February 29, 2016).

Strous, Rael D et al. 2003. "Dehydroepiandrosterone Augmentation in the Management of Negative, Depressive, and Anxiety Symptoms in Schizophrenia." *Archives of general psychiatry* 60(2): 133–41. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12578430 (January 20, 2016).

Sud, Reeteka, Robert N Spengler, Nader D Nader, and Tracey A Ignatowski. 2008. "Antinociception Occurs with a Reversal in Alpha 2-Adrenoceptor Regulation of TNF

Production by Peripheral Monocytes/macrophages from pro- to Anti-Inflammatory." *European journal of pharmacology* 588(2-3): 217–31. http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2587399&tool=pmcentrez&rendertype=abstract (March 2, 2016).

Sutcigil, Levent et al. 2007. "Pro- and Anti-Inflammatory Cytokine Balance in Major Depression: Effect of Sertraline Therapy." *Clinical & developmental immunology* 2007: 76396. http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2248234&tool=pmcentrez&rendertype=abstract (March 2, 2016).

Suzuki, T, Y Kishimoto, and M Misawa. 1996. "Formalin- and Carrageenan-Induced Inflammation Attenuates Place Preferences Produced by Morphine, Methamphetamine and Cocaine." *Life sciences* 59(19): 1667–74. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8913332 (March 4, 2016).

Suzuki, Takahiro et al. 2007. "Experimental Neuropathy in Mice Is Associated with Delayed Behavioral Changes Related to Anxiety and Depression." *Anesthesia and Analgesia* 104(6): 1570–77.

Tandrup, T, C J Woolf, and R E Coggeshall. 2000. "Delayed Loss of Small Dorsal Root Ganglion Cells after Transection of the Rat Sciatic Nerve." *The Journal of comparative neurology* 422(2): 172–80. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10842225 (February 15, 2016).

Tang, Jianrong et al. 2005. "Pavlovian Fear Memory Induced by Activation in the Anterior Cingulate Cortex." *Molecular pain* 1: 6. http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1074356&tool=pmcentrez&rendertype=abstract (February 17, 2016).

Tang, Nicole K Y, and Catherine Crane. 2006. "Suicidality in Chronic Pain: A Review of the Prevalence, Risk Factors and Psychological Links." *Psychological medicine* 36(5): 575–86. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16420727 (March 4, 2016).

Tardito, Daniela et al. 2010. "Blockade of Stress-Induced Increase of Glutamate Release in the Rat Prefrontal/frontal Cortex by Agomelatine Involves Synergy between Melatonergic and 5-HT2C Receptor-Dependent Pathways." *BMC neuroscience* 11: 68. http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2896952&tool=pmcentrez&rendertype=abstract (February 21, 2016).

Terman, G W et al. 1984. "Intrinsic Mechanisms of Pain Inhibition: Activation by Stress." *Science (New York, N.Y.)* 226(4680): 1270–77. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6505691 (February 28, 2016).

Terner, Jolan M et al. 2003. "Pharmacogenetic Analysis of Sex Differences in Opioid Antinociception in Rats." *Pain* 106(3): 381–91. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14659521 (February 28, 2016).

Thakor, Devang Kashyap et al. 2009. "Increased Peripheral Nerve Excitability and Local NaV1.8 mRNA up-Regulation in Painful Neuropathy." *Molecular pain* 5: 14. http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2667430&tool=pmcentrez&rendertype=abstract (February 15, 2016).

Thant, M et al. 1982. "Possible Enhancement of Vincristine Neuropathy by VP-16." *Cancer* 49(5): 859–64. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6277454 (March 2, 2016).

Thibault, Karine et al. 2014. "Molecular Mechanisms Underlying the Enhanced Analgesic Effect of Oxycodone Compared to Morphine in Chemotherapy-Induced Neuropathic Pain." *PloS one* 9(3): e91297. http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3949760&tool=pmcentrez&rendertype=abstract (March 2, 2016).

Tischler, Rebecca C, and L P Morin. 2003. "Reciprocal Serotonergic Connections between the Hamster Median and Dorsal Raphe Nuclei." *Brain research* 981(1-2): 126–32. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12885433 (February 29, 2016).

Todd, A J. 2002. "Anatomy of Primary Afferents and Projection Neurones in the Rat Spinal Dorsal Horn with Particular Emphasis on Substance P and the Neurokinin 1 Receptor." *Experimental physiology* 87(2): 245–49. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11856970 (February 13, 2016).

Tomiyama, Masahiko et al. 2005. "Upregulation of mRNAs Coding for AMPA and NMDA Receptor Subunits and Metabotropic Glutamate Receptors in the Dorsal Horn of the Spinal Cord in a Rat Model of Diabetes Mellitus." *Brain research. Molecular brain research* 136(1-2): 275–81. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15893611 (February 16, 2016).

Tracey, Irene. 2007. "Neuroimaging of Pain Mechanisms." *Current opinion in supportive and palliative care* 1(2): 109–16. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18685351 (February 17, 2016).

Treede, R-D et al. 2008. "Neuropathic Pain: Redefinition and a Grading System for Clinical and Research Purposes." *Neurology* 70(18): 1630–35. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18003941 (January 6, 2015).

Treit, D, C Pesold, and S Rotzinger. 1993. "Noninteractive Effects of Diazepam and Amygdaloid Lesions in Two Animal Models of Anxiety." *Behavioral neuroscience* 107(6): 1099–1105. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8136064 (February 17, 2016).

Twillman, Robert K. 2007. "Mental Disorders in Chronic Pain Patients." *Journal of pain & palliative care pharmacotherapy* 21(4): 13–19. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18032311 (March 1, 2016).

Ugale, Rajesh R et al. 2007. "Neurosteroid Allopregnanolone Mediates Anxiolytic Effect of Etifoxine in Rats." *Brain research* 1184: 193–201. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17950705 (February 27, 2016).

Ulrich-Lai, Yvonne M et al. 2006. "Limbic and HPA Axis Function in an Animal Model of Chronic Neuropathic Pain." *Physiology & behavior* 88(1-2): 67–76.

Ulugol, Ahmet et al. 2002. "Involvement of Adenosine in the Anti-Allodynic Effect of Amitriptyline in Streptozotocin-Induced Diabetic Rats." *Neuroscience letters* 328(2): 129–32. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12133572 (March 2, 2016).

Veinante, Pierre, Ipek Yalcin, and Michel Barrot. 2013. "The Amygdala between Sensation and Affect: A Role in Pain." *Journal of molecular psychiatry* 1(1): 9. http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4223879&tool=pmcentrez&rendertype=abstract (November 2, 2015).

Verleye, M et al. 2001. "Functional Modulation of Gamma-Aminobutyric acid(A) Receptors by Etifoxine and Allopregnanolone in Rodents." *Neuroscience letters* 301(3): 191–94. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11257430 (March 1, 2016).

Verleye, M, R Schlichter, and J M Gillardin. 1999. "Interactions of Etifoxine with the Chloride Channel Coupled to the GABA(A) Receptor Complex." *Neuroreport* 10(15): 3207–10. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10574561 (March 2, 2016).

Verleye, M. et al. 2001. "Functional Modulation of Gamma-Aminobutyric acidA Receptors by Etifoxine and Allopregnanolone in Rodents." *Neuroscience Letters* 301(3): 191–94.

Verleye, Marc et al. 2005. "The Anxiolytic Etifoxine Activates the Peripheral Benzodiazepine Receptor and Increases the Neurosteroid Levels in Rat Brain." *Pharmacology, biochemistry, and behavior* 82(4): 712–20.

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16388839 (February 27, 2016).
———. 2011. "Differential Effects of Etifoxine on Anxiety-like Behaviour and Convulsions in BALB/cByJ and C57BL/6J Mice: Any Relation to Overexpression of Central GABAA Receptor beta2 Subunits?" *European neuropsychopharmacology : the journal of the European College of Neuropsychopharmacology* 21(6): 457–70. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20943351 (March 1, 2016).
Verleye, Marc, and Jean-Marie Gillardin. 2004. "Effects of Etifoxine on Stress-Induced Hyperthermia, Freezing Behavior and Colonic Motor Activation in Rats." *Physiology & behavior* 82(5): 891–97. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15451655 (March 1, 2016).
Verleye, Marc, Isabelle Heulard, and Jean-marie Gillardin. 2009. "The Anxiolytic Etifoxine Protects against Convulsant and Anxiogenic Aspects of the Alcohol Withdrawal Syndrome in Mice." *Alcohol* 43(3): 197–206. http://dx.doi.org/10.1016/j.alcohol.2009.02.003.
Vos, B P, J M Benoist, M Gautron, and G Guilbaud. 2000. "Changes in Neuronal Activities in the Two Ventral Posterior Medial Thalamic Nuclei in an Experimental Model of Trigeminal Pain in the Rat by Constriction of One Infraorbital Nerve." *Somatosensory & motor research* 17(2): 109–22. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10895882 (February 28, 2016).
Wall, P D et al. 1979. "Autotomy Following Peripheral Nerve Lesions: Experimental Anaesthesia Dolorosa." *Pain* 7(2): 103–11. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/574931 (February 7, 2016).
Wang, H et al. 2002. "Chronic Neuropathic Pain Is Accompanied by Global Changes in Gene Expression and Shares Pathobiology with Neurodegenerative Diseases." *Neuroscience* 114(3): 529–46. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12220557 (February 15, 2016).
Wang, Jing-Wen et al. 2008. "Chronic Fluoxetine Stimulates Maturation and Synaptic Plasticity of Adult-Born Hippocampal Granule Cells." *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 28(6): 1374–84. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18256257 (December 11, 2015).
Washburn, M S, and H C Moises. 1992. "Inhibitory Responses of Rat Basolateral Amygdaloid Neurons Recorded in Vitro." *Neuroscience* 50(4): 811–30. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1333061 (February 14, 2016).
Weisberg, Risa B, Ingrid Dyck, Larry Culpepper, and Martin B Keller. 2007. "Psychiatric Treatment in Primary Care Patients with Anxiety Disorders: A Comparison of Care Received from Primary Care Providers and Psychiatrists." *The American journal of psychiatry* 164(2): 276–82. http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3831273&tool=pmcentrez&rendertype=abstract (February 17, 2016).
Weisskopf, M G, E P Bauer, and J E LeDoux. 1999. "L-Type Voltage-Gated Calcium Channels Mediate NMDA-Independent Associative Long-Term Potentiation at Thalamic Input Synapses to the Amygdala." *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 19(23): 10512–19. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10575047 (December 25, 2015).
Willner, P. 1984. "The Validity of Animal Models of Depression." *Psychopharmacology* 83(1): 1–16. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6429692 (February 2, 2016).
WINTER, C A, E A RISLEY, and G W NUSS. 1962. "Carrageenin-Induced Edema in Hind Paw of the Rat as an Assay for Antiiflammatory Drugs." *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine. Society for Experimental Biology and Medicine*

(New York, N.Y.) 111: 544–47. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14001233 (August 12, 2015).

Wittchen, Hans-Ulrich, Stephan Mühlig, and Katja Beesdo. 2003. "Mental Disorders in Primary Care." *Dialogues in clinical neuroscience* 5(2): 115–28. http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3181625&tool=pmcentrez&rendertype=abstract (February 17, 2016).

Wong, Hon Kit et al. 2008. "Blocking Acid-Sensing Ion Channel 1 Alleviates Huntington's Disease Pathology via an Ubiquitin-Proteasome System-Dependent Mechanism." *Human molecular genetics* 17(20): 3223–35. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18658163 (March 1, 2016).

Xiao, Wen Hua et al. 2009. "Olesoxime (cholest-4-En-3-One, Oxime): Analgesic and Neuroprotective Effects in a Rat Model of Painful Peripheral Neuropathy Produced by the Chemotherapeutic Agent, Paclitaxel." *Pain* 147(1-3): 202–9. http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2787910&tool=pmcentrez&rendertype=abstract (March 2, 2016).

Yalcin, Ipek et al. 2008. "Effects of 5,7-Dihydroxytryptamine Lesion of the Dorsal Raphe Nucleus on the Antidepressant-like Action of Tramadol in the Unpredictable Chronic Mild Stress in Mice." *Psychopharmacology* 200(4): 497–507.

———. 2009. "Beta(2)-Adrenoceptors Are Critical for Antidepressant Treatment of Neuropathic Pain." *Annals of neurology* 65(2): 218–25. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19259968.

———. 2011. "A Time-Dependent History of Mood Disorders in a Murine Model of Neuropathic Pain." *Biological psychiatry* 70(10): 946–53. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21890110 (February 26, 2016).

Yang, S et al. 1998. "Different GABA-Receptor Types Are Involved in the 5-HT-Induced Antinociception at the Spinal Level: A Behavioral Study." *Life sciences* 62(11): PL143–48. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9515562 (February 13, 2016).

Yizhar, Ofer et al. 2011. "Neocortical Excitation/inhibition Balance in Information Processing and Social Dysfunction." *Nature* 477(7363): 171–78. http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4155501&tool=pmcentrez&rendertype=abstract (July 11, 2014).

Yoshimura, M, and S Nishi. 1995. "Primary Afferent-Evoked Glycine- and GABA-Mediated IPSPs in Substantia Gelatinosa Neurones in the Rat Spinal Cord in Vitro." *The Journal of physiology* 482 (Pt 1: 29–38. http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1157751&tool=pmcentrez&rendertype=abstract (February 13, 2016).

Yoshimura, Masakazu, and Norifumi Yonehara. 2006. "Alteration in Sensitivity of Ionotropic Glutamate Receptors and Tachykinin Receptors in Spinal Cord Contribute to Development and Maintenance of Nerve Injury-Evoked Neuropathic Pain." *Neuroscience research* 56(1): 21–28. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16901566 (February 16, 2016).

Zhang, Zhi, and Qian-Quan Sun. 2011. "The Balance between Excitation and Inhibition and Functional Sensory Processing in the Somatosensory Cortex." *International review of neurobiology* 97: 305–33. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21708316 (February 14, 2016).

Zhao, Zuowei, Yong Yang, David L Walker, and Michael Davis. 2009. "Effects of Substance P in the Amygdala, Ventromedial Hypothalamus, and Periaqueductal Gray on Fear-Potentiated Startle." *Neuropsychopharmacology : official publication of the American College of Neuropsychopharmacology* 34(2): 331–40.

http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3792658&tool=pmcentrez&rendertype=abstract (February 14, 2016).
Zhuang, X et al. 1999. "Altered Emotional States in Knockout Mice Lacking 5-HT1A or 5-HT1B Receptors." *Neuropsychopharmacology : official publication of the American College of Neuropsychopharmacology* 21(2 Suppl): 52S – 60S. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10432489 (February 21, 2016).
Zhuo, Min. 2008. "Cortical Excitation and Chronic Pain." *Trends in neurosciences* 31(4): 199–207. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18329111 (February 17, 2016).
Zimmerman, M, W McDermut, and J I Mattia. 2000. "Frequency of Anxiety Disorders in Psychiatric Outpatients with Major Depressive Disorder." *The American journal of psychiatry* 157(8): 1337–40. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10910803 (February 17, 2016).
Zung, W W. "A Rating Instrument for Anxiety Disorders." *Psychosomatics* 12(6): 371–79. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/5172928 (January 24, 2016).
Hokfelt T, Zhang X, Wiesenfeld-Hallin Z (1994) Messenger plasticity in primary sensory neurons following axotomy and its functional implications. Trends Neurosci 17:22-30.
Holmes

UNIVERSITÉ DE STRASBOURG

Nisrine KAMOUN

Bénéfice thérapeutique d'un traitement par l'étifoxine (stresam™) dans les neuropathies accompagnées de comorbidités anxiodépressives: Etude préclinique chez la souris

École Doctorale des Sciences de la Vie et de la Santé STRASBOURG

Résumé

La douleur neuropathique est un syndrome secondaire à une maladie ou à une lésion affectant le système nerveux somatosensoriel. Les causes biologiques de ces comorbidités ne sont pas clairement établies. En utilisant un modèle murin de douleur neuropathique, nous avons cherché à amplifier l'inhibition nerveuse médiée par les récepteurs GABAA afin de tenter de réduire les symptômes douloureux neuropathiques et les troubles émotionnels associés. Pour cela nous avons utilisé l'étifoxine, un **anxiolytique non benzodiazépinique** qui possède une action originale sur les récepteurs GABAA mais, surtout, semble avoir des effets secondaires limités comparativement à d'autres molécules comme les benzodiazépines par exemple. Son effet passe par la potentialisation directe du récepteur GABAA (site modulateur situé sur les sous-unités β2 et β3) mais aussi par une action indirecte : la stimulation de la production de **neurostéroïdes** 3α-réduits capables de potentialiser la fonction des récepteurs GABAA . Quelques rares études ont montré que les neurostéroïdes endogènes, surtout ceux réduits en position 3α comme l'allopregnanolone **(THP, allotétrahydroprogestérone)** ou **le THDOC (tétrahydrodéoxycorticostérone)**, pouvaient réduire les symptômes douloureux. Les effets obtenus dans ces études sont similaires à ceux issus d'injections exogènes des mêmes composés.

Mots clés :

Douleur neuropathique, les récepteurs GABAA, les anxiolytiques non benzodiazépiniques, les neurostéroïdes, etifoxine

Résumé en anglais

Neuropathic pain is associated with significant co-morbidity, including anxiety and depression, which impact considerably on the overall patient experience. Several lines of evidence suggest that anxiolytics may be of interest to alleviate pain symptoms and the associated negative emotions in chronic pain states. Among them, the non-benzodiazepine anxiolytic etifoxine (EFX: stresam™) has an interesting pharmacological profile. In patients, it has a weak sedative action, with limited functional tolerance and dependence, and without cognitive declines. In this study, we aim at analyzing the preclinical therapeutic potential of etifoxine on the anxiodepressive consequences of neuropathic pain.

Keywords :
Neuropathic pain, the non-benzodiazepine anxiolytic, etifoxine