HAL
open science

Traitement d'une douleur neuropathique par la modulation pharmacologique du complexe basolatéral de l'amygdale

Alexandre Zeitler

To cite this version:

Alexandre Zeitler. Traitement d'une douleur neuropathique par la modulation pharmacologique du complexe basolatéral de l'amygdale. Neurosciences [q-bio.NC]. Université de Strasbourg, 2013. Français. NNT : 2013STRAJ115 . tel-01149108

HAL Id: tel-01149108

https://theses.hal.science/tel-01149108

Submitted on 6 May 2015

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

Université de Strasbourg

Faculté des Sciences de la Vie

THESE

Pour obtenir le grade de

Docteur de l'Université de Strasbourg

Discipline : Sciences du vivant

Spécialité : Neurosciences

Présentée par

Alexandre ZEITLER

Traitement d'une douleur neuropathique par la modulation pharmacologique du complexe basolatéral de l'amygdale

Soutenue publiquement le 21 mars 2013

Membres du jury :

Pr. Ron STOOP	Rapporteur externe
Pr. Fernand ANTON	Rapporteur externe
Dr. Pierre VEINANTE	Rapporteur interne
Dr. Pascal DARBON	Directeur de thèse

Remerciements

Tout d'abord, je remercie sincèrement le Pr Ron Stoop, le Pr Fernand Anton, ainsi que le Dr Pierre Veinante d'avoir accepté de faire partie de mon jury de thèse et d'avoir consacré une partie de leur temps à l'évaluation de mes travaux.

Je remercie très chaleureusement le Dr Pascal Darbon pour m'avoir encadré tout au long de cette thèse et pendant le stage de Master. Merci pour ta bonne humeur de tous les jours, pour tes encouragements dans les moments difficiles, et surtout pour ton aide précieuse et les nombreuses discussions durant la rédaction de ce manuscrit. Merci aussi pour m'avoir motivé lors de mes moments de nonchalance apparente…Enfin merci de m'avoir donné l'opportunité de pouvoir faire de l'enseignement pendant ma thèse, ce qui fut pour moi une expérience enrichissante.

Merci au Pr Pierrick Poisbeau pour m'avoir fait confiance et accueilli au sein de son équipe dès le stage de Master. Merci pour les discussions passionnantes, et passionnées, qui ont souvent débouchées sur de bonnes idées de manip.

De manière générale, merci à tous les membres, présents ou passés, de l'équipe « Exploration fonctionnelle de la douleur », notamment à Vivien, Pierre-Eric, Maya et Alex. Merci également aux membres de l'IPCB, pour leur aide technique, ainsi qu'aux autres doctorants, Florent, Romain, Salim et Fred. Merci d'avoir agrémenté les pauses de bonnes rigolades. Et de manière générale, merci à tous les membres de l'INCI que j'ai pu côtoyer de près ou de loin, notamment Dominique (ou Dom') pour son aide très précieuse lors de mon apprentissage de la chirurgie.

Merci également à tous les membres des « Mygales détendues », donc certains ont déjà été cités plus-haut ! Ce fut un plaisir de pouvoir jouer avec vous pendant les nombreuses fêtes de l'INCI et lors des fêtes de la musique.

Un grand merci à tous mes amis du monde des Neurosciences, notamment ceux de ma promotion, à savoir ; Laetitia, Antoine, Joseph, Romain, Vivien, Sarah, Michaël, Paul et Laurent. Merci pour tous les excellents moments passés en dehors du labo pendant le master et pendant la thèse, avec entre autres, les nombreuses soirées au Happy, les nombreux apéros en terrasse à la sortie du labo, les randos dans les Vosges, les après-

Remerciements

midis piscine, les vacances (enfin, le congrès…) à Barcelone, et tout le reste que j'oublie, la liste serait trop longue ! Pour ceux dont la thèse est terminée et le post-doc (ou les vacances post-thèse) ont déjà commencé, je vous souhaite beaucoup de bonheur et de réussite dans votre nouvelle vie. Pour les autres il vous reste encore quelques mois, alors bon courage pour la fin, je serai aussi là pour vous pendant l'épreuve de rédaction de thèse !

Merci également à tous mes autres amis de l'INCI, notamment aux organisateurs des rencontres du vendredi soir : Pauline, Seb, David et Joseph. Quelle meilleure façon de commencer le weekend qu'en allant boire un verre aux rencontres ? Pauline et Seb, merci aussi pour les super repas au RU, les nombreux cafés, et tout le reste ! Edith, merci ta bonne humeur, pour les bonnes rigolades en TP grenouilles et pour l'initiation à l'escalade ! Merci également à Anaïs, la petite dernière de l'équipe Poulain, d'être toujours si souriante et pour ton soutien, et à Coralie, la reine de l'organisation de soirée, à la Lolita, au théâtre ou encore à la gravière.

Merci à mes amis de (très) longue date, Hervé, Quentin, Mathieu, et Robin, pour leur soutien et pour m'avoir permis d'améliorer ma pédagogie en essayant de leur expliquer le sens de mes recherches !

De manière générale je vous remercie tous pour votre soutien, ô combien important au cours d'une thèse.

Merci aussi à tous les membres, anciens ou nouveaux, du collectif Doctoneuro. Que de bons moments passés lors des fêtes de la Science, des pièces de théâtre, des séminaires-apéros, et surtout lors des weekends (scientifiques) !! Participer à la vie de ce collectif a été pour moi un des nombreux à-côtés agréables de la thèse.

Enfin, je remercie mes parents pour leur soutien et pour m'avoir permis de faire ces études.

Et bien sûr, un immense merci à Hélène, qui est à mes côtés depuis maintenant 5 ans et avec qui je peux m'épanouir. Merci pour ton soutien quotidien inconditionnel, c'est ce qui m'aide à toujours aller de l'avant.

Table des matières

Liste des abréviations....5
Publications et communications....7
Table des illustrations....9
Résumé....13

Introduction....17

I. Description de la structure amygdalienne....19
I.1. Découverte de la structure....19
I.2. Anatomie de la structure....21
I.2.a. Introduction....21
I.2.b. Le groupe basolatéral....21
I.2.c. Le groupe des noyaux corticaux....23
I.2.d. Le groupe centromédian....23
I.2.e. Les autres noyaux de l'amygdale....23
I.2.f. L'amygdale étendue....23
I.3. Afférences de l'amygdale....25
I.3.a. Afférences du complexe basolatéral de l'amygdale....25
I.3.b. Afférences du noyau central de l'amygdale....27
I.4. Efférences de l'amygdale....29
I.4.a. Efférences du complexe basolatéral de l'amygdale....29
I.4.b. Efférences du noyau central de l'amygdale....31
I.5. Connexions intra-amygdaloïdes....31

II. Morphologie et neurochimie des neurones de l'amygdale....35
II.1. Morphologie des neurones....35
II.1.a. Dans le complexe basolatéral de l'amygdale....35
II.1.b. Dans le noyau central de l'amygdale....37
II.2. Neurochimie et pharmacologie des neurones et de leurs terminaisons..37
II.2.a. Dans le complexe basolatéral de l'amygdale....37
II.2.b. Dans le noyau central de l'amygdale....43

III. Implications physiologiques de l'amygdale....47
III.1. Amygdale et émotions....47
III.2. Amygdale et peur conditionnée....49
III.3. Amygdale et douleur....53

IV. La douleur....57
IV.1. Qu'est-ce que la douleur ?....57
IV.1.a. Définition....57
IV.1.b. Douleur aiguë et douleur chronique....59
IV.1.c. La douleur neuropathique....61
IV.1.d. Mesure de la douleur neuropathique chez l'animal....65
IV.2. Traitements actuels de la douleur....67
IV.2.a. Traitements pharmacologiques de la douleur aiguë....67
IV.2.b. Traitements pharmacologiques de la douleur neuropathique....69
IV.2.c. Alternative aux traitements classiques des douleurs neuropathiques....71
IV.3. Les voies neuroanatomiques de la douleur....75
IV.3.a. L'intégration du message nociceptif....75
IV.3.b. Les voies nociceptives ascendantes....79

Table des matières

IV.3.c. Les contrôles nociceptifs descendants.....81
IV.3.d. Localisation de l'amygdale dans les voies nociceptives.....83

Objectifs 87

Matériels et méthodes 93

Partie I : Evaluation comportementale de la douleur..... 95
I. Animaux 95
II. Implantation des canules..... 95
III. Modèle de douleur neuropathique 97
IV. Injection dans les canules..... 97
V. Evaluation de la sensibilité nociceptive mécanique 99
VI. Prélèvement des cerveaux pour vérification histologique 101
VII. Protocoles utilisés 101
VIII. Préparation des substances pharmacologiques..... 101
IX. Statistiques..... 103

Partie II : Enregistrements électrophysiologiques *in vitro*..... 105
I. Animaux 105
II. Anesthésie des animaux..... 105
III. Protocole de dissection 105
IV. Préparation des tranches 107
V. Le montage expérimental 107
V.1. Dispositif de patch-clamp « en aveugle » 109
V.2. Dispositif de patch-clamp infrarouge..... 109
VI. Enregistrements électrophysiologiques 109
VI.1. Les pipettes et les solutions d'enregistrement 109
VI.2. Le patch-clamp 111
VI.3. L'acquisition des données..... 113
VII. Préparation et utilisation des substances pharmacologiques..... 113
VIII. Contrôle de la morphologie et la connectivité des neurones enregistrés..... 115
IX. Analyse des enregistrements 115
X. Statistiques..... 117

Résultats..... 119

Partie I : Etude de l'implication du BLA dans la régulation du comportement douloureux..... 121
I. Modulation pharmacologique des seuils nociceptifs mécaniques par infusion dans le BLA d'animaux sains..... 121
II. Modulation pharmacologique des seuils nociceptifs mécaniques par infusion dans le BLA d'animaux neuropathiques 123
II.1. Validation du modèle de douleur neuropathique : modèle du « cuff »... 123
II.2. Implication de la transmission synaptique inhibitrice GABAergique..... 123
II.3. Conséquence de la potentialisation de la transmission synaptique inhibitrice GABAergique..... 125

Table des matières

II.4. Implication de la transmission synaptique excitatrice glutamatergique . 127
III. Action de l'étifoxine sur le comportement douloureux..... 129
III.1. Action de l'EFX sur des animaux sains 129
III.2. Action de l'EFX sur des animaux neuropathiques..... 131
IV. Implication des neurostéroïdes dans le processus anti-allodynique 131
IV.1. Action du DZP sur des animaux neuropathiques traités au finastéride 133
IV.2. Action de l'EFX sur des animaux neuropathiques traités au finastéride 133

Partie II : Action électrophysiologique de l'étifoxine sur les neurones du BLA.....137
I. Etude des effets de l'étifoxine sur l'excitabilité des neurones du BLA 137
I.1. Profils de décharge en condition contrôle 137
I.2. Action de l'EFX sur les profils de décharge..... 139
II. Etude des effets de l'étifoxine sur l'activité synaptique spontanée 141
II.1. Transmission synaptique spontanée en condition contrôle..... 141
II.2. Transmission synaptique spontanée en présence d'EFX 143
III. Etude des effets de l'étifoxine sur l'activité synaptique inhibitrice miniature..... 145
III.1. Application d'EFX en condition contrôle..... 145
III.1.a. Effet sur l'amplitude.....149
III.1.b. Effet sur la fréquence 149
III.1.c. Effet sur la constante de déactivation 151
III.1.d. Combinaison des effets.....151
III.2. Application d'EFX en présence de finastéride..... 153
III.3. Comparaison des effets de l'EFX avec ceux du diazépam 155
IV. Morphologie et connectivité des neurones enregistrés..... 155

Discussion 159
I. Existence d'un contrôle tonique amygdalien de la douleur 163
II. Le BLA pilote le contrôle tonique amygdalien..... 163
III. Le contrôle du BLA est dépendant de l'équilibre excitation/inhibition .. 167
IV. L'étifoxine module l'équilibre excitation/inhibition *via* son action neurostéroïdogène 169
IV.1. Etude de son action comportementale 169
IV.2. Etude de son action cellulaire et moléculaire..... 173

Conclusion et perspectives 179

Références 187

Liste des abréviations

0

3α-HSD : 3α -hydroxystéroïde déshydrogénase

A

ACSF : liquide cérébrospinal artificiel

AMPA : acide α-amino-3-hydroxy-5-méthyl-4-isoxazolépropionique

ATP : adénosine tri-phosphate

B

BDNF : brain derived neurotrophic factor

BLA : complexe basolatéral de l'amygdale

BNST : noyau du lit de la strie terminale

BL : noyau basal de l'amygdale

C

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

CV : coefficient de variation

D

DMSO : diméthylsulfoxyde

DZP : diazépam

E

EFX : étifoxine

F

FITC : fluorescéine isothiocyanate

FIN : finastéride

G

GABA : acide gamma-amino butyrique

GAD : acide glutamique décarboxylase

GDNF : glial-cell derived neurotrophic factor

GTP : guanosine tri-phosphate

H

HEPES : acide 4-(2-hydroxyéthyl)-1-pipérazine éthane sulfonique

I

IASP : association internationale pour l'étude de la douleur

L

LA : noyau latéral de l'amygdale

N

NGF : nerve growth factor

NMDA : N-méthyl-D-aspartate

NTS : noyau du tractus solitaire

O

OMS : organisation mondiale de la santé

P

PA : potentiel d'action

PAG : substance grise périaqueducale

PB : noyau parabrachial

PBR : peripheral benzodiazepine receptor

PBS : phosphate buffered saline

PLT : potentialisation à long terme

R

RVM : bulbe rostro-ventro-médian

S

SEM : erreur standard à la moyenne

T

THDOC : 3α-5α-tétrahydrodéoxycorticostérone

TPMPA : acide (1,2,5,6-tétrahydropyridin-4-yl) méthylphosphinique

TrkB : tyrosine-related kinase B

TSPO : translocator protein

V

VIH : virus de l'immunodéficience humaine

Vm : potentiel membranaire de repos

W

WDR : wide dynamic range

Publications et communications

Publications de thèse :

- **Zeitler A**, Sage-Ciocca D, Poisbeau P, Darbon P.
  The Basolateral complex of Amygdala neuronal network activity sets mechanical pain threshold.
  European Journal of Pain, **2013**, pour soumission.

- **Zeitler A**, Poisbeau P, Darbon P.
  Application of Etifoxine in the Basolateral complex of Amygdala is anti-nociceptive.
  A écrire.

Publication de thèse issue d'une collaboration :

- Zell V, Prévot M, **Zeitler A**, Juif PE, Poisbeau P, Darbon P.
  Persistent sodium current blockade alters coding properties of lamina II spinal cord interneurons.
  The Journal of Physiology, **2013**, pour soumission.

Communications affichées :

- **Zeitler A**, Poisbeau P, Darbon P.
  Modulation of the GABAergic system in the basolateral complex of the Amygdala: Action of the anxiolytic drug Etifoxine.
  Congrès annuel de la SSN (Swiss Society for Neuroscience), mars 2011, Bâle (Suisse).

- **Zeitler A**, Sage-Ciocca D, Poisbeau P, Darbon P.
  Modulation of inhibitory synaptic transmission in Basolateral Amygdala alters pain threshold.
  Forum FENS 2012 (Federation of European Neuroscience Societies), juillet 2012, Barcelone (Espagne).
  Bourse de la Société des Neurosciences Françaises.

Table des illustrations

Introduction

Figure 1 : Première illustration de l'amygdale dans le cerveau humain par Burdach (1819) 18
Figure 2 : Les noyaux du groupe basolatéral de l'amygdale chez la souris 20
Figure 3 : Le groupe des noyaux corticaux de l'amygdale chez la souris 22
Figure 4 : les noyaux du groupe centromédian de l'amygdale chez la souris 22
Figure 5 : Les noyaux annexes de l'amygdale chez la souris 24
Figure 6 : Résumé des afférences et efférences principales de l'amygdale 32
Figure 7 : Illustration d'un neurone de projection du BLA rempli avec de la biocytine 34
Figure 8 : Illustration d'interneurones du BLA exprimant des protéines liant le calcium 34
Figure 9 : Marquage des neurones exprimant la GAD_{65} dans un cerveau de souris 38
Tableau 1 : Définitions des termes couramment utilisés dans l'étude de la douleur 60
Figure 10 : Echelle thérapeutique de la douleur définie par l'OMS 66
Figure 11 : Etapes de la neurostéroïdogenèse et actions de l'EFX 70
Tableau 2 : Expression d'enzymes de la neurostéroïdogenèse dans les structures du système nerveux central de rongeurs 72
Figure 12 : Principales voies ascendantes nociceptives 78

Matériels et méthodes

Partie I : Evaluation comportementale de la douleur

Figure 13 : Pose d'un « cuff » chez une souris 96
Figure 14 : Illustration de l'évaluation de la sensibilité mécanique avec le test des filaments de von Frey sur une souris 98
Figure 15 : Illustration d'une vérification histologique de l'implantation des canules 100
Figure 16 : Illustration de l'aspect temporel des différents protocoles utilisés en fonction du type de groupe d'animaux 102

Partie II : Enregistrements électrophysiologiques *in vitro*

Figure 17 : Coupe coronale de cerveau de souris avec une coloration au crésyl violet 108
Figure 18 : Détection des courants post-synaptiques à l'aide du logiciel WinEDR 114
Figure 19 : Contrôle manuel des évènements détectés automatiquement par le logiciel WinEDR 116

Table des illustrations

Résultats

Partie I : Etude de l'implication du BLA dans la régulation du comportement douloureux

Figure 20 : Effet d'une injection de bicuculline dans le BLA sur la sensibilité mécanique chez des animaux sains 120

Figure 21 : Validation du modèle du « cuff »..... 122

Figure 22 : Effet d'une injection de bicuculline dans le BLA sur la sensibilité mécanique chez des animaux neuropathiques 122

Figure 23 : Test d'une injection de diazépam à deux concentrations différentes dans le BLA d'animaux neuropathiques 124

Figure 24 : Effet d'une injection de diazépam dans le BLA sur le comportement nociceptif d'animaux neuropathiques 124

Figure 25 : Effet d'une injection de MK-801 dans le BLA sur le comportement nociceptif d'animaux neuropathiques 126

Figure 26 : Effet d'une injection d'étifoxine dans le BLA d'animaux sains 128

Figure 27 : Effet d'une injection d'étifoxine dans le BLA d'animaux neuropathiques 130

Figure 28 : Effet de l'injection de diazépam chez des animaux neuropathiques traités au finastéride 132

Figure 29 : Effet de l'injection d'étifoxine chez des animaux neuropathiques traités au finastéride 132

Partie II : Action électrophysiologique de l'étifoxine sur les neurones du BLA

Figure 30 : Les différents profils de décharge des neurones du BLA 136

Tableau 3 : Caractéristiques des profils de décharge des neurones du BLA en condition contrôle 138

Tableau 4 : Caractéristiques des CPSIs et des CPSEs du BLA en condition contrôle .. 140

Figure 31 : Identification pharmacologique des CPSIs 140

Figure 32 : Identification pharmacologique des CPSEs 140

Tableau 5 : Effets de l'EFX sur la transmission synaptique inhibitrice spontanée 142

Tableau 6 : Effets de l'EFX sur la transmission synaptique inhibitrice spontanée 144

Figure 33 : Illustration de l'application d'EFX sur une cellule 144

Tableau 7 : Effets de l'EFX à 30 µM sur la transmission synaptique inhibitrice miniature 146

Figure 34 : Effet de l'EFX sur l'amplitude des mCPSIs 146

Figure 35 : Effet de l'EFX sur la fréquence des mCPSIs..... 147

Tableau 8 : Représentation de l'hétérogénéité des effets de l'EFX sur les mCPSIs 147

Figure 36 : Illustration de l'augmentation de la cinétique des mCPSIs pour une cellule 150

Table des illustrations

Figure 37 : Effet de l'EFX sur la constante de déactivation des mCPSIs.....150
Tableau 9 : Effets de l'EFX sur les paramètres des mCPSIs en présence de Finastéride 152
Figure 38 : Effet de l'EFX sur la fréquence des mCPSIs en présence de finastéride 152
Tableau 10 : Effets du DZP sur la transmission synaptique inhibitrice miniature.....154
Figure 39 : Exemples de morphologies des neurones du BLA.....156

Discussion

Figure 40 : Le contrôle tonique amygdalien 162
Figure 41 : Illustration de l'action de la balance excitation/inhibition dans le BLA.....180

Résumé

L'amygdale est une structure du système nerveux central impliquée dans l'intégration des émotions comme la peur et l'anxiété. Des études ont également montré que l'amygdale peut moduler de façon positive ou négative la douleur par le biais des projections de son noyau de sortie, le noyau central de l'amygdale (CeA), sur les structures impliquées dans les contrôles nociceptifs descendants. Le complexe basolatéral de l'amygdale (BLA), placé en amont du noyau central, est intimement connecté à ce dernier et peut ainsi réguler son fonctionnement.

Les données obtenues au cours de ma thèse ont montré l'existence d'un contrôle tonique amygdalien de la nociception et de la douleur. A l'aide d'expériences *in vivo* d'injections dans le BLA de souris saines ou neuropathiques, et de mesure de leurs effets sur la sensibilité mécanique des animaux, nous avons pu analyser le fonctionnement de ce contrôle. Ainsi le blocage de l'inhibition dans le BLA conduit à un effet pro-nociceptif. Le blocage de l'excitation induit, quant à lui, un effet analgésique temporaire chez les animaux neuropathiques, et cette même action est observée après la potentialisation de l'inhibition dans la structure. Ces résultats indiquent que le contrôle de la douleur effectué par le BLA est dépendant de l'équilibre entre l'excitation et l'inhibition au sein de la structure.

Par ailleurs, nous nous sommes également intéressés à l'étude précise du mode d'action d'une molécule anxiolytique non benzodiazépinique, l'étifoxine (EFX), et à son effet sur le comportement douloureux. Des travaux précédents au laboratoire avaient déjà montré le potentiel analgésique de cette molécule, lorsqu'elle est injectée par voie intrapéritonéale dans un modèle de douleur neuropathique chimio-induite. Les résultats des injections d'EFX dans le BLA indiquent qu'elle induit une action analgésique chez les animaux neuropathiques, mais ne modifie pas les seuils de sensibilité des animaux sains. Cette action analgésique est dépendante de l'effet indirect neurostéroïdogène de l'EFX. Ceci, associé au fait que l'EFX ne présente pas ou peu d'effets secondaires, en fait une molécule particulièrement intéressante pour un traitement alternatif des douleurs neuropathiques. Dans une dernière partie, nous avons cherché à observer les mécanismes en jeu au niveau cellulaire lorsque l'EFX est appliquée sur les neurones du BLA. Pour cela, nous avons utilisé l'approche électrophysiologique du patch-clamp. Ainsi, nous avons montré que l'EFX potentialise l'inhibition au sein de la structure, *via* trois

Résumé

mécanismes indépendants ; l'augmentation de la fréquence des courants post-synaptiques inhibiteurs miniatures (mCPSIs), l'augmentation de leur amplitude, et l'augmentation de leur constante de déactivation. Ces deux derniers effets sont dépendants de l'action neurostéroïdogène de l'EFX, tandis que l'effet sur la fréquence des mCPSIs est du à l'action de l'EFX sur le récepteur $GABA_A$.

Les résultats de ma thèse ont ainsi permis de montrer l'existence d'un contrôle tonique amygdalien de la douleur, dans le cadre d'animaux neuropathiques, mais également de la nociception, chez des animaux sains. Par ailleurs, la place du complexe basolatéral de l'amygdale, souvent peu prise en compte dans les études sur la douleur, a été redéfinie. Ce complexe doit être pris en considération dans le circuit de la douleur et son rôle de pilote du noyau central de l'amygdale ne doit pas être négligé.

Introduction

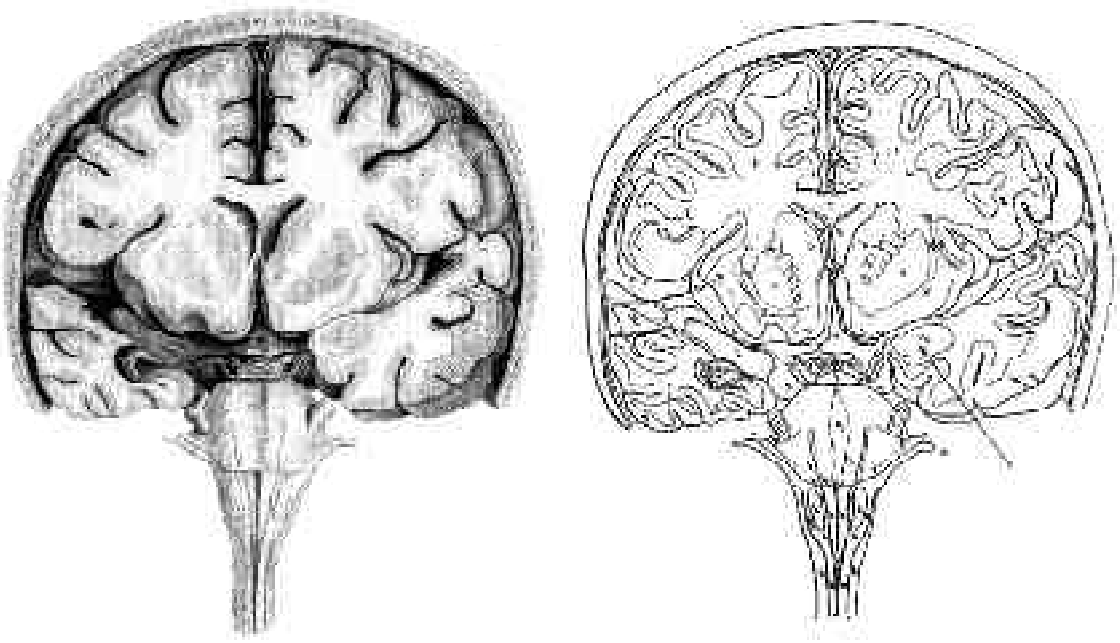


Figure 1 : Première illustration de l'amygdale dans le cerveau humain par Burdach (1819)

Le dessin de droite est le dessin original du cerveau humain réalisé par Burdach. La flèche désigne la localisation de l'amygdale selon ce dernier. En comparant le dessin originel avec un standard moderne (à gauche), on s'aperçoit que l'amygdale de Burdach ne correspondait en réalité qu'au complexe basolatéral (Swanson and Petrovich, 1998).

INTRODUCTION

I. Description de la structure amygdalienne

I.1. Découverte de la structure

L'amygdale ou complexe amygdalien est un noyau pair situé dans la région interne du lobe temporal. Le terme d'amygdale est emprunté au latin *amygdala* « amande », lui-même emprunté au grec ἀμυγδάλη « amande ». C'est le physiologiste Karl Friedrich Burdach qui, le premier, a employé le terme d'*amygdala* pour décrire une formation de matière grise en forme d'amande dans la position antérieure du lobe temporal (Burdach, 1819-1822) (Fig. 1). Une cinquantaine d'années plus tard, l'étude microscopique de la structure par l'anatomiste Theodor Meynert révèle que l'amygdale de Burdach ne représente qu'une partie de l'amygdale (la partie basolatérale), et que l'ensemble de la structure est en réalité plus complexe, hétérogène, et composé de nombreuses sous-régions (Meynert, 1867). Néanmoins, les cinquantes années suivantes seront encore le siège de nombreuses controverses et débats quant à l'origine structurelle de l'amygdale. La plupart des anatomistes s'accordant tout de même sur le fait que l'amygdale semble émaner ventralement du cortex olfactif, *via* le lobe piriforme. Il faudra attendre 1923 pour que le neuroanatomiste John Black Johnston propose une description fondamentale de la structure amygdalienne (Johnston, 1923), qui reste encore celle en vigueur de nos jours. Ainsi, Johnston postule que l'amygdale est divisée en deux groupes de noyaux ; l'un dérivant du système olfactif (noyau central, médian et noyaux corticaux) et l'autre étant un « nouveau » groupe, ne possédant aucune affiliation phylogénétique (noyau latéral et basal). Tout comme Meynert avant lui, Johnston démontre alors le caractère fondamentalement hétérogène de l'amygdale. Les travaux des années suivantes ont ensuite permis de préciser et d'affiner les propos de Johnston en déterminant les afférences et efférences de chaque groupe neuronal et leurs interactions au sein de la structure (Swanson et al., 1998).

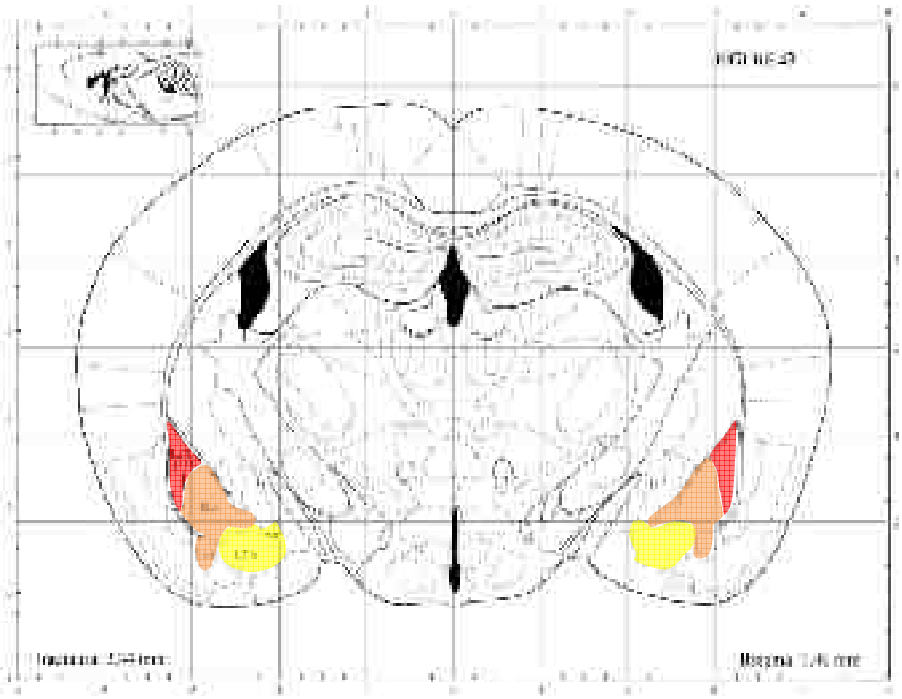


Figure 2 : Les noyaux du groupe basolatéral de l'amygdale chez la souris

Le groupe (ou complexe) basolatéral est constitué du noyau latéral (en rouge), du noyau basal (en orange) et du noyau basomédian (en jaune). Chez la souris, l'ensemble formé par le noyau latéral et le noyau basal est délimité par la séparation de la capsule externe. BLA = noyau basal antérieur, BLV = noyau basal ventral, BMA = noyau basomédian antérieur, BMP = noyau basomédian postérieur, LaDL = noyau latéral partie dorsolatérale, LaVL = noyau latéral partie ventrolatérale (Paxinos and Watson, 2001).

I.2. Anatomie de la structure

I.2.a. Introduction

Le complexe amygdaloïde est une structure hétérogène située dans le lobe temporal et constituée d'une douzaine de noyaux, selon la nomenclature considérée. Ces noyaux se distinguent principalement entre eux selon leur cytoarchitecture, leur nature neurochimique ou encore les connections qu'ils réalisent (Pitkänen, 2000). La plupart des études de l'anatomie de la structure ont été réalisées chez le rat (Alheid et al., 1995; Pitkänen et al., 1997; McDonald, 1998), bien qu'elle ait également été étudiée chez le singe (Pitkänen and Amaral, 1998) et le chat (Price et al., 1987). Malgré quelques différences dans l'organisation et la taille relative des différents noyaux, la structure de l'amygdale est similaire chez les différentes espèces. Le modèle animal utilisé durant ma thèse étant la souris, j'utiliserai essentiellement les illustrations anatomiques disponibles chez cette espèce (Paxinos and Watson, 2001) afin de présenter la structure amygdalienne. Ainsi, les noyaux de l'amygdale se divisent en trois principaux groupes : le groupe basolatéral, le groupe des noyaux superficiels ou corticaux, et le groupe centromédian. Enfin, il subsiste un certain nombre de noyaux qui ne sont pas intégrés dans les groupes précédemment définis.

I.2.b. 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) (Fig. 2). 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 (Fig 2).

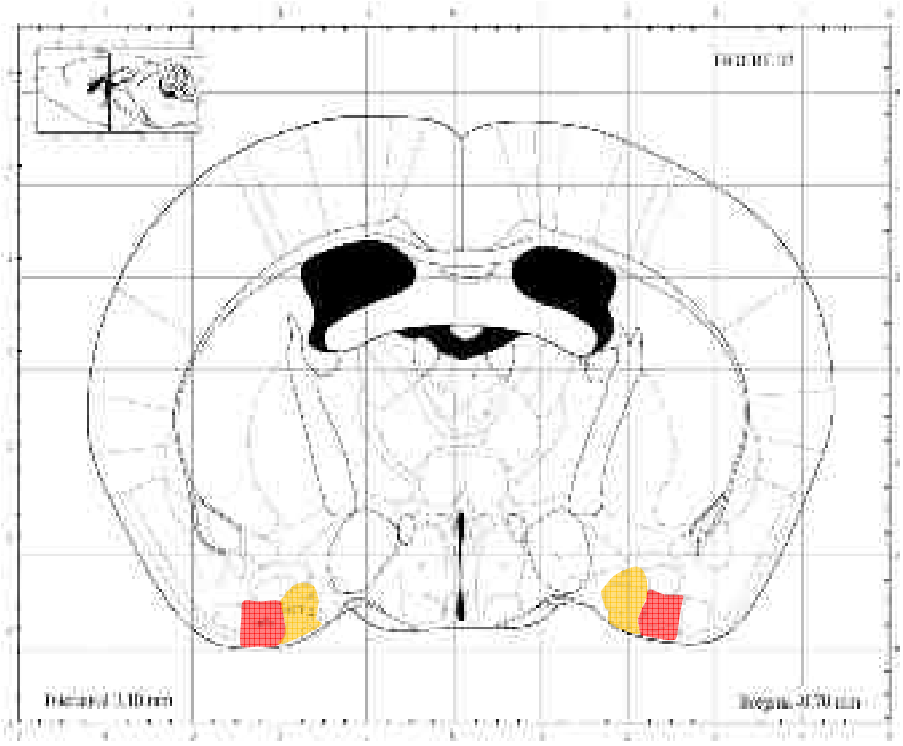


Figure 3 : Le groupe des noyaux corticaux de l'amygdale chez la souris

Le groupe des noyaux corticaux est composé du noyau du tractus olfactif latéral (en orange), du noyau du lit du tractus olfactif (non-visible sur l'illustration) et des noyaux corticaux antérieur (en rouge) et postérieur (non-visible sur l'illustration). ACo = noyau cortical antérieur, LOT = noyau du tractus olfactif latéral (Paxinos and Watson, 2001).

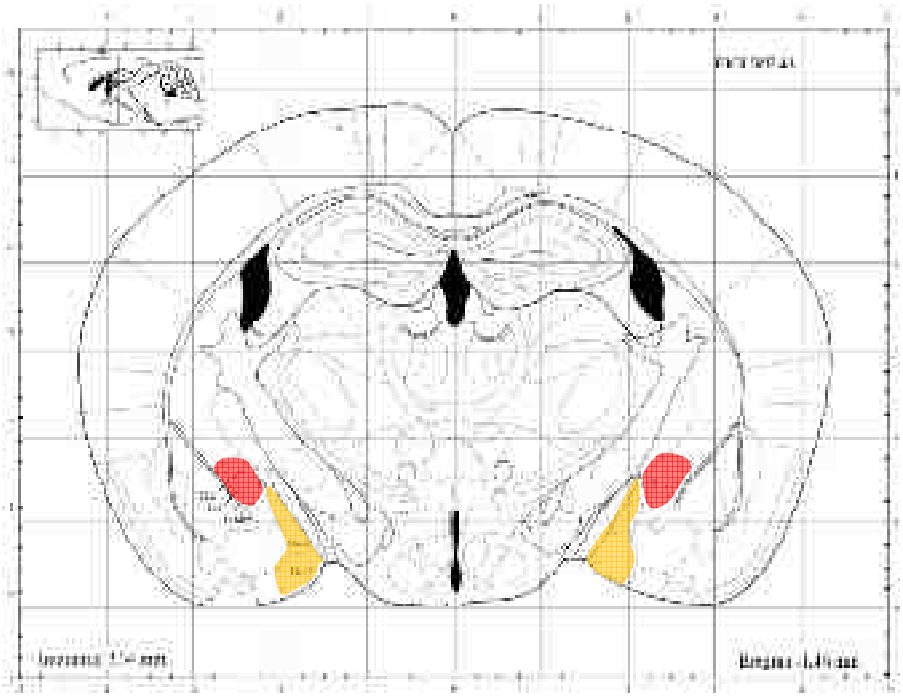


Figure 4 : Les noyaux du groupe centromédian de l'amygdale chez la souris

Le groupe centromédian est constitué du noyau central (en rouge) et du noyau médian (en orange). Le noyau central est le noyau principal de ce groupe et se divise en 3 parties : la partie capsulaire, la partie latérale et la partie médiane. CeC = noyau central partie capsulaire, CeL = noyau central partie latérale, CeMPV = noyau central partie médiane, MePD = noyau médian partie dorsale, MePV = noyau médian partie ventrale (Paxinos and Watson, 2001).

I.2.c. 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 et al., 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 (Fig. 3).

I.2.d. Le groupe centromédian

Le groupe centromédian est, au même titre que le groupe basolatéral, un groupe important du complexe amygdalien. Il 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 (Fig. 4). Le noyau central est généralement défini comme étant le noyau de sortie de l'amygdale (Pitkänen, 2000).

I.2.e. Les autres noyaux de l'amygdale

Il subsiste un dernier groupe de noyaux, qui ont été définis comme faisant partie de l'amygdale (Pitkänen et al., 1997), mais qui ne s'intègrent pas dans les groupes cités précédemment en raison de leurs caractéristiques anatomo-fonctionnelles. Ce groupe annexe est ainsi constitué de l'aire de l'amygdale antérieure, de l'aire amygdalo-hippocampique et des noyaux (ou « masses ») intercalé(e)s (Fig. 5). 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.

I.2.f. L'amygdale étendue

Bien que la classification décrite précédemment est acceptée et est celle utilisée par la plupart des groupes de recherche travaillant sur l'amygdale, quelques auteurs ont proposé une classification différente. Initialement, Alheid et Heimer, qui se sont basés sur les projections des noyaux de l'amygdale, et notamment du noyau central, avaient

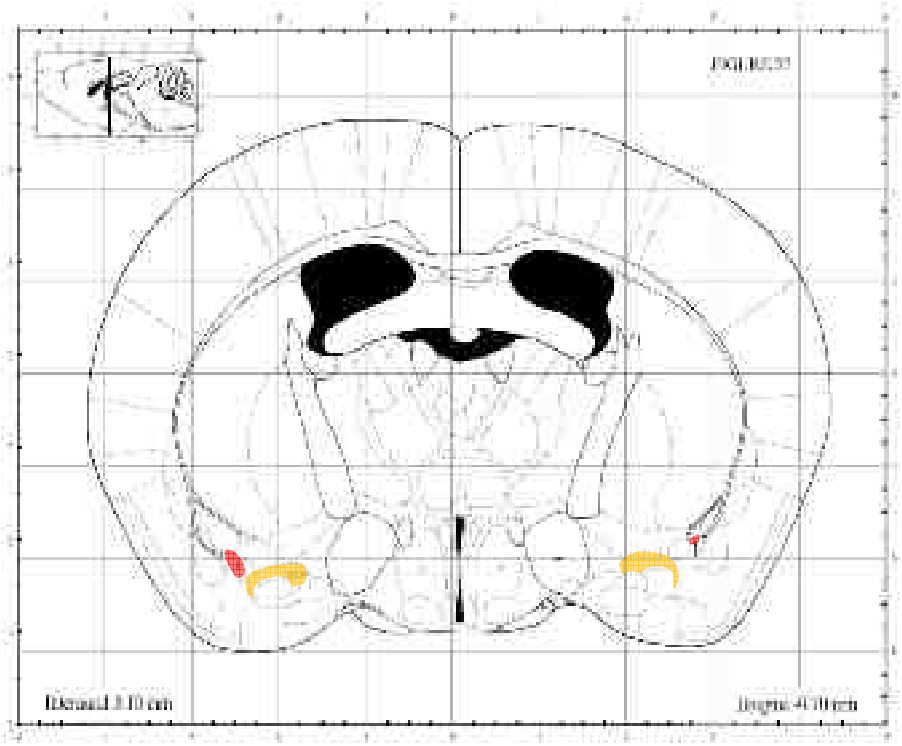


Figure 5 : Les noyaux annexes de l'amygdale chez la souris

L'amygdale est également constituée de quelques noyaux qui ne s'intègrent dans aucun des groupes cités précédemment, en raison de leurs caractéristiques. Ce groupe est composé de l'aire de l'amygdale antérieure (en orange), de l'aire amygdalo-hippocampique (non-visible sur l'illustration) et des noyaux (ou « masses ») intercalé(e)s (en rouge). AAD = aire de l'amygdale antérieure, I = masses intercallées (Paxinos and Watson, 2001).

suggeré d'étendre l'amygdale rostralement et médialement (Alheid and Heimer, 1988). Ainsi, ils ont proposé que la partie latérale du noyau du lit de la strie terminale (BNST) et la partie dorsale de la substance innominée soient associées à l'amygdale. En effet, ces deux noyaux possèdent une organisation et des projections similaires au noyau central de l'amygdale. Quelques autres groupes scientifiques vont également dans ce sens et décrivent cet ensemble de structures sous le terme d' « amygdale étendue » (Cassell et al., 1999; McDonald et al., 1999). Les fonctions du CeA étant vraisemblablement liées à ce circuit structurel plus vaste, le terme d'amygdale étendue est aujourd'hui couramment employé dans la littérature.

I.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 et al., 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.

I.3.a. Afférences du complexe basolatéral de l'amygdale

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 (Fig. 6).

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 (Scalia and Winans, 1975; Luskin and Price, 1983).

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 (LeDoux et al., 1990, 1991). De la même manière, les informations visuelles proviennent du thalamus et des aires visuelles secondaires et connectent également le noyau latéral de l'amygdale (Shi and Davis, 2001). L'ensemble de ces connections est particulièrement important dans le processus de peur conditionnée, qui sera développé la seconde partie du chapitre III, « amygdale et peur conditionnée ».

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 (Shi and Cassell, 1998). Des informations somatosensorielles arrivent également à l'amygdale *via* des projections du noyau parabrachial du pont, et des noyaux géniculé médian et intralaminaire postérieur du thalamus, qui sont impliqués dans les circuits véhiculant la transmission de l'information nociceptive (Bernard et al., 1989; Bordi and LeDoux, 1994). Ces noyaux connectent l'amygdale *via* le noyau latéral et le noyau basomédian de l'amygdale (Bernard et al., 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 et al., 1996). La seconde partie des informations polymodales proviennent des structures impliquées dans la mémoire déclarative à long terme : le cortex périrhinal, le cortex entorhinal, le cortex parahippocampique et l'hippocampe (Milner et al., 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).

I.3.b. 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 (Scalia and Winans, 1975; Luskin and Price, 1983; LeDoux et al., 1990, 1991).

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 et al., 1993).

Les informations visuelles proviennent du thalamus et des aires visuelles secondaires et connectent la partie latérale du noyau central de l'amygdale (Shi and Davis, 2001).

Pour les informations somatosensorielles, la plupart des afférences proviennent des aires somatosensorielles primaires et connectent le noyau central (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 et al., 1993).

Le noyau central reçoit, tout comme le BLA, des informations polymodales de la part du cortex préfrontal (Mcdonald et al., 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, il 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 et al., 1995; Cassell et al., 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 inclut le CeA dans la voie spino-parabrachio-amygdaloïde, qui est une voie spécifique de la douleur (Bernard et al., 1993).

I.4. Efférences de l'amygdale

I.4.a. Efférences du complexe basolatéral de l'amygdale

Si le BLA est considéré comme l'entrée principale d'informations de l'amygdale, il possède également des efférences notables (Fig. 6). Tout d'abord, il existe des connections réciproques importantes vers les centres de la mémoire desquels il reçoit des informations polymodales, comme le cortex périrhinal (McDonald, 1998) ou encore l'hippocampe (Petrovich et al., 2001). Il a également été montré que le BLA projette de façon importante vers le noyau accumbens (McDonald, 1991). Le noyau latéral, de même que le noyau basal projettent tous deux vers le cortex préfrontal ainsi que le

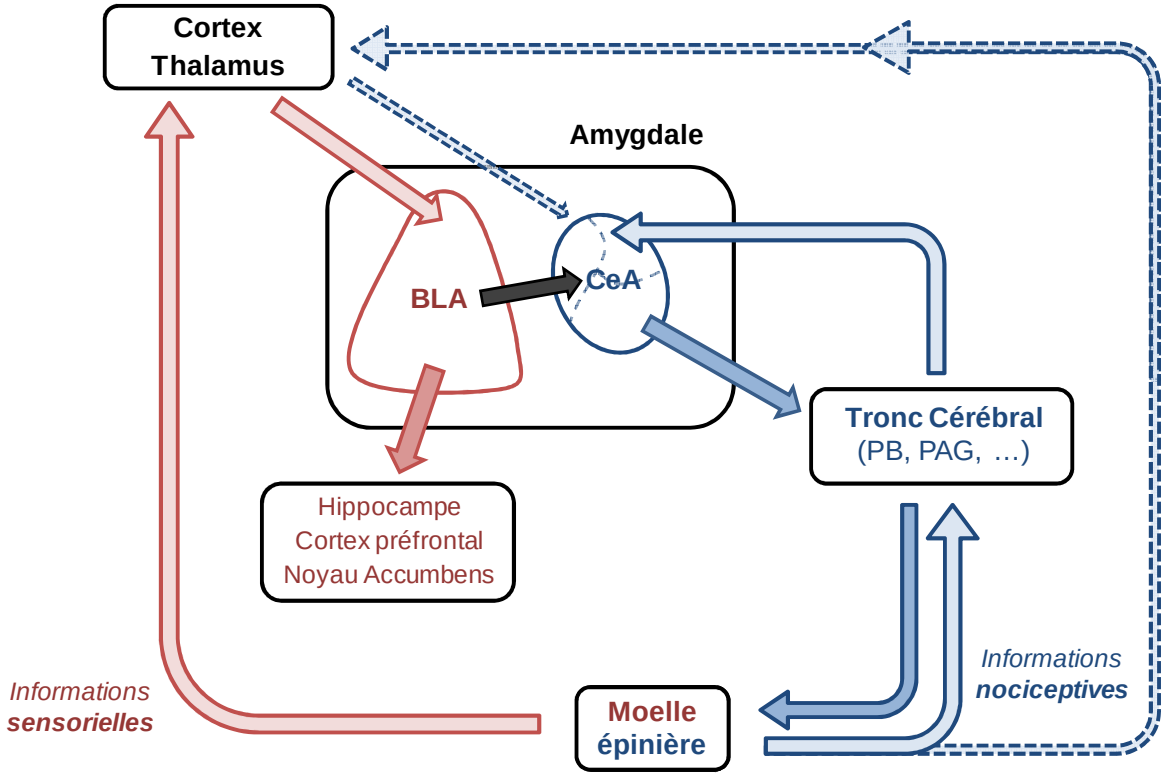


Figure 6 : Résumé des afférences et efférences principales de l'amygdale

Le complexe basolatéral reçoit de nombreuses afférences sensorielles et polymodales de zones corticales et thalamiques. Ces informations sont traitées localement au sein du complexe. Une partie de ces informations est alors envoyée vers d'autres structures corticales, et l'autre partie vers le noyau central (CeA). Ce dernier reçoit des afférences de nombreuses structures vers lesquelles il projette, ainsi que du cortex et du thalamus dans une moindre mesure. Au regard de cette organisation, le complexe basolatéral est considéré comme l'entrée principale de l'amygdale et le noyau central comme la sortie principale. BLA = complexe basolatéral, BNST = noyau du lit de la strie terminale, CeA = noyau central de l'amygdale, PAG = substance grise périaqueducale, PB = noyau parabrachial (Adapté de : Neugebauer et al., 2004).

thalamus (McDonald, 1998). Enfin, le BLA projette de manière importante, mais non réciproque, vers le CeA (Savander et al., 1995).

I.4.b. 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 et al., 1994; 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 (Millan, 2002). Ces derniers seront décrits plus précisément dans la quatrième partie du chapitre IV, « les voies neuroanatomiques de la douleur ».

Le noyau central projette également vers les noyaux de l'aire latérale de l'hypothalamus (LeDoux et al., 1988), ainsi que vers le BNST (Dong et al., 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 et al., 1995).

I.5. Connexions intra-amygdaloïdes

Plusieurs études ont montré que les noyaux de l'amygdale présentent de nombreuses connexions entre eux (Pitkänen et al., 1997; McDonald, 1998; 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 et al., 1997) (Fig. 6). 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) (Fig. 6). 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 et présente également des connexions entre ses différentes subdivisions. Mais la plus importante projection du noyau basal a lieu 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.

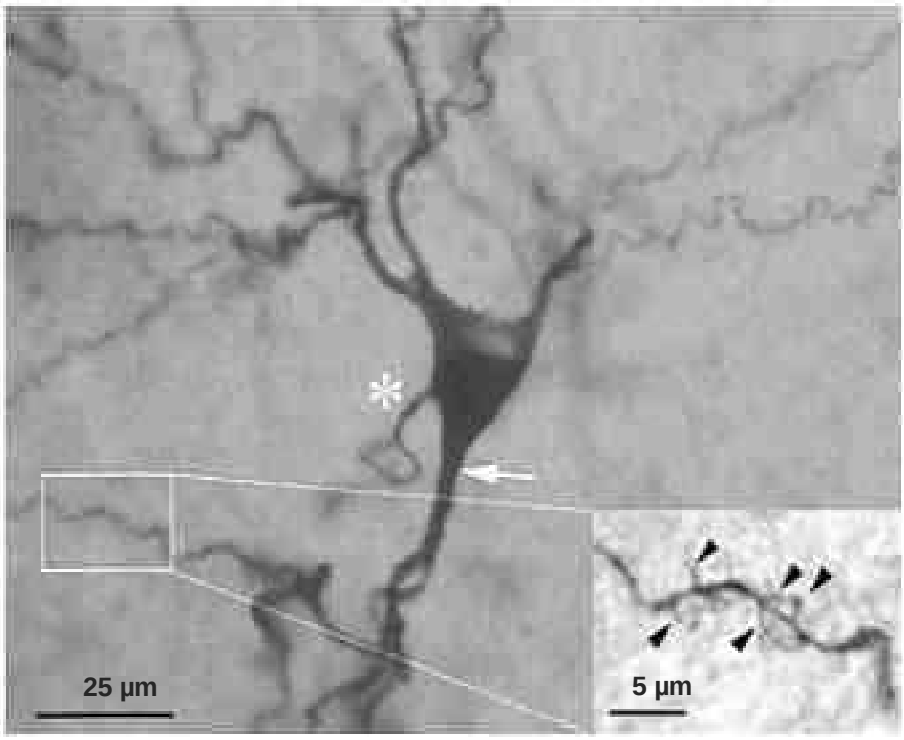


Figure 7 : Illustration d'un neurone de projection du BLA rempli avec de la biocytine

On peut noter la forme pyramidale du soma. La dendrite apicale est indiquée par la flèche blanche et l'axone par l'astérisque blanc. Dans l'insert en bas à gauche, on a un agrandissement d'une dendrite et l'on peut voir les épines, désignées par les flèches noires. Ces neurones sont présents majoritairement (75%) dans le BLA (Faber et al., 2001).

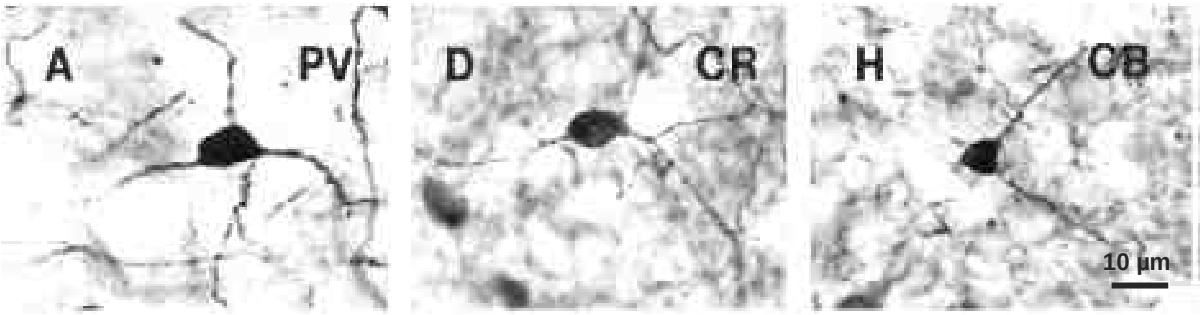


Figure 8 : Illustration d'interneurones du BLA exprimant des protéines liant le calcium

On note la forme arrondie, voire ovoïde des somas de ces interneurones, ce qui les distingue des somas pyramidaux des neurones de projection. Ces interneurones présentent 2 à 6 dendrites primaires non-épineuses qui forment une arborisation relativement sphérique. Ces neurones représentent environ 25% des cellules du BLA. La plupart d'entres eux expriment soit des protéines liant le calcium, soit des hormones peptidiques. PV = parvalbumine, CR = calrétinine, CB = calbindine (Kemppainen and Pitkänen, 2000).

II. Morphologie et neurochimie des neurones de l'amygdale

II.1. Morphologie des neurones

II.1.a. Dans le complexe basolatéral de l'amygdale

En se basant sur des études morphologiques utilisant principalement la coloration de Golgi, deux types principaux de neurones ont été initialement décrits dans le BLA. Le premier type, qui correspond à environ 70 à 75 % de la population neuronale, est une population de neurones pyramidaux (Millhouse and DeOlmos, 1983; Washburn and Moises, 1992). La plupart de ces neurones ont un soma de forme pyramidale et présentent 3 à 7 dendrites émanant de ce soma (Fig. 7). Certaines de ces dendrites sont épineuses et proéminentes, ce qui apparente ces neurones aux cellules étoilées épineuses du cortex (McDonald, 1992). Néanmoins l'organisation et l'orientation de ces dendrites suffisent à distinguer clairement ces neurones des neurones pyramidaux corticaux (Faber et al., 2001). Ainsi il est plus approprié de parler de neurones de type pyramidaux ou bien de neurones de projection (Faber et al., 2001). Au sein du complexe basolatéral, on ne note pas de nette différence dans la morphologie de ces neurones entre les différents noyaux. Néanmoins, les neurones du noyau basal semblent avoir un soma légèrement plus grand (15-20 µm) que ceux du noyau latéral (10-15 µm) (McDonald, 1982a; Millhouse and DeOlmos, 1983).

Le second groupe principal de neurones décrit dans le BLA est composé d'interneurones locaux. Il correspond à environ 20 à 25 % de la population neuronale du BLA (Millhouse and DeOlmos, 1983). Ces neurones présentent 2 à 6 dendrites primaires, non-épineuses, qui forment une arborisation dendritique relativement sphérique et ont un soma relativement petit (10-15 µm) (McDonald, 1982a) (Fig. 8). Il existe différentes classes d'interneurones selon leur contenu en protéines liant le calcium (*i.e.* calbindine, parvalbumine, calrétinine), en hormones peptides (*i.e.* somatostatine, cholécystokinine) ou en peptide (*i.e.* peptide vasoactif intestinal ou VIP) (Kemppainen and Pitkänen, 2000; McDonald and Mascagni, 2001). Ainsi, on trouve des interneurones positifs à la parvalbumine contenant également pour la plupart de la calbindine (Kemppainen and Pitkänen, 2000; McDonald and Betette, 2001). On trouve également des interneurones positifs à la cholécystokinine, et une partie d'entre eux est aussi positive à la calbindine (Mascagni and McDonald, 2003), à la calrétinine (Kemppainen and Pitkänen, 2000) ou au VIP (McDonald and Mascagni, 2002; Mascagni and McDonald, 2003). Enfin, les

interneurones exprimant la somatostatine sont pour la plupart positifs à la calbindine (McDonald and Mascagni, 2002).

En plus des classes d'interneurones précédemment décrites, il existe quelques autres type d'interneurones qui ont pu être décrits dans le BLA en se basant sur leur morphologie axonale ou dendritique. Ainsi, il a été observé des neurones allongés, des neurones à cône, des cellules Chandelier et des cellules de forme neurogliale (McDonald, 1982a, 1984; Millhouse and DeOlmos, 1983; Faulkner and Brown, 1999).

II.1.b. Dans le noyau central de l'amygdale

A l'aide d'études utilisant également la coloration de Golgi, la morphologie des neurones du CeA a pu être définie. Ainsi 3 types principaux de neurones ont été décrits. Le premier type correspond à des neurones épineux de taille moyenne, similaires à ceux observés dans les noyaux du striatum, situés à côté du CeA (McDonald, 1982b). Ces neurones présentent un soma de forme ovoïde ou fusiforme et 3 à 5 dendrites primaires, relativement épineuses (Martina et al., 1999; Schiess et al., 1999). Le second type de neurone décrit possède un soma plus grand, ainsi qu'une seule dendrite primaire, très épaisse, qui se sépare en de petites dendrites secondaires épineuses (Cassell and Gray, 1989; Martina et al., 1999; Schiess et al., 1999). Enfin, une petite population de neurones non épineux a également pu être décrite dans le CeA (Cassell and Gray, 1989).

Ces 3 types de neurones sont distribués de manière homogène au sein des différentes divisions du CeA. Ces neurones sont morphologiquement très différents de ceux trouvés dans le BLA. En effet, ceux du BLA ont une morphologie plutôt corticale alors que ceux du CeA une morphologie plus striatale (McDonald, 1982b). Ceci est en accord avec les différences d'origines embryonnaires des deux noyaux (Swanson and Petrovitch, 1998; Puelles, 2001).

II.2. Neurochimie et pharmacologie des neurones et de leurs terminaisons

II.2.a. 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 (Carlsen, 1988; Swanson and Petrovitch, 1998) (Fig. 9). Les

Figure 9 : Marquage des neurones exprimant la GAD_{65} dans un cerveau de souris

Hydribation *in situ* (image en autoradiographie en fond noir) de l'acide glutamique décarboxylase (GAD) dans le cerveau de souris. Cette enzyme est l'enzyme de synthèse du GABA et permet donc de révéler les neurones GABAergiques. Ainsi, on peut voir que le marquage est particulièrement dense dans le noyau central et le noyau médian, et qu'il est beaucoup plus éparse dans les noyaux du complexe basolatéral. BLA = noyau basal de l'amygdale, BMA = noyau basomédian de l'amygdale, cc = corps calleux, CEA = noyau central, CLA = claustrum, COAa = noyau cortical antérieur de l'amygdale, CP = caudé putamen, ec = capsule externe, EP = noyau endopiriforme, GP = globus pallidus, HIP = hippocampe, INS = cortex insulaire, LA = noyau latéral de l'amygdale, MEA = noyau médian de l'amygdale, MO = aires motrices, PERI = cortex périhinal, PIR = cortex piriforme, RSP = aire rétrospléniale, SS = aires somatosensorielles, V3 = 3ème ventricule, VL = ventricule latéral (Swanson and Petrovitch, 1998).

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 (Farb et al., 1995), ce qui indique la nature glutamatergique de ces entrées. La présence de récepteurs AMPA et NMDA du glutamate à ces synapses excitatrices a pu être démontrée grâce à des études électrophysiologiques (Chapman and Bellavance, 1992; Davis et al., 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 aux synapses provenant d'afférences corticales (Weisskopf 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 (Mayer et al., 1984; Nowak et al., 1984). 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 (Li et al., 1995; Mahanty and Sah, 1999; Weisskopf 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 and Shinnick-Gallagher, 1992; Rainnie et al., 1994).

Les neurones du BLA expriment également des récepteurs au GABA. La composante synaptique rapide est médiée par les récepteurs $GABA_A$, tandis que la composante synaptique lente est médiée par les récepteurs $GABA_B$ (Rainnie et al., 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 locaux 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; Woodruff et al., 2006).

Plusieurs groupes de recherche ont étudié le type de sous-unités composant les récepteurs $GABA_A$ 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; Barnard et al., 1998). 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 $GABA_A$ 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 (Möhler, 2006). Ainsi, dans le BLA, la stœchiométrie majoritaire semble être $\alpha_{1\text{-}2}\beta_{1\text{-}2\text{-}3}\gamma_2$ (Heldt and Ressler, 2007; Esmaeili et al., 2009).

Les récepteurs contenant les sous-unités $\alpha_{1,2,3,5}$ en combinaison avec n'importe quelle sous-unité β et une sous-unité γ_2 sont sensibles à la modulation par les benzodiazépines (Pritchett et al., 1989; Wisden et al., 1991; Wafford et al., 1994; Hadingham et al., 1996). Ces molécules, qui font partie des principaux modulateurs allostériques positifs du récepteur $GABA_A$ (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). Ces molécules sont utilisées largement en clinique pour leurs actions anxiolytique (Towler, 1962; Lambert and Delaunay, 1963) et anticonvulsivante (Liske and Forster, 1963). 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 (Kang-Park et al., 2004; Marowsky et al., 2004). Infusé *in vivo* directement dans le BLA chez des rats, le DZP est anxiolytique et anti-nociceptif (Jiménez-Velázquez et al., 2010).

Les récepteurs $GABA_A$ du BLA sont également sensibles à leur antagoniste spécifique (Marowsky et al., 2004), la bicuculline, contrairement à une partie des récepteurs présents dans le CeA qui y sont insensibles (Delaney and Sah, 1999, 2001).

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. Parmi les neurotransmetteurs, on note la présence de terminaisons dopaminergiques provenant des structures mésolimbiques, ainsi que de ses récepteurs D1 et D2 (Asan, 1997; Grace and Rosenkranz, 2002; Chu et al., 2012). Les afférences provenant du Raphé libèrent de la sérotonine dans le BLA (Daftary et al., 2012), et certains neurones expriment les récepteurs sérotoninergiques $5\text{-}HT_{1A}$, $5\text{-}HT_2$ et $5\text{-}HT_3$ (Stein et al., 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 (Chung and Moore, 2009; Giesbrecht et al., 2010), la cholécystokinine (Chung and Moore, 2009), le VIP (Roberts et al., 1982), la neurotensine (Roberts et al., 1982) ou encore la substance P (Zhao et al., 2009). L'ensemble de ces neurotransmetteurs et neuromodulateurs ont 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., 2009). Ceci a pu être observé dans le cortex somatosensoriel (Zhang and Sun, 2011), l'hypothalamus latéral (Stanley et al., 2011), l'hippocampe (Treviño et al., 2011) 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 (Stief et al., 2007; Derchansky et al., 2008; Fritsch et al., 2009), la schizophrénie (Yizhar et al., 2011; Lisman, 2012), l'autisme (Yizhar et al., 2011), ou encore la douleur (Woolf and Salter, 2000; Keller et al., 2001; Fitzgerald, 2005; Hathway et al., 2006; Petrou et al., 2012).

II.2.b. Dans le noyau central de l'amygdale

Le marquage de la GAD montre une expression très dense par les neurones du CeA (Swanson and Petrovitch, 1998) (Fig. 9). Comme la majorité des cellules du striatum, la totalité des neurones du CeA et de leurs projections sont donc GABAergiques, ce qui est encore une fois cohérent avec les origines embryonnaires du noyau (Saha et al., 2000).

Les expériences d'électrophysiologie ont pu montrer que les neurones de la partie médiane et latérale du CeA reçoivent des afférences glutamatergiques du BLA qui vont activer des récepteurs AMPA et NMDA (Royer et al., 1999; Sah and Lopez De Armentia, 2003). Il a également été montré la présence de récepteurs métabotropiques du glutamate dans les neurones de la partie latérale du CeA (Neugebauer et al., 2000).

Les neurones du CeA forment également des circuits d'inhibition locaux au sein des différentes divisions du noyau (Delaney and Sah, 2001). Ainsi, on retrouve deux types de récepteurs ionotropiques au GABA. Un premier type qui correspond à des récepteurs $GABA_A$ classiques, bloqués par de faibles concentrations de bicuculline, et modulés positivement par des benzodiazépines ou des barbituriques (Whiting et al., 1995). Et un second type de récepteurs qui sont insensibles à la bicuculline, mais bloqués par l'antagoniste spécifique des récepteurs $GABA_C$, le TPMPA (Delaney and Sah, 1999). Ces récepteurs ont donc été définis comme des récepteurs de type $GABA_C$, en raison de leur pharmacologie particulière. Généralement les récepteurs de type $GABA_C$ sont constitués uniquement de sous-unités ρ, ce qui leur confère une insensibilité à la plupart des modulateurs ou des antagonistes des récepteurs $GABA_A$ (Shimada et al., 1992). Le premier type de récepteurs $GABA_A$ est quant à lui composé majoritairement d'une stœchiométrie $\alpha_2\beta_{1\text{-}2\text{-}3}\gamma_{1\text{-}2}$ (Heldt and Ressler, 2007; Esmaeili et al., 2009).

Dans le CeA, ces récepteurs de type $GABA_C$ sont modulés négativement par les benzodiazépines, comme le diazépam (Delaney and Sah, 2001), alors que ce dernier est connu comme étant un modulateur positif des récepteurs $GABA_A$ (Haefely, 1984). Ceci suggère donc des rôles distincts pour ces différents récepteurs dans les circuits d'inhibitions locaux (Delaney and Sah, 2001). Néanmoins, l'application *in vitro* de diazépam dans le CeA induit une augmentation de l'amplitude et de la cinétique des courants post-synaptiques inhibiteurs de manière équivalente à celle observée dans le BLA (Kang-Park et al., 2004). En revanche, l'utilisation de zolpidem, un dérivé des benzodiazépines, provoque des effets différentiels dans le CeA et le BLA. Cette molécule est en effet spécifique à faible concentration des récepteurs contenant une sous-unité α_1 (Rush, 1998; Doble, 1999; Crestani et al., 2000). De ce fait, son application *in vitro* dans le CeA ne provoque pas d'effet alors qu'elle augmente l'amplitude et la cinétique des courants post-synaptiques inhibiteurs des neurones du BLA. En revanche, à forte dose, la spécificité du zolpidem s'estompe et l'on obtient alors des résultats équivalents entre le BLA et le CeA (Kang-Park et al., 2004). Cette différence de sensibilité des récepteurs GABAergiques entre les deux complexes de l'amygdale peut apporter des hypothèses alternatives dans l'explication des mécanismes d'action des molécules anxiolytiques.

Comme dans le BLA, d'autres neurostransmetteurs et neuromodulateurs sont présents dans le CeA. Parmi les neurotransmetteurs présents, on trouve la présence de terminaisons dopaminergiques arrivant des structures mésolimbiques, ainsi que de ses récepteurs D1 et D2 (Freedman and Cassell, 1994; Naylor et al., 2010). Par ailleurs, la sérotonine va avoir une action anxiolytique ou anxiogène selon sa liaison sur son récepteur $5\text{-}HT_{1A}$ ou son récepteur $5\text{-}HT_{2C}$ (Li et al., 2012). Des études ont montré la

présence des trois types de récepteurs aux opiacés (mu, kappa et delta) (Le Merrer et al., 2009), de récepteurs CB1 aux cannabinoïdes (Tsou et al., 1998), et de CRF associé à ses récepteurs CRF1 et CRF2 (Gilpin, 2012). On trouve également la présence d'ocytocine et de vasopressine dans le CeA, ainsi que du récepteur V1a à la vasopressine et des récepteurs de l'ocytocine. De manière intéressante, ces deux hormones ont des effets opposés ; la vasopressine augmente l'agressivité, l'anxiété et la consolidation de la mémoire émotionnelle, tandis que l'ocytocine diminue les niveaux de stress et d'anxiété et favorise l'extinction de la mémoire émotionnelle (Roozendaal et al., 1993; Landgraf and Neumann, 2004; Huber et al., 2005; Knobloch et al., 2012; Stoop, 2012). A noter également la présence de divers neuropeptides tels que le neuropeptide Y (Gilpin et al., 2011) ou la substance P (Zhao et al., 2009).

III. Implications physiologiques de l'amygdale

III.1. Amygdale et émotions

Depuis plus d'un siècle, on sait que le lobe temporal, qui contient l'amygdale, est impliqué dans le traitement des émotions. En 1888, Brown et Schafer démontrent que des lésions bilatérales des lobes temporaux chez des singes rendent les animaux anormalement dociles, mais que ce changement de comportement émotionnel ne semble pas associé avec des changements moteurs ou sensoriels (Brown and Schafer, 1888). Des modifications du comportement émotionnel similaires sont décrites un peu plus tard par Klüver et Bucy (Klüver and Bucy, 1939). Ces derniers montrent que des lésions bilatérales des lobes temporaux chez des macaques rhésus modifient fortement leur comportement. En effet, les animaux, qui sont naturellement sauvages et plutôt craintifs, présentent, après lésion, une absence totale de peur et d'anxiété, comme en témoigne l'augmentation très nette de leur comportement exploratoire. De plus, ils présentent des comportements d'hyperoralité, d'hypersexualité, une perte d'interaction sociale ainsi qu'une perte d'expression de toute forme d'émotion. Ainsi, l'ensemble de ces symptômes suite à une lésion des lobes temporaux caractérise le syndrome de Klüver et Bucy (Klüver and Bucy, 1937). Cependant, ce n'est qu'en 1956 que Weiskrantz démontre que la plupart des symptômes du syndrome de Klüver et Bucy, notamment la perte de toute forme d'émotion, sont en majeure partie dus à la lésion bilatérale de l'amygdale (Weiskrantz, 1956). Le même type d'effets sur le comportement émotionnel a également pu être obtenu chez d'autres espèces, notamment chez le rat, lors de lésions bilatérales de l'amygdale (Goddard, 1964). Peu de données sont disponibles chez l'humain, mais l'étude de quelques rares cas de lésions bilatérales de l'amygdale ont pu montrer que les

patients présentent des déficits émotionnels sévères ainsi qu'une perte totale de sentiment de peur (Aggleton, 1993; Adolphs et al., 1998).

Néanmoins, notre compréhension du rôle de l'amygdale dans le traitement des émotions est en partie biaisée par la nature abstraite de l'émotion. La définition de l'émotion reste variable selon les auteurs et les domaines d'étude, mais si l'on se réfère au dictionnaire Petit Robert®, elle correspond à un « état de conscience complexe, généralement brusque et momentané, accompagné de troubles physiologiques ». Ainsi, l'émotion est une expérience complexe subjective, et chaque individu va l'exprimer de manière différente. La réelle difficulté de l'étude du comportement émotionnel se retrouve donc dans les études réalisées chez l'animal, puisque ce dernier ne peut pas dire à l'expérimentateur ce qu'il ressent. C'est pourquoi, la majeure partie des connaissances acquises sur le rôle de l'amygdale dans les émotions vient des études réalisées chez l'animal afin de tester une composante particulière ; la peur, et plus particulièrement la peur conditionnée (LeDoux, 1996). Ce type de peur est facilement osbervable et mesurable chez l'animal, malgré son incapacité à pouvoir oraliser son ressenti. En effet, un des comportements induit dans ce type de protocole est un comportement d'immobilisation de l'animal, appelé « freezing ». Généralement, les expérimentateurs mesurent le temps de freezing, qui correspond à la peur exprimée par l'animal.

III.2. Amygdale et peur conditionnée

La peur est une réponse adaptative essentielle à la survie de nombreuses espèces animales. Qu'elle soit conditionnée ou non, elle provoque des réponses autonomes et hormonales de la part de l'organisme, telles que des effets cardiovasculaires (modification du rythme cardiaque, augmentation de la pression artérielle), une libération d'hormones de stress (corticotrophine, corticostérone), des vocalisations, ou encore un « freezing » (Brown et al., 1951; LeDoux, 1996, 2000; Maren, 1999). Par ailleurs, ce type de réponses à la peur est observé de manière similaire chez les humains et les animaux (Lang et al., 2000). Des études d'imagerie cérébrale ont montré que la vue d'un évènement effrayant va activer l'amygdale (Morris et al., 1996, 1998), de la même manière qu'un visage effrayé (Whalen et al., 2001). Par ailleurs, d'autres expériences ont montré que des stimulations électriques de l'amygdale réalisées chez l'homme ou chez l'animal induisent des comportements de panique et d'anxiété (Kaada, 1951; Chapman et al., 1954).

Néanmoins, l'amygdale n'est pas nécessaire qu'à l'expression ou la reconnaissance de la peur, elle est également impliquée dans son apprentissage. Une réaction de peur apparaît généralement face à un stimulus ou une situation potentiellement dangereuse, et l'adoption d'un comportement adéquat de l'individu peut être vue comme une adaptation comportementale. Cette adaptation peut être la conséquence d'un apprentissage au cours duquel l'individu apprend qu'un stimulus particulier va engendrer un évènement désagréable. Chez le rat, ou la souris, cet apprentissage peut être modélisé par l'utilisation d'un conditionnement de type pavlovien qui consiste à associer un stimulus sonore neutre à un stimulus aversif, généralement un choc électrique léger délivré aux pattes de l'animal. Au cours de ce conditionnement, les animaux apprennent que le stimulus sonore prédit le choc électrique. Ainsi, la présentation ultérieure du stimulus sonore va induire un ensemble de réponses conditionnées de peur, incluant notamment un comportement de freezing. De nombreuses données indiquent que l'amygdale est fortement impliquée dans l'apprentissage et l'expression des réponses conditionnées de peur (Davis, 2000; LeDoux, 2000; Maren and Quirk, 2004). Les différentes études des circuits neuronaux de la peur conditionnée ont clairement établi qu'au sein de l'amygdale, le BLA et le CeA jouent des rôles clé dans l'acquisition et l'expression des comportements de peur. En effet, l'amygdale reçoit, *via* ces deux complexes, les informations sensorielles auditives liées au son, ainsi que les informations nociceptives dues au choc électrique dans les pattes (Lanuza et al., 2008). La théorie prédominante est que lors du conditionnement, les informations sensorielles (*i.e.* son et choc électrique) arrivent dans le BLA *via* le noyau latéral, sont associées au sein du complexe puis transmises au CeA afin d'entrainer une réponse comportementale adaptée (Maren, 1999; Ciocchi et al., 2011). De plus, une lésion de l'amygdale va empêcher l'acquisition et l'expression de la peur conditionnée (LeDoux, 2000; Maren, 2001). L'amygdale possède donc un rôle clé et se présente comme un centre intégrateur de la peur conditionnée.

L'un des principaux mécanismes cellulaires expliquant l'apprentissage et le stockage de la mémoire au niveau neuronal est la potentialisation à long terme (PLT). Durant ce phénomène, une activation brève et répétée d'une synapse va induire une augmentation à long terme de l'efficacité de cette synapse (Bliss and Lomo, 1973). Durant de nombreuses années, des groupes de recherche se sont intéressés à l'implication d'un phénomène de PLT dans l'acquisition et le stockage de la mémoire émotionnelle dans l'amygdale. Plusieurs preuves en faveur d'une implication de la PLT ont ainsi pu être mises en avant. Tout d'abord, les protocoles de conditionnement pavlovien induisent une augmentation de la transmission synaptique au niveau des afférences sensorielles

arrivant à l'amygdale, comme cela a pu être montré à l'aide d'enregistrement électrophysiologiques *in vitro* (McKernan and Shinnick-Gallagher, 1997; Tsvetkov et al., 2002) et *in vivo* (Quirk et al., 1997; Rogan et al., 1997). Ensuite, la PLT peut être induite aux synapses des afférences sensorielles du BLA par des stimulations électriques (Huang and Kandel, 1998; Weisskopf et al., 1999). Enfin, le blocage pharmacologique de la PLT *in vivo* ou *in vitro* empêche l'acquisition de la peur conditionnée (Rodrigues et al., 2001; Bauer et al., 2002; Humeau et al., 2007). Ce mécanisme de PLT dans l'amygdale semblerait être dépendant des récepteurs NMDA du glutamate. En effet, le blocage spécifique de ces récepteurs empêche l'acquisition de la peur conditionnée (Huang and Kandel, 1998; Maren, 1999; Weisskopf et al., 1999).

Les neurotransmetteurs et neuromodulateurs présents dans la structure peuvent agir de manière importante sur le circuit de la peur. L'injection de neuropeptide Y dans le BLA peut produire des effets anxiogènes ou anxiolytiques en fonction de la dose (Sajdyk et al., 2002). L'injection de substance P va réduire l'état de stress induit par un protocole de peur conditionnée (Zhao et al., 2009). Par ailleurs, des hauts niveaux de dopamine (Grace and Rosenkranz, 2002), de même qu'une activation des récepteurs CRF1 (Hubbard et al., 2007) va potentialiser l'étape d'acquisition du souvenir dans un protocole de peur conditionnée. L'ocytocine dans le CeA va avoir un rôle anxiolytique tandis que la vasopressine va avoir des propriétés anxiogènes (Stoehr et al., 1992; Huber et al., 2005). Enfin, le circuit de la peur peut également être modulé par l'influence de substances anxiolytiques, tel que le diazépam, ce qui va empêcher la formation de nouveaux souvenirs dans des protocoles de conditionnement (Tomaz et al., 1993).

III.3. Amygdale et douleur

Connaissant le rôle de l'amygdale dans le traitement et le contrôle des émotions, ainsi que son implication dans les processus de peur conditionnée, 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, généralement désagréable, ce qui la rend très aversive.

L'amygdale, comme cela a été montré précédemment, intègre des informations sensorielles, dont certaines sont nociceptives, et polymodales. Elle attribue à ces informations une valeur émotionnelle, que l'on appelle la « valence », qui peut être positive ou négative (ou « aversive »). Ainsi, l'individu, en fonction de la valence d'une information, va adopter le comportement le plus adapté. Par exemple, lors d'un protocole

de peur conditionnée, l'association entre le son et le choc électrique va avoir une valence négative, qui va pouvoir être stockée dans 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 limiter les réflexes et de faciliter une réaction rapide de fuite ou d'attaque (LeDoux, 2000). On voit donc que l'amygdale, qui est intégrée dans un des circuits de la douleur *via* ses afférences et efférences, peut moduler cette composante.

Il existe une relation forte et réciproque entre douleur et état émotionnel. En effet, une douleur, particulièrement lorsqu'elle est chronique, peut conduire certains patients à des états anxieux et dépressifs. Inversement, un état anxieux peut induire des phénomènes d'hypersensibilité sensorielle. Ces aspects ont pu être montrés en clinique chez l'homme (Gallagher et al., 1995) ainsi que dans des modèles animaux (Rivat et al., 2010; 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, de par son appartenance à la voie nociceptive spino-parabrachio-amygdaloïde, et de par ses efférences sur des structures impliquées dans la nociception, est un élément important de la modulation douloureuse. 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). Par ailleurs, 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 $GABA_A$, provoque un effet antinociceptif, tandis que l'injection de muscimol, un agoniste $GABA_A$, induit une augmentation des symptômes douloureux (Hasanein et al., 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 des afférences nociceptives au CeA était augmentée à partir de 6 à 8 heures après l'induction de la douleur (Neugebauer et

al., 2004). Cette plasticité est par ailleurs dépendante des récepteurs NMDA du glutamate. Quelques années plus tard, Ikeda et ses collègues ont réalisé le même type d'étude mais avec un modèle de douleur chronique de type neuropathique (Ikeda et al., 2007). Ils ont ainsi pu montrer qu'une douleur neuropathique induit une PLT de la transmission synaptique excitatrice, de manière bilatérale, aux synapses BLA-CeA, et, de manière controlatérale à la lésion, aux synapses provenant du noyau parabrachial et arrivant au CeA. Cependant, à la différence du modèle aigu de douleur, la potentialisation de la transmission synaptique est ici indépendante des récepteurs NMDA.

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 stockage de la peur conditionnée, le BLA est un complexe important au sein de l'amygdale puisqu'il permet l'intégration de nombreuses informations sensori-discriminatives. Dans le cadre de la douleur, nous savons que le BLA reçoit également des informations nociceptives (Lanuza et al., 2008), et une étude a montré que l'application d'opioïdes dans le BLA induit une action anti-nociceptive (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.

IV. La douleur

IV.1. Qu'est-ce que la douleur ?

IV.1.a. Définition

La douleur correspond à un message complexe qui va indiquer à l'organisme l'existence d'une altération dans son fonctionnement. Le processus sensoriel à l'origine du message nerveux est appelé la nociception, terme utilisé pour la première fois par Sherrington (Sherrington, 1906). Cette composante sensorielle a été préservée au cours de l'évolution et se retrouve chez tous les organismes, depuis les invertébrés jusqu'aux mammifères (Kavaliers, 1988). La nociception correspond donc aux fonctions sensori-discriminatives de l'organisme qui vont permettre de détecter, et de réagir face à des stimulations pouvant être potentiellement nocives. Ainsi, douleur et nociception sont deux notions bien distinctes. La première correspond à la partie purement sensorielle et mécanistique, et la seconde à la perception et l'interprétation consciente du message nociceptif. Les définitions des termes couramment utilisés dans le domaine d'étude de la

Termes	Définitions
Nociception	Processus nerveux par lequel le système somatosensoriel encode un stimulus nocif.
Nocicepteur	Récepteur sensoriel à haut seuil du sytème nerveux périphérique somatosensoriel capable de transduction et d'encodage de stimuli nocifs.
Stimulus nocif	Stimulus préjudiciable ou menaçant d'endommager les tissus sains.
Douleur	Expérience sensorielle et émotionnelle désagréable liée à une lésion tissulaire réelle ou potentielle, ou décrite en des termes évoquant une telle lésion.
Neuropathie	Affection du système nerveux périphérique ou central.
Douleur neuropathique	Douleur causée par une lésion ou une maladie affectant le système somatosensoriel.
Allodynie	Douleur due à un stimulus non nociceptif.
Hyperalgésie	Douleur exacerbée suite à un stimulus nociceptif.

Tableau 1 : Définitions des termes couramment utilisés dans l'étude de la douleur

L'IASP (International Association for the Study of Pain) a défini en 1994 la plupart des termes utilisés dans le domaine de l'étude la douleur (source : www.iasp-pain.org).

douleur sont regroupées dans le tableau 1. L'IASP (International Association for the Study of Pain) propose en 1994 de définir la douleur comme étant « une expérience sensorielle et émotionnelle désagréable liée à une lésion tissulaire réelle ou potentielle, ou décrite en des termes évoquant une telle lésion ». Cette définition indique bien la nature profondément subjective de la douleur, qui est avant tout une sensation, un ressenti, vécu et décrit par l'individu. Par ailleurs, Melzack et Casey ont distingué trois composantes dans la douleur (Melzack and Casey, 1968). La composante sensori-discriminative, correspondant à l'activation des voies anatomiques de la nociception, qui vont analyser l'intensité, la localisation, la durée et le type de stimulation nociceptive. La composante affectivo-émotionnelle, qui confère le caractère désagréable à la stimulation nociceptive et qui va provoquer une réaction comportementale adaptée. Enfin la composante cognitive, qui regroupe les processus participant au traitement des différentes informations et qui va permettre de replacer la stimulation nociceptive dans un contexte particulier, d'interpréter sa signification, ou encore de faire référence aux expériences passées.

IV.1.b. Douleur aiguë et douleur chronique

La douleur aiguë est généralement due à une stimulation des nocicepteurs. Ce sont des récepteurs sensoriels à haut seuil du système nerveux périphérique somatosensoriel capables de traduire et d'encoder les stimuli nocifs (Tab. 1). La douleur aiguë correspond donc à un processus physiologique pouvant être assimilé à un signal d'alarme devant une menace de l'intégrité de l'organisme (Guirimand and Le Bars, 1996; Scholz and Woolf, 2002; Guirimand, 2003). En réponse à une stimulation nociceptive, le système nerveux va alors déclencher des réactions musculaires réflexes, comportementales et autonomes (cardiovasculaires, endocrines) afin d'en limiter les conséquences néfastes. Comme lors des protocoles de peur conditionnée, la douleur va s'inscrire dans un apprentissage adaptif qui visera à limiter la réapparition des actions potentiellement dangereuses. Ainsi, la douleur aiguë, physiologique, est utile et protectrice. Mais, comme toute fonction de l'organisme, le système nociceptif peut subir des dérèglements et le symptôme initial de douleur aiguë pourra alors devenir persistant et pathologique.

La douleur chronique est caractérisée par une durée évoluant après 3 à 6 mois. En revanche, pour un modèle animal de douleur neuropathique, les échelles de temps ne sont pas les mêmes et on peut considérer que la douleur devient chronique lorsque les symptômes perdurent 2 semaines après la lésion originelle. La douleur chronique est en réalité une douleur-maladie, correspondant à un syndrome à part entière et survenant

dans des conditions pathologiques qui vont persister au cours du temps. Dans ce cas, elle perd son rôle de signal d'alarme, ne protège plus et devient néfaste pour l'organisme. Elle est généralement définie par son caractère spontané (*i.e.* en l'absence de stimulus) et/ou par la présence d'hyperalgésie et/ou d'allodynie, en plus de symptômes éventuels de dysesthésie et/ou de paresthésie (Tab. 1). Par ailleurs, outre leur caractère strictement déplaisant, les douleurs pathologiques s'accompagnent souvent de troubles de l'appétit, du sommeil et potentiellement de l'humeur avec des comportements anxieux et dépressifs. Elles vont retentir sur le quotidien du patient, avec des répercussions sociales, professionnelles et familiales.

Néanmoins, tout comme la douleur aiguë, il n'existe pas une douleur seule persistante mais plusieurs, qui peuvent être différenciées selon leur mécanisme physiopathologique. Ainsi on distingue :

- Les douleurs par excès de nociception, qui résultent d'une hyperstimulation des circuits nociceptifs, consécutive à une lésion tissulaire et majoritairement à une réaction inflammatoire initiale. La douleur est persistante soit parce que la stimulation originelle subsiste, soit parce qu'elle a altéré durablement le circuit nociceptif.
- Les douleurs neuropathiques (ou neurogènes), qui sont une conséquence d'une lésion du système nerveux central ou périphérique. Le plus souvent, ces douleurs sont observées à la suite d'un traumatisme d'un nerf périphérique ou du système nerveux central, d'une atteinte virale (herpès, VIH, …) ou d'une atteinte neurotoxique d'origine métabolique (diabète) ou chimiotoxique (anticancéreux).
- Les douleurs *sine materia*, liées à des mécanismes encore mal connus (céphalées de tension, fibromyalgie, …), à une pathologie indétectable ou bien à une étiologie psychogène.

Lors de ce travail de thèse, les études ont été menées uniquement sur le modèle du « cuff », qui est un modèle animal de douleur neuropathique (Mosconi and Kruger, 1996; Benbouzid et al., 2008). Le principe repose sur l'apposition d'un manchon en polyéthylène autour de la branche principale du nerf sciatique de la patte de l'animal, ce qui va instaurer une neuropathie observable et mesurable 2 à 3 jours après la chirurgie.

IV.1.c. La douleur neuropathique

La douleur neuropathique est définie selon l'IASP comme une « douleur consécutive à une lésion ou à une maladie affectant le système somatosensoriel »

(Tab. 1). Pouvant être d'étiologie centrale ou périphérique, selon la localisation de la lésion neurologique causale, les douleurs neuropathiques présentent des caractéristiques cliniques spécifiques qui les distinguent de toutes les autres douleurs. La sémiologie clinique est relativement stéréotypée, associant des symptômes douloureux dits positifs et négatifs (Attal et al., 2006; Baron, 2006).

Les symptômes positifs sont définis par l'apparition de signes sensoriels supplémentaires, normalement absents en condition physiologique saine. Parmi ceux-ci, des symptômes non douloureux peuvent être perçus. Il s'agit de sensations anormales comme les paresthésies, qui sont des manifestations non douloureuses de fourmillements, d'engourdissements ou de picotements. D'autres sensations anormales sont appelées dysesthésie lorsqu'elles sont ressenties comme désagréables par le patient. Généralement, ces sensations anormales vont se retrouver dans la même zone de l'organisme que les symptômes douloureux. Ces derniers sont de deux types : les douleurs spontanées et les douleurs provoquées. Les douleurs spontanées peuvent être continues, superficielles, souvent décrites comme des sensations de brûlure, ou profondes comme une sensation de compression ou de crampes. Concernant les douleurs provoquées, on distingue classiquement d'une part l'allodynie mécanique, déclenchée par des stimulations mécaniques non nociceptives comme un frottement ou une légère pression, et d'autre part l'allodynie thermique, déclenchée par des stimulations froides ou chaudes normalement non douloureuses. L'autre type de douleur provoquée est l'hyperalgésie qui correspond à l'exacerbation de la douleur induite par des stimulations mécaniques ou thermiques nociceptives.

Les symptômes négatifs sont eux définis par l'atténuation de fonctions sensorielles normalement présentent en condition physiologique saine. Certaines douleurs neuropathiques peuvent se manifester par la survenue d'un déficit partiel (hypoesthésie) ou total (anesthésie) d'une modalité sensitive au niveau de la zone neurologique lésée.

Par ailleurs, il ne faut pas oublier la sémiologie affective des douleurs neuropathiques. En clinique, les liens entre douleur et troubles affectifs sont bien établis (Dersh et al., 2002). Ces résultats ont pu être reproduits sur des modèles animaux de douleur neuropathique, chez lesquels apparaissent des troubles de l'humeur après la mise en place de la douleur (Gonçalves et al., 2008; Yalcin et al., 2011). Réciproquement, la dépression semble être un terrain propice au développement de douleurs (Dworkin et al., 1995; Campbell et al., 2003). Cet aspect a également pu être modélisé chez l'animal, puisque une hypersensibilité sensorielle a été mesurée dans un modèle animal d'anxiété (Rivat et al., 2010).

IV.1.d. Mesure de la douleur neuropathique chez l'animal

La douleur neuropathique peut induire divers symptômes chez l'homme et l'animal, en fonction de son étiologie. Les symptômes mesurables chez l'animal sont un ensemble de réponses motrices induites par une stimulation nociceptive aiguë et de réponses comportementales plus complexes.

Les réponses mesurables les plus simples suite à un stimulus nociceptif sont des réponses motrices élémentaires, consistant en un retrait de la zone stimulée. Les réponses comportementales consistent plutôt à des léchages de la zone stimulée, qu'il faut bien différencier du toilettage normal de l'animal. Pour mesurer ces réponses, plusieurs tests existent :

- Le test de la plaque chaude, qui permet d'évaluer la latence de réaction nociceptive en réponse à une stimulation chaude fixe (Woolfe and MacDonald, 1944). L'animal est placé sur une plaque chaude à une température nociceptive et en est retiré dès l'apparition d'une réponse comportementale douloureuse (*e.g.* retrait et/ou léchage des pattes, sauts, …). Le temps avant le retrait de l'animal est alors utilisé comme mesure de l'hyperalgésie thermique. Une variante de ce test est la plaque chaude / froide dynamique, qui consiste en une rampe thermique allant d'une température non nociceptive à une température nociceptive. L'intérêt étant de pouvoir observer le comportement de l'animal au cours de cette rampe thermique et d'apprécier à la fois les phénomènes d'allodynie et d'hyperalgésie.
- Le test de Hargreaves, ou Plantar, permet d'observer la sensibilité cutanée thermique chaude en exposant la surface plantaire des pattes de l'animal à une chaleur radiante croissante (Hargreaves et al., 1988). Ici également, le temps avant le retrait de l'animal est alors utilisé comme mesure de l'hyperalgésie thermique. L'avantage de ce test est de pouvoir discriminer la sensibilité de chacune des pattes postérieures de l'animal, ce qui n'est pas le cas avec le test de la plaque chaude.
- Le test des filaments de von Frey, utilisé à l'origine en clinique, a été adapté à la l'évaluation des seuils nociceptifs mécaniques statiques chez le rongeur (Chaplan et al., 1994). Il consiste à appliquer successivement des filaments de raideur croissante sur la surface plantaire de l'animal. Le premier filament induisant une réponse, généralement de type retrait, indiquera le seuil douloureux.
- La pince calibrée, offre une alternative au test des filaments de von Frey pour l'évaluation des seuils nociceptifs mécaniques (Luis-Delgado et al., 2006).Il

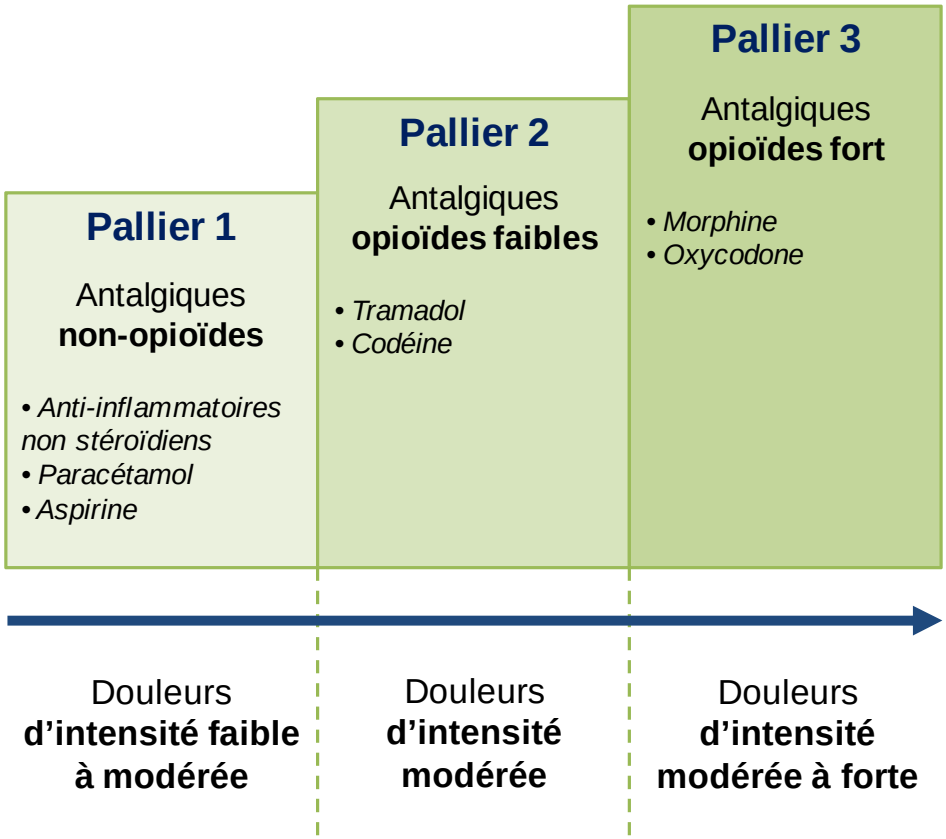


Figure 10 : Echelle thérapeutique de la douleur définie par l'OMS

L'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) a défini des échelles de la douleur avec une prise en charge thérapeutique par des molécules antalgiques de plus en plus fortes en fonction de la douleur ressentie par le patient (source : www.who.int/fr/).

- consiste en l'application sur la patte postérieure de l'animal d'une pression constante et l'arrêt de cette dernière lors de l'apparition d'un réflexe de retrait. La pince calibrée affiche alors la quantification de pression maximale appliquée au moment du retrait de la patte, correspondant ainsi au seuil nociceptif mécanique. Bien qu'un outillage adapté à la souris ait été mis au point, ce dernier reste peu fiable à l'utilisation et l'on préférera l'utilisation des filaments de von Frey chez cet animal.
- Le test à l'acétone, permettant d'évaluer la sensibilité thermique froide chez l'animal (Flatters and Bennett, 2004). Il consiste à appliquer quelques microlitres d'acétone sur la face dorsale de la patte postérieure de l'animal et à noter la réponse comportementale qui s'en suit. En effet, l'acétone provoque, lors de son évaporation, une stimulation thermique froide non nociceptive, permettant ainsi de mesurer l'allodynie au froid.

Le modèle du cuff utilisé dans cette étude induit uniquement deux symptômes mesurables : une hyperalgésie thermique au chaud, qui est transitoire (*i.e.* environ 3 semaines), et une allodynie mécanique statique, qui disparaît après environ 3 mois. Nous nous sommes donc uniquement intéressés à ce second symptôme, puisqu'il est mesurable sur une durée de temps plus longue. Pour ce faire, nous avons utilisé le test des filaments de von Frey, puisque le modèle animal de l'étude est la souris.

IV.2. Traitements actuels de la douleur

IV.2.a. Traitements pharmacologiques des douleurs aiguës

La prise en charge thérapeutique des douleurs varie selon les causes probables de la douleur. Ainsi, l'OMS (Organisation Mondiale de la Santé) a défini trois paliers correspondant à trois niveaux de traitement en fonction de la douleur perçue par le patient (Fig. 10). Plus la douleur perçue par le patient est décrite comme étant forte, plus le traitement antalgique va reposer sur des molécules puissantes, allant jusqu'à l'utilisation d'opioïdes. Néanmoins, ce protocole thérapeutique qui est souvent efficace pour le traitement des douleurs aiguës ou des douleurs inflammatoires, ne s'applique pas dans le cas des douleurs neuropathiques, car celles-ci ne répondent généralement peu, voire pas du tout, aux traitements antalgiques classiques (*i.e.* anti-inflammatoires non stéroïdiens, paracétamol, …).

IV.2.b. Traitements pharmacologiques des douleurs neuropathiques

Malgré la grande hétérogénéité étiologique des douleurs neuropathiques, plusieurs classes de molécules ont fait la preuve de leur efficacité. De plus, la plupart de ces traitements ont une efficacité similaire quelle que soit l'étiologie douloureuse (Attal et al., 2006, 2010).

Les molécules couramment utilisées pour le traitement de la douleur chronique résistante aux antalgiques classiques, notamment la douleur neuropathique, sont les opioïdes. Par exemple, les morphiniques peuvent être bénéfiques dans le cas de douleurs neuropathiques périphériques (Huse et al., 2001) ou centrales (Attal et al., 2002; Rowbotham et al., 2003). Néanmoins, les doses nécessaires à l'obtention d'un effet analgésique significatif sont près de deux fois plus élevées que celles habituellement utilisées pour traiter les douleurs aiguës (Benedetti et al., 1998). Par ailleurs, il n'y a pas de dose maximale recommandée et l'OMS conseille l'utilisation et l'augmentation des doses du traitement jusqu'à un soulagement des symptômes. Malheureusement, les effets secondaires de ce type de molécules apparaissent relativement rapidement : mise en place d'une tolérance (*i.e.* nécessité d'augmenter la dose afin d'obtenir le même effet) et de phénomènes d'addiction.

C'est pourquoi, les molécules utilisées actuellement en première ligne pour traiter les douleurs neuropathiques appartiennent à la classe des antidépresseurs. Les plus anciennes font partie de la classe des antidépresseurs tricycliques. Ces molécules aux effets indésirables nombreux ont prouvé leur efficacité dans le traitement de douleurs neuropathiques variées (Collins et al., 2000). Une alternative peut être utilisée en cas d'intolérance ou de contre-indication à la prise des tricycliques ; il s'agit des inhibiteurs mixtes de la recapture de la sérotonine et de la noradrénaline. Ceux-ci ont également fait preuve d'une bonne efficacité dans certains types de douleurs neuropathiques périphériques (Tasmuth et al., 2002; Sindrup et al., 2003) ou liées au diabète (Anon., 2005). Il existe également les inhibiteurs sélectifs de recapture de la sérotonine, mais leur efficacité reste moindre (Wolfe and Trivedi, 2004).

La seconde grande classe pharmacologique utilisée dans le traitement des douleurs neuropathiques est celle des anticonvulsivants (Collins et al., 2000; Jensen, 2002). Leur action antalgique est efficace dans certains cas de douleurs neuropathiques, sans que les mécanismes en jeu soient totalement compris. Par ailleurs, ces molécules entraînent également bon nombre d'effets secondaires.

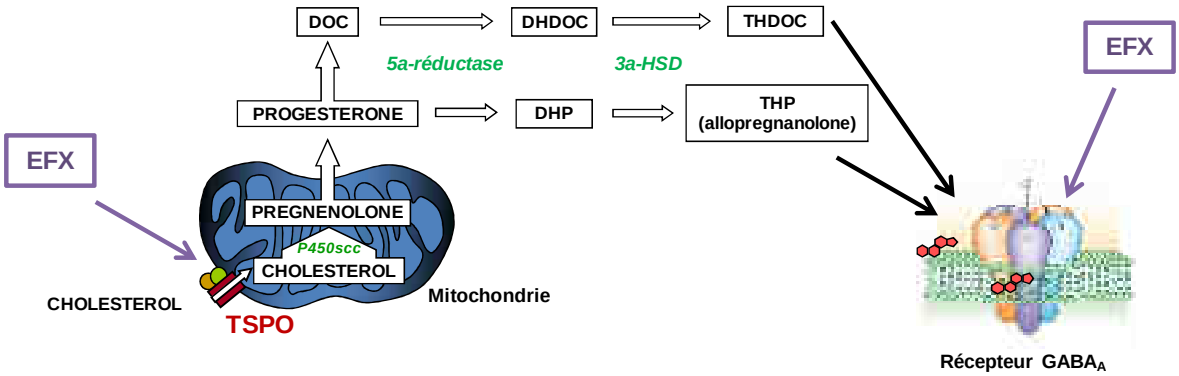


Figure 11 : Etapes de la neurostéroïdogenèse et actions de l'EFX

Les neurostéroïdes sont synthétisés à partir du cholestérol ou de précurseurs stéroïdiens circulants. Le cholestérol est acheminé au sein de la membrane mitochondriale interne, puis transformé en prégnénolone par l'enzyme p450scc. Il s'en suit alors une chaîne de réaction avec des réductions enzymatiques en position 5α et 3α, respectivement par la 5α-réductase et la 3α-hydroxystéroïde déshydrogénase (3α-HSD), pour obtenir *in fine* le THDOC et l'alloprégnanolone, de puissants modulateurs du récepteur $GABA_A$.

L'EFX agit de manière directe en se fixant sur les sous-unités β_2/β_3 du récepteur $GABA_A$ ou de manière indirecte en se fixant sur le TSPO, ce qui conduit à augmenter la synthèse de neurostéroïdes actifs.

Pour résumer, les traitements actuels utilisés contre les douleurs neuropathiques ont une efficacité relative selon l'étiologie de la douleur, mais leur principal défaut réside dans les effets secondaires importants et désagréables liés à la prise du traitement.

IV.2.c. Alternative aux traitements classiques des douleurs neuropathiques

De nombreuses données suggèrent que les stéroïdes endogènes contrôlent l'expression symptomatique de la douleur chez l'homme (Craft et al., 2004). Peu de données sont cependant disponibles concernant le mécanisme d'action de ces molécules dans la cadre de douleurs neuropathiques (Rupprecht and Holsboer, 1999).

Les neurostéroïdes sont des stéroïdes produits dans le système nerveux par les neurones et les cellules gliales, et ceci indépendamment des stéroïdes circulants. Ils sont synthétisés à partir du cholestérol ou de précurseurs stéroïdiens circulants. La neurostéroïdogenèse a lieu dans les mitochondries des neurones et des cellules gliales (Compagnone and Mellon, 2000; Mellon et al., 2001). Le transport du cholestérol dans la mitochondrie se fait en partie *via* un transporteur spécifique, le TSPO (Translocator Protein, anciennement nommé PBR, pour Peripheral Benzodiazepine Receptor) (Fig. 11). Comme l'indique l'ancien nom de ce transporteur, la plupart des benzodiazépines peuvent se fixer sur celui-ci et ainsi stimuler l'entrée de cholestérol dans la mitochondrie, donc la neurostéroïdogenèse (Krueger, 1991; Papadopoulos et al., 1991). Après son entrée dans la mitochondrie, le cholestérol est acheminé au sein de la membrane mitochondriale interne, puis transformé en prégnénolone par l'enzyme p450scc (cytochrome p450 side chain cleavage) (Fig. 11). A partir de ce précurseur s'en suit une chaîne de réactions conduisant *in fine* à la production de neurostéroïdes actifs, réduits en positions 3α et 5α (Fig. 11). Ces neurostéroïdes, comme l'alloprégnanolone (3α-5α-tétrahydroprogestérone) ou le THDOC (3α-5α-tétrahydrodéoxycorticostérone) sont connus comme étant de puissants modulateurs du récepteur $GABA_A$ (Keller et al., 2004; Belelli and Lambert, 2005). En effet, celui-ci possède deux sites de liaison pour les neurostéroïdes : un site de modulation, à haute affinité (*i.e.* ordre du nM), situé sur les sous-unités α du récepteur, et un site agoniste, à basse affinité (*i.e.* concentration > 100 µM), situé entre les sous-unités α et β du récepteur (Hosie et al., 2006). En se fixant sur ces sites de modulation, les neurostéroïdes actifs vont conduire à une augmentation de l'inhibition.

Les enzymes permettant la production de neurostéroïdes actifs sont actives à l'état basal. Elles permettent la production des neurostéroïdes locaux et sont fortement stimulées lors du développement de douleurs dans des modèles animaux de douleurs

	P450scc	3βHSD	5αR	3αHSD
Cortex	++ (1,2,3)	+ (1)	+ (1,2)	+ (2,3)
Hippocampe	+ (2)	++ (1,3)	+ (1,2)	+ (2,3)
Ganglion de la base	++ (2,3)	++ (1,2,3)	+ (1)	+ (2,3)
Amygdale	+ (1,2)	++ (3)	+ (1,2)	
Hypothalamus	+ (2)	+ (1,2)	+ (2)	+ (3)
Thalamus	+ (2)	+ (1,2)	+ (1,2)	+ (2,3)
Cervelet	+ (1,2)	+ (1)	+ (1,2)	+ (3)
Tronc cérébral		++ (1)	+ (1)	(2,3)
Moelle épinière	+ (1,2,3)	+ (1,2,3)	+ (1,2,3)	+ (2,3)
Nerfs périphériques	++ (1,2,3)	+ (1,2,3)	+ (1,2,3)	

Tableau 2 : Expression d'enzymes de la neurostéroïdogenèse dans des structures du système nerveux central de rongeurs

Les hormones sont exprimées par les neurones et les cellules gliales. La mise en évidence du niveau d'expression des ARN messager (1) et/ou des protéines (2) ainsi que l'activité enzymatique (3) est indiquée selon leur intensité par le signe +. Les lettres ND indiquent que l'enzyme n'a pas été détectée à ce jour. P450scc = enzyme à cytochrome p450 side chain cleavage, 3βHSD = 3β hydroxystéroïde déshydrogénase, 5αR = 5α-réductase, 3αHSD = 3α hydroxystéroïde déshydrogénase (Keller and Poisbeau, 2009).

inflammatoires (Poisbeau et al., 2005) et neuropathiques (Pathirathna et al., 2005; Meyer et al., 2008). Par ailleurs, ces travaux montrent que le blocage de la neurostéroïdogenèse provoque une aggravation des symptômes douloureux en comparaison avec les animaux ayant une neurostéroïdogènese intacte. Ces enzymes sont notamment exprimées dans l'amygdale (Compagnone and Mellon, 2000; Keller and Poisbeau, 2009) (Tab. 2).

Ces résultats suggèrent une solution alternative pour le traitement des neuropathies, consistant à stimuler la production endogène de neurostéroïdes, en utilisant notamment des molécules liant le TPSO et augmentant son activité. Les benzodiazépines, utilisées en clinique pour traiter l'anxiété, sont connues pour se lier sur le TPSO et stimuler la neurostéroïdogenèse. Elles pourraient donc être des molécules intéressantes à tester pour traiter les douleurs neuropathiques. Néanmoins, leurs effets secondaires sont similaires à ceux observés avec l'usage des opioïdes (*i.e.* tolérance, addiction), additionnés d'effets hypnotiques, sédatifs et mnésiques.

L'étifoxine (EFX), une molécule de la classe des benzoxazines, mise sur le marché récemment et prescrite comme anxiolytique en France (Stresam®), ne présente pas de structure apparentée aux benzodiazépines mais présente des mécanismes d'action similaires. En effet, il a été montré en électrophysiologie qu'elle peut agir de deux manières distinctes (Schlichter et al., 2000). Elle se fixe directement sur un site propre, localisé sur les sous-unités β_2/β_3 du récepteur $GABA_A$, et potentialise son activité de manière allostérique (Verleye et al., 2002; Hamon et al., 2003), mais elle peut également se fixer sur le TPSO, et donc augmenter la synthèse de neurostéroïdes actifs réduits en positions 3α et 5α (Verleye et al., 2005) (Fig. 11). Ainsi, qu'elles soient directe ou indirecte, les actions de l'EFX conduisent toutes deux à une potentialisation de l'activité du récepteur $GABA_A$. Par ailleurs, du fait de sa structure non benzodiazépinique, l'EFX ne possède pas ou peu d'effets secondaires (Kruse and Kuch, 1985; Micallef et al., 2001). Cette molécule pourrait donc se révéler un outil intéressant afin de potentialiser la neurostéroïdogenèse endogène, dans le but d'améliorer les symptômes douloureux dans le cadre de neuropathies.

IV.3. Les voies neuroanatomiques de la douleur

Pour références et revues générales, se référer à (Guirimand and Le Bars, 1996; Millan, 1999, 2002; Guirimand, 2003).

IV.3.a. L'intégration du message nociceptif

Les nocicepteurs ont une fonction de transmission du message nociceptif de la périphérie vers le système nerveux central. Ces neurones, dont leur corps cellulaire est situé dans les ganglions rachidiens (pour ceux innervant le tronc et les membres) ou crâniens (pour ceux innervant la face), possèdent une extrémité axonale en périphérie, qui détecte les stimuli nociceptifs, et une autre extrémité axonale projetant vers le système nerveux central.

Les messages nociceptifs sont générés au niveau de récepteurs nociceptifs appelés « terminaisons libres », qui sont amyéliniques et qui constituent des arborisations dans les tissus innervés. Ces terminaisons libres ont pour rôle la transduction du signal, c'est-à-dire la transformation d'un stimulus physique en un potentiel électrique détectable par le système nerveux. Le stimulus nociceptif est codé en fonction de son intensité. Les terminaisons libres sont classées en fonction de la modalité de stimulation qu'elles détectent. On trouve deux classes : la première correspond aux nocicepteurs mécaniques, activés par les déformations mécaniques nociceptives, et la seconde correspond aux nocicepteurs polymodaux. Ces derniers sont activés par des stimuli nociceptifs de n'importe quelle nature. Ainsi, ils peuvent détecter les stimuli mécaniques, chimiques et thermiques.

Les fibres conduisant l'influx nerveux sont classées selon leur diamètre et la présence ou non d'une gaine de myéline. On peut ainsi distinguer 3 grands groupes de fibres afférentes :

- Les fibres Aβ, qui sont de gros calibre (6-20 µm) et fortement myélinisées, conduisent l'information tactile non nociceptive. Leur vitesse de conduction est très élevée (30 à 120 m/s), en raison de leur forte myélinisation.
- Les fibres Aδ, qui sont de petits calibres (2-5 µm) et faiblement myélinisées, avec une vitesse de conduction moyenne (4 à 40 m/s). Elles transmettent les messages en provenance des nocicepteurs mécaniques et thermiques à la chaleur, ainsi que l'information thermique non nociceptive.
- Enfin les fibres C, qui ont un calibre très fin (0,3-3 µm), sont totalement dépourvues de myéline. Leur vitesse de conduction est de ce fait très lente (0,5 à

- 2 m/s). Elles conduisent l'information provenant des nocicepteurs polymodaux. Classiquement, elles sont subdivisées en fibres peptidergiques, qui synthétisent des peptides tels que la substance P et le CGRP (Calcitonin Gene-Related Peptide) et expriment le récepteur TrkA du facteur de croissance NGF (Nerve Growth Factor), et des fibres non peptidergiques, qui expriment le récepteur du GNDF (Glial-cell Derived Neurotrophic Factor) et un site de liaison pour la lectine IB4.

Le stimulus nociceptif détecté par les nocicepteurs va ensuite être acheminé au système nerveux central, avec un premier relai dans la corde dorsale de la moelle épinière. C'est une région clé du système nerveux central dans laquelle les informations sensorielles sont reçues, intégrées et relayées vers les centres supraspinaux. Les neurones de la substance grise de la moelle épinière sont organisés en couches, ou *laminae*, définies selon la classification de Rexed (Rexed, 1952). Les couches I à VI forment la corne dorsale de la moelle épinière et s'organisent dans un axe dorso-ventral, la couche I étant la plus dorsale. Les *laminae* I, II et V sont les principales entrées nociceptives. Néanmoins, les fibres nociceptives Aδ et C vont se distribuer dans les différentes couches de la corne dorsale de manière ordonnée et différente selon leur origine (cutanée, musculaire ou viscérale). Ainsi, les fibres C en provenance des territoires cutanés projettent majoritairement vers les *laminae* I et II, et dans une moindre mesure vers les V et X. Les fibres Aδ des territoires cutanées projettent quant à elles vers les *laminae* I et II. Enfin, les fibres afférentes en provenance des territoires musculaires et viscéraux projettent dans les *laminae* I, V et VI pour la partie musculaire, ou I, V, VII et X pour la partie viscérale.

Dans les différentes couches de la moelle épinière, les afférences primaires (des nocicepteurs) vont faire synapse avec les neurones de second ordre. Ces derniers vont véhiculer les informations nociceptives vers les centres supérieurs et sont divisés en deux groupes :

- Les neurones nociceptifs non spécifiques, à convergence, également appelés WDR (Wide Dynamic Range), répondent à des stimulations nociceptives ou non nociceptives. Ils reçoivent donc l'ensemble des informations somatosensorielles périphériques. On les retrouve principalement dans la *lamina* V, et dans une moindre mesure dans la *lamina* I. Ils vont coder précisément l'intensité de la stimulation nociceptive.

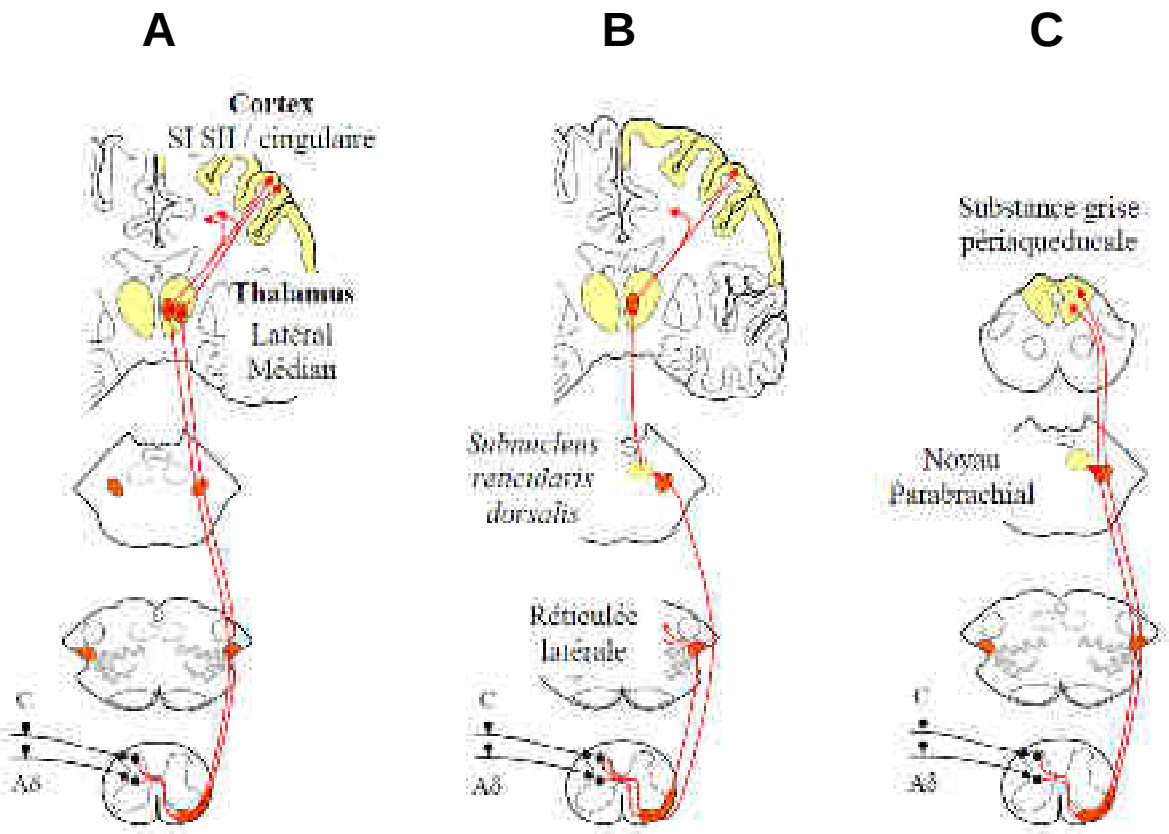


Figure 12 : Principales voies ascendantes nociceptives

A. Voie spino-thalamique. Un faisceau majoritaire projette vers le thalamus latéral puis vers les aires corticales sensorielles primaires et secondaires ; un faisceau minoritaire projette vers le thalamus médian puis vers le cortex cingulaire. **B.** Voie spino-réticulée. Une partie projette vers le *subnucleus reticularis dorsalis* tandis qu'une autre partie projette vers la substance réticulée latérale. **C.** Voie spino-ponto-mésencéphalique. Un premier tractus projette vers le noyau parabrachial et un second vers la substance grise périaqueducale.

- Les neurones nociceptifs spécifiques, qui ne répondent qu'à des stimulations mécaniques ou thermiques nociceptives et qui contactent des fibres strictement nociceptives. On en trouve majoritairement dans les couches I et II, et quelques uns dans la couche V.

IV.3.b. Les voies nociceptives ascendantes

Après avoir été intégré dans la moelle épinière, le message nociceptif est transmis vers les centres supraspinaux *via* les neurones de projection. Les projections vont réaliser une décussation au niveau médullaire puis vont emprunter les tractus de fibres ascendants. Il existe trois tractus nociceptifs principaux :

- Le tractus spino-thalamique (Fig. 12A) qui est la principale voie afférente ascendante. Un ensemble de fibres constitue le faisceau spino-thalamique dorsal, qui provient des *laminae* I, IV, V et VI et projette vers la partie latérale du thalamus, puis vers les aires somatosensorielles primaires et secondaires. Ce faisceau est responsable de la composante sensori-discriminative de la douleur. Un second ensemble de fibres constitue le faisceau spino-thalamique ventral et entre en jeu dans la composante affective et émotionnelle de la douleur. Ce faisceau est constitué de fibres provenant des couches VII, VIII et X qui projettent vers la partie médiane du thalamus, puis vers le cortex cingulaire antérieur et le cortex préfrontal.
- Les tractus spino-réticulés (Fig. 12B) qui participent à l'élaboration des composantes motivationnelles et affectives de la douleur. Ces tractus partent des *laminae* I et V et projettent vers le noyau giganto-cellulaire, le noyau réticulaire latéral et le *subnucleus reticularis dorsalis*.
- Enfin, les tractus spino-mésencéphaliques (Fig. 12C), participant à l'élaboration de la réponse comportementale, émotionnelle et autonome à la douleur. Ces faisceaux projettent essentiellement vers deux structures du tronc cérébral : la PAG à partie des *laminae* I, IV, V et VI, et le noyau parabrachial à partir de la couche I.

Parmi les tractus spino-mésencéphaliques, celui projetant vers le noyau parabrachial est particulièrement important pour l'intégration du message nociceptif et l'élaboration des réponses émotionnelles et autonomes à la douleur. Le noyau parabrachial intègre l'information nociceptive puis peut la rediriger vers des structures diencéphaliques. Ainsi, il peut projeter vers l'hypothalamus pour former la voie parabrachio-hypothalamique (Bester et al., 1997), vers le thalamus pour donner lieu à la

voie parabrachio-thalamique (Bourgeais et al., 2001), et vers le noyau central de l'amygdale pour constituer la voie parabrachio-amygdaloïde (Bernard et al., 1993). Cette dernière projection est particulièrement intéressante car elle montre l'intégration de l'amygdale dans un des circuits de la douleur, et de fait, son rôle potentiel dans celui-ci.

D'autres voies de projection existent (Millan, 1999), ce qui montre bien la diversité des voies ascendantes susceptibles d'acheminer le message nociceptif au cerveau. Néanmoins, bien que le rôle premier de ces voies est d'informer l'organisme de la présence d'un danger potentiel, elles peuvent également activer divers contrôles endogènes qui vont moduler le message nociceptif.

IV.3.c. Les contrôles nociceptifs descendants

Le message nociceptif peut être influencé par de nombreux contrôles descendants d'origine supraspinale qui vont exercer une action inhibitrice ou au contraire facilitatrice. En revanche, il n'existe pas de distinction entre les structures à l'origine des contrôles inhibiteurs ou facilitateurs. En effet, un même effecteur peut avoir des effets opposés en fonction de la cellule ou du récepteur-cible. Les contrôles descendants d'origine supraspinale sont nombreux et variés (Millan, 2002). Aussi, la présentation de ces derniers ne sera pas exhaustive mais s'intéressera essentiellement aux structures contactées par l'amygdale.

Le bulbe rostro-ventro-médian (RVM), est une source importante de sérotonine (Mason, 1999), et participe spécifiquement au contrôle tonique de la nociception. On y trouve deux types de populations cellulaires : les cellules *on* et les cellules *off*. Les cellules *off* ont une activité basale importante et participent aux contrôles descendants inhibiteurs, mais elles sont inhibées par une stimulation nociceptive. Les cellules *on*, en revanche, sont silencieuses en condition basale, mais vont s'activer lors de l'arrivée d'une stimulation nociceptive. Elles vont alors participer aux contrôles descendants facilitateurs. Le RVM, de part ses possibilités de modulation, peut donc contribuer aux phénomènes d'hyperalgésie et d'allodynie (Porreca et al., 2001).

La substance grise périaqueducale (PAG) présente des connections avec la plupart des autres structures impliquées dans la régulation de la nociception (*e.g.* RVM, cortex, hypothalamus, noyau parabrachial, noyau du tractus solitaire, …). La PAG a donc un rôle clé dans la régulation et l'intégration du message nociceptif. Elle peut contrôler les

réponses émotionnelles et comportementales à la douleur (Bandler and Shipley, 1994; Odeh and Antal, 2001). Ses contrôles descendants inhibiteurs s'effectuent principalement *via* le système noradrénergique (Millan, 2002). La PAG peut également moduler l'analgésie opioïdergique et non opioïdergique (Millan, 2002).

Le noyau parabrachial, de même que le noyau du tractus solitaire, sont tous deux des interfaces entre les systèmes sensoriels et les systèmes autonomes. Ils peuvent, *via* leurs projections, moduler les paramètres autonomes (*e.g.* fonctions cardiovasculaires, rythme cardiaque, pression artérielle) associés avec le comportement douloureux. Par ailleurs, ils sont à l'origine de contrôles descendants directs capables de produire une analgésie (Heinricher et al., 2009).

Enfin, l'hypothalamus, qui présente également des connections avec de nombreuses autres structures impliquées dans le contrôle de la nociception (*e.g.* PAG, noyau du tractus solitaire, RVM, …). C'est un acteur essentiel du système nerveux autonome, mais il est aussi à l'origine de plusieurs contrôles descendants, notamment dopaminergiques. Par ailleurs, le noyau parvocellulaire de l'hypothalamus a été montré comme induisant une analgésie en libérant de l'ocytocine dans la moelle épinière (Sawchenko and Swanson, 1982; Kremarik et al., 1995; Barberis and Tribollet, 1996; Breton et al., 2008). Ce contrôle semble fortement impliqué dans le phénomène d'« analgésie liée au stress » (Porro and Carli, 1988; Mogil et al., 1995), témoignant encore une fois du lien fort entre douleur et composante émotionnelle.

Les structures responsables des contrôles nociceptifs descendants, qu'ils soient inhibiteurs ou facilitateurs, sont donc fortement interconnectées en une organisation complexe. Par ailleurs, la plupart de ces structures ont des rôles multiples, pas spécifiquement nociceptifs, et participent à la réponse émotionnelle et autonome à la douleur.

IV.3.d. Localisation de l'amygdale dans les voies nociceptives

Parmi les voies spino-ponto-mésencéphaliques, la voie spino-parabrachio-amygdaloïde inclut l'amygdale dans un des nombreux circuits de la douleur (Bernard et al., 1993). Le CeA reçoit ainsi de l'information nociceptive de la part du noyau parabrachial. Cette information va être intégrée au sein du noyau, qui va alors, *via* ses efférences vers les centres de contrôles autonomes et nociceptifs, comme la PAG ou l'hypothalamus par exemple, moduler le comportement de l'individu.

Le BLA, quant à lui, reçoit des informations sensorielles, dont certaines, nociceptives *via* le thalamus, mais reçoit également des informations traitant de la composante émotionnelle de la douleur. *Via* ses connections avec le CeA, le BLA peut ainsi également être acteur de la modulation nociceptive et influencer les processus douloureux, afin de participer à des mécanismes d'hyper- ou d'hypoalgésie.

Objectifs

Objectifs

L'amygdale est impliquée dans l'une des principales voies nociceptives ascendantes et plusieurs équipes ont identifié son implication 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. Très peu de données sont disponibles quant à l'implication du complexe basolatéral de l'amygdale dans ce processus de régulation de la douleur.

L'objectif de ce doctorat a été pour moi de montrer que le BLA est un élément important de régulation de la nociception, et qu'il se place comme un pilote du noyau central et des efférences qui en émergent. Nous avons cherché à répondre à diverses questions visant à montrer les mécanismes d'action en jeu, et j'ai utilisé pour cela plusieurs approches techniques, partant d'un niveau intégré et allant progressivement vers un niveau cellulaire et moléculaire.

I. Etude de l'implication du BLA dans la régulation du comportement douloureux

La première partie de l'étude eut pour but de montrer l'effet comportemental d'une manipulation pharmacologique du BLA. Ainsi, j'ai utilisé une approche *in vivo* avec l'implantation bilatérale de canules dans le BLA de souris. Les expériences ont été réalisées chez des animaux sains dans un premier temps, pour voir l'action du BLA sur la nociception en conditions physiologiques, puis chez des animaux neuropathiques, pour voir son effet dans des conditions douloureuses.

Pour commencer, nous avons bloqué la transmission synaptique excitatrice NMDA à l'aide du MK-801, un antagoniste des récepteurs NMDA. Cette modulation entraînant un effet sur la sensibilité mécanique des animaux, nous avons alors bloqué la transmission synaptique inhibitrice GABAergique avec de la bicuculline. Dans ce cas également, les seuils nociceptifs ont été modifiés. Nous avons alors potentialisé la transmission GABAergique à l'aide du diazépam, une benzodiazépine de référence, ce qui a eu pour conséquence de produire le même effet que le blocage de la transmission

glutamatergique. Cette expérience a ainsi mis en évidence que la régulation de la nociception par le BLA est dépendante de l'équilibre entre excitation et inhibition.

- **Article I** : **Zeitler A**, Sage-Ciocca D, Poisbeau P and Darbon P. *The Basolateral complex of Amygdala neuronal network activity sets mechanical pain threshold*. European Journal of Pain, 2013, pour soumission.

Nous savons que les benzodiazépines et que l'étifoxine ont une action de stimulation de la neurostéroïdogenèse, et que plusieurs études ont montré que les neurostéroïdes peuvent être impliqués dans la modulation de la douleur. Ainsi, nous avons voulu voir si les effets obtenus par l'application de diazépam ou d'EFX étaient dépendant de la synthèse de neurostéroïdes endogènes. Pour cela, nous avons réitéré les expériences en présence de finastéride, un bloqueur de la synthèse des neurostéroïdes actifs réduits en positions 3α et 5α.

II. Etude électrophysiologique de l'action de l'EFX sur les neurones du BLA

La première partie *in vivo* a pu montrer que l'étifoxine infusée directement dans le BLA induit un effet sur le comportement douloureux des animaux. Cette molécule étant assez peu étudiée, il nous a paru intéressant d'étudier dans un second temps ses mécanismes d'action à l'échelle cellulaire et moléculaire sur les neurones du BLA. Pour cela, nous avons utilisé une approche électrophysiologique de patch-clamp *in vitro* sur une préparation de tranches d'amygdale.

Les effets de l'EFX ont été observés sur l'excitabilité des neurones, sur la transmission synaptique inhibitrice spontanée et miniature. Enfin, de la même manière que dans la première partie, nous avons voulu voir si les neurostéroïdes étaient impliqués dans les mécanismes d'action de l'EFX sur la transmission synaptique. Pour cela, nous avons à nouveau effectué des expériences en présence de finastéride, afin de bloquer la neurostéroïdogenèse et de n'observer que les effets directs de l'EFX sur le récepteur $GABA_A$.

- **Article II** : **Zeitler A**, Poisbeau P and Darbon P. *Application of Etifoxine in the Basolateral complex of Amygdala is anti-nociceptive*. A écrire.

Matériels et méthodes

PARTIE 1

Evaluation comportementale de la douleur

I. Animaux

Les expériences sont réalisées sur des souris C57BL/6J mâles âgées de 8 à 12 semaines au moment de la chirurgie. Les animaux sont maintenus en cycle 12 heures d'obscurité et 12 heures de lumière, avec nourriture et boisson *ad libitum*, à une température constante de 22 ± 2°C et une hygrométrie contrôlée de 50 ± 5 %.

II. Implantation des canules

Les animaux sont anesthésiés 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 ± 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.

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 : Antério-postérieur, -1.8 mm ; Latéral, ± 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

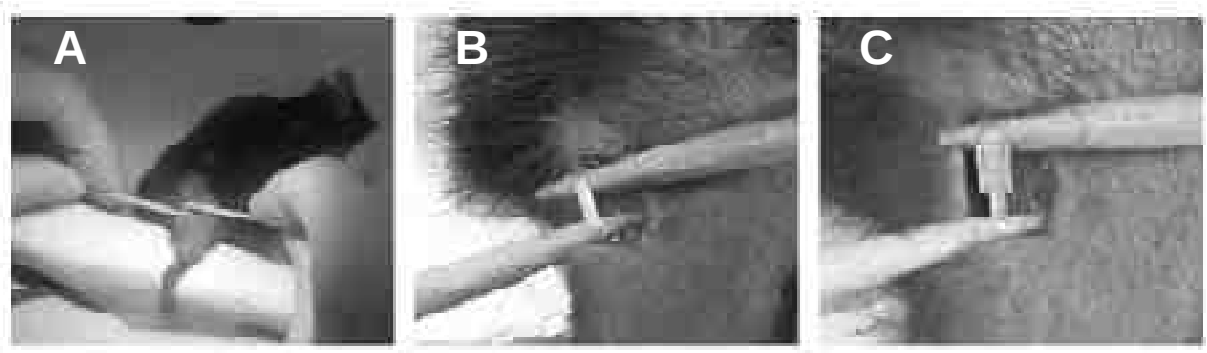


Figure 13 : Pose d'un « cuff » chez une souris

A. Une incision est effectuée le long de la patte arrière droite de l'animal, puis le nerf sciatique est isolé et exposé à l'air libre. **B.** Gros plan sur le nerf sciatique isolé. Celui-ci est maintenu à l'aide de cure-dents en bois. **C.** Nerf sciatique après la pose du manchon en polyéthylène (cuff).

éléments est alors inclus dans du ciment dentaire, puis l'animal est retiré du cadre stéréotaxique. Des bouchons de protection sont vissés sur les canules, pour éviter que celles-ci ne se bouchent avec des impuretés.

Afin de faciliter le réveil des animaux, ils reçoivent une injection intrapéritonéale d'Atipamézole (Antisedan®, 10 mg/kg), qui est un antagoniste des effets de la Médétomidine. Les animaux reçoivent également une injection intramusculaire d'un anti-inflammatoire (Kétofène®, 5 mg/kg).

Les souris sont alors replacées dans leur cage sous une lampe chauffante et surveillées jusqu'à leur réveil. Une semaine de récupération est observée, avec vérification journalière de l'état des animaux.

III. Modèle de douleur neuropathique

Afin d'évaluer les effets d'une modulation pharmacologique du BLA sur le comportement douloureux, les animaux subissent une seconde chirurgie visant à instaurer une douleur neuropathique. Le modèle retenu est le modèle 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 l'expérience 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) est posé autour du nerf (Fig. 13). 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 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. L'allodynie mécanique induite par la chirurgie est observable 3 jours après la chirurgie et persiste au moins 2 mois (Benbouzid et al., 2008).

IV. Injection dans les canules

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

Figure 14 : Illustration de l'évaluation de la sensibilité mécanique avec le test des filaments de von Frey sur une souris

L'animal est placé dans une enceinte en plastique transparent et repose sur une grille métallique. L'expérimentateur applique alors une pression calibrée sur les voûtes plantaires des pattes postérieures à l'aide de filaments de différents calibres. 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).

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 micro-pompe 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.

V. Evaluation de la sensibilité nociceptive mécanique

Le test des filaments de von Frey (Bioseb, France) est utilisé pour déterminer le seuil de sensibilité mécanique des pattes postérieures des souris. 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. Ils sont placés 15 minutes avant d'être testés dans une enceinte en plastique transparent reposant sur une grille métallique. 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 (Fig. 14). 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).

Pour chaque souris, des lignes de base sont réalisées avant l'instauration de la douleur neuropathique. Deux jours après la chirurgie, les animaux sont à nouveau testés puis tous les deux jours pendant deux semaines avant la première injection d'une molécule d'intérêt, afin d'obtenir des lignes de base avec des valeurs stables. Après injection dans les canules, les animaux sont testés 15 minutes, 30 minutes puis 1, 2, 4 et 24 heures après. Ce type d'évaluation est aussi réalisé pour les souris naïves.

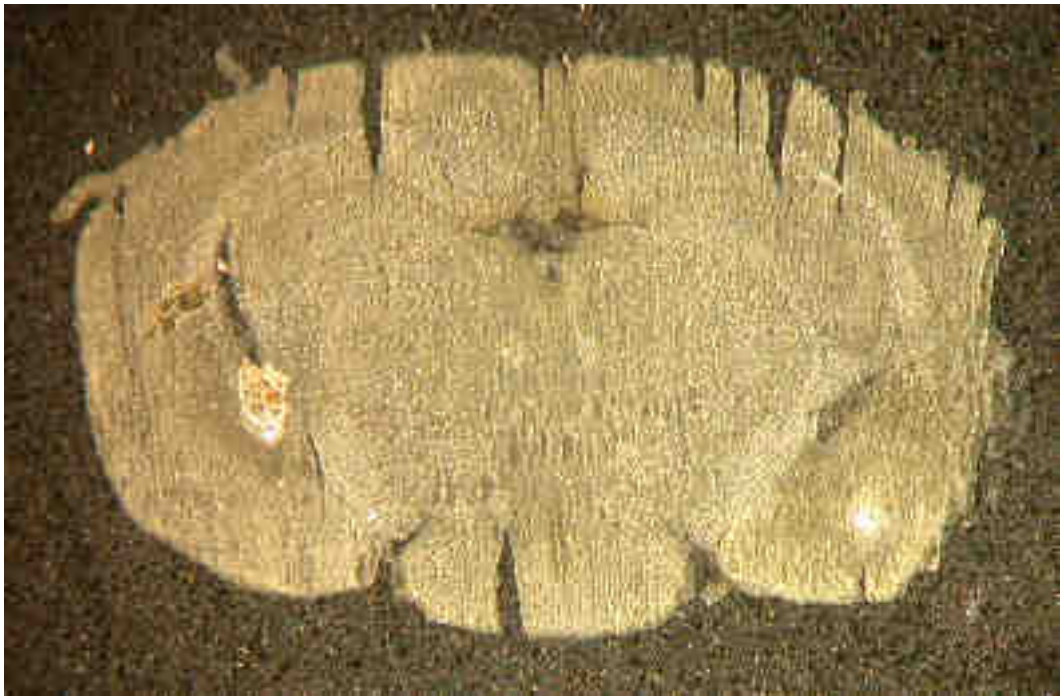


Figure 15 : Illustration d'une vérification histologique de l'implantation des canules

Après prélèvement, les cerveaux des animaux implantés sont fixés puis coupés en tranches coronales de 40 µm d'épaisseur. La bonne implantation des deux canules est systématiquement vérifiée pour chaque animal. Sur cette illustration, réalisée à l'aide d'une loupe binoculaire au grossissement x2,5, l'implantation est correcte à gauche. En revanche, à droite, le point d'injection est situé trop ventralement par rapport au BLA. Cet animal a donc été retiré de l'étude.

VI. 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 (Fig. 15). 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 (Sigma-Aldrich, 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 (Fig. 15). Si l'une des deux, ou les deux canules d'un animal s'avèrent être mal implantées, ce dernier est retiré de l'étude.

VII. Protocoles utilisés

En fonction de l'objectif expérimental, nous avons été amenés à utiliser 3 types de groupes d'animaux implantés bilatéralement dans le BLA avec des canules : des animaux sains, des animaux rendus neuropathiques par la pose d'un cuff, et des animaux neuropathiques (cuff) ayant reçu un traitement de 2 semaines au finastéride. Les détails temporels des protocoles utilisés sont présentés à l'aide des frises dans la figure de la page suivante (Fig. 16), et les détails des substances utilisées et injectées sont précisés dans le paragraphe suivant.

VIII. 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.

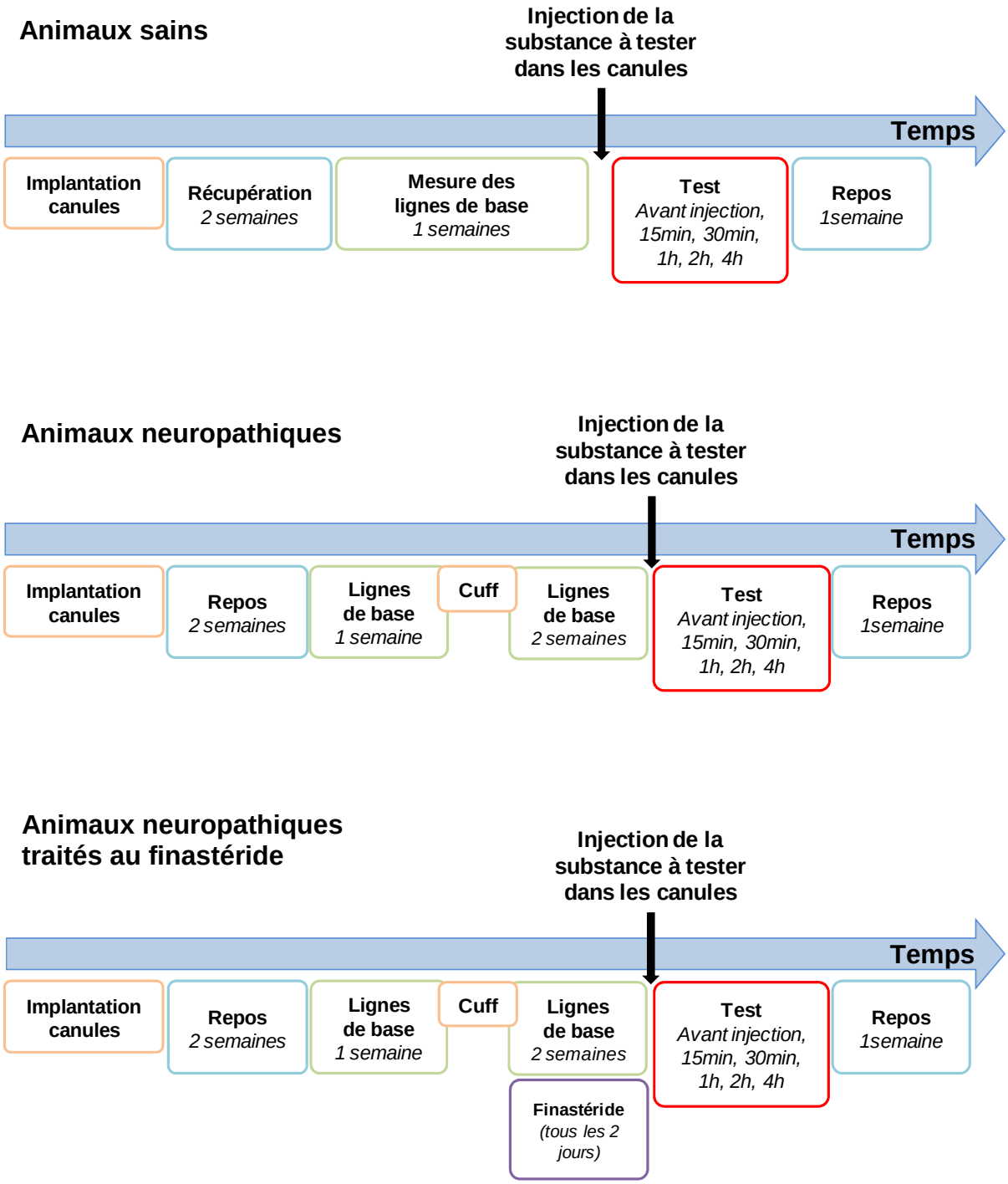


Figure 16 : Illustration de l'aspect temporel des différents protocoles utilisés en fonction du type de groupe d'animaux

Après la semaine de repos suivant l'injection dans les canules, soit une nouvelle injection et une série de test sont effectués, soit les animaux sont euthanasiés pour le prélèvement de leurs cerveaux, afin de vérifier la bonne implantation des canules.

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)amine-hydrochloride 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.

IX. Statistiques

Les analyses statistiques ainsi que les graphiques ont été effectués avec le logiciel Prism 4.0 (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 Friedman, suivi d'un test *post-hoc* de Dunn ont été utilisés afin de comparer les effets d'un traitement sur une même animal, ou pour comparer les différents groupes entre eux. Le seuil de significativité a été fixé à 5 %.

PARTIE 2

Enregistrements électrophysiologiques *in vitro*

I. Animaux

Les animaux sont maintenus en cycle 12 heures d'obscurité et 12 heures de lumière, à une température constante de 22 ± 0,2°C, une hygrométrie contrôlée de 50 ± 5 %, et avec nourriture et boisson *ad libitum*.

Les expériences sont réalisées sur des souris C57BL/6J mâles ou femelles, âgées de 21 à 28 jours. Cet âge est idéal pour ce type d'expérience, puisque les animaux sont assez avancés dans la maturation de leur système nerveux, mais pas trop âgés pour obtenir des enregistrements électrophysiologiques de bonne qualité et avec une reproductibilité stable.

II. Anesthésie des animaux

Les souris sont anesthésiées par une injection intrapéritonéale de kétamine (2,5 mg/100g, Imalgène 500, Mérial, France). La qualité de l'anesthésie est vérifiée par l'absence de réflexes moteurs.

III. Protocole de dissection

Une solution de Mg-ACSF (NaCl 124 mM ; NaH_2PO_4 1,25 mM ; $MgSO_4.7H_2O$ 10 mM ; KCl 2,7 mM ; $NaHCO_3$ 26 mM ; $CaCl_2$ 2 mM), supplémentée en magnésium, est ici utilisée pour limiter l'excitotoxicité cellulaire. En effet la stimulation mécanique du tissu lors de la réalisation des coupes peut entraîner une activation trop importante des récepteurs NMDA du glutamate, ce qui va provoquer une entrée massive de calcium dans la cellule et causer sa mort. Le magnésium présent en excès dans la solution de dissection va donc remplir son rôle de bloqueur du récepteur-canal NMDA et ainsi empêcher l'activation de celui-ci.

Une fois l'animal anesthésié, il est décapité. La tête de l'animal est immédiatement refroidie par immersion dans une solution à 4°C de Mg-ACSF préalablement oxygénée (95% O_2, 5% CO_2). On retire la peau du crâne, puis on réalise une incision sagittale de la

boite crânienne à partir du *foramen magnum* afin d'enlever les os pariétaux. Ensuite, l'encéphale est sorti de la boite crânienne et est immédiatement déposé dans une boite de Pétri remplie de solution Mg-ACSF à 4°C oxygénée. On réalise alors une section coronale au niveau du cervelet pour ne conserver que la partie rostrale.

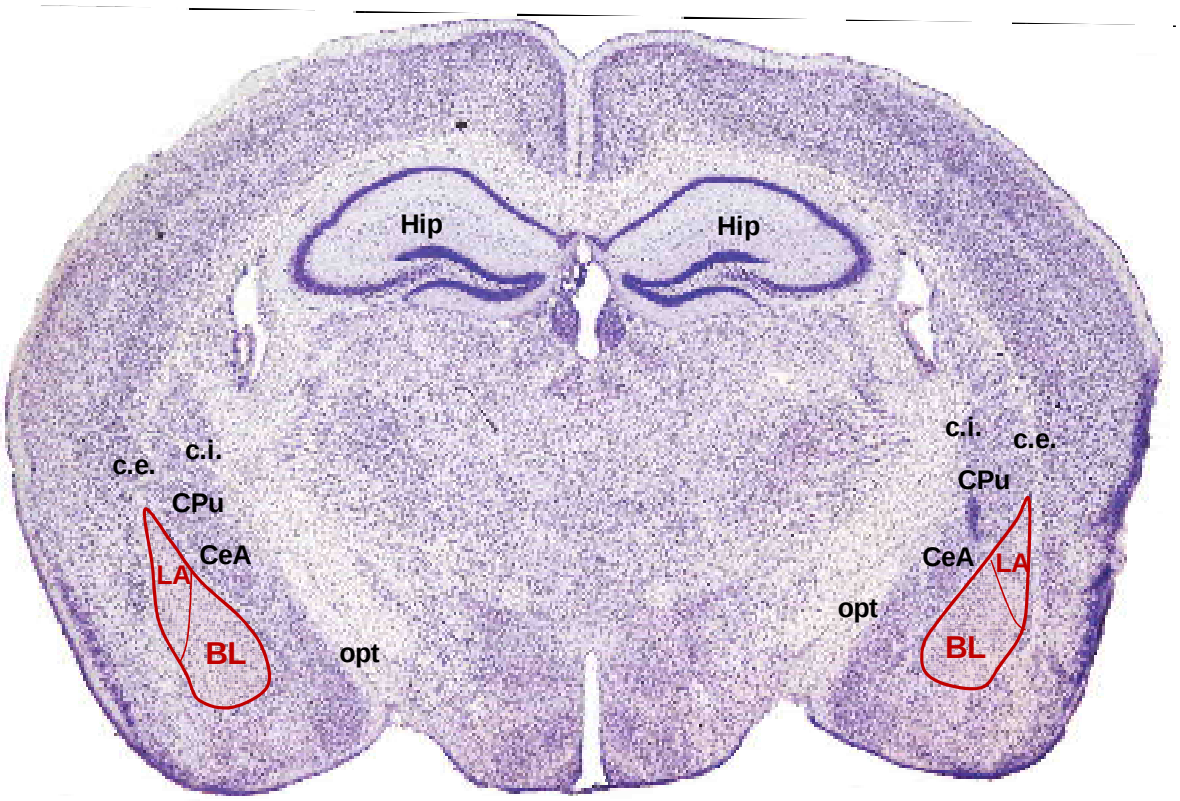
IV. Préparation des tranches

L'encéphale est collé par la face sectionnée sur le porte-échantillon L'ensemble est immédiatement inclus dans une solution d'agarose à 2 % (type I-B, point de gélification : 38°C ; Sigma-Aldrich, France). L'agarose est rapidement gélifié en appliquant une pince, préalablement congelée à -21°C, sur le porte-échantillon.

Le porte-échantillon est alors monté sur le vibratome (VF-200, Precisionary Instruments Inc., USA). La chambre de récupération des coupes est remplie de solution de Mg-ACSF oxygénée à 4°C. Des tranches d'une épaisseur de 325 ou de 450 µm sont alors effectuées. Elles sont ensuite stockées dans une chambre d'incubation à interface contenant une solution d'ACSF (NaCl 124 mM ; NaH_2PO_4 1,25 mM ; $MgSO_4.7H_2O$ 1,3 mM ; KCl 2,7 mM ; $NaHCO_3$ 26 mM ; $CaCl_2$ 2 mM) à 34°C continuellement oxygénée, pendant 45 minutes. Suite à cela, les tranches sont placées dans une chambre à immersion contenant une solution d'ACSF oxygénée, à température ambiante, pendant au moins 45 minutes. Pour les expériences portant sur l'étude des courants inhibiteurs miniatures, la solution d'ACSF est additionnée de tétrodotoxine (TTX) 0,5 µM (Abcam Biochemicals, Angleterre) et d'acide kynurénique 2 mM (Sigma-Aldrich, France), qui sont respectivement un bloqueur des canaux sodium voltage-dépendants et un antagoniste non-compétitif des récepteurs NMDA et AMPA/Kaïnate du glutamate. Cette solution sera celle utilisée au moment des enregistrements électrophysiologiques. Les tranches sont conservées dans cette même chambre à température ambiante jusqu'au moment de leur utilisation.

V. Le montage expérimental

Deux dispositifs d'enregistrement différents ont été utilisés au cours de ma thèse, en fonction de la nécessité des expériences.



Légende

BL : noyau basolatéral de l'amygdale
c.e. : capsule externe
c.i. : capsule interne
CeA : noyau central de l'amygdale
CPu : noyaux Caudé et Putamen
LA : noyau latéral de l'amygdale
Hip : hippocampe
Opt : tractus optique

Figure 17 : Coupe coronale de cerveau de souris avec une coloration au crésyl violet

Le complexe basolatéral de l'amygdale (BLA), constitué du noyau latéral et du noyau basolatéral, est aisément repéré dans la fourche formée par la division de la capsule externe, située sous les fibres striatales des noyaux Caudé et Putamen. Le noyau central est quant à lui situé médialement par rapport à la partie interne de la fourche, environ à mi-hauteur du BLA. Avec l'hippocampe (Hip) localisé plus dorsalement, ces différents repères anatomiques constituent de bons indices permettant de localiser et de viser précisément le BLA lors de l'approche sous loupe binoculaire ou sous observation au microscope.

V.1. Dispositif de patch-clamp « en aveugle »

Chaque tranche d'amygdale de 450 µm d'épaisseur est placée dans une chambre d'enregistrement à interface, à température ambiante, et maintenue en place par une harpe en platine. La chambre est perfusée par gravité avec une solution d'ACSF oxygénée (95% O_2, 5% CO_2) à un débit de 2 mL/min.

Le complexe Basolatéral (BLA) et le noyau Central (CeA) de l'amygdale sont visualisés avec une loupe binoculaire (Zeiss, Allemagne), en se servant de plusieurs repères anatomiques visibles. Ainsi qu'illustré sur la figure 17, chez la souris, le BLA est aisément repéré dans la fourche résultant de la division de la capsule externe.

V.2. Dispositif de patch-clamp infrarouge

Des tranches d'amygdale de 325 µm sont utilisées dans ce cas. En effet, l'observation des tranches se faisant à l'aide d'un microscope droit inversé, l'utilisation de tranches trop épaisses gênerait le passage de la lumière à travers celles-ci et empêcherait une visualisation optimale des structures. Chacune des tranches est placée dans une chambre d'enregistrement à immersion, à température ambiante, et maintenue en place à l'aide d'une harpe en platine. La chambre est perfusée continuellement par gravité avec une solution d'ACSF oxygénée à un débit de 2 mL/min. Le niveau de solution est maintenu constant grâce à une pompe péristaltique qui aspire au même débit.

L'observation des tranches se fait à l'aide d'un microscope droit (Axioskop, Zeiss, Allemagne) équipé d'un contraste de phase et d'une caméra infrarouge (C2400, Hamamatsu, Japon). La première observation du BLA ainsi que la localisation de la pipette se font avec un objectif à faible grossissement de x10. La visualisation précise des neurones et l'approche avec la pipette d'enregistrement se font ensuite avec un objectif à immersion à eau de grossissement x40.

VI. Enregistrements électrophysiologiques

VI.1. Les pipettes et les solutions d'enregistrement

On utilise des électrodes de verre, fabriquées à partir de tubes de borosilicate (diamètre externe 1,2 mm, diamètre interne 0,69 mm, Harvard Apparatus LTD, GB). Ces

tubes sont étirés grâce à une étireuse laser horizontale (P-2000, Sutter Instruments Co, USA). Les électrodes sont alors remplies d'une solution intrapipette. Au cours de ce travail de thèse, deux solutions intrapipette ont été utilisées. La solution 1 (K_2SO_4 80 mM ; $MgCl_2$ 2 mM ; KCl 8 mM ; HEPES 10 mM ; MgATP 2 mM ; NaGTP 0,2 mM ; Biocytine 10 mM ; pH = 7,3 ajusté avec KOH ; osmolarité = 295 mOsm ajustée avec du saccharose) possède un potentiel d'inversion des ions Cl^- à -60 mV et un potentiel d'inversion des cations à 0 mV. Dans cette condition, en imposant un potentiel de membrane de -40 mV, on peut enregistrer à la fois les courants synaptiques glutamatergiques (AMPA et NMDA), qui sont alors entrants, et les courants synaptiques GABAergiques qui sont sortants. Cette solution rend ainsi possible l'enregistrement à la fois des courants synaptiques excitateurs et inhibiteurs, tout en conservant les transmissions synaptiques libres au sein du réseau. Dans la seconde partie des expériences, je me suis focalisé sur la transmission synaptique inhibitrice. J'ai alors utilisé la solution intrapipette 2 (KCl 125 mM ; $MgCl_2$ 2 mM ; HEPES 10 mM ; MgATP 2 mM ; NaGTP 0,2 mM ; Biocytine 10 mM ; pH = 7,3 ajusté avec KOH ; osmolarité = 295 mOsm ajustée avec du saccharose) qui possède un potentiel d'inversion des ions Cl^- à 0 mV et un potentiel d'inversion des cations à 0 mV. En imposant un potentiel de membrane de -60 mV, on observe alors les courants synaptiques glutamatergiques et GABAergiques qui sont entrants. Pour pouvoir enregistrer uniquement des courants inhibiteurs, de l'acide kynurénique (antagoniste des récepteurs AMPA/Kaïnate/NMDA du glutamate) est ajouté au milieu extracellulaire.

L'utilisation de biocytine dans les milieux intrapipette n'affecte pas les enregistrements électrophysiologiques mais permet une révélation *a posteriori* de la localisation des neurones ainsi que de leurs projections.

VI.2. Le patch-clamp

Une légère pression positive est appliquée dans la pipette puis on la plonge dans le milieu extracellulaire. Sa résistance est alors mesurée par l'application d'un *seal test* de -5 mV. La pipette est alors descendue dans la tranche à l'aide d'un micromanipulateur à huile (Narishige, Japon) sur le poste infrarouge, ou bien à l'aide d'un micromanipulateur mécanique sur le poste en aveugle. Une fois au contact d'une cellule, la pression positive intrapipette est relâchée, permettant ainsi à la pipette de se coller intimement à la membrane et d'obtenir une jonction avec une résistance de l'ordre du GΩ. On obtient alors la configuration « cellule attachée ». On impose un potentiel de -60 mV. Le passage en configuration « cellule entière » se fait ensuite par l'application d'une légère pression négative, afin de rompre la membrane sous la pipette. Le potentiel membranaire

de repos est mesuré immédiatement après l'obtention de la configuration « cellule entière ». On mesure également, avant compensation, les valeurs de capacitance membranaire, traduisant la taille de la cellule et de ses prolongements, et de résistance sériée.

VI.3. L'acquisition des données

La chaine de mesure se compose d'un amplificateur Multiclamp 700B (Axon Instruments, USA). L'acquisition des données est effectuée *via* une interface Digidata 1440A (Axon Instruments, USA) et le module Clampex du logiciel pClamp 10.2 (Axon Instruments, USA). Les courants sont également visualisés sur un oscilloscope (TDS 210, Tektronix, USA). Les signaux sont numérisés à 10 kHz, filtrés à 4 kHz et enregistrés sur un ordinateur.

VII. Préparation et utilisation des substances pharmacologiques

Tous les agents pharmacologiques utilisés, sauf l'acide kynurénique, sont préparés sous forme de solutions stock concentrées, conservées à - 21°C, et diluées dans de l'ACSF extemporanément.

L'acide kynurénique (Sigma-Aldrich, France) est broyé puis dilué directement dans l'ACSF à une concentration finale de 2 mM.

Le diazépam (Sigma-Aldrich, France) est dilué dans de l'éthanol absolu pour une concentration stock de 1 mM, puis utilisé à une concentration finale de 1 µM. La concentration finale d'éthanol est inférieure à 0,1 %.

L'étifoxine (6-Chloro-4-méthyl-4-phényl-3,1-benzoxazin-2-yl(éthyl)amine-hydrochloride ou Stresam®, Biocodex, Gentilly, France) (EFX) est diluée dans du DMSO pour une concentration stock de 100 mM. L'EFX est utilisée diluée dans de l'ACSF 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. Du finastéride (inhibiteur de la 5α-réductase) a été ajouté à la solution d'ACSF pendant l'incubation à température ambiante qui suit la réalisation des tranches. Ces dernières incubent alors au moins 3 heures dans la solution contenant le finastéride afin d'éliminer toute trace de neurostéroïdogenèse. Le finastéride (Sigma-Aldrich, France) est dilué dans de l'éthanol absolu à une concentration stock de 50 mM, puis utilisé à une

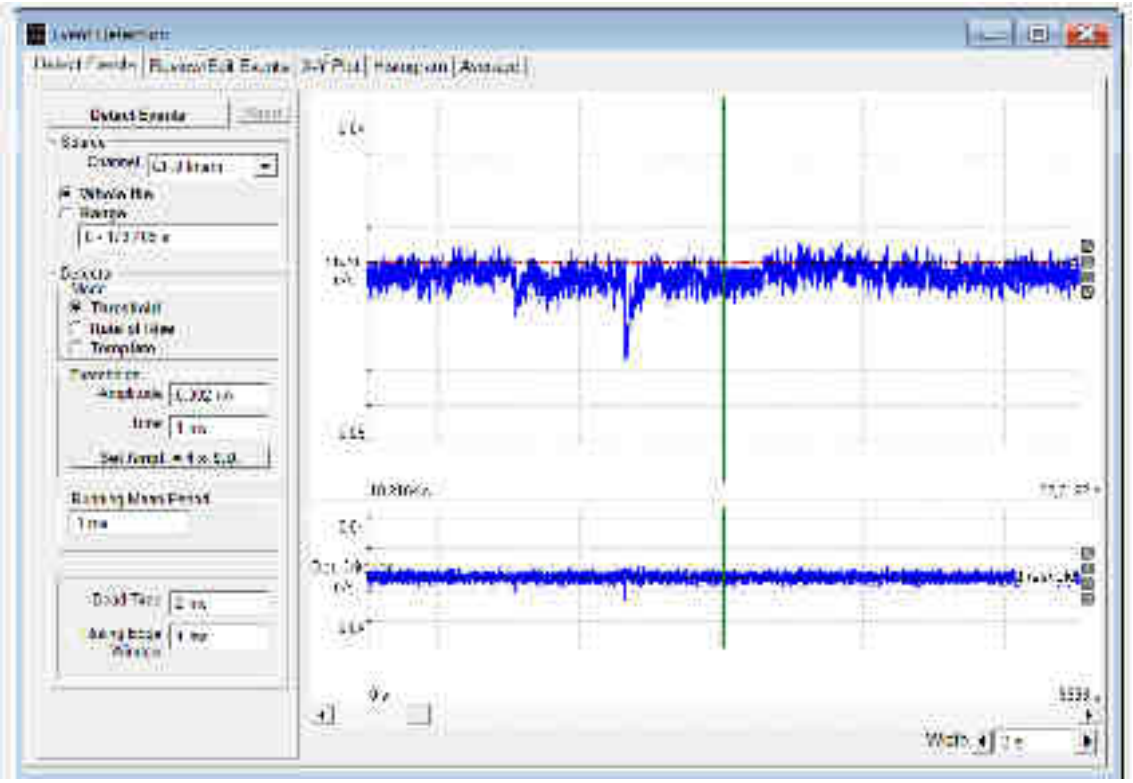


Figure 18 : Détection des courants post-synaptiques à l'aide du logiciel WinEDR

On fixe un seuil de détection (« threshold ») en renseignant les cases « amplitude » et « time ». Généralement on fixe un seuil à -2 pA pour 1 ms. Ainsi, tout évènement ayant une pente supérieure à 2 pA / 1 ms et passant sous la ligne de base mobile (en rouge), sera considéré par le logiciel comme un courant synaptique. On peut également régler le temps durant lequel est mesurée la ligne de base avant un évènement (« running mean period », fixé à 1 ms dans notre cas). Enfin le temps de rejet (« dead time », fixé à 2 ms), qui correspond à la période durant laquelle aucun autre évènement ne peux être détecté. Ce dernier paramètre est notamment utile pour éviter les détections artefactuelles en doublet ou triplet qui sont fréquentes avec le logiciel.

concentration finale de 50 µM en le diluant dans l'ACSF. La concentration finale d'éthanol est inférieure à 0,1 %.

VIII. Contrôle de la morphologie et de la connectivité des neurones enregistrés

Le milieu intrapipette contenant 10 mM de biocytine (Sigma-Aldrich, France), une révélation *post-hoc* des neurones enregistrés peut être effectuée. Une fois l'enregistrement électrophysiologique terminé (minimum 20 min), les tranches sont fixées et conservées dans une solution de paraformaldéhyde à 4 % (PBS, paraformaldéhyde 4 %). Ensuite les tranches sont rincées 3 fois avec du PBS (NaCl 154 mM ; Na_2HPO_4 13,1 mM ; NaH_2PO_4 2,5 mM ; merthiolate de sodium 2 %). La révélation de la biocytine est réalisée par une incubation de 12h avec de l'isothiocyanate de fluorescéine (FITC) conjugué à l'extravidine (Sigma-Aldrich, France), à la concentration finale de 1/400e dans du PBS-Triton (PBS, Triton x100 0,5%). La tranche est rincée 3 fois dans du PBS puis montée entre lame et lamelle à l'aide d'un milieu de montage Vectashield (Hard set H-1400, Vector laboratories Inc., USA), pour une observation au microscope à épifluorescence (Leica DMRD, Allemagne).

IX. Analyse des enregistrements

L'analyse des résultats est effectuée à l'aide des logiciels WinEDR et WinWCP (fournis gracieusement par le Dr John Dempster, Strathclyde Electrophysiology Software, Angleterre).

Le logiciel WinEDR est utilisé pour la détection des courants post-synaptiques. Celle-ci se fait de manière automatisée après avoir déterminé les paramètres de détection. Comme le montre la figure 18, on fixe un seuil de détection de -2 pA en dessous de la ligne de base pour une durée de 1 ms. Ainsi, toute variation du courant au dessus de ce seuil est considérée comme un évènement synaptique. Le calcul de la ligne de base (« running mean period ») est effectué durant la milliseconde précédent le début de l'évènement détecté. Cette ligne de base est mobile car recalculée pour chaque évènement détecté. Enfin le dernier paramètre (« dead time ») correspond au temps de rejet d'une nouvelle détection ; pendant les 2 ms suivant le premier évènement détecté, aucune autre détection ne sera faite. L'ensemble de ces paramètres permet de déceler les évènements synaptiques qui sortent du bruit de fond, tout en minimisant la détection d'évènements non synaptiques. Néanmoins, chaque évènement issu de cette première détection est ensuite contrôlé visuellement afin d'éliminer les éventuelles erreurs (Fig. 19).

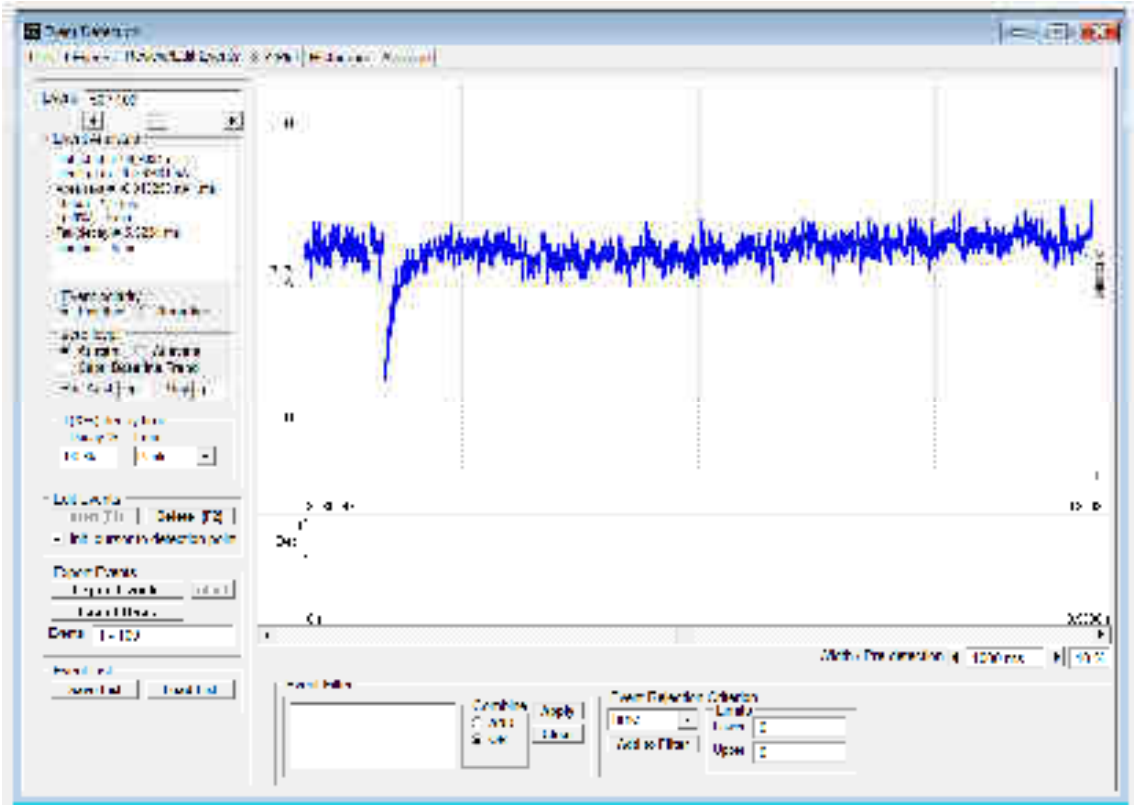


Figure 19 : Contrôle manuel des évènements détectés automatiquement par le logiciel WinEDR

Le logiciel détecte automatiquement les évènements synaptiques en fonction en fonction des paramètres de recherche entrés précédemment. Néanmoins, une vérification visuelle de chaque évènement détecté est nécessaire afin d'éliminer les erreurs éventuelles.

Ensuite, le logiciel WinWCP est utilisé afin d'extraire les caractéristiques des évènements synaptiques enregistrés ; l'amplitude des courants (en pA), leur fréquence instantanée (en Hz), et leur constante de déactivation (en ms). La mesure des 2 premiers paramètres (amplitude et fréquence) est automatique ; le logiciel passe les évènements d'un enregistrement en revue et va donner l'amplitude moyenne et la fréquence moyenne de ces évènements. Concernant la constante de déactivation, on refait une deuxième analyse du fichier, en plaçant cette fois-ci le premier curseur au pic, et le deuxième après le retour à la ligne de base. Une fonction monoexponentielle est alors ajustée entre les deux curseurs. A partir de la fonction exponentielle utilisée, le logiciel va déterminer la constante de temps sur 5 % et 95 % de l'amplitude totale du courant. La mesure de cet effet se fait en sélectionnant des évènements synaptiques isolés de différentes amplitudes et en réalisant un évènement moyenné pour chaque condition. On compare ensuite la cinétique de chacun de ces évènements moyennés.

Pour les enregistrements en mode courant imposé, le logiciel détecte par une méthode de seuillage les potentiels d'action (PA), ce qui nous a permis de déterminer les profils de décharge des neurones, à savoir les patrons temporels d'apparition des potentiels d'action. Parmi les paramètres mesurés par le logiciel nous avons pris en compte la fréquence instantanée moyenne des PA ainsi que le délai d'apparition du premier PA. Par ailleurs, nous avons aussi mesuré le potentiel membranaire de repos (Vm), la rhéobase (V rhéobase), qui correspond à la valeur seuil de potentiel membranaire à partir de laquelle le premier PA va être émis, et le courant injecté nécessaire pour l'atteindre (I rhéobase). Enfin, pour mesurer la régularité des PA, nous avons utilisé le coefficient de variation (CV) des intervalles inter-potentiels, qui correspond à l'écart-type divisé par la moyenne.

X. Statistiques

Les analyses statistiques ainsi que les graphiques ont été effectués avec le logiciel Prism 4.0 (GraphPad Software, USA). Les résultats sont exprimés en valeur moyenne ± SEM (erreur standard à la moyenne).

Le test non paramétrique de Wilcoxon (Mann-Whitney) a été utilisé afin de comparer soit deux groupes entre eux, soit les effets d'une substance sur une même cellule. Le seuil de significativité a été fixé à 5 %.

Le test non paramétrique de Kolmogorov-Smirnov a été utilisé pour comparer la distribution de deux populations. Le seuil de significativité a été fixé à 5 %.

Résultats

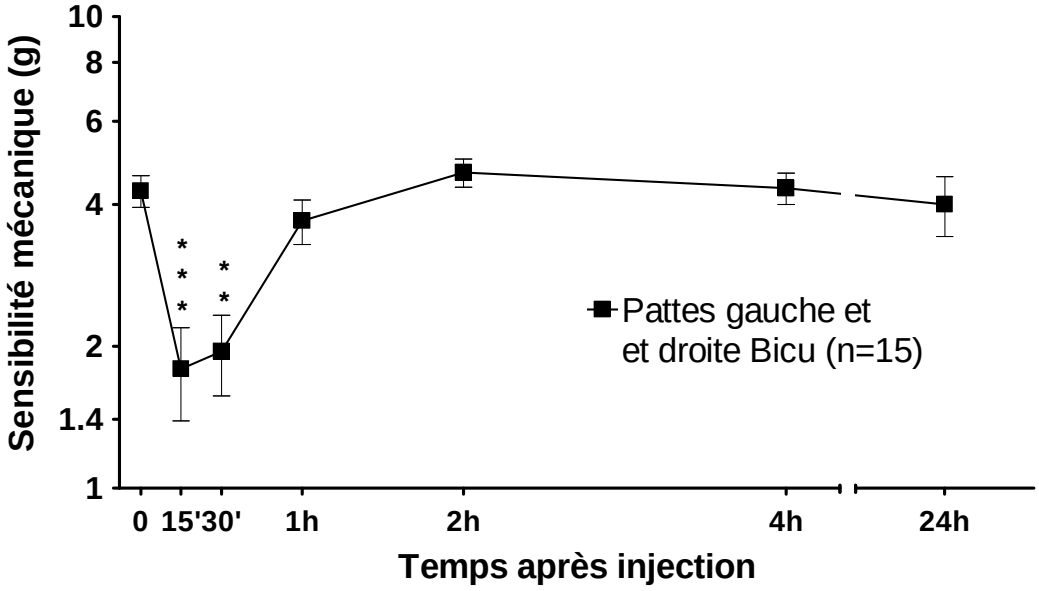


Figure 20 : Effet d'une injection de bicuculline dans le BLA sur la sensibilité mécanique chez des animaux sains

L'injection de bicuculline (10 µM), un antagoniste des récepteurs $GABA_A$, dans le BLA provoque une diminution significative du seuil de sensibilité mécanique chez des souris saines pendant 30 minutes, résultant en une allodynie mécanique. Cet effet est bilatéral et réversible dans le temps.

PARTIE 1

Etude de l'implication du BLA dans la régulation du comportement douloureux

La première partie de ma thèse s'est intéressée à l'implication du complexe basolatéral de l'amygdale dans la modulation du comportement douloureux chez la souris. Les expériences présentées ci-après sont réalisées sur des souris mâles, implantées bilatéralement dans le BLA à l'aide de canules permettant l'injection localisée de substances pharmacologiques. L'effet de cette modulation pharmacologique est ensuite observé sur la mesure du seuil de sensibilité mécanique des pattes postérieures, à l'aide du test des filaments de von Frey.

I. Modulation pharmacologique des seuils nociceptifs mécaniques par infusion dans le BLA d'animaux sains

Afin d'observer l'influence du BLA sur la sensibilité nociceptive mécanique de l'animal, nous avons réalisé une étude préliminaire sur des animaux sains, ne présentant aucune douleur neuropathique. Les souris (n=15) reçoivent une injection bilatérale de bicuculline (10 µM), un antagoniste spécifique des récepteurs $GABA_A$. On effectue les mesures de sensibilité mécanique à différents temps avant et après l'injection afin de voir son effet sur le comportement nociceptif. Les résultats montrent une diminution drastique de la sensibilité mécanique dans les 30 minutes suivant l'injection (t0 : 4,27 ± 0,33 g, t+15 min : 1,79 ± 0,40 g, $p < 0,001$; 30 min : 1,95 ± 0,40 g, $p < 0,01$) (Fig. 20). Le seuil de sensibilité retourne ensuite de façon durable à des valeurs équivalentes ($p > 0,05$) à celles précédent l'injection (t+1h : 3,69 ± 0,40 g, t+4h : 4,33 ± 0,33 g), montrant la réversibilité de l'action de la bicuculline.

Cette première expérience nous apprend donc que le blocage de la transmission synaptique GABAergique dans le BLA entraîne un effet pro-nociceptif chez les animaux. Cela nous montre à la fois l'implication de la transmission inhibitrice du BLA dans la modulation de ce type de comportement et son importance sur la réponse comportementale. Cela nous laisse suspecter la présence d'un tonus inhibiteur dans la structure en conditions physiologiques. En revanche, nous ne pouvons pas nous

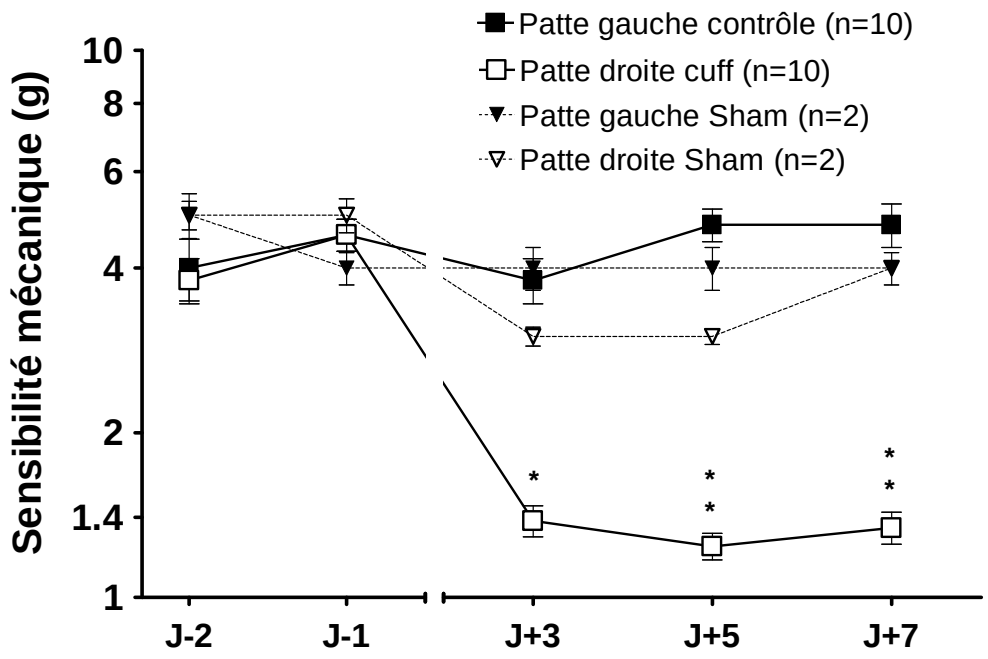


Figure 21 : Validation du modèle du « cuff »

L'implantation d'un manchon en polyéthylène (cuff) sur la branche principale du nerf sciatique de la patte droite des souris provoque une allodynie mécanique chez celles-ci. La douleur neuropathique apparaît dès 3 jours après la chirurgie. Chez les animaux Sham ayant subit la chirurgie mais non la pose du cuff, on note une légère diminution de la sensibilité mécanique sur la patte droite. Cette diminution est non-significative et disparaît 1 semaine après la chirurgie.

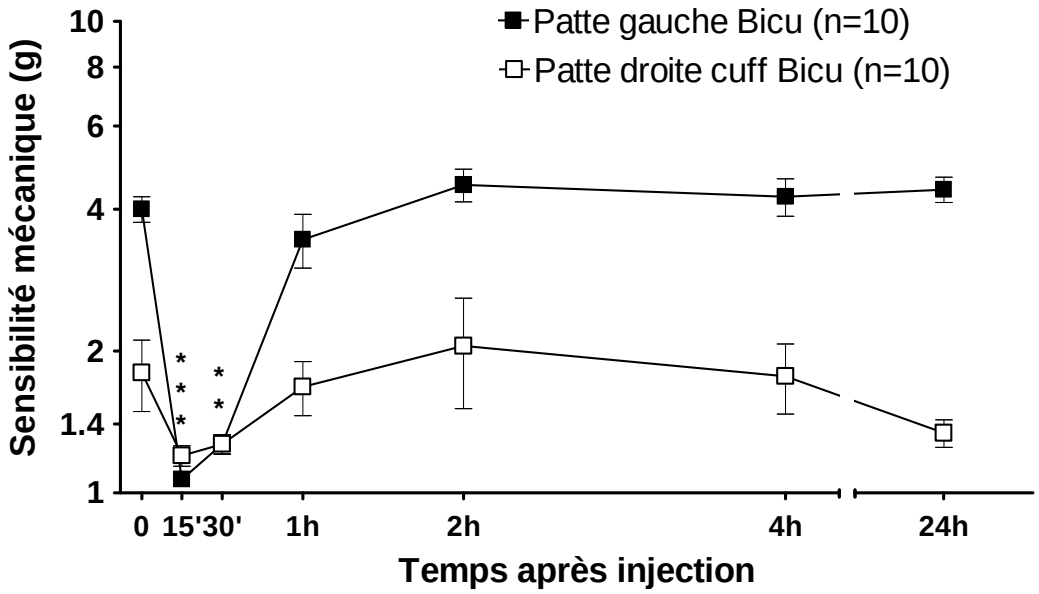


Figure 22 : Effet d'une injection de bicuculline dans le BLA sur la sensibilité mécanique chez des animaux neuropathiques

L'injection bilatérale de bicuculline (Bicu, 10 µM) dans le BLA d'animaux neuropathiques provoque une diminution significative du seuil de sensibilité mécanique sur leur patte contrôle (gauche). Ceci résulte donc en une allodynie mécanique. Sur la patte cuff (droite) présentant déjà une allodynie, cette dernière est accrue de manière non-significative par l'injection de bicuculline. Pour les 2 pattes, l'effet de l'injection disparaît après 1 heure.

prononcer sur le lieu d'action de ce tonus inhibiteur : agit-il sur les informations ascendantes arrivant dans le BLA notamment à partir du cortex ou du thalamus, ou bien module-t-il les informations descendantes qui sortent de l'amygdale *via* le noyau central, ou encore a-t-il une action sur ces deux niveaux ?

II. Modulation pharmacologique des seuils nociceptifs mécaniques par infusion dans le BLA d'animaux neuropathiques

II.1. Validation du modèle de douleur neuropathique : modèle du « cuff »

Nous avons ensuite étudié l'implication de la transmission synaptique GABAergique du BLA sur le comportement douloureux des animaux présentant des douleurs neuropathiques. Une semaine après l'implantation de canules dans le BLA, les animaux (n=10) subissent une seconde chirurgie, consistant en la pose d'un manchon en polyéthylène sur la branche principale de leur nerf sciatique droit (modèle du « cuff »). Les seuils de sensibilité mécanique de ces animaux sont mesurés avant et après cette chirurgie. On peut ainsi observer un abaissement du seuil de sensibilité ($p < 0,05$) sur la patte droite, 3 jours après la pose du cuff (J-1 : 4,60 ± 0,31 g, J+3 : 1,38 ± 0,09 g) (Fig. 21). Le seuil de la patte droite reste en revanche à son niveau basal après la chirurgie (J-1 : 4,60 ± 0,31 g, J+3 : 3,80 ± 0,36 g, $p > 0,05$). Un contrôle est effectué avec des animaux Sham (n=2) ayant subit la même chirurgie que ceux du groupe test, mais sans la pose du manchon en polyéthylène (cuff). On peut observer une légère sensibilisation non significative ($p > 0,05$) et transitoire de la patte opérée chez ces animaux durant les 5 jours suivant l'opération (J-1 : 5,00 ± 0,36 g, J+5 : 3,00 ± 0,12 g) (Fig. 21). Dans les 7 jours suivant la pose du cuff, la mesure des seuils de sensibilité est effectuée de manière régulière jusqu'à l'obtention de valeurs stables pour tous les animaux (Fig. 21).

II.2. Implication de la transmission synaptique inhibitrice GABAergique

Dans les mêmes conditions que précédemment, des animaux neuropathiques reçoivent une injection bilatérale de bicuculline (10 µM). Celle-ci entraîne une baisse du seuil de sensibilité sur la patte (gauche) contrôle (t0 : 4,00 ± 0,25 g, t+15 min : 1,07 ± 0,04 g, $p < 0,001$, t+30 min : 1,27 ± 0,06 g, $p < 0,01$) (Fig. 22), similaire à celle observée précédemment chez les animaux sains (Fig. 20). On observe également une légère hypersensibilité non-significative sur la patte (droite) cuff (t0 : 1,80 ± 0,31 g,

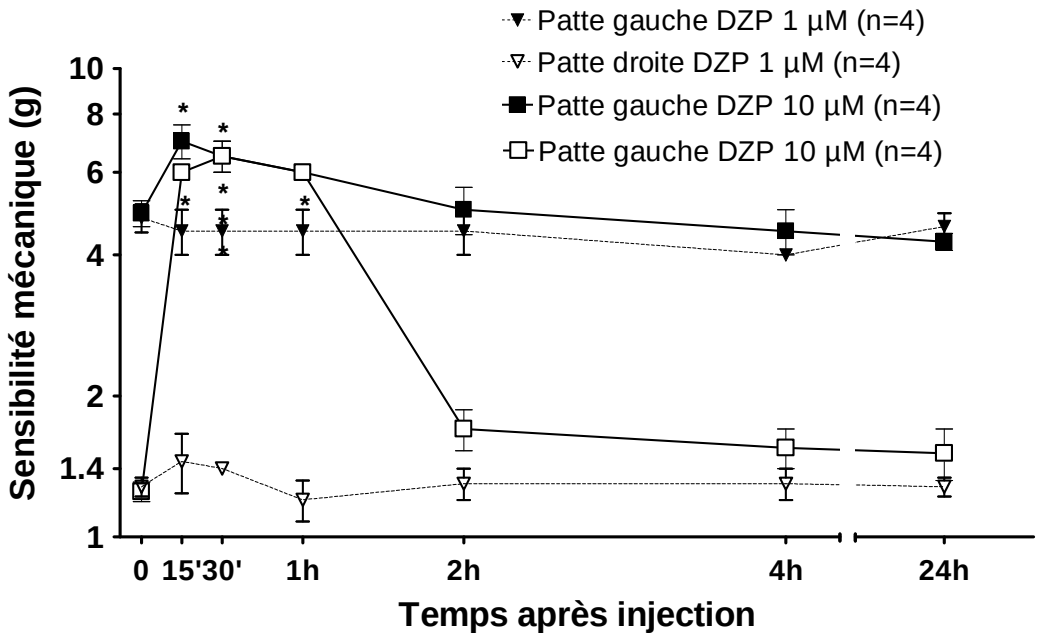


Figure 23 : Test d'une injection de diazépam à deux concentrations différentes dans le BLA d'animaux neuropathiques

Deux doses différentes ont été testées afin de voir l'effet d'une injection bilatérale dans le BLA de diazépam (DZP), un modulateur allostérique positif des récepteurs $GABA_A$. La dose plus faible de 1 µM n'induit aucune modification de la sensibilité mécanique. En revanche, la dose de 10 µM provoque un effet anti-allodynique significatif sur la patte cuff et une augmentation légère de la sensibilité sur la patte contrôle.

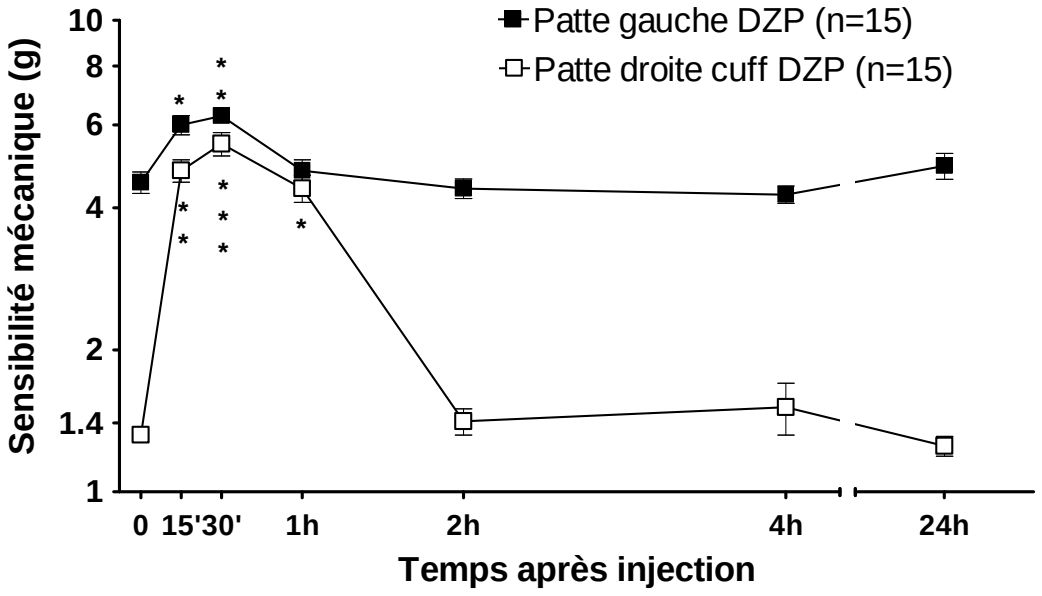


Figure 24 : Effet d'une injection de diazépam dans le BLA sur le comportement nociceptif d'animaux neuropathiques

L'injection bilatérale de DZP (10 µM) dans le BLA d'animaux neuropathiques induit un effet anti-allodynique sur la patte cuff. Cet effet perdure 1 heure après l'injection. Le DZP provoque également une augmentation légère de la sensibilité mécanique sur la patte contrôle.

t+15 min : 1,20 ± 0,06 g, t+30 min : 1,27 ± 0,06 g, $p > 0,05$). Dans ce cas, l'effet est temporaire et disparaît en 1 heure pour les deux pattes (Fig. 22).

Les résultats obtenus ici montrent que le blocage de la transmission synaptique inhibitrice GABAergique dans le BLA est suffisant pour entraîner l'induction d'une allodynie mécanique équivalente à celle observée lors d'une douleur neuropathique.

II.3. Conséquence de la potentialisation de la transmission synaptique inhibitrice GABAergique

Le blocage de la transmission synaptique inhibitrice du BLA entrainant un effet pro-nociceptif, il nous a semblé intéressant de voir si la potentialisation de l'inhibition provoque l'action inverse, et permettait éventuellement une récupération des seuils de sensibilité pour la patte douloureuse. Pour tester cette hypothèse, un groupe d'animaux neuropathiques (n=4) implanté bilatéralement dans le BLA avec des canules a reçu une injection de Diazépam (DZP, 1 µM). Cette molécule de la classe de benzodiazépines, utilisé principalement pour ses actions anxiolytique et sédative, agit comme un modulateur allostérique positif des récepteurs $GABA_A$. Après avoir injecté et testé 4 animaux, nous nous sommes rendu compte qu'il n'y avait aucune variation des seuils de sensibilité (Fig. 23). Nous avons alors testé la dose de 10 µM de DZP sur 4 autres animaux (Fig. 23). Cette dose étant plus efficace, nous avons alors réitéré l'expérience sur un nombre plus important d'animaux. On peut noter ici que cette dose de 10 µM reste proche des concentrations utilisées classiquement sur des préparations *in vitro*. Les effets anxiolytiques ou sédatifs lorsque le diazépam est utilisé injecté intrapéritonéalement sont généralement observés à partir de 5 mg/kg, ce qui se rapprocherait de concentrations de l'ordre de la centaine de mM.

Un nouveau groupe d'animaux neuropathiques (n=15) a donc reçu une injection bilatérale de DZP (10 µM) (Fig. 24). Les animaux présentent également une augmentation du seuil de sensibilité sur la patte contrôle à 15 et 30 minutes après l'injection (t0 : 4,53 ± 0,24 g ; t+15 min : 6,00 ± 0,28 g, $p< 0,05$; t+30 min : 6,27 ± 0,18 g, $p < 0,01$). Le seuil revient ensuite à la normale de manière durable (t+2h : 4,40 ± 0,21 g, t+24h : 4,60 ± 0,31 g). Sur la patte cuff, le décours temporel est similaire : on note une augmentation significative du seuil de sensibilité mécanique qui atteint une valeur maximale 30 minutes après l'injection (t0 : 1,32 ± 0,04 g ; t+15 min : 4,80 ± 0,26 g, $p < 0,01$; t+30 min : 5,47 ± 0,31 g, $p < 0,001$). Cependant l'effet est prolongé jusqu'à 1 heure après l'injection (t+1h : 4,40 ± 0,29 g, $p < 0,05$). Les seuils atteints pour la patte cuff durant l'heure suivant l'injection de DZP sont équivalents et non différents statistiquement

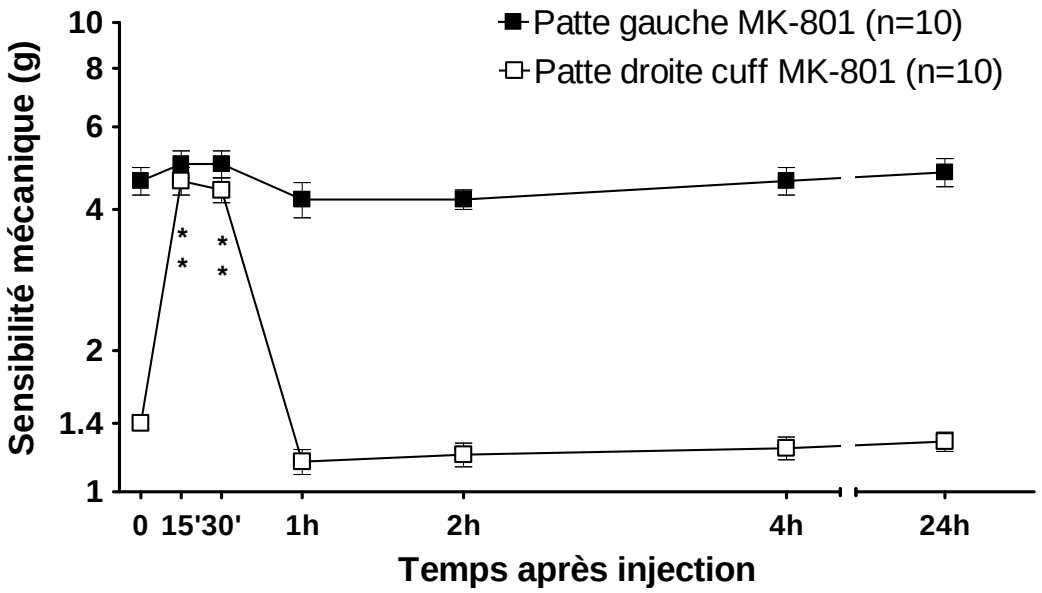


Figure 25 : Effet d'une injection de MK-801 dans le BLA sur le comportement nociceptif d'animaux neuropathiques

L'action d'une injection bilatérale de MK-801 (1 µM), un antagoniste des récepteurs NMDA, dans le BLA d'animaux neuropathiques est étudiée. Le MK-801 induit un effet anti-allodynique sur la patte cuff qui atteint une sensibilité équivalente à la patte contrôle. L'effet disparaît 1 heure après l'injection. Sur la patte contrôle, aucune variation de la sensibilité n'est à remarquer.

de ceux de la patte contrôle ($p > 0,05$ à 15 min, 30 min et 1h.). Enfin, à partir de 2 heures après l'injection, le seuil de la patte cuff retourne à son niveau de base de manière durable (t+2h : 1,41 ± 0,09 g, t+24h : 1,28 ± 0,06 g).

Cette expérience montre donc le rôle déterminant de la transmission synaptique GABAergique du BLA. En effet, nous avons vu précédemment que son blocage avec de la bicuculline entraîne un effet pro-nociceptif. Dans cette expérience, nous voyons que sa potentialisation par le diazépam dans le cas d'une douleur neuropathique engendre l'inverse : une action antinociceptive. De plus, le seuil de sensibilité de la patte cuff est alors restauré au même niveau que la patte contrôle, ce qui signifie que la composante GABAergique est suffisante pour le mécanisme anti-nociceptif mis en jeu. Le contrôle tonique inhibiteur présent au sein du BLA influence donc de manière importante le comportement nociceptif de l'animal.

II.4. Implication de la transmission synaptique excitatrice glutamatergique

A la vue des résultats précédents, deux hypothèses peuvent être avancées quant aux mécanismes intervenants dans le BLA lors d'une douleur neuropathique : soit l'activité inhibitrice, et uniquement elle, est diminuée dans le BLA du côté controlatéral à la lésion, soit il existe une altération de l'ensemble de l'activité du réseau et la balance entre transmission synaptique excitatrice et inhibitrice dans cette même structure est perturbée. Nous avons testé cette seconde hypothèse en réalisant une injection bilatérale de MK-801, un antagoniste non-compétitif des récepteurs NMDA impliqués dans la transmission excitatrice rapide. Un groupe de souris neuropathiques (n=10) a reçu une injection bilatérale de MK-801 (1 µM). Les résultats obtenus sont présentés dans la figure 25.

Le blocage de la transmission synaptique excitatrice provoque le même type d'effet que l'injection de DZP, à savoir une action anti-allodynique. Pendant les 30 minutes suivant l'injection, les animaux voient la sensibilité mécanique de leur patte cuff (t0 : 1,40 ± 0 g ; t+15 min : 4,60 ± 0,31 g, $p < 0,01$; t+30 min : 4,40 ± 0,27 g, $p < 0,01$) remonter à des valeurs équivalente à celle de la patte contrôle (t+15 min : 5,00 ± 0,33 g ; t+30 min : 5,00 ± 0,33 g). L'allodynie mécanique est à nouveau présente sur la patte cuff 1 heure après l'injection. Concernant la patte contrôle, aucune variation de la sensibilité n'est à déclarer après l'injection de MK-801 ($p > 0,05$).

Les résultats de cette première série d'expériences indiquent l'implication du BLA dans la modulation du comportement douloureux de l'animal. Par ailleurs, un déséquilibre entre la transmission synaptique inhibitrice et excitatrice dans le BLA semble être présent dans le cas d'une douleur neuropathique. Un blocage de la transmission glutamatergique,

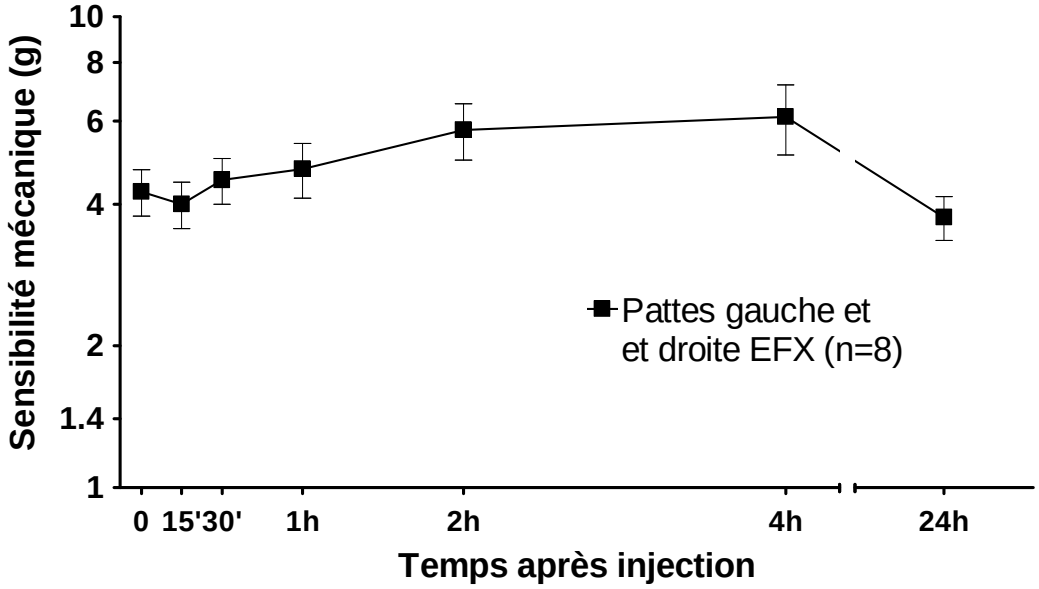


Figure 26 : Effet d'une injection d'étifoxine dans le BLA d'animaux sains

L'injection bilatérale d'étifoxine (EFX, 60 µM) dans le BLA d'animaux sains n'induit pas de variation significative du seuil de sensibilité mécanique. On peut éventuellement noter une légère tendance à une augmentation progressive de la sensibilité dans les 4 heures suivant l'injection.

de même qu'une potentialisation de la transmission GABAergique permettent de restaurer temporairement les seuils de sensibilité mécanique de la patte douloureuse des animaux.

III. Action de l'étifoxine sur le comportement nociceptif

Après avoir montré l'implication de l'équilibre entre excitation et inhibition du BLA dans la régulation du comportement douloureux, nous avons voulu tester l'action d'une autre molécule potentialisant la transmission synaptique inhibitrice GABAergique, l'étifoxine (EFX). Cette molécule non-benzodiazépinique a fait l'objet d'études passées au sein du laboratoire et a montré un fort potentiel anti-nociceptif. En effet, des travaux précédents (Aouad et al., 2009) ont révélé que des injections intrapéritonéales d'EFX entraînent un soulagement des symptômes douloureux et empêchent également leur apparition en traitement préventif, et cela dans un modèle de douleur neuropathique chimio-induite chez le rat et nous avons reproduit les mêmes résultats chez la souris. Néanmoins, les structures cérébrales cibles de l'EFX ne sont pas connues. Le BLA, au regard des résultats précédemment obtenus et de l'importance de son contrôle tonique inhibiteur sur le comportement douloureux pourrait être une des cibles supraspinales de l'EFX.

III.1. Action de l'EFX sur des animaux sains

Le premier groupe testé est constitué d'animaux sains (n=8). Ces derniers reçoivent une injection bilatérale d'EFX (60 µM) dans le BLA. L'effet de l'EFX est relativement faible ; on observe une augmentation légère et non-significative du seuil de sensibilité mécanique pour atteindre des valeurs maximales à 2 heures et 4 heures après l'injection (t0 : 4,25 ± 0,48 g, t+2h : 5,75 ± 0,79 g, t+4h : 6,13 ± 1,04 g, $p > 0,05$) (Fig. 26). Néanmoins, on peut noter que 24 heures après l'injection, le seuil de sensibilité est retourné à une valeur moyenne similaire à celle avant l'injection (t0 : 4,25 ± 0,48 g, t+24h : 3,75 ± 0,40 g).

L'EFX semble donc n'avoir que très peu d'effet lorsqu'elle est injectée dans le BLA chez des animaux sains. L'EFX étant, comme le DZP, un potentialisateur des récepteurs $GABA_A$, s'il y a peu d'inhibition, il y aura peu d'action. Or le DZP, comme nous l'avons vu précédemment, a une action antinociceptive importante en cas de douleur neuropathique. L'ensemble de la transmission synaptique, notamment inhibitrice, est donc vraisemblablement augmentée chez des animaux neuropathiques.

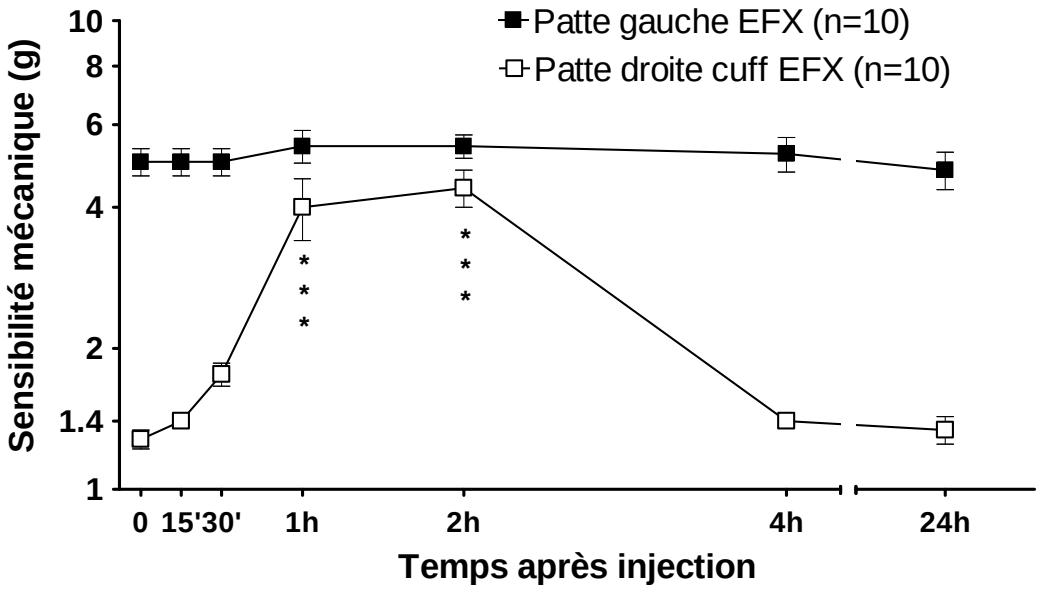


Figure 27 : Effet d'une injection d'étifoxine dans le BLA d'animaux neuropathiques

Chez des animaux neuropathiques, l'injection bilatérale d'EFX induit un effet anti-allodynique sur la patte cuff qui apparaît 1 heure après l'injection et a disparu 4 heures après. Sur la patte contrôle, on ne note aucune modification de la sensibilité.

III.2. Action de l'EFX sur des animaux neuropathiques

La molécule a donc été testée sur un groupe d'animaux neuropathiques (n=10) implantés avec des canules dans le BLA. Ils reçoivent à leur tour une injection bilatérale d'EFX (60 µM). Celle-ci induit une augmentation progressive du seuil de sensibilité mécanique des animaux sur leur patte droite, et la hausse est significative 1 heure et 2 heures après l'injection (t0 : 1,28 ± 0,06 g ; t+1h : 4,00 ± 0,60 g, $p < 0,001$; t+2h : 4,40 ± 0,40 g, $p < 0,001$) (Fig. 27). L'effet analgésique sur la patte droite a disparu 4 heures après l'injection. Concernant la patte gauche, on ne distingue aucune variation significative du seuil de sensibilité mécanique après l'injection d'EFX, comme cela était le cas chez les animaux sains.

Tout comme le diazépam, l'étifoxine, lorsqu'elle est injectée dans le BLA, a un effet analgésique temporaire. La potentialisation de la transmission synaptique inhibitrice du BLA dans le cadre d'une douleur neuropathique est donc une manière efficace pour atténuer les symptômes douloureux. Néanmoins, la différence entre les cinétiques des deux molécules est notable. L'action de l'étifoxine arrive en effet relativement tard par rapport à l'action du diazépam. Il semble probable que les mécanismes d'action soient distincts pour chacune des molécules.

IV. Implication des neurostéroïdes dans le processus anti-allodynique

Comme indiqué dans l'introduction, l'étifoxine est une molécule qui peut agir de deux manières distinctes, en se fixant soit sur les sous-unités β_2/β_3 du récepteur $GABA_A$ afin de potentialiser son activité de manière allostérique, soit sur le transporteur mitochondrial du cholestérol (TPSO) pour augmenter la production de neurostéroïdes endogènes. Par ailleurs, les benzodiazépines, le DZP entre autres, peuvent également avoir une action positive sur le TSPO, en plus de leur modulation allostérique du récepteur $GABA_A$.

Ainsi, afin de savoir si les effets anti-nociceptifs observés précédemment sont dus à l'action directe de l'EFX ou du DZP sur le récepteur $GABA_A$, ou à leur action indirecte sur le TSPO, nous avons reproduit des expériences sur des animaux neuropathiques, canulés dans le BLA, mais traités préalablement au finastéride. Cette substance est un inhibiteur de la 5α-réductase qui intervient dans la voie de synthèse des neurostéroïdes actifs. Ainsi, les éventuels effets de l'EFX ou du DZP observés en présence de finastéride seront uniquement dus à leur action directe sur le récepteur $GABA_A$. Les souris (n=11)

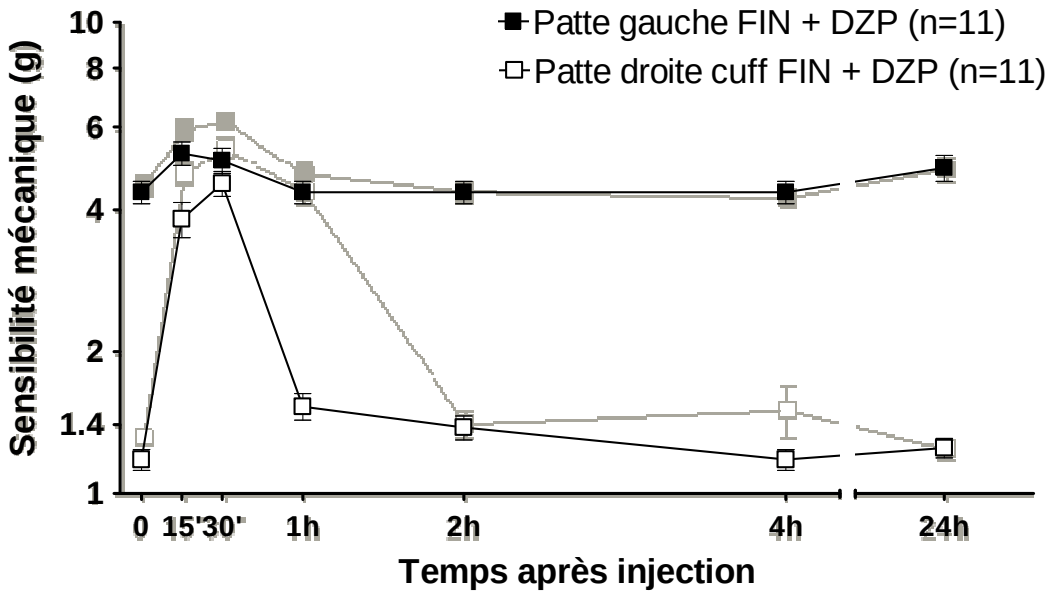


Figure 29 : Effet de l'injection d'étifoxine chez des animaux neuropathiques traités au finastéride

Le même groupe d'animaux que dans la figure du dessus reçoit 1 semaine plus tard une injection bilatérale d'EFX (60 µM) dans le BLA. Le traitement au finastéride empêche totalement la mise en place de l'action anti-allodynique de l'EFX sur la patte cuff. La trace grise rappelle l'effet obtenu avec l'EFX en absence de finastéride.

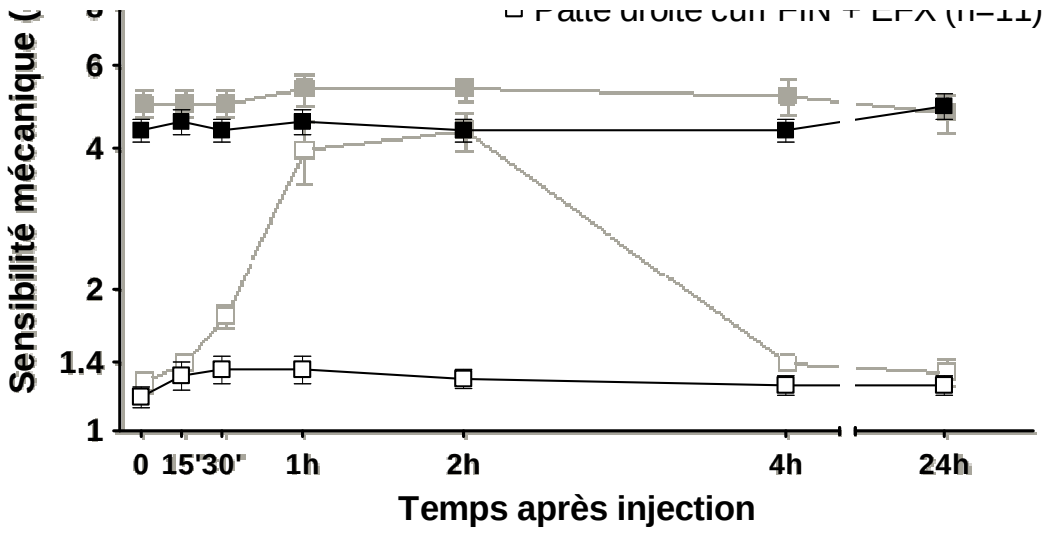


Figure 29 : Effet d'une injection d'étifoxine chez des animaux neuropathiques traités au finastéride

Le même groupe d'animaux que dans la figure du dessus reçoit 1 semaine plus tard une injection bilatérale d'EFX (60 µM) dans le BLA. Le traitement au finastéride empêche totalement la mise en place de l'action anti-allodynique de l'EFX sur la patte cuff. La trace grise rappelle l'effet obtenu avec l'EFX en absence de finastéride.

sont traitées durant 2 semaines avec des injections sous-cutanées de finastéride (25 mg/kg), au rythme d'une injection tous les 2 jours.

IV.1. Action du DZP sur des animaux neuropathiques traités au finastéride

Suite à leur traitement au finastéride, les animaux reçoivent une injection bilatérale de DZP (10 µM). Les résultats de cette expérience sont présentés dans la figure 28. On observe le même effet anti-allodynique que précédemment sur la patte cuff (t0 : 1,18 ± 0,06 g ; t+15 min : 3,82 ± 0,33 g, $p < 0,001$; t+30 min : 4,55 ± 0,28 g, $p < 0,001$). L'effet maximal est obtenu à nouveau obtenu 30 minutes après l'injection mais en revanche, il a totalement disparu après 1 heure (1h : 1,53 ± 0,10 g, $p > 0,05$). Si l'on superpose les deux graphiques (Fig. 28), on observe nettement cette différence de cinétique.

Le DZP induit encore une action anti-nociceptive chez des animaux traités au finastéride, mais sa durée d'action est réduite. Il semblerait donc que cet effet antinoceptif passe directement par les récepteurs $GABA_A$ durant une première phase d'environ 30 minutes, puis une seconde phase (jusqu'à 1 heure) durant laquelle l'action est prolongée *via* l'action du DZP sur la synthèse de neurostéroïdes. En présence de finastéride, il ne subsiste alors que la première phase d'action du diazépam sur les récepteurs $GABA_A$. Le mécanisme d'action antinociceptif du DZP est donc mixte : d'abord une action directe sur les récepteurs $GABA_A$, puis la mise en place d'une action indirecte dépendante de la neurostéroïdogenèse.

IV.2. Action de l'EFX sur des animaux neuropathiques traités au finastéride

Le même groupe de souris (n=11) reçoit 1 semaine plus tard une injection bilatérale d'EFX (60 µM) et les résultats de cette expérience sont présentés dans la figure 29. Dans ce cas, l'EFX n'engendre aucune modification du seuil de sensibilité mécanique, et cela à n'importe quel temps après l'injection ($p > 0,05$).

Cela signifie que l'action anti-nociceptive de l'EFX, lorsqu'elle est injectée dans le BLA d'animaux neuropathiques, est due à son effet sur le TPSO et est donc entièrement dépendante de la synthèse de neurostéroïdes endogènes.

L'ensemble des résultats de cette première partie suggère que le complexe basolatéral de l'amygdale est un élément important de modulation de la sortie comportementale douloureuse. De plus, l'équilibre entre transmission synaptique

excitatrice et inhibitrice au sein de la structure semble être un élément clé de cette modulation. L'usage de substances pharmacologiques agissant sur l'une ou l'autre de ces transmissions synaptiques induit un effet direct sur le comportement de l'animal. Enfin, l'usage d'étifoxine, qui a déjà montré ses propriétés anti-nociceptives lorsqu'elle est injectée intrapéritonéalement, se révèle également efficace lorqu'elle est injectée directement dans le BLA. Néanmoins, ses effets anti-allodyniques sont uniquement dus à son action sur le TSPO, engendrant une hausse de la neurostéroïdogénèse, et non pas à son action directe sur le récepteur $GABA_A$.

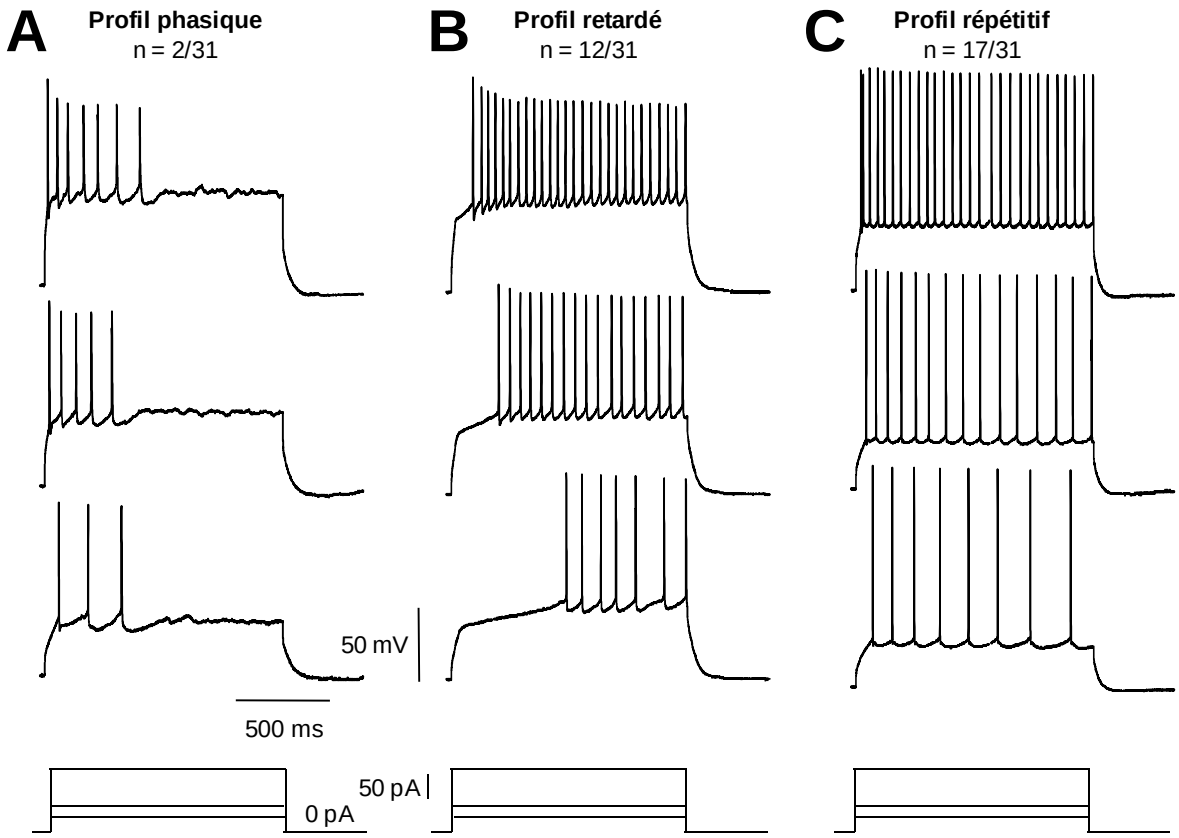


Figure 30 : Les différents profils de décharge des neurones du BLA

A. Cellule à profil phasique : La cellule émet une bouffée de potentiels d'action au début de la stimulation uniquement, et présente une adaptation de la fréquence d'émission des PA. **B.** Cellule à profil retardé : Cette cellule présente un délai avant l'émission du premier potentiel d'action. Ce délai diminue avec l'accroissement de la dépolarisation. **C.** Cellule à profil répétitif : La cellule émet des potentiels d'action pendant toute la durée du créneau dépolarisant.

PARTIE 2

Etude électrophysiologique de l'action de l'étifoxine sur les neurones du BLA

L'étifoxine ayant une action remarquée sur le comportement douloureux, nous avons voulu étudier les mécanismes cellulaires et moléculaires mis en œuvre au niveau synaptique dans le BLA. Pour cela, nous avons utilisé une approche électrophysiologique de patch-clamp, en configuration cellule entière, sur une préparation de tranches d'amygdale. J'ai réalisé des enregistrements en mode courant imposé, afin d'observer les profils de décharge et l'excitabilité des neurones, ainsi que des enregistrements en mode potentiel imposé, afin de pouvoir enregistrer la transmission synaptique. Ces expériences ont permis d'étudier la transmission synaptique spontanée inhibitrice et excitatrice. Dans une seconde partie, je me suis focalisé sur la transmission synaptique inhibitrice miniature. L'étude des courants miniatures s'est révélée nécessaire pour analyser précisément les mécanismes d'action de l'EFX au niveau synaptique. En effet, ceci permet de s'affranchir d'une éventuelle action du réseau de neurones et de se focaliser uniquement sur l'action de cette substance au niveau de la synapse, dans le but d'identifier le site d'action de la molécule.

I. Etude des effets de l'étifoxine sur l'excitabilité des neurones du BLA

Pour cette première partie, les enregistrements sont réalisés en mode courant imposé, avec la solution intrapipette 1, à base de K_2SO_4. Par ailleurs, on ne conserve que les cellules possédant un potentiel membranaire de repos (Vm) plus négatif que -50 mV.

I.1. Profils de décharge en condition contrôle

Les cellules enregistrées (n=31) ont été classées selon leur profil de décharge en réponse à des créneaux de courants d'amplitude croissante (Fig. 30). En condition contrôle, on retrouve 3 catégories de profils de décharge :

	Répétitive		**Phasique**	**Retardée**
	Régulière	Irrégulière		
n	4	13	2	12
Vm (mV)	-64.00 *1.58*	-63.23 *1.45*	-60.5 *3.5*	-66.50 *1.44*
Rhéobase (mV)	-32.00 *2.74*	-31.85 *2.07*	-28 *6*	-26.17 *2.26*
I injecté (pA)	125.00 *22.82*	100.00 *10.96*	125 *75*	125.00 *11.92*
Fréquence (ms)	15.03 *5.33*	10.80 *1.45*	4.70 *0.93*	11.09 *1.76*
CV	0.15 *0.02*	0.44 *0.05*		
Retard (ms)				324.83 *49.28*

Tableau 3 : Caractéristiques des profils de décharge des neurones du BLA en condition contrôle

Les chiffres en italique sont les SEM. Aucune différence significative n'a été observée entre les paramètres des différents profils ($p > 0,05$).

- Des cellules émettant des potentiels d'action durant l'ensemble du créneau de stimulation, qui sont dites « répétitives » ou « toniques » (n=17/31). On peut en distinguer deux sous-types en fonction de la régularité des PA, mesurée par le coefficient de variation (CV) : les cellules répétitives régulières (n=4/17) et les cellules répétitives irrégulières (n=13/17). Les cellules répétitives régulières possèdent un CV inférieur à 0,2. Les cellules répétitives régulières (n=4/31) sont définies par un potentiel membranaire de repos de -64 ± 1,58 mV, une rhéobase de -32 ± 2,74 mV en réponse à l'injection d'un courant moyen (« I rhéobase ») de 125 ± 22,82 pA. Leur fréquence instantanée moyenne est de 15,03 ± 5,33 Hz et le CV les définissant comme régulières est de 0,15 ± 0,02 (Tab. 3). Les cellules répétitive irrégulières (n=13/31), quant à elles possèdent des caractéristiques similaires. Elles ont un potentiel membranaire de repos de -63,23 ± 1,45 mV, une rhéobase de -31,85 ± 2,07 mV mais en revanche le I rhéobase est dans ce cas de 100 ± 10,96 pA. La fréquence instantanée moyenne est de 10,80 ± 1,45 Hz. Le CV de ces cellules diffère significativement ($p < 0,05$) des cellules répétitives. Il est de 0,44 ± 0,05, ce qui montre bien une irrégularité dans l'émission des potentiels d'action.

- Des cellules générant des potentiels d'action après un certain délai, qui sont dites « retardées » (n=12/31). Elles ont des propriétés très proches de celles des cellules répétitives, le seul critère les distinguant vraiment étant le retard avant le déclenchement du premier potentiel d'action, qui est en moyenne de 324,83 ± 49,28 ms à la rhéobase. Par ailleurs, leur potentiel membranaire de repos est de -66,50 ± 1,44 mV, leur rhéobase de -26,17 ± 2,26 mV et le I rhéobase de 125 ± 11,92 pA. Enfin leur fréquence instantanée moyenne est de 11,09 ± 1,76 Hz (Tab. 3).

- Enfin des cellules émettant une bouffée de potentiels d'action uniquement au début de la stimulation, qui sont alors dites « phasiques » (n=2/31). Elles sont définies par un potentiel de repos membranaire de -60,5 ± 3,5 mV, une rhéobase de -28 ± 6 mV et un courant injecté de 125 ± 75 pA. Leur fréquence instantanée moyenne est de 4,70 ± 0,93 Hz (Tab. 3).

I.2. Action de l'étifoxine sur les profils de décharge

L'EFX étant une substance modulatrice positive du récepteur $GABA_A$, elle n'est *a priori* pas connue pour agir sur les canaux voltage-dépendants impliqués dans la génération des potentiels d'action. Toutefois, nous avons voulu savoir si l'EFX pouvait modifier certains paramètres tels que le potentiel membranaire de repos ou la rhéobase.

	Amplitude (pA)		Fréquence (Hz)		tau decay (ms)	
	CPSIs	*CPSEs*	CPSIs	*CPSEs*	CPSIs	*CPSEs*
Moyenne	26,85	*20,32*	0,18	*0,38*	65,1	*37,02*
SEM	3,92	*1,69*	0,09	*0,08*	4,16	*4,26*
n	14	*18*	14	*18*	4	*4*

Tableau 4 : Caractéristiques des CPSIs et des CPSEs du BLA en condition contrôle

L'ensemble des 18 cellules testées présente une activité synaptique excitatrice spontanée et une partie d'entre elles (n=14/18) présentent une activité synaptique inhibitrice spontanée. Les caractéristiques de ces transmissions sont indiquées dans le tableau.

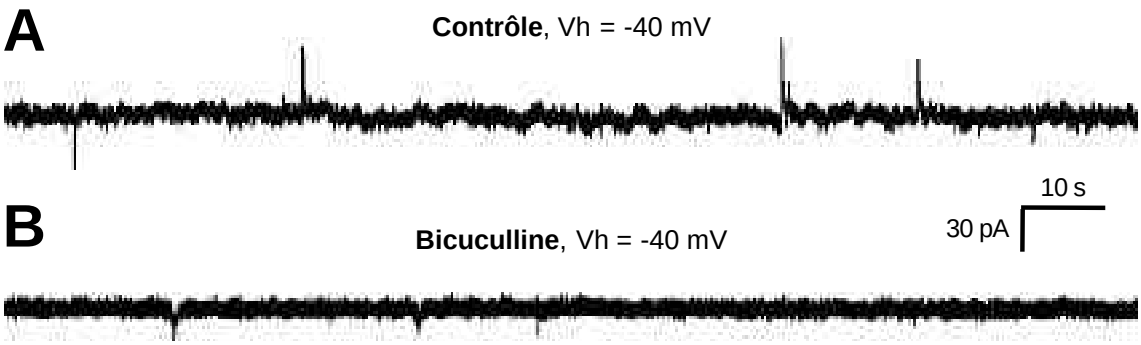


Figure 31 : Identification pharmacologique des CPSIs

A. L'enregistrement à -40 mV permet d'obtenir des évènements sortants inhibiteurs ainsi que des évènements entrants excitateurs. **B.** L'ajout de bicuculline (10 µM), un antagoniste spécifique des récepteurs $GABA_A$, supprime totalement les évènements sortants inhibiteurs, démontrant ainsi leur nature GABAergique.

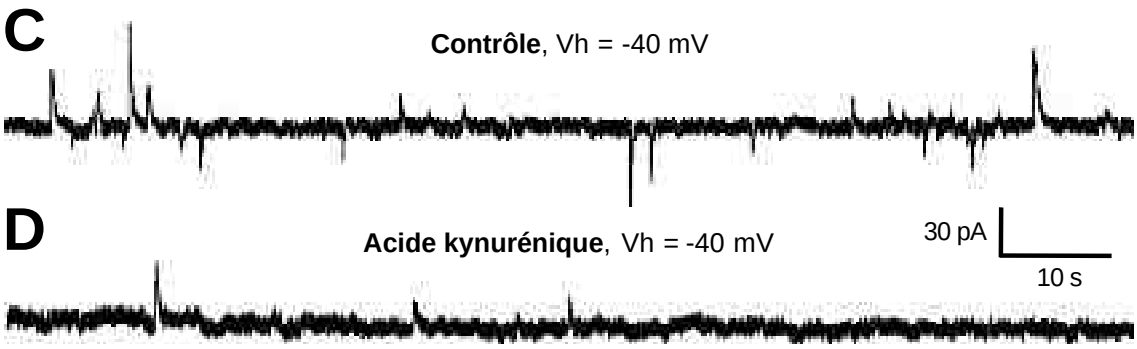


Figure 32 : Identification pharmacologique des CPSEs

A. L'enregistrement à -40 mV permet d'obtenir des évènements sortants inhibiteurs ainsi que des évènements entrants excitateurs. **B.** L'ajout d'acide kynurénique (2 mM), un antagoniste de la transmission glutamatergique rapide (AMPA et NMDA), supprime l'ensemble des évènements entrants excitateurs, démontrant ainsi leur nature glutamatergique.

La concentration d'EFX que nous avons choisi d'utiliser pour cette partie électrophysiologique est similaire à celle employée lors de la première étude électrophysiologique des effets de l'EFX (Schlichter et al., 2000), bien qu'inférieure à celle utilisée pour nos expériences *in vivo* (*i.e.* 60 µM).

Néanmoins, suite à l'application d'EFX 30 µM, je n'ai observé aucun changement de profil, chaque cellule (n=4/4) restant dans sa catégorie. Par ailleurs, les autres paramètres ne sont pas significativement modifiés suite à l'application de l'EFX.

II. Etude des effets de l'étifoxine sur l'activité synaptique spontanée

II.1. Transmission synaptique spontanée en condition contrôle

La majorité des cellules enregistrées présentent une activité synaptique inhibitrice spontanée (n=14/18) : elles reçoivent donc des entrées provenant de neurones inhibiteurs. Dans nos conditions d'enregistrement (solution intrapipette 1, E_{Cl} = -60mV), cette activité se traduit par l'apparition de courants sortants, reflétant une entrée d'ions chlorure. Pour les observer, les cellules sont maintenues à un potentiel plus dépolarisé que le potentiel d'inversion des ions Cl^-. Nous avons choisi d'imposer un potentiel de -40 mV, afin de mesurer simultanément les CPSIs et les CPSEs, qui seront donc de directions opposées.

La fréquence moyenne d'apparition de ces courants synaptiques inhibiteurs est relativement faible (0,18 ± 0,09 Hz, n=14 cellules) mais varie de 0,02 à 0,84 Hz. L'amplitude moyenne de ces courants est de 26,85 ± 3,92 pA (Tab. 4). Enfin ces courants ont une constante de déactivation moyenne de 65,1 ± 4,16 ms.

Afin de s'assurer que ces courants sortants sont bien GABAergiques, nous avons appliqué un antagoniste spécifique des récepteurs $GABA_A$, la bicuculline (10 µM), qui entraine la suppression des courants sortants (n=8/8) (Fig. 31), confirmant la nature GABAergique de ces courants synaptiques.

Toutes les cellules enregistrées (n=18/18) présentent également une activité synaptique excitatrice spontanée. Cette activité se traduit par des courants entrants, correspondant à une entrée d'ions Na^+ et Ca^{2+} dans la cellule. Le potentiel d'inversion des cations dans notre solution étant à 0 mV, l'observation des CPSEs a été réalisée à un potentiel de maintien de -40mV.

L'amplitude moyenne de ces CPSEs est de 20,32 ± 1,69 pA, et leur fréquence instantanée moyenne est de 0,38 ± 0,08 Hz, mais varie de 0,08 à 1,01 Hz (Tab. 4). L'ajout

	Amplitude (pA)		Fréquence (Hz)		Constante déact. (ms)	
	Contrôle	EFX	Contrôle	EFX	Contrôle	EFX
Moyenne	17,33	33,77	0,29	0,60	62,17	63,71
SEM	2.125	1.07	0,12	0,18	6,12	6,07
n	2/4		4/4		4/4	

Tableau 5 : Effets de l'EFX sur la transmission synaptique inhibitrice spontanée

L'application d'EFX 30 µM engendre une augmentation de la fréquence des CPSIs sur toutes les cellules testées ($p < 0,05$). On observe également une augmentation de la fréquence des CPSIs sur une partie de l'échantillon testé ($n=2/4$, $p < 0,05$). En revanche, la constante de déactivation ne varie pas en présence d'EFX.

d'un antagoniste des récepteurs AMPA/Kaïnate/NMDA du glutamate, l'acide kynurénique (2 mM), a entrainé une suppression totale des CPSEs (n=2/2), nous indiquant qu'ils sont bien dus à la transmission excitatrice rapide (Fig. 32).

Les cinétiques obtenues pour les CPSEs dans nos conditions d'enregistrement sont relativement lentes par rapport à celles classiquement observées. Cependant, il existe dans le BLA des récepteurs NMDA aux cinétiques très lentes (*i.e.* environ 100 ms) (Spampanato et al., 2011), ce qui pourrait expliquer nos valeurs atypiques.

II.2. Transmission synaptique spontanée en présence d'EFX

Après avoir caractérisé l'activité synaptique des neurones du BLA, nous avons utilisé l'EFX afin d'étudier les conséquences d'une augmentation de la transmission GABAergique au sein du réseau neuronal du BLA. L'effet sur la transmission synaptique inhibitrice est maximal et stable après 15 minutes d'application de 30 µM d'EFX. L'effet majeur observé est une augmentation de la fréquence d'apparition des CPSIs spontanés. En effet elle passe de 0,29 ± 0,12 Hz en situation contrôle à 0,60 ± 0,18 Hz en présence d'EFX, et cela sur l'ensemble des cellules testées (n=4/4) (Tab. 5). L'EFX a également un effet sur l'amplitude des CPSIs (contrôle : 17,33 ± 2,13 pA ; EFX : 33,77 ± 1,07 pA) (Tab. 5). En revanche, cet effet n'est présent que dans une partie de l'échantillon testé (n=2/4). Enfin, l'EFX ne modifie pas la cinétique des CPSIs, les valeurs moyennes de constante de déactivation ne présentant pas de différence significative (contrôle : 62,17 ± 6,12 ms ; EFX : 63,71 ± 6,07 ms, $p > 0,05$) (Tab. 5).

Bien que L'EFX n'ait *a priori* pas d'action pharmacologique directe sur la transmission excitatrice glutamatergique, nous avons tout de même vérifié si elle modifiait les CPSEs. Ainsi, on ne note aucune différence significative de la fréquence d'apparition des CPSEs (contrôle : 0,65 ± 0,22 Hz ; EFX : 0,75 ± 0,35 Hz, n=4), ni de l'amplitude des courants (contrôle : 9,47 ± 0,74 pA ; EFX : 15,33 ± 2,31 pA, n=4). Enfin la constante de déactivation ne semble pas affectée par l'EFX, elle passe de 36,43 ± 4,5 ms à 35,02 ± 5,95 ms (n=4).

L'EFX module donc de façon positive les CPSIs du BLA, sans affecter les CPSEs. Afin d'analyser plus précisément les mécanismes mis en œuvres lors de cette modulation, la suite des expériences s'est portée uniquement sur la transmission synaptique inhibitrice miniature.

	Contrôle			EFX 30 µM		
	Amplitude (pA)	Fréquence (Hz)	Decay (ms)	Amplitude (pA)	Fréquence (Hz)	Decay (ms)
Moyenne	17,72	3,54	13,40	16,37	3,84	17,63
SEM	3,63	1,86	1,31	1,09	1,75	3,70
n	3	3	3	3	3	3

Tableau 6 : Effets de l'EFX à 30 µM sur la transmission synaptique inhibitrice miniature

L'application d'EFX 30 µM ne modifie aucun des paramètres de la transmission synaptique inhibitrice miniature ($p > 0,05$). Ces résultats nous ont conduit à poursuivre l'étude avec une concentration d'EFX supérieure (60 µM).

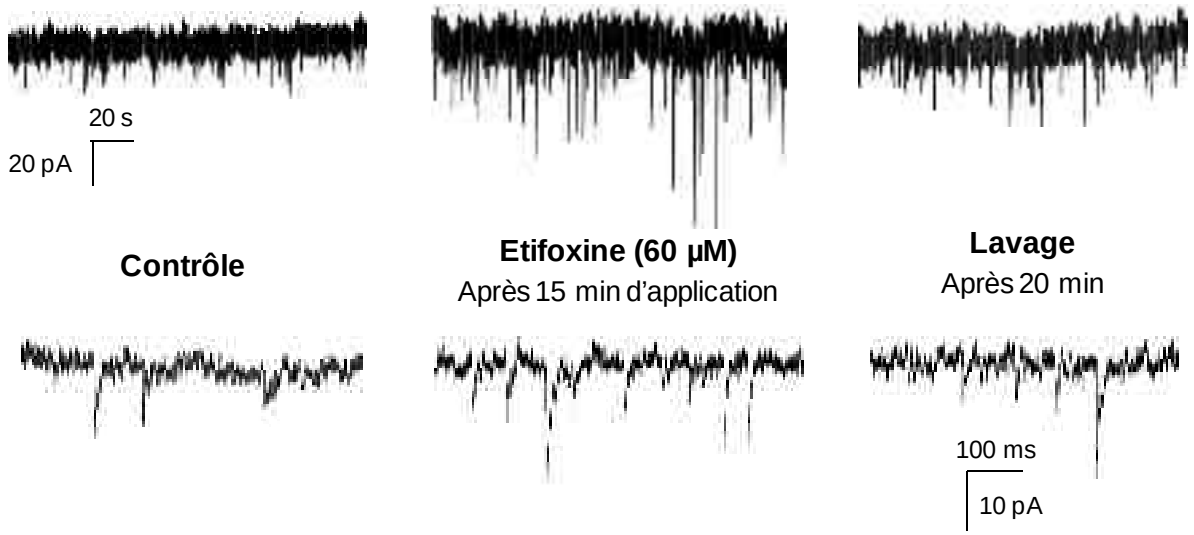


Figure 33 : Illustration de l'application d'EFX sur une cellule

L'application d'EFX (60 µM) entraine une augmentation de l'amplitude et de la fréquence des mCPSIs, qui peut être remarquée visuellement. Les traces représentées en dessous sont un agrandissement de traces du dessus. L'effet de l'EFX est ici partiellement lavé après 20 minutes.

III. Etude des effets de l'étifoxine sur l'activité synaptique inhibitrice miniature

Pour cette partie de l'étude, les enregistrements sont réalisés en présence de TTX 0,5 µM et d'acide kynurénique 2 mM dans le milieu extracellulaire, afin d'isoler pharmacologiquement les courants post-synaptiques inhibiteurs miniatures (mCPSIs). Par ailleurs, la solution intracellulaire utilisée dans ce cas est la solution 2, à base de KCl et qui possède un potentiel d'inversion des ions Cl^- à 0 mV. Les enregistrements sont effectués à -60 mV, et les mCPSIs se traduisent donc par l'apparition de courants entrants. Afin d'étudier les effets de l'EFX sur les mCPSIs, je l'applique dans le bain et j'observe l'effet lorsqu'il est stabilisé après 15 minutes. Suite à cela, j'effectue un rinçage pendant 15 à 20 minutes sans EFX afin de voir si les effets persistent ou non.

Cependant, après application d'EFX 30 µM sur un petit groupe de cellules (n=3), nous n'avons pu observer aucun effet sur la transmission inhibitrice miniature du BLA. Ni l'amplitude, ni la fréquence, ni la constante de déactivation ne sont modifiés ($p > 0,05$) par l'application d'EFX à la concentration de 30 µM (Tab. 6). Nous avons alors décidé d'utiliser une concentration supérieure, identique à celle des expériences *in vivo* (*i.e.* 60 µM). Le but de cette étude étant de comprendre les mécanismes d'action de l'EFX lors de son action sur les neurones du BLA, nous avons volontairement choisi une concentration relativement forte afin d'être sûrs de pouvoir observer des effets.

Ainsi, après application d'EFX à une concentration de 60 µM, toutes les cellules testées (n=14) répondent à l'application d'EFX. Néanmoins, nous avons pu observer 3 effets distincts : une augmentation de l'amplitude des mCPSIs, une augmentation de leur fréquence (Fig. 33) ainsi qu'une augmentation de leur constante de déactivation. Cependant, ces 3 effets ne se retrouvent pas sur toutes les cellules ; certaines présentent uniquement un seul de ces effets, certaines une combinaison des 3, et certaines les 3 effets (Tab. 7)

III.1. Application d'EFX en condition contrôle

La fréquence moyenne d'apparition des courants en condition contrôle est en moyenne de 3,42 ± 0,48 Hz (n=14) mais est extrêmement variable d'une cellule à l'autre (min : 1,34 Hz, max : 8,66 Hz, médiane : 3,18 Hz). L'amplitude moyenne de ces courants

	Cell. 1	Cell. 2	Cell. 3	Cell. 4	Cell. 5	Cell. 6	Cell. 7	Cell. 8	Cell. 9	Cell. 10	Cell. 11	Cell. 12	Cell. 13	Cell. 14
Augmentation de l'**amplitude**	▨	▨			▨	▨		▨	▨		▨	▨	▨	
Augmentation de la **fréquence**	▨	▨				▨	▨	▨	▨	▨	▨			
Augmentation du **tau decay**			▨	▨			▨	▨			▨			▨

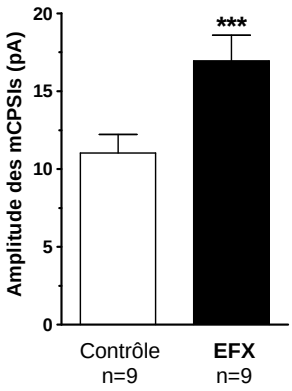
Tableau 7 : Représentation de l'hétérogénéité des effets de l'EFX sur les mCPSIs

Les cases rayées signifient que la cellule a présenté l'effet suite à l'application d'EFX 60 µM. Toutes les cellules testées voient leur activité inhibitrice miniature modifiée par l'application d'EFX. On distingue trois types d'effets différents : une augmentation de l'amplitude des mCPSIs, une augmentation de leur fréquence instantanée et une augmentation de leur constante de déactivation (tau decay). Après application d'EFX, les neurones présentent soit un seul, soit une combinaison des trois effets, soit les trois effets.

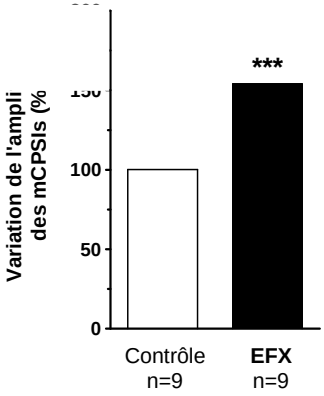
A

Amplitude (pA)		
Contrôle	**EFX**	**Lavage**
11,02 ± 1,20	**16,94 ± 1,66**	15,64 ± 1,94
n = 9/14	n = 9/14	n = 3/14

B



C



D

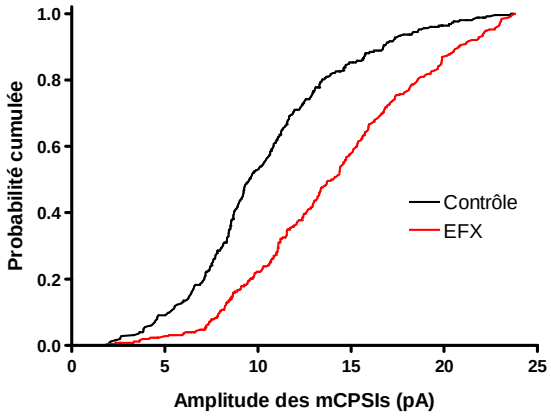


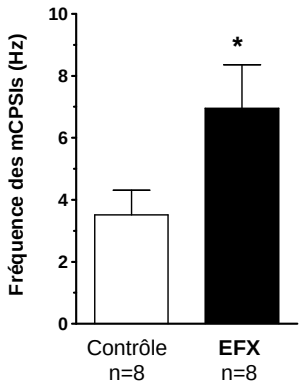
Figure 34 : Effet de l'EFX sur l'amplitude des mCPSIs

A. et B. L'application d'EFX (60 µM) entraine une augmentation de l'amplitude des mCPSIs dans 9 cellules sur 14 testées ($p<0,001$). Bien que non significatif ($p>0,05$), l'effet n'est pas totalement lavé après 20 min. **C.** L'augmentation de l'amplitude des mCPSIs représente un accroissement de 54 % par rapport à l'amplitude moyenne en condition contrôle. **D.** L'analyse de Kolmogorov-Smirnov montre un décalage de la courbe vers la droite après EFX. Cela signifie une augmentation générale des amplitudes de l'ensemble des mCPSIs.

A

Fréquence (Hz)		
Contrôle	**EFX**	**Lavage**
3,51 ± 0,80	**6,96 ± 1,40**	3,89 ± 0,25
n = 8/14	n = 8/14	n = 2/14

B



C

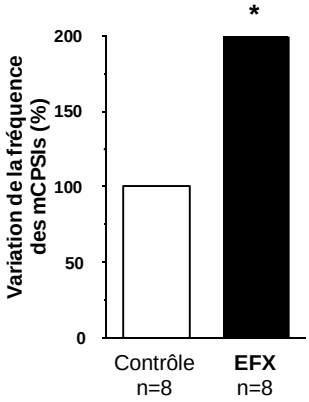
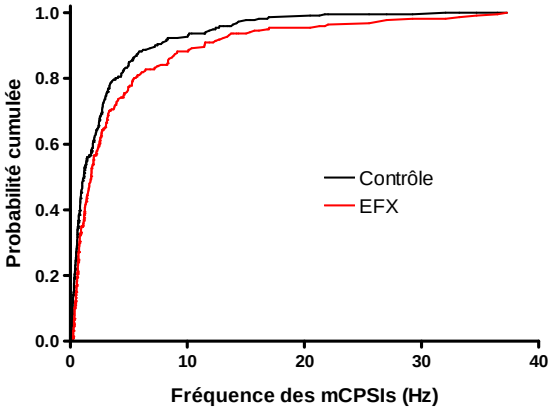


Figure 35 : Effet de l'EFX sur la fréquence des mCPSIs

A. et **B.** L'application d'EFX (60 µM) entraine une augmentation de la fréquence des mCPSIs dans 8 cellules sur 14 testées ($p<0,05$). Cet effet est totalement lavé après 20 min. **C.** L'augmentation de la fréquence des mCPSIs représente un accroissement de 98 % par rapport à la fréquence moyenne en condition contrôle. **D.** L'analyse de Kolmogorov-Smirnov montre une augmentation du nombre d'évènements de grande fréquence après l'application d'EFX. Cela signifie alors l'apparition de bouffées de libérations vésiculaires après application d'EFX et/ou une augmentation générale du nombre d'évènements synaptiques.

D



	Contrôle		EFX	
	CV	**Fréquence moyenne (Hz)**	**CV**	**Fréquence moyenne (Hz)**
Moyenne	1,17	0,66	1,19	1,32
SEM	0,06	0,21	0,09	0,36
n	8	8	8	8

Tableau 8 : Analyse du coefficient de variation des intervalles inter-évènements et de la fréquence moyenne des cellules présentant une augmentation de la fréquence instantanée de leur mCPSIs après EFX

Le coefficient de variation (CV) des intervalles inter-évènements ne varie pas après application d'EFX. Un CV faible correspondrait à une apparition d'évènements synaptiques de manière relativement régulière, tout au long de l'enregistrement. En revanche, un CV élevé signifierait une irrégularité dans l'apparition des évènements, ce qui peut arriver lors de bouffées. Dans ce cas le CV des neurones ne varie pas significativement ($p >0,05$) après application d'EFX. En revanche, on voit que la fréquence moyenne augmente de manière significative ($p < 0,01$) après l'application d'EFX, signifiant un nombre de mCPSIs plus important.

est de 13,52 ± 1,51 pA (min : 7,96 pA, max : 24,79 pA, médiane : 11,79 pA) et leur constante de déactivation moyenne est de 18,67 ± 1,36 ms (min : 11,83 ms, max : 27,03 ms, médiane : 19,20 ms).

III.1.a. Effet sur l'amplitude

L'effet que l'on retrouve majoritairement est l'augmentation de l'amplitude des mCPSIs. Cet effet est retrouvé dans 9 cellules sur 14 testées (64%) (Tab. 7) et représente une augmentation significative de 54 % de l'amplitude moyenne (contrôle : 11,02 ± 1,20 pA ; EFX : 16,94 ± 1,66 pA ; $p < 0,001$) (Fig. 34A, B et C). En appliquant le test de Kolmogorov-Smirnov qui mesure dans ce cas la distribution des amplitudes avant et après EFX, on peut voir que la courbe est décalée vers la droite après traitement (Fig. 34D), ce qui signifie une augmentation globale des amplitudes. Par ailleurs, un lavage a été réalisé sur 3 des 9 cellules présentant cet effet, et on peut noter que l'amplitude moyenne, bien que non différente statistiquement par rapport aux valeurs contrôle ($p > 0,05$), reste supérieure à celles-ci (15,64 ± 1,94 pA après 20 minutes de lavage). Il semblerait donc que cet effet persiste en partie après l'application d'EFX.

III.1.b. Effet sur la fréquence

La seconde action de l'EFX sur les mCPSIs est une augmentation de leur fréquence instantanée moyenne (n=8/14, 57%) (Tab. 7) : elle passe de 3,51 ± 0,80 Hz en condition contrôle à 6,96 ± 1,40 Hz après application d'EFX ($p < 0,05$) (Fig. 35A et B), ce qui représente un accroissement de 98 % (Fig. 35C). Dans ce cas, nous avons également analysé la distribution des populations d'évènements avec le test de Kolmogorov-Smirnov (Fig. 35D). Ceci nous apprend que dans les deux conditions, on observe un nombre important d'évènements de faible fréquence, mais qu'après application d'EFX, on obtient une augmentation d'évènements de hautes fréquences par rapport à la condition contrôle. Ceci peut signifier une augmentation générale du nombre d'évènement (fréquence moyenne) mais également une augmentation de la libération en bouffée de vésicules synaptiques. Afin de vérifier l'une ou l'autre hypothèse, nous avons analysé le coefficient de variation (CV) des intervalles inter-évènements (*i.e.* l'inverse des fréquences instantanées), ainsi que la fréquence moyenne de mCPSIs (*i.e.* le nombre d'évènements pour une durée temporelle donnée). Un CV faible correspondrait à une apparition d'évènements synaptiques de manière relativement régulière, tout au long de l'enregistrement. En revanche, un CV élevé signifierait une irrégularité dans l'apparition des évènements, ce qui peut arriver lors de bouffées. Les résultats de l'analyse montrent

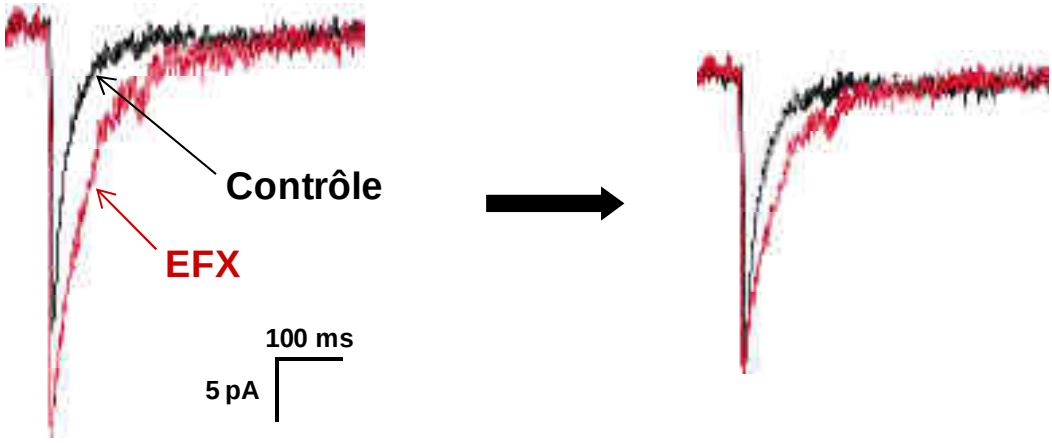


Figure 36 : Illustration de l'augmentation de la cinétique des mCPSIs pour une cellule

A. Courants post-synaptiques inhibiteurs miniatures moyennés à partir d'une centaine d'évènements, en condition contrôle (trace noire) et après application d'EFX (trace rouge). **B.** En normalisant les courants par leur amplitude, on distingue bien l'augmentation de la constante de déactivation après application d'EFX.

A

Constante de déactivation (ms)		
Contrôle	EFX	Lavage
17,35 ± 2,44	21,16 ± 2,01	20,29 ± 2,75
n = 6/14	n = 6/14	n = 2/14

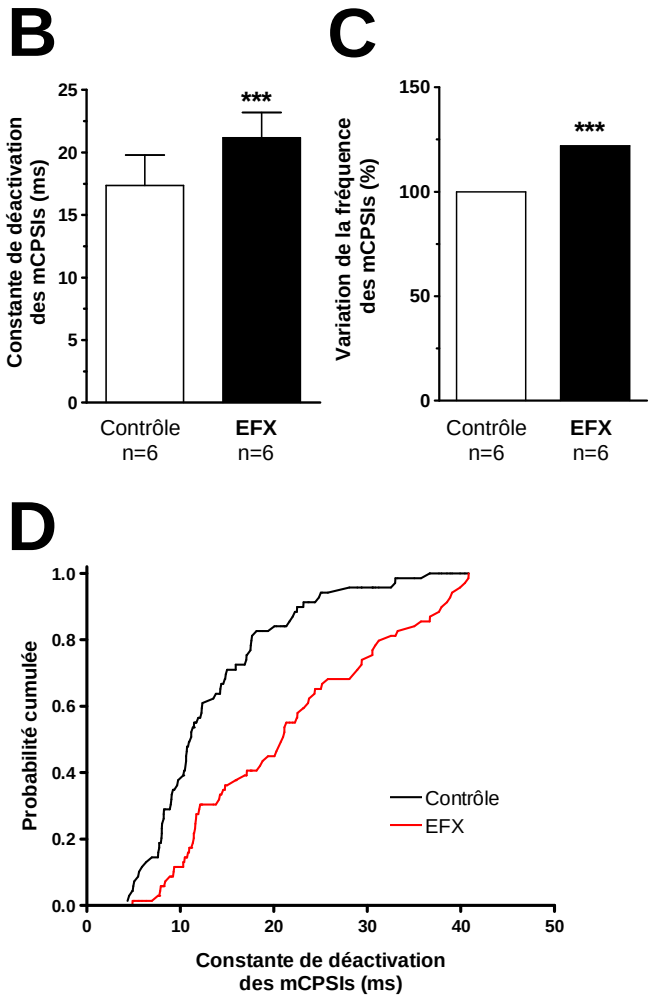


Figure 37 : Effet de l'EFX sur la constante de déactivation des mCPSIs

A. et **B.** L'application d'EFX (60 µM) entraine une augmentation de la cinétique des mCPSIs dans 6 cellules sur les 14 testées ($p<0,001$). Cet effet est prolongé significativement ($p<0,001$) après 20 min de lavage en absence d'EFX. **C.** L'augmentation de la fréquence des mCPSIs représente un accroissement de 21 % par rapport à la cinétique moyenne en condition contrôle. **D.** L'analyse de Kolmogorov-Smirnov montre un décalage de la courbe vers la droite après EFX, signifiant une augmentation générale des cinétiques de l'ensemble des mCPSIs.

que le CV des neurones ne varie pas significativement après application d'EFX (contrôle : 1,17 ± 0,06 ; EFX : 1,19 ± 0,09 ; $p > 0,05$, n=8) (Tab. 8). Au vu des valeurs moyennes du CV, on peut cependant noter que l'apparition des mCPSIs est relativement irrégulière, ce qui traduit la présence probable de bouffées d'évènements en condition contrôle et après EFX. En revanche, on voit que la fréquence moyenne augmente de manière significative après l'application d'EFX (contrôle : 0,66 ± 0,21 Hz; EFX : 1,32 ± 0,36 Hz ; $p < 0,01$, n=8) (Tab. 8). Ceci nous permet donc d'affirmer que l'augmentation de la fréquence instantanée suite à l'application d'EFX est bien due à une augmentation du nombre de CPSIs. Enfin, un lavage a été effectué pour 2 des 8 cellules présentant cette augmentation de fréquence. On peut alors voir que dans ce cas, l'action modulatrice de l'EFX semble avoir disparue après 20 minutes de lavage (3,89 ± 0,25 Hz).

III.1.c. Effet sur la constante de déactivation

Enfin, le dernier effet mesuré est une augmentation de la constante de déactivation des mCPSIs, pouvant être observé dans 6 cellules sur 14 testées (42%) (Tab. 7). Cet effet est illustré pour une cellule dans la figure 17. Ainsi, on peut voir que pour ces neurones, la cinétique des évènements passe de 17,35 ± 2,44 ms à 21,16 ± 2,01 ms ($p < 0,001$) après application d'EFX (Fig. 37 A et B), ce qui représente un accroissement de 22 % (Fig. 37 C). A nouveau l'analyse de Kolmogorov-Smirnov montre un décalage de la courbe vers la droite, indiquant une augmentation des évènements aux cinétiques plus lentes (Fig. 37 D). Par ailleurs, le lavage obtenu pour 2 des 6 cellules présentant cet effet montre qu'il est prolongé et maintenu après 20 minutes de lavage (20,29 ± 2,75 ms), donc en absence d'EFX.

III.1.d. Combinaison des effets

En observant le tableau 3 qui représente la répartition des effets de l'EFX sur l'ensemble des cellules testées, on peut voir toutes les combinaisons possibles. Chaque effet peut être présent de manière isolée, ou associé avec un ou deux des autres effets. Néanmoins, et sans pouvoir en tirer de conclusion particulière, la seule combinaison n'étant jamais observée est l'augmentation de l'amplitude des mCPSIs associée avec l'augmentation de la constante de déactivation des mCPSIs.

	Cell. 1	Cell. 2	Cell. 3	Cell. 4	Cell. 5	Cell. 6	Cell. 7	Cell. 8
Augmentation de l'**amplitude**								
Augmentation de la **fréquence**								
Augmentation du **tau decay**								

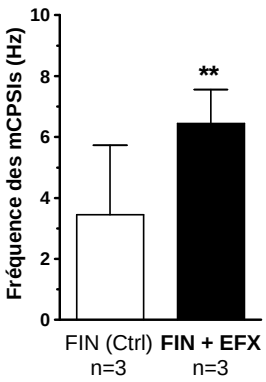
Tableau 9 : Effets de l'EFX sur les paramètres des mCPSIs en présence de finastéride

Les cases rayées signifient que la cellule a présenté l'effet suite à l'application d'EFX 60 µM. En présence de finastéride, on ne retrouve plus qu'un seul des 3 effets de l'EFX observés précédemment : l'augmentation de la fréquence des mCPSIs (n=3/8).

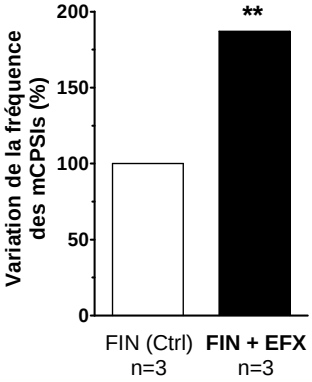
A

Fréquence (Hz)	
Contrôle (FIN)	**FIN + EFX**
3,45 ± 2,28	**6,44 ± 1,12**
n = 3/8	n = 3/8

B



C



D

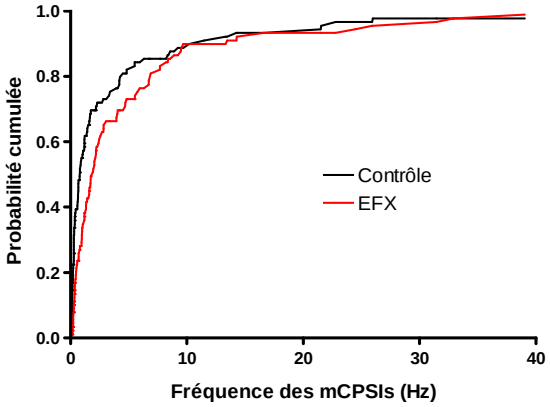


Figure 38 : Effet de l'EFX sur la fréquence des mCPSIs en présence de finastéride

A. et **B.** L'application d'EFX (60 µM) entraine une augmentation de la fréquence des mCPSIs dans 3 des 8 cellules testées en présence de finastéride (FIN). **C.** L'augmentation de la fréquence des mCPSIs représente un accroissement de 87 % par rapport à la fréquence moyenne en condition contrôle. **D.** L'analyse de Kolmogorov-Smirnov montre une augmentation du nombre d'évènements de grande fréquence après l'application d'EFX. Cela signifie alors l'apparition de bouffées de libérations vésiculaires après application d'EFX et/ou une augmentation générale du nombre d'évènements synaptiques.

III.2. Application d'EFX en présence de finastéride

Afin de savoir si les différents effets observés précédemment sur la transmission synaptique inhibitrice miniature sont dus à l'action directe de l'EFX sur le récepteur $GABA_A$ ou bien son action indirecte sur le TSPO, nous avons refait les enregistrements électrophysiologiques en présence de finastéride (FIN). Comme pour les expériences comportementales présentées précédemment, les éventuels effets de l'EFX observés en présence de finastéride seront uniquement dus à son action directe sur le récepteur $GABA_A$.

Après avoir testé l'application d'EFX après incubation (au moins 3 heures) et en présence de finastéride, nous pouvons faire deux remarques : la première est que toutes les cellules ne présentent pas une modification de leur activité synaptique inhibitrice miniature suite à l'application d'étifoxine, et la seconde est qu'on ne retrouve plus qu'un seul des 3 effets observés précédemment, à savoir l'augmentation de la fréquence des mCPSIs. En effet, 3 des 8 cellules testées (38%) (Tab. 9) présentent une augmentation de la fréquence des mCPSIs. Celle-ci passe de 3,45 ± 2,28 Hz en condition contrôle à 6,44 ± 1,12 Hz après application d'EFX (Fig. 38 A et B), ce qui représente un accroissement de 87 % (Fig. 38C) A nouveau nous avons analysé la distribution des populations d'évènements avec le test de Kolmogorov-Smirnov (Fig. 38D). Il nous montre qu'avant et après application d'EFX, on observe un nombre important d'évènements de faible fréquence. En revanche, après application d'EFX, on obtient une augmentation d'évènements de haute fréquence par rapport à la condition contrôle. L'analyse du CV nous montre qu'il ne varie pas après EFX (contrôle : 1,38 ± 0,18 ; EFX : 1,52 ± 0,27 ; $p > 0,05$, n=3), mais que la fréquence moyenne augmente (contrôle : 0,35 ± 0,16 Hz ; EFX : 0,88 ± 0,06 Hz ; $p < 0,01$, n=3). L'augmentation de la fréquence instantanée suite à l'application d'EFX est donc due à une augmentation du nombre de mCPSIs. Malheureusement, aucun lavage n'a pu être réalisé sur ces cellules et l'on ne sait donc pas si la fréquence des mCPSIs revient à un niveau basal après rinçage de l'EFX ou non. Néanmoins, malgré la présence de cet effet d'augmentation de fréquences des mCPSIs en présence de finastéride, on peut noter que son occurrence est moindre au sein de la population de cellules testées (38% avec finastéride contre 57% sans finastéride). On peut donc se demander si l'effet est uniquement du à l'action de l'EFX sur les récepteurs $GABA_A$, ou s'il y a une participation des neurostéroïdes endogènes. En revanche, les effets d'augmentation de l'amplitude ou de la constante de déactivation des mCPSIs semblent être entièrement dépendants de l'action de l'EFX sur la neurostéroïdogenèse.

	Contrôle			DZP		
	Amplitude (pA)	Fréquence (Hz)	Decay (ms)	Amplitude (pA)	Fréquence (Hz)	Decay (ms)
Moyenne	18,47	2,63	18,54	23,20	**4,22**	**32,41**
SEM	4,27	0,48	2,90	7,37	0,97	4,19
n	4	4	4	4	4	4

Tableau 10 : Effets du DZP sur la transmission synaptique inhibitrice miniature

L'application de DZP 1 µM sur les neurones du BLA entraîne une augmentation significative ($p < 0,01$) de leur fréquence instantanée ainsi que de leur constante de déactivation, et cela sur la totalité de l'échantillon testé (n=4/4).

Ces résultats suggèrent que les effets de l'EFX engendrés sur la transmission synaptique inhibitrice miniature dans le BLA sont majoritairement dus à son action indirecte sur le TPSO, provoquant une augmentation de la neurostéroïdogénèse. Ces résultats sont à mettre en corrélation avec ceux observés *in vivo*, où nous avons pu voir que l'effet anti-nociceptif de l'EFX est supprimé lorsque les animaux sont traités préalablement avec du finastéride. Il semblerait donc que l'action de l'EFX est directement dépendante de la production de neurostéroïdes 3α-5α réduits, qui vont agir au niveau cellulaire comme des potentialisateurs de la transmission synaptique inhibitrice.

III.3. Comparaison des effets de l'EFX avec ceux du diazépam

A titre de comparaison, nous avons voulu voir quels étaient les effets d'une benzodiazépine de référence, tel que le diazépam (DZP). De plus, les effets comportementaux de type anti-nociceptif obtenus avec cette molécule lors des expériences *in vivo* sont similaires que ceux de l'EFX.

L'application de DZP, à une concentration de 1 µM, a été réalisée sur un petit groupe de cellules (n=4). On peut ainsi voir qu'il augmente de manière significative la fréquence instantanée (contrôle : 2,63 ± 0,48 Hz ; DZP : 4,22 ± 0,97 ; $p < 0,01$, n=4/4), ainsi que la constante de déactivation des mCPSIs (contrôle : 18,54 ± 2,90 ms ; DZP : 32,41 ± 4,19 ; $p < 0,01$, n=4/4) (Tab. 10). L'amplitude des mCPSIs augmente légèrement après application de DZP mais de manière non-significative ($p > 0,05$).

Les effets du DZP, tout comme lors des tests *in vivo*, sont donc similaires à ceux de l'EFX, suggérant des mécanismes sous-jacents probablement identiques.

IV. Morphologie et connectivité des neurones enregistrés

Les milieux intracellulaires utilisés contenant de la biocytine, nous avons tenté de révéler *a posteriori* la morphologie des neurones enregistrés. Nous avons pu observer deux types de morphologies distinctes : des neurones possédant une arborisation dendritique très dense mais restreinte au BLA, assez typique des interneurones (Fig. 39A), et des neurones ayant une arborisation moindre, unilatérale et projetant vers le CeA par un ou plusieurs prolongements, correspondant à des neurones de projections (Fig. 39B).

Le but de cette expérience était de pouvoir faire des corrélations entres les paramètres électrophysiologiques enregistrés et la morphologie et/ou la localisation

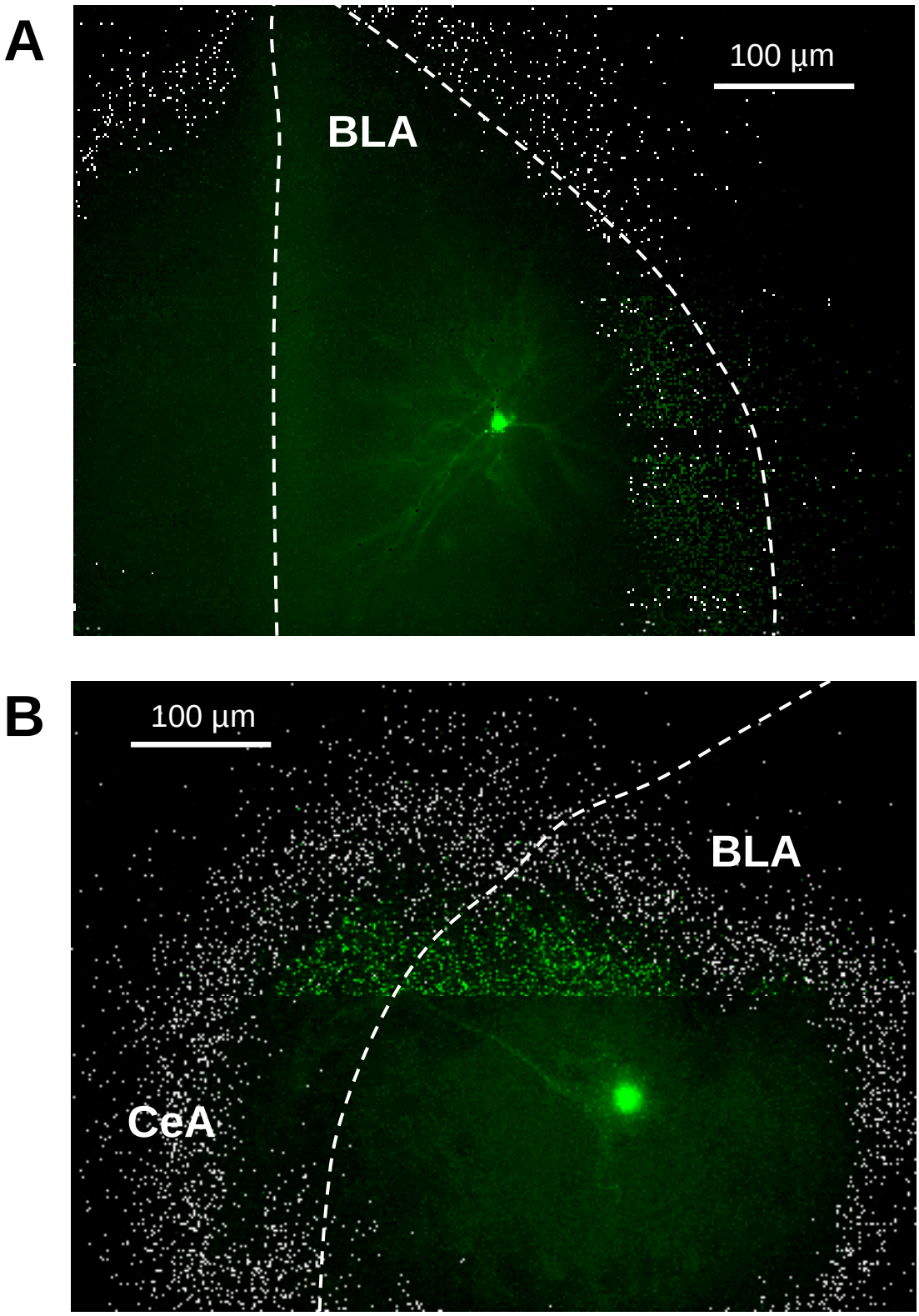


Figure 39 : Exemples de morphologies des neurones du BLA

A. Interneurone du BLA, possédant une arborisation dendritique très dense mais restreinte au BLA. **B.** Neurone de projection, avec une arborisation dendritique peu développée et un long prolongement vers le CeA.

exacte de ces neurones. Néanmoins, en raison notamment de l'épaisseur importante des tranches d'amygdale utilisées pour les enregistrements électrophysiologiques, la qualité des révélations a été très amoindrie et les résultats inexploitables. Nous ne disposons donc que de quelques illustrations mais aucune corrélation n'a réellement pu être réalisée.

Discussion

DISCUSSION

Au cours de ce travail de doctorat, j'ai obtenu un certain nombre d'éléments nouveaux concernant le fonctionnement et l'implication du complexe basolatéral de l'amygdale dans la modulation de la douleur. L'objectif était de voir si le BLA peut agir tel un pilote de la sortie comportementale se faisant par le CeA, et si sa modulation pharmacologique peut modifier la réponse nociceptive et douloureuse des animaux.

Ainsi nous avons pu voir que la seule modulation pharmacologique du BLA était suffisante pour modifier la sensibilité mécanique chez des animaux sains ou neuropathiques. Par ailleurs, l'équilibre entre l'excitation et l'inhibition synaptiques du BLA semble être un point clé pour définir le seuil de sensibilité mécanique.

Nous nous sommes également intéressés à l'étude précise du mode d'action d'une molécule anxiolytique non benzodiazépinique, l'étifoxine, et à son effet sur le comportement douloureux. Des travaux précédents au laboratoire avaient déjà montré le potentiel anti-nociceptif de cette molécule, lorsqu'elle est injectée par voie intrapéritonéale dans un modèle de douleur neuropathique chimio-induite (Aouad et al., 2009). Les résultats présentés dans cette thèse montrent également un effet analgésique de l'étifoxine, et cela lorsqu'elle est appliquée localement dans le BLA d'animaux rendus neuropathiques par le modèle du cuff. Cet effet est directement dépendant de la synthèse de neurostéroïdes actifs induite par l'EFX.

Enfin, après avoir démontré que le BLA était une cible potentielle de l'EFX, nous avons étudié les mécanismes cellulaires sous-jacents qui sont à la base de l'effet comportemental. Ainsi, après avoir installé au laboratoire une préparation de tranches d'amygdale de souris, j'ai eu recours à l'approche électrophysiologique du patch-clamp afin d'étudier l'activité des neurones du BLA. Ceci a permis de montrer que l'EFX induit une potentialisation de la transmission synaptique inhibitrice, et que cette augmentation est également dépendante de la neurostéroïdogenèse.

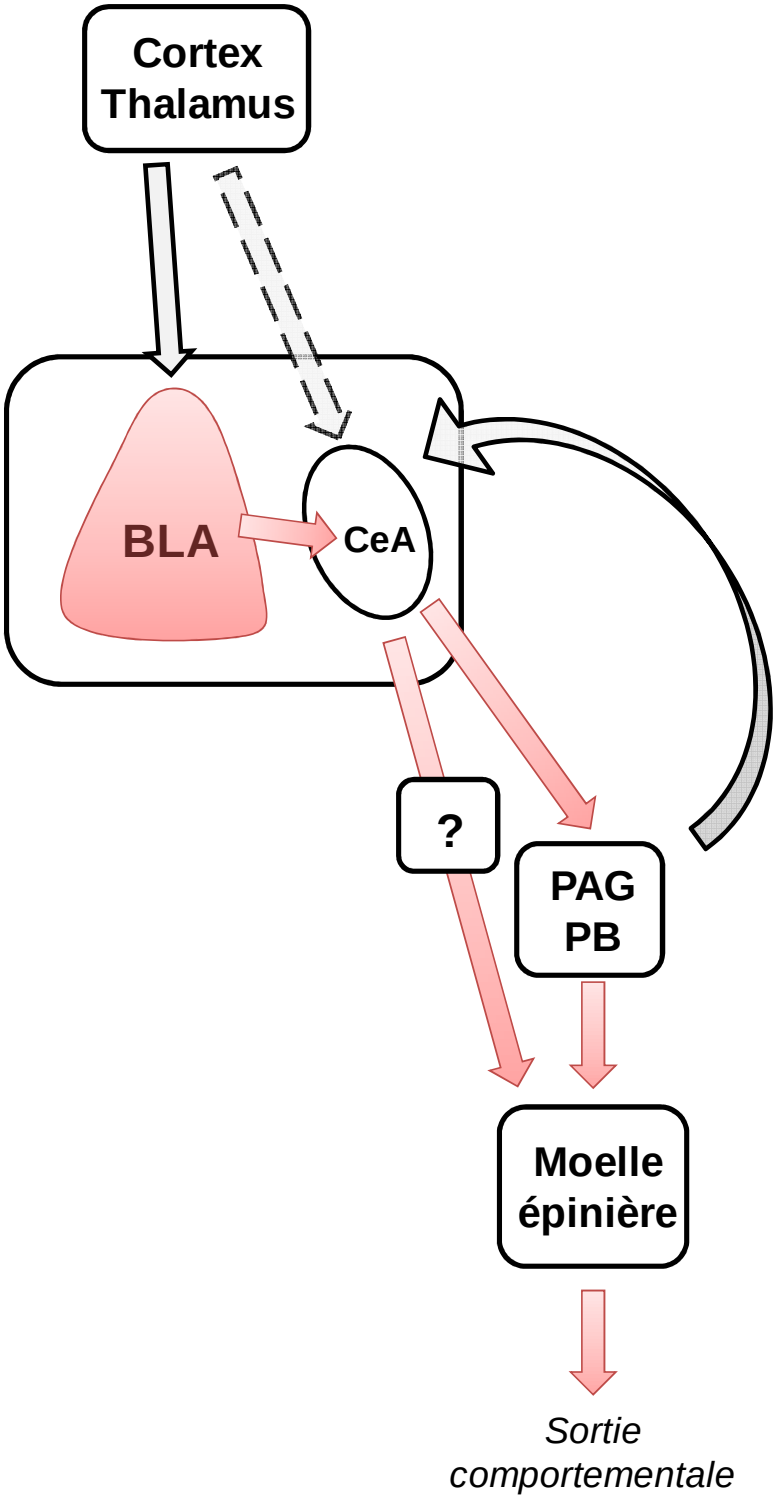


Figure 40 : Le contrôle tonique amygdalien

Illustration du contrôle tonique amygdalien de la douleur, piloté par le BLA. Il interagit avec le circuit nociceptif ascendant spino-parabrachio-amygdaloïde, ainsi que dans les voies des contrôles nociceptifs descendants, qui forment des relais dans les structures nociceptives du tronc cérébral (*e.g.* PAG, PB, …) avant d'atteindre la moelle épinière. Néanmoins, toutes les structures relais intervenant dans ce contrôle ne sont pas encore connues.

I. Existence d'un contrôle tonique amygdalien de la douleur

Les résultats obtenus avec les injections localisées dans le BLA indiquent que le blocage de la transmission excitatrice dans le BLA modifie le seuil de sensibilité mécanique des animaux. En effet, l'injection de MK-801, un bloqueur du canal du récepteur NMDA du glutamate, dans le BLA d'animaux neuropathiques, induit un effet analgésique temporaire sur la patte douloureuse (cf. Fig 25). Nous savons, de part les données anatomiques de l'amygdale, que le BLA reçoit des afférences glutamatergiques du cortex et du thalamus et qu'il est intimement connecté au CeA *via* des projections glutamatergiques (Pitkänen et al., 1997). Le CeA est, quant à lui, considéré comme la sortie de l'amygdale, pouvant agir sur les contrôles nociceptifs descendants et moduler la douleur (Millan, 2002; Veinante, 2009). Bien évidemment, en bloquant la transmission glutamatergique, on bloque donc la transmission synaptique au sein du BLA, mais également le transfert d'informations du BLA au CeA. Cependant, étant donné que le CeA ne contient que des neurones GABAergiques, l'injection de MK-801 n'affecte en rien leur fonctionnement. En revanche, si le transfert d'informations du BLA au CeA n'a pas lieu, le fonctionnement du CeA, et par conséquence son contrôle de la nociception, s'en retrouve altéré. Nos données démontrent l'existence d'un contrôle tonique de l'amygdale sur les seuils douloureux, qui s'en retrouvent modifiés lorsque ce contrôle est supprimé. Celui-ci interagit avec le circuit nociceptif ascendant spino-parabrachio-amygdaloïde, ainsi que dans les voies des contrôles nociceptifs descendants, qui forment des relais dans les structures nociceptives du tronc cérébral (*e.g.* PAG, PB, …), avant d'atteindre la moelle épinière (Fig. 40).

II. Le BLA pilote le contrôle tonique amygdalien

La transmission inhibitrice GABAergique du BLA peut varier en condition physiologique, et plusieurs équipes ont montré qu'elle semble réduite dans le BLA lors de conditions aversives (Sanders and Shekhar, 1995; Ferry and Di Scala, 1997; Soltis et al., 1997). Ainsi, nous avons injecté de la bicuculline, un antagoniste spécifique des récepteurs $GABA_A$, dans le BLA, afin de voir l'effet d'un blocage de la transmission synaptique inhibitrice dans cette structure sur les seuils nociceptifs. Dans ce cas de figure, on n'interfère pas avec la communication BLA-CeA, mais on supprime l'inhibition locale dans le BLA. Nos résultats indiquent que le blocage bilatéral la transmission synaptique inhibitrice GABAergique du BLA entraîne un effet pro-nociceptif temporaire en diminuant significativement les seuils de sensibilité mécanique pour les deux pattes chez

des animaux sains (cf. Fig 20). Chez des animaux neuropathiques, l'injection de bicuculline entraîne un effet pro-nociceptif réversible sur la patte contrôle (*i.e.* la patte gauche) et aucun effet significatif sur la patte cuff (*i.e.* la patte droite). Le seuil de sensibilité atteint par cette dernière est fortement abaissé par les conditions neuropathiques et semble être à son niveau minimal. Le seuil de sensibilité mécanique atteint par la patte contrôle après bicuculline est quant à lui équivalent au niveau de la patte neuropathique (cf. Fig 22).

Ces données démontrent également l'existence d'un contrôle tonique amygdalien de la douleur. De plus ce contrôle n'est pas lié strictement à la douleur, mais également à la nociception, puisqu'il peut modifier la sensibilité nociceptive d'animaux sains. Par ailleurs, les résultats indiquent que ce contrôle s'effectue à deux niveaux : au sein du BLA, qui agit en tant que pilote du tonus amygdalien, et dans le CeA, qui, sous la tutelle du BLA, va agir comme l'effecteur de la réponse comportementale.

Le noyau central de l'amygdale n'est constitué, à la différence du BLA, que de neurones GABAergiques. On serait donc en mesure de craindre une diffusion de la bicuculline du BLA vers le CeA suite à son injection, entraînant un biais dans l'interprétation des résultats. Néanmoins, l'observation de la diffusion du bleu de pontamine, injecté pour la vérification histologique de l'implantation des canules, nous a permis de voir que la substance reste dans les limites du complexe basolatéral. Par ailleurs, la littérature scientifique montre des résultats divergents selon les groupes scientifiques. Ainsi dans le cadre d'un modèle de douleur neuropathique par ligature du nerf sciatique, Pedersen et ses collaborateurs montrent que l'injection de bicuculline n'a pas d'effet lorsqu'elle est injectée dans le CeA (Pedersen et al., 2007). Leur résultat est attribué à l'absence, ou à la présence limitée d'un tonus GABAergique dans le CeA lors de conditions neuropathiques, ce qui expliquerait que la bicuculline n'ait pas d'effet. En revanche, dans l'étude de Hasanein et de ses collègues, chez des animaux sains, l'injection de bicuculline dans le CeA engendre une diminution de la nociception, mesurée par le test du réflexe spinal de retrait de la queue (Hasanein et al., 2008). Leur hypothèse est que, chez des animaux sains, il existe un contrôle tonique GABAergique présent dans le CeA, et ses projections inhibitrices sur les structures du tronc cérébral impliquées dans la nociception vont influencer les seuils nociceptifs. L'injection de bicuculline atténuerait donc ce contrôle inhibiteur et provoquerait une augmentation des symptômes nociceptifs *via* un mécanisme de désinhibition. Ainsi, dans nos expériences, si les injections de bicuculline avaient débordées dans le CeA, nous devrions observer des effets différents

entre les animaux sains et les animaux neuropathiques, ce qui n'est pas le cas. Par ailleurs, les neurones du CeA expriment des récepteurs $GABA_A$, sensibles classiquement à la bicuculline, mais également des récepteurs $GABA_C$, qui sont insensibles à ce bloqueur (Delaney and Sah, 1999). L'ensemble de ces données nous permet donc de nous assurer que l'effet la bicuculline observé lors de nos expériences est bien du à son action sur le BLA.

III. Le contrôle du BLA est dépendant de l'équilibre excitation/inhibition

Nos données indiquent que, d'une part, le blocage de la transmission excitatrice NMDA dans le BLA induit une action analgésique, et d'autre part, le blocage de la transmission inhibitrice dans cette même structure entraîne une action pro-algique. Ces deux résultats indiquent le rôle clé du BLA dans le contrôle de la nociception et que le blocage de deux neurotransmissions opposées induit des effets opposés. Une alternative afin de mieux comprendre les mécanismes en jeu est de potentialiser l'une ou l'autre de ces neurotransmissions afin de voir l'effet engendré sur la nociception. Les potentialisateurs de la transmission excitatrice NMDA n'étant pas disponibles, nous avons utilisé du diazépam, une benzodiazépine classique, connue pour agir comme modulateur allostérique positif du récepteur $GABA_A$. Cette molécule est couramment utilisée en clinique pour ses actions anxiolytique et anticonvulsivante (Towler, 1962). Néanmoins, ces actions sont souvent associées avec des effets secondaires, les principaux étant une sédation parfois importante, et la mise en place rapide de phénomènes de tolérance et d'addiction. Les concentrations de diazépam injectées dans notre étude (*i.e.* 10 µM) se situent bien en dessous de celles utilisées classiquement pour obtenir action une sédation des animaux (*i.e.* 5 mg/kg ~ 100 mM). La mesure de leur sensibilité mécanique lors du test n'est donc pas biaisée par une éventuelle sédation.

L'injection bilatérale de diazépam chez les animaux neuropathiques provoque une augmentation temporaire significative du seuil de sensibilité mécanique de la patte neuropathique, ainsi qu'une augmentation légère et significative du seuil de la patte contrôle gauche. Le seuil de sensibilité de la patte neuropathique revient ensuite à son niveau avant injection (cf. Fig 24). Récemment, une autre équipe a réalisé des infusions de DZP dans le BLA, ainsi que dans la PAG, chez des animaux sains, et en a observé les effets sur l'anxiété la nociception des animaux (Jiménez-Velázquez et al., 2010). Leurs données vont dans le même sens que les nôtres, indiquant un effet anti-nociceptif suite à l'injection de DZP dans le BLA. Par ailleurs, le diazépam étant un modulateur allostérique positif et non un agoniste des récepteurs $GABA_A$, nos résultats indiquent que la transmission GABAergique est également présente dans le BLA lors de conditions

neuropathiques. De manière intéressante, le DZP induit le même effet anti-nociceptif que le MK-801 lorsqu'il est injecté dans le BLA. Autrement dit, dans une situation de douleur neuropathique, le blocage de l'excitation dans le BLA conduit au même effet que la potentialisation de l'inhibition. Cela amène la notion d'équilibre entre l'excitation et l'inhibition, un phénomène à la base du fonctionnement de l'ensemble des structures corticales (Haider et al., 2006; Lu et al., 2009; Yizhar et al., 2011; Zhang and Sun, 2011). Ainsi, dans le BLA, l'équilibre entre excitation et inhibition semble être un facteur clé pour son fonctionnement. Cependant, l'effet obtenu après injection de DZP n'est pas le même pour les deux pattes ; il est très marqué sur la patte neuropathique et relativement plus faible sur la patte contrôle (cf. Fig 24). Ceci laisse à penser que les niveaux d'inhibition GABAergique ne sont pas les mêmes de chaque côté. En effet, les voies sensorielles ascendantes partent de la moelle épinière puis décussent avant d'arriver à l'amygdale. Théoriquement, la partie gauche de l'amygdale est liée au côté droit de l'organisme et *vice versa*. On peut alors imaginer que l'inhibition GABAergique est forte dans le BLA du côté controlatéral à la lésion et faible du côté ipsilatéral. Cependant, nos résultats obtenus avec les injections de bicuculline montrent que son action est présente pour la patte contrôle, liée au côté ispilatéral à la lésion, et absente pour la patte cuff (cf. Fig 22). Si l'hypothèse émise plus haut était vérifiée, nous devrions observer des résultats opposés. Cela démontre que le contrôle effectué par le BLA sur les seuils nociceptifs n'est pas réellement dépendant du niveau absolu d'inhibition ou d'excitation, mais de l'équilibre entre les deux. C'est le niveau relatif d'excitation et d'inhibition qui va définir le contrôle exercé par le BLA. Toute altération de cet équilibre entraîne une modification du contrôle tonique amygdalien par le BLA et influence les seuils nociceptifs.

IV. L'étifoxine module l'équilibre excitation/inhibition *via* son action neurostéroïdogène

IV.1. Etude de son action comportementale

Le diazépam, au même titre que la plupart des benzodiazépines, potentialise l'activité du récepteur $GABA_A$ de deux manières différentes : soit en se fixant sur son site de modulation propre, situé à l'interface des sous-unité α et γ du récepteurs, soit en se fixant sur le transporteur mitochondrial du cholestérol, le TSPO, ce qui conduit *in fine* à augmenter la production de neurostéroïdes actifs, réduits en positions 5α-3α, qui sont également de puissants modulateurs allostériques positifs du récepteur $GABA_A$. La potentialisation de la neurostéroïdogenèse endogène est une voie thérapeutique

envisageable au vu des résultats de la littérature scientifique, indiquant leur effet bénéfique dans le traitement des douleurs chroniques (Craft et al., 2004; Poisbeau et al., 2005). Néanmoins le principal problème de l'utilisation de diazépam réside dans ses effets secondaires associés. Les phénomènes de tolérance, d'addiction ainsi que le problème de sevrage à l'arrêt du traitement font partie des principaux problèmes des benzodiazépines. Leur usage afin de traiter la douleur neuropathique n'est donc pas recommandé, et l'on privilégiera plutôt l'emploi des antidépresseurs, notamment tricycliques, bien qu'ils ne soient pas efficaces pour la totalité des patients.

L'étifoxine (EFX), une molécule de la classe des benzoxazines, mise sur le marché récemment et prescrite comme anxiolytique en France (Stresam®), ne présente pas de structure apparentée aux benzodiazépines mais présente des mécanismes d'action similaires. Il a été montré en électrophysiologie, que de la même manière que les benzodiazépines, elle peut agir de deux manière distinctes (Schlichter et al., 2000). Elle se fixe directement sur un site propre, localisé sur les sous-unités β_2/β_3 du récepteur $GABA_A$, et potentialise son activité de manière allostérique (Verleye et al., 2002; Hamon et al., 2003), mais elle peut également se fixer sur le transporteur mitochondrial du cholestérol (TPSO), et donc augmenter la synthèse de neurostéroïdes actifs réduits en positions 3α et 5α (Verleye et al., 2005). Son principal avantage par rapport aux benzodiazépines réside dans le fait qu'elle n'induit pas ou peu d'effets secondaires (Kruse and Kuch, 1985; Micallef et al., 2001), en raison de sa structure moléculaire différente. Par ailleurs, des travaux précédents au sein de notre équipe ont montré que l'injection intrapéritonéale d'EFX est analgésique dans un modèle animal de douleur neuropathique chimio-induite (Aouad et al., 2009).

Nos données obtenues avec les injections d'étifoxine montrent qu'elle n'induit pas ou peu d'effet lorsqu'elle est injectée dans le BLA d'animaux sains (cf. Fig 26). En revanche, lorsqu'elle est injectée chez des animaux neuropathiques, l'EFX induit une action analgésique temporaire sur la patte cuff (cf. Fig 27). Ce résultat indique de manière intéressante l'apparente spécificité de l'EFX, qui est efficace dans le traitement de la douleur, au sens pathologique, mais pas de la nociception, chez les animaux sains. Néanmoins, le décours temporel est différent de celui obtenu avec l'injection de DZP, puisque l'action anti-nociceptive de l'EFX arrive tardivement après son injection, ce qui plaide en faveur d'un mécanisme d'action indirect. Pour discriminer entre l'action directe de l'EFX sur le récepteur et son action indirecte neurostéroïdogène, les expériences ont été réitérées en présence de finastéride, un bloqueur de la voie de synthèse des neurostéroïdes actifs. Dans ce cas de figure, l'EFX injectée dans le BLA n'a plus aucun

effet sur les seuils nociceptifs mécaniques ; son action analgésique est totalement supprimée par le blocage de la neurostéroïdogenèse. Ces résultats indiquent donc clairement que son effet direct sur le récepteur $GABA_A$ n'a pas ou peu de conséquence pour la mise en place de son action analgésique, mais que c'est l'action sur le TSPO qui induit l'effet tardif et prolongé des neurostéroïdes.

L'action de l'étifoxine est particulièrement intéressante au niveau thérapeutique car elle est plus spécifique que d'autres potentialisateurs de la neurostéroïdogenèse, comme les benzodiazépines. Les résultats obtenus avec le diazépam indiquent une action mixte, avec une composante précoce due à l'action sur le récepteur $GABA_A$, et une composante tardive, supprimée en présence de finastéride (cf. Fig 28). L'action de l'étifoxine est quant à elle restreinte à la douleur chronique, neuropathique dans notre étude, et son effet comportemental, plus prolongé que celui du diazépam, est uniquement du à son action neurostéroïdogène. L'EFX paraît donc plus adaptée au traitement des douleurs neuropathiques, et l'absence d'effets secondaires majeurs lors de son utilisation en fait une molécule de choix pour de nouvelles pistes thérapeutiques.

IV.2. Etude de son action cellulaire et moléculaire

L'action comportementale de l'EFX lorsqu'elle est injectée dans le BLA a ensuite été analysée plus précisément au niveau cellulaire et moléculaire, à l'aide d'expériences d'électrophysiologie.

Les résultats obtenus en mode courant-imposé indiquent que l'EFX ne modifie pas les profils de décharge ni les autres paramètres intrinsèques des neurones du BLA. L'excitabilité de ces derniers n'est donc pas affectée par l'EFX. L'action de celle-ci a donc uniquement lieu au niveau synaptique.

Les données des enregistrements en mode voltage-imposé montrent que l'EFX ne modifie pas la transmission synaptique excitatrice. Ce résultat est attendu puisque que l'EFX ne modifie pas l'excitabilité des neurones, et n'a, *a priori*, pas de modulation connue pour les récepteurs NMDA/AMPA/Kaïnate du glutamate. En revanche, l'action cellulaire principale de l'étifoxine est d'augmenter l'inhibition synaptique GABAergique des neurones du BLA. Cette augmentation se fait *via* trois mécanismes complémentaires pouvant être simultanés ; l'augmentation de la fréquence des courants post-synaptiques inhibiteurs miniatures, l'augmentation de leur amplitude et l'augmentation de leur constante de déactivation (cf. Tab. 8). Les deux derniers effets sont dépendants de l'action neurostéroïdogène de l'EFX, puisqu'ils sont supprimés en présence de finastéride,

tandis que l'effet sur la fréquence est probablement du à une action directe sur les récepteurs $GABA_A$ présynaptiques dépolarisants (cf. Tab. 9).

L'effet d'augmentation de la fréquence des mCPSIs est relativement atypique. En effet, l'EFX étant un modulateur allostérique positif du récepteur $GABA_A$, il augmente la charge inhibitrice véhiculée. Cependant, il est classiquement admis que l'augmentation de la fréquence d'évènements synaptiques miniatures après l'application d'une substance indique que cette dernière augmente la probabilité de libération vésiculaire au niveau des terminaisons pré-synaptiques. Cet effet est obtenu par l'excitation des terminaisons pré-synaptiques *via* des récepteurs situés sur celles-ci, ce qui revient à dépolariser ces terminaisons. Dans notre cas, l'EFX qui est une substance potentialisant l'inhibition GABAergique (produisant généralement une hyperpolarisation), augmente dans le BLA la probabilité de libération des neurones, ce qui correspond *a priori* à deux mécanismes opposés. L'effet hyperpolarisant du GABA est en réalité dépendant du gradient de chlorure entre le milieu intracellulaire et le milieu extracellulaire, qui est régulé par deux transporteurs spécifiques. Ainsi, dans la majorité des cas, l'ouverture du canal du récepteur $GABA_A$ conduit à une entrée de chlore qui suit le gradient de concentration. Dans certaines conditions, comme lors du développement ou lors de pathologies par exemple (Boulenguez et al., 2010), il arrive que le gradient de concentration se retrouve inversé en raison de l'expression différentielle des transporteurs du chlore, et que l'activation du récepteur $GABA_A$ conduise à une sortie d'ions chlore, provoquant alors une dépolarisation du neurone. Il a été montré dans le BLA, que ce gradient de concentration des ions chlore peut être modifié localement à certaines terminaisons synaptiques, et cela dans des conditions physiologiques (Washburn and Moises, 1992). Ceci expliquerait que dans les neurones du BLA, l'EFX agisse sur les récepteurs $GABA_A$ pré-synaptiques, induise une dépolarisation de la terminaison, qui renforce l'influx calcique voltage-dépendant, et augmente ainsi la probabilité calcium-dépendante de libération vésiculaire, ce qui conduit *in fine* à une augmentation de la fréquence des mCPSIs. Par ailleurs, l'application de diazépam, également modulateur allostérique positif du récepteur $GABA_A$, induit le même effet d'augmentation de la fréquence des mCPSIs. Peu de travaux se sont intéressés à cet effet dans le BLA, mais néanmoins, Marowsky et ses collègues l'ont relevé dans leurs travaux, sans en tirer de conclusions particulières (Marowsky et al., 2004).

Les deux autres effets de l'EFX, à savoir l'augmentation de la constante de déactivation ainsi que l'augmentation de l'amplitude des mCPSIs, qui sont dépendants des neurostéroïdes sont plus classiques. En effet, les neurostéroïdes endogènes ont été

décrits pour moduler positivement le récepteur $GABA_A$, notamment en augmentant sa cinétique d'ouverture (Macdonald and Olsen, 1994; Sieghart, 1995; Poisbeau et al., 1997), ce qui conduit à une augmentation de la constante de déactivation. Concernant l'augmentation de l'amplitude des mCPSIs, elle peut être expliquée de deux manières. La première est un effet des neurostéroïdes qui vont moduler directement le récepteur et augmenter la charge inhibitrice. La seconde explication est que l'augmentation de la probabilité de libération, induite par l'EFX au niveau pré-synaptique, augmente par ce mécanisme la synchronisation des sites de libération, conduisant à des évènements synaptiques plus importants en amplitude. Cette hypothèse peut être appuyée par le fait que l'augmentation d'amplitude des mCPSIs est souvent retrouvée en association avec l'augmentation de leur fréquence après l'application d'EFX (cf. Tab. 8). Cependant, les données obtenues en présence de finastéride indiquent que l'augmentation de l'amplitude n'est plus présente, alors que l'augmentation fréquence l'est toujours.

Conclusion et perspectives

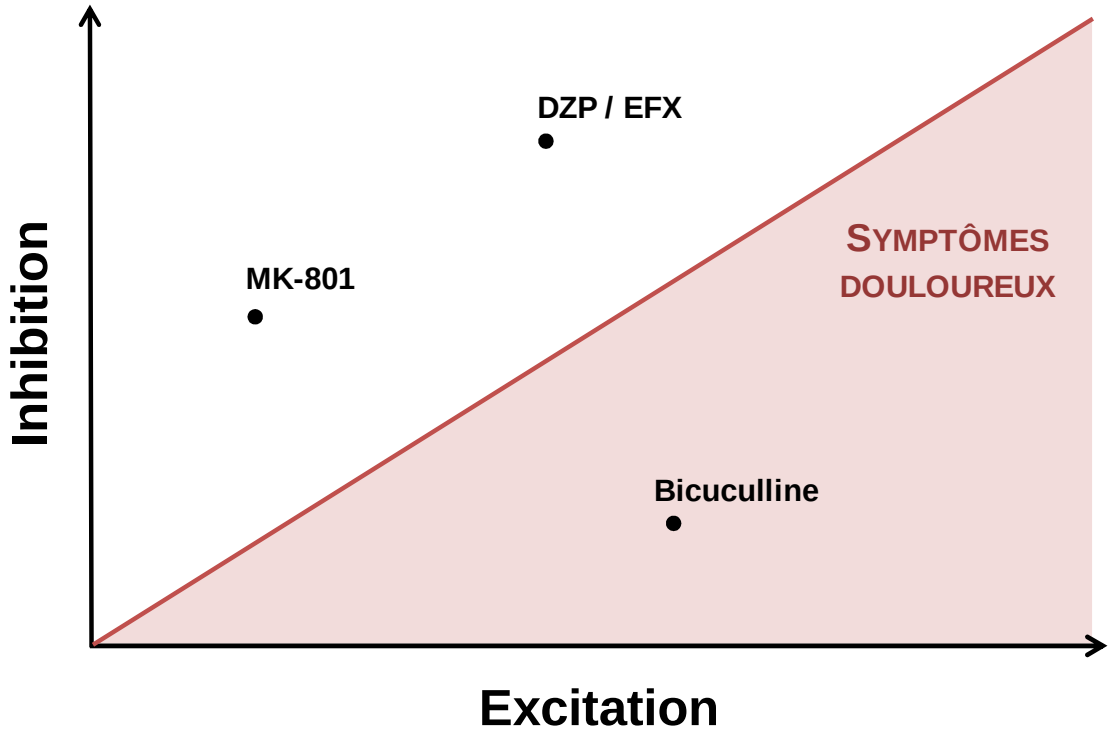


Figure 41 : Illustration de l'action de la balance excitation/inhibition dans le BLA

Cet équilibre, ou balance, entre l'inhibition et l'excitation, au sein du BLA fait basculer le contrôle amygdalien dans une action pro-algique ou une action analgésique. Les résultats *in vivo* nous montrent bien que, dans nos conditions de test, il n'y a pas de d'effet intermédiaire ; soit l'animal présente une douleur, soit il n'en présente pas. Ainsi, on peut assimiler ce type de réponse à un état bistable, oscillant entre une condition douloureuse pathologique, et une autre physiologique. Cette représentation graphique reprend ici cette notion de bistabilité. En fonction des niveaux relatifs d'inhibition et d'excitation, l'animal va présenter ou non des symptômes douloureux. Bien évidemment ce modèle conceptuel est ici simplifié et comprend uniquement nos résultats. Mais les travaux réalisés sur les autres types de neurotransmissions présentes dans le BLA, ou sur les neuromodulateurs excitateurs ou inhibiteurs, pourraient être intégrés dans ce modèle.

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Les données que nous avons obtenues indiquent que l'EFX potentialise l'inhibition GABAergique au sein du complexe basolatéral de l'amygdale. Cette action se traduit comportementalement par un effet analgésique dans le cadre d'une douleur neuropathique. Les résultats des expériences *in vivo* nous ont appris que l'équilibre entre l'excitation et l'inhibition au sein du BLA est l'élément clé permettant le contrôle de la douleur par l'amygdale. L'EFX, par son action, rétablirait cet équilibre, *a priori* déficitaire en inhibition dans des conditions neuropathiques, en potentialisant la transmission synaptique GABAergique.

Cet équilibre, ou balance, entre l'inhibition et l'excitation, au sein du BLA va finalement faire basculer le contrôle dans une action pro-algique ou une action analgésique. Les résultats *in vivo* nous montrent bien que, dans nos conditions de test, il n'y a pas de résultat intermédiaire ; soit l'animal présente une douleur, soit il n'en présente pas. On pourrait assimiler ce type de réponse à un état bistable, oscillant entre une condition douloureuse pathologique, et une autre physiologique. Des résultats obtenus précédemment au sein de l'équipe avec l'EFX vont dans le sens de cette explication. L'utilisation de gammes croissantes d'EFX a montré que pour une certaine concentration, l'effet est nul, et pour la concentration suivante, l'effet est tout de suite maximal (Aouad, communication personnelle). Ce concept de bistabilité est illustré dans la figure 41. Bien évidemment, il est ici simplifié et comprend uniquement nos résultats. Néanmoins, les travaux réalisés sur les autres types de neurotransmissions présentes dans le BLA (*e.g.* sérotonine, dopamine), ou sur les neuromodulateurs excitateurs ou inhibiteurs (*e.g.* CRF, neuropeptides, opioïdes, …), pourraient être intégrés dans cette représentation.

Les résultats de ma thèse ont ainsi permis de montrer l'existence d'un contrôle tonique amygdalien de la douleur, dans le cadre d'animaux neuropathiques, mais également de la nociception, chez des animaux sains. Par ailleurs, la place du complexe basolatéral de l'amygdale, souvent peu prise en compte dans les études sur la douleur, a été redéfinie. Ce complexe doit être pris en compte dans le circuit de la douleur et son rôle de pilote du noyau central de l'amygdale ne doit pas être négligé. Néanmoins, nous

ne connaissons pas actuellement quelles structures en aval sont impliquées dans lc contrôle amygdalien par le BLA. Des enregistrements électrophysiologiques *in vivo* pourraient être effectué dans des structures identifiées comme appartenant aux contrôle nociceptifs descendants (*e.g.* PAG, RVM, …etc), tout en réalisant simultanément une stimulation nociceptive, et une modulation pharmacologique du BLA. Ainsi, il serait possible de voir comme cette modulation modifie la réponse observée dans les structures enregistrées. Par ailleurs, le fonctionnement du BLA dans le cadre de la douleur étant vraisemblablement régi par l'équilibre entre excitation et inhibition, il serait intéressant de voir si ce modèle de fonctionnement s'applique à d'autres comportements régulés par l'amygdale, comme la peur conditionnée ou les phénomènes anxieux.

Ce travail de thèse a également permis de confirmer le potentiel analgésique de l'étifoxine, qui s'effectue *via* son action neurostéroïdogène, passant par sa fixation sur le TPSO. Cependant, contrairement au DZP, son action est spécifiquement analgésique, chez des animaux neuropathiques, et non anti-nociceptive, chez des animaux sains. Cette spécificité pourrait s'expliquer par un accroissement de l'expression du TSPO en conditions neuropathiques. Il a été montré récemment dans un modèle de douleur neuropathique chez le rat, une surexpression du TSPO dans la corne dorsale de la moelle épinière, du côté ispilatéral à la lésion (Miller et al., 2012). On peut donc imaginer le même type de mécanisme dans l'amygdale, et notamment dans le BLA, avec une expression accrue du TSPO du côté controlatéral à la lésion (en raison de la décussation des fibres ascendantes). Un marquage immunohistochimique couplé à une quantification par Western Blot permettrait de quantifier la présence du transporteur et de confirmer cette hypothèse.

Il s'agira bien évidemment d'identifier également l'action de l'EFX sur le BLA dans d'autres modèles de douleurs chroniques, neuropathiques et/ou inflammatoires. Le potentiel analgésique de l'EFX avait été montré initialement par son injection intrapéritonéale dans un modèle de douleur neuropathique chimio-induite (Aouad et al., 2009), ainsi que dans un modèle d'inflammation du genou par injection d'adjuvant complet de Freund (Aouad, communication personnelle). Il serait donc intéressant d'étudier l'implication du contrôle amygdalien dans ce type de douleur, et de voir si l'EFX produit le même effet que dans nos travaux. Par ailleurs, l'étude d'Aouad et de ses collègues, a montré que les injections répétées cumulatives d'EFX durant cinq jours permettent d'obtenir un effet analgésique durable sur les symptômes douloureux (Aouad et al., 2009). Ce même type d'injections cumulatives pourrait être testé dans le BLA. Enfin, l'EFX dispose actuellement d'une autorisation de mise sur le marché pour son

action anxiolytique. Récemment, des travaux ont montré que suite à la mise en place d'une douleur neuropathique chez l'animal, celui-ci va développer des symptômes anxieux puis dépressifs dans les 6 à 8 semaines suivantes, et que ces symptômes vont perdurer, même après suppression de la douleur neuropathique originelle (Yalcin et al., 2011). L'EFX ayant des propriétés anxiolytique et analgésique, on peut imaginer que son application dans le BLA puisse empêche l'apparition des symptômes anxieux et dépressifs.

Enfin pour terminer, ce travail ouvre une nouvelle voie thérapeutique innovante avec l'utilisation d'une molécule qui ne présente pas ou peu d'effets secondaires et qui permet de potentialiser la neurostéroïdogenèse endogène. Néanmoins, en vue d'une application éventuelle chez l'humain, plusieurs points restent à vérifier. Lorsque l'EFX est utilisée pour le traitement des troubles anxieux chez l'humain, elle est prise par voie orale. Si l'on considère que le BLA est une cible potentielle de la molécule, il faudrait doser la concentration exacte d'EFX atteignant la structure. De plus, son action analgésique étant dépendante de son effet neurostéroïdogène, il est important de doser la quantité de neurostéroïdes produite dans les structures cérébrales après la prise d'EFX. Nous avons tenté de réaliser un dosage de la neurostéroïdogenèse induite dans le BLA après l'application d'EFX mais les limites de détection de nos appareils de mesure ne nous ont pas permis d'obtenir de résultats fiables. Toutefois, l'étifoxine se liant au TSPO, elle augmente la production de l'ensemble des stéroïdes, notamment les hormones produites au sein des glandes surrénales (*i.e.* cortisol, catécholamines) ou des gonades (*i.e.* hormones sexuelles). Avant d'envisager un développement de l'utilisation de l'EFX en clinique, notamment de manière chronique, il s'agira de vérifier son action au niveau de ces deux structures, et d'en évaluer les conséquences sur le fonctionnement de l'organisme.

Références

Adolphs R, Tranel D, Damasio AR (1998) The human amygdala in social judgment. Nature 393:470–474.

Aggleton JP (1993) The contribution of the amygdala to normal and abnormal emotional states. Trends in neurosciences 16:328–333.

Alheid G, De Olmos J, Beltramino C (1995) Amygdala and extended amygdala. In: The Rat Nervous System, 2nd ed. (Paxinos G, Orlando F, eds), pp 495–578. San Diego, CA: Academic Press.

Alheid GF, Heimer L (1988) New perspectives in basal forebrain organization of special relevance for neuropsychiatric disorders: the striatopallidal, amygdaloid, and corticopetal components of substantia innominata. Neuroscience 27:1–39.

Anon. (2005) Duloxetine (Cymbalta) for diabetic neuropathic pain. The Medical letter on drugs and therapeutics 47:67–68.

Aouad M, Charlet A, Rodeau J-L, 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.

Asan E (1997) Ultrastructural features of tyrosine-hydroxylase-immunoreactive afferents and their targets in the rat amygdala. Cell and tissue research 288:449–469.

Attal N, Cruccu G, Baron R, Haanpää M, Hansson P, Jensen TS, Nurmikko T (2010) EFNS guidelines on the pharmacological treatment of neuropathic pain: 2010 revision. European journal of neurology 17:1113–e88.

Attal N, Cruccu G, Haanpää M, Hansson P, Jensen TS, Nurmikko T, Sampaio C, Sindrup S, Wiffen P (2006) EFNS guidelines on pharmacological treatment of neuropathic pain. European journal of neurology 13:1153–1169.

Attal N, Guirimand F, Brasseur L, Gaude V, Chauvin M, Bouhassira D (2002) Effects of IV morphine in central pain: a randomized placebo-controlled study. Neurology 58:554–563.

Bandler R, Shipley MT (1994) Columnar organization in the midbrain periaqueductal gray: modules for emotional expression? Trends in neurosciences 17:379–389.

Barberis C, Tribollet E (1996) Vasopressin and oxytocin receptors in the central nervous system. Critical reviews in neurobiology 10:119–154.

Barnard EA, Skolnick P, Olsen RW, Mohler H, Sieghart W, Biggio G, Braestrup C, Bateson AN, Langer SZ (1998) International Union of Pharmacology. XV. Subtypes of gamma-aminobutyric acidA receptors: classification on the basis of subunit structure and receptor function. Pharmacological reviews 50:291–313.

Baron R (2006) Mechanisms of disease: neuropathic pain--a clinical perspective. Nature clinical practice Neurology 2:95–106.

Bauer EP, Schafe GE, LeDoux JE (2002) NMDA receptors and L-type voltage-gated calcium channels contribute to long-term potentiation and different components of fear memory formation in the lateral amygdala. The Journal of neuroscience 22:5239–5249.

Behbehani MM (1995) Functional characteristics of the midbrain periaqueductal gray. Progress in neurobiology 46:575–605.

Belelli D, Lambert JJ (2005) Neurosteroids: endogenous regulators of the GABA(A) receptor. Nature reviews Neuroscience 6:565–575.

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

Benedetti F, Vighetti S, Amanzio M, Casadio C, Oliaro A, Bergamasco B, Maggi G (1998) Dose-response relationship of opioids in nociceptive and neuropathic postoperative pain. Pain 74:205–211.

Bernard JF, Alden M, Besson JM (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 329:201–229.

Bernard JF, Peschanski M, Besson JM (1989) A possible spino (trigemino)-ponto-amygdaloid pathway for pain. Neuroscience letters 100:83–88.

Bester H, Besson JM, Bernard JF (1997) Organization of efferent projections from the parabrachial area to the hypothalamus: a Phaseolus vulgaris-leucoagglutinin study in the rat. The Journal of comparative neurology 383:245–281.

Bliss T V, Lomo T (1973) Long-lasting potentiation of synaptic transmission in the dentate area of the anaesthetized rabbit following stimulation of the perforant path. The Journal of physiology 232:331–356.

Bordi F, LeDoux JE (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 98:275–286.

Boulenguez P, Liabeuf S, Bos R, Bras H, Jean-Xavier C, Brocard C, Stil A, Darbon P, Cattaert D, Delpire E, Marsala M, Vinay L (2010) Down-regulation of the potassium-chloride cotransporter KCC2 contributes to spasticity after spinal cord injury. Nature medicine 16:302–307.

Bourgeais L, Monconduit L, Villanueva L, Bernard JF (2001) Parabrachial internal lateral neurons convey nociceptive messages from the deep laminas of the dorsal horn to the intralaminar thalamus. The Journal of neuroscience 21:2159–2165.

Breton J-D, Veinante P, Uhl-Bronner S, Vergnano AM, Freund-Mercier MJ, Schlichter R, Poisbeau P (2008) Oxytocin-induced antinociception in the spinal cord is mediated by a subpopulation of glutamatergic neurons in lamina I-II which amplify GABAergic inhibition. Molecular pain 4:19.

Brown JS, Kalish HI, Farber IE (1951) Conditioned fear as revealed by magnitude of startle response to an auditory stimulus. Journal of experimental psychology 41:317–328.

Brown S, Schafer E (1888) An investigation into the functions of the occipital and temporal lobes of the monkey's brain. Philosophical Transactions of the Royal Society Of London B: Biological Sciences 179:303–327.

Burdach KF (1819-1822) Vom Baue und Leben des Gehirns.

Campbell LC, Clauw DJ, Keefe FJ (2003) Persistent pain and depression: a biopsychosocial perspective. Biological psychiatry 54:399–409.

Canteras NS, Swanson LW (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 324:180–194.

Carlsen J (1988) Immunocytochemical localization of glutamate decarboxylase in the rat basolateral amygdaloid nucleus, with special reference to GABAergic innervation of amygdalostriatal projection neurons. The Journal of comparative neurology 273:513–526.

Cassell MD, Freedman LJ, Shi C (1999) The intrinsic organization of the central extended amygdala. Annals of the New York Academy of Sciences 877:217–241.

Cassell MD, Gray TS (1989) Morphology of peptide-immunoreactive neurons in the rat central nucleus of the amygdala. The Journal of comparative neurology 281:320–333.

Chaplan SR, Bach FW, Pogrel JW, Chung JM, Yaksh TL (1994) Quantitative assessment of tactile allodynia in the rat paw. Journal of neuroscience methods 53:55–63.

Chapman PF, Bellavance LL (1992) Induction of long-term potentiation in the basolateral amygdala does not depend on NMDA receptor activation. Synapse (New York, NY) 11:310–318.

Chapman WP, Schroeder HR, Geyer G, Brazier MA, Fager C, Poppen JL, Solomon HC, Yakovlev PI (1954) Physiological evidence concerning importance of the amygdaloid nuclear region in the integration of circulatory function and emotion in man. Science (New York, NY) 120:949–950.

Chu H-Y, Ito W, Li J, Morozov A (2012) Target-specific suppression of GABA release from parvalbumin interneurons in the basolateral amygdala by dopamine. The Journal of neuroscience 32:14815–14820.

Chung L, Moore SD (2009) Neuropeptides modulate compound postsynaptic potentials in basolateral amygdala. Neuroscience 164:1389–1397.

Ciocchi S, Lüthi A, Herry C (2011) Novel amygdala neuronal circuits controlling fear behavior. Médecine sciences 27:455–457.

Collins SL, Moore RA, McQuayHJ, Wiffen P (2000) Antidepressants and anticonvulsants for diabetic neuropathy and postherpetic neuralgia: a quantitative systematic review. Journal of pain and symptom management 20:449–458.

Compagnone NA, Mellon SH (2000) Neurosteroids: biosynthesis and function of these novel neuromodulators. Frontiers in neuroendocrinology 21:1–56.

Conner JM, Lauterborn JC, Yan Q, Gall CM, Varon S (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 17:2295–2313.

Craft RM, Mogil JS, Aloisi AM (2004) Sex differences in pain and analgesia: the role of gonadal hormones. European journal of pain (London, England) 8:397–411.

Crestani F, Martin JR, Möhler H, Rudolph U (2000) Mechanism of action of the hypnotic zolpidem in vivo. British journal of pharmacology 131:1251–1254.

Daftary SS, Calderon G, Rios M (2012) Essential role of brain-derived neurotrophic factor in the regulation of serotonin transmission in the basolateral amygdala. Neuroscience 224:125–134.

Davis M (2000) The role of the amygdala in conditioned and unconditioned fear and anxiety. In: The amygdala (Aggleton JP, ed), pp 213–288. Oxford, UK: Oxford University Press.

Davis M, Rainnie D, Cassell M (1994) Neurotransmission in the rat amygdala related to fear and anxiety. Trends in neurosciences 17:208–214.

Delaney AJ, Sah P (1999) GABA receptors inhibited by benzodiazepines mediate fast inhibitory transmission in the central amygdala. The Journal of neuroscience 19:9698–9704.

Delaney AJ, Sah P (2001) Pathway-specific targeting of GABA(A) receptor subtypes to somatic and dendritic synapses in the central amygdala. Journal of neurophysiology 86:717–723.

Derchansky M, Jahromi SS, Mamani M, Shin DS, Sik A, Carlen PL (2008) Transition to seizures in the isolated immature mouse hippocampus: a switch from dominant phasic inhibition to dominant phasic excitation. The Journal of physiology 586:477–494.

Dersh J, Polatin PB, Gatchel RJ (2002) Chronic pain and psychopathology: research findings and theoretical considerations. Psychosomatic medicine 64:773–786.

Dityatev AE, Bolshakov VY (2005) Amygdala, long-term potentiation, and fear conditioning. The Neuroscientist 11:75–88.

Doble A (1999) New insights into the mechanism of action of hypnotics. Journal of psychopharmacology 13:S11–20.

Dong HW, Petrovich GD, Swanson LW (2001) Topography of projections from amygdala to bed nuclei of the stria terminalis. Brain research Brain research reviews 38:192–246.

Dutar P, Nicoll RA (1988) A physiological role for GABAB receptors in the central nervous system. Nature 332:156–158.

Dworkin RH, Clark WC, Lipsitz JD (1995) Pain responsivity in major depression and bipolar disorder. Psychiatry research 56:173–181.

Esmaeili A, Lynch JW, Sah P (2009) GABAA receptors containing gamma1 subunits contribute to inhibitory transmission in the central amygdala. Journal of neurophysiology 101:341–349.

Faber ES, Callister RJ, Sah P (2001) Morphological and electrophysiological properties of principal neurons in the rat lateral amygdala in vitro. Journal of neurophysiology 85:714–723.

Farb CR, Aoki C, Ledoux JE (1995) Differential localization of NMDA and AMPA receptor subunits in the lateral and basal nuclei of the amygdala: a light and electron microscopic study. The Journal of comparative neurology 362:86–108.

Faulkner B, Brown TH (1999) Morphology and physiology of neurons in the rat perirhinal-lateral amygdala area. The Journal of comparative neurology 411:613–642.

Ferry B, Di Scala G (1997) Bicuculline administration into basolateral amygdala facilitates trace conditioning of odor aversion in the rat. Neurobiology of learning and memory 67:80–83.

Fitzgerald M (2005) The development of nociceptive circuits. Nature reviews Neuroscience 6:507–520.

Flatters SJL, Bennett GJ (2004) Ethosuximide reverses paclitaxel- and vincristine-induced painful peripheral neuropathy. Pain 109:150–161.

Fox RJ, Sorenson CA (1994) Bilateral lesions of the amygdala attenuate analgesia induced by diverse environmental challenges. Brain research 648:215–221.

Freedman LJ, Cassell MD (1994) Distribution of dopaminergic fibers in the central division of the extended amygdala of the rat. Brain research 633:243–252.

Fritsch B, Qashu F, Figueiredo TH, Aroniadou-Anderjaska V, Rogawski MA, Braga MFM (2009) Pathological alterations in GABAergic interneurons and reduced tonic inhibition in the basolateral amygdala during epileptogenesis. Neuroscience 163:415–429.

Gallagher RM, Moore P, Chernoff I (1995) The reliability of depression diagnosis in chronic low back pain. A pilot study. General hospital psychiatry 17:399–413.

Gauriau C, Bernard J-F (2002) Pain pathways and parabrachial circuits in the rat. Experimental physiology 87:251–258.

Giesbrecht CJ, Mackay JP, Silveira HB, Urban JH, Colmers WF (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 30:16970–16982.

Gilpin NW (2012) Corticotropin-releasing factor (CRF) and neuropeptide Y (NPY): effects on inhibitory transmission in central amygdala, and anxiety- & alcohol-related behaviors. Alcohol 46:329–337.

Gilpin NW, Misra K, Herman M a, Cruz MT, Koob GF, Roberto M (2011) Neuropeptide Y opposes alcohol effects on gamma-aminobutyric acid release in amygdala and blocks the transition to alcohol dependence. Biological psychiatry 69:1091–1099.

Goddard G V (1964) Functions of the amygdala. Psychological bulletin 62:89–109.

Gonçalves L, Silva R, Pinto-Ribeiro F, Pêgo JM, Bessa JM, Pertovaara A, Sousa N, Almeida A (2008) Neuropathic pain is associated with depressive behaviour and induces neuroplasticity in the amygdala of the rat. Experimental neurology 213:48–56.

Grace AA, Rosenkranz JA (2002) Regulation of conditioned responses of basolateral amygdala neurons. Physiology & behavior 77:489–493.

Guirimand F (2003) Recent data on the physiology of pain. Néphrologie 24:401–407.

Guirimand F, Le Bars D (1996) Physiology of nociception. Annales françaises d'anesthésie et de réanimation 15:1048–1079.

Hadingham KL, Garrett EM, Wafford KA, Bain C, Heavens RP, Sirinathsinghji DJ, Whiting PJ (1996) Cloning of cDNAs encoding the human gamma-aminobutyric acid type A receptor alpha 6 subunit and characterization of the pharmacology of alpha 6-containing receptors. Molecular pharmacology 49:253–259.

Haefely W (1984) Benzodiazepine interactions with GABA receptors. Neuroscience letters 47:201–206.

Haider B, Duque A, Hasenstaub AR, McCormick DA (2006) Neocortical network activity in vivo is generated through a dynamic balance of excitation and inhibition. The Journal of neuroscience 26:4535–4545.

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

Hargreaves K, Dubner R, Brown F, Flores C, Joris J (1988) A new and sensitive method for measuring thermal nociception in cutaneous hyperalgesia. Pain 32:77–88.

Hasanein P, Mirazi N, Javanmardi K (2008) GABAA receptors in the central nucleus of amygdala (CeA) affect on pain modulation. Brain research 1241:36–41.

Hasanein P, Parviz M, Keshavarz M, Javanmardi K (2007) CB1 receptor activation in the basolateral amygdala produces antinociception in animal models of acute and tonic nociception. Clinical and experimental pharmacology & physiology 34:439–449.

Hathway G, Harrop E, Baccei M, Walker S, Moss A, Fitzgerald M (2006) A postnatal switch in GABAergic control of spinal cutaneous reflexes. The European journal of neuroscience 23:112–118.

Heinricher MM, Tavares I, Leith JL, Lumb BM (2009) Descending control of nociception: Specificity, recruitment and plasticity. Brain research reviews 60:214–225.

Heldt SA, Ressler KJ (2007) Forebrain and midbrain distribution of major benzodiazepine-sensitive GABAA receptor subunits in the adult C57 mouse as assessed with in situ hybridization. Neuroscience 150:370–385.

Helmstetter FJ, Tershner S a, Poore LH, Bellgowan PS (1998) Antinociception following opioid stimulation of the basolateral amygdala is expressed through the periaqueductal gray and rostral ventromedial medulla. Brain research 779:104–118.

Hosie AM, Wilkins ME, Da Silva HMA, Smart TG (2006) Endogenous neurosteroids regulate GABAA receptors through two discrete transmembrane sites. Nature 444:486–489.

Huang YY, Kandel ER (1998) Postsynaptic induction and PKA-dependent expression of LTP in the lateral amygdala. Neuron 21:169–178.

Hubbard DT, Nakashima BR, Lee I, Takahashi LK (2007) Activation of basolateral amygdala corticotropin-releasing factor 1 receptors modulates the consolidation of contextual fear. Neuroscience 150:818–828.

Huber D, Veinante P, Stoop R (2005) Vasopressin and oxytocin excite distinct neuronal populations in the central amygdala. Science 308:245–248.

Humeau Y, Reisel D, Johnson AW, Borchardt T, Jensen V, Gebhardt C, Bosch V, Gass P, Bannerman DM, Good MA, Hvalby Ø, Sprengel R, Lüthi A (2007) A pathway-specific function for different AMPA receptor subunits in amygdala long-term potentiation and fear conditioning. The Journal of neuroscience 27:10947–10956.

Huse E, Larbig W, Flor H, Birbaumer N (2001) The effect of opioids on phantom limb pain and cortical reorganization. Pain 90:47–55.

Ikeda R, Takahashi Y, Inoue K, Kato F (2007) NMDA receptor-independent synaptic plasticity in the central amygdala in the rat model of neuropathic pain. Pain 127:161–172.

Jensen TS (2002) Anticonvulsants in neuropathic pain: rationale and clinical evidence. European journal of pain 6 Suppl A:61–68.

Jiménez-Velázquez G, López-Muñoz FJ, Fernández-Guasti A (2010) Parallel anxiolytic-like and antinociceptive actions of diazepam in the anterior basolateral amygdala and dorsal periaqueductal gray. Brain research 1349:11–20.

Johnston J (1923) Further contribution to the study of the evolution of the forebrain. J Comp Neurol 35:337–482.

Jolkkonen E, Pitkänen A (1998) Intrinsic connections of the rat amygdaloid complex: projections originating in the central nucleus. The Journal of comparative neurology 395:53–72.

Kaada BR (1951) Somato-motor, autonomic and electrocorticographic responses to electrical stimulation of rhinencephalic and other structures in primates, cat, and dog; a study of responses from the limbic, subcallosal, orbito-insular, piriform and temporal cortex, hippoc. Acta physiologica Scandinavica Supplementum 24:1–262.

Kalivas PW, Gau BA, Nemeroff CB, Prange AJ (1982) Antinociception after microinjection of neurotensin into the central amygdaloid nucleus of the rat. Brain research 243:279–286.

Kang-Park M, W.A. W, SD M (2004) Differential actions of diazepam and zolpidem in basolateral and central amygdala nuclei. Neuropharmacology 46:1–9.

Kavaliers M (1988) Evolutionary and comparative aspects of nociception. Brain research bulletin 21:923–931.

Keller A, Poisbeau P (2009) Neurostéroïdes et douleur. Douleur et Analgésie 22:157–168.

Keller AF, Breton J-D, Schlichter R, Poisbeau P (2004) Production of 5alpha-reduced neurosteroids is developmentally regulated and shapes GABA(A) miniature IPSCs in lamina II of the spinal cord. The Journal of neuroscience 24:907–915.

Keller AF, Coull JA, Chery N, Poisbeau P, De Koninck Y (2001) Region-specific developmental specialization of GABA-glycine cosynapses in laminas I-II of the rat spinal dorsal horn. The Journal of neuroscience 21:7871–7880.

Kemppainen S, Pitkänen A (2000) Distribution of parvalbumin, calretinin, and calbindin-D(28k) immunoreactivity in the rat amygdaloid complex and colocalization with gamma-aminobutyric acid. The Journal of comparative neurology 426:441–467.

Klüver H, Bucy PC (1937) “Psychic blindness” and other symptoms following bilateral temporal lobectomy in rhesus monkeys. American Journal of Physiology 119:352–353.

Klüver H, Bucy PC (1939) Preliminary analysis of functions of the temporal lobes in monkeys. Archive of Neurological Psychiatry 42:979–1000.

Knobloch HS, Charlet A, Hoffmann LC, Eliava M, Khrulev S, Cetin AH, Osten P, Schwarz MK, Seeburg PH, Stoop R, Grinevich V (2012) Evoked axonal oxytocin release in the central amygdala attenuates fear response. Neuron 73:553–566.

Kremarik P, Freund-Mercier MJ, Stoeckel ME (1995) Oxytocin and vasopressin binding sites in the hypothalamus of the rat: histoautoradiographic detection. Brain research bulletin 36:195–203.

Krueger KE (1991) Peripheral-type benzodiazepine receptors: a second site of action for benzodiazepines. Neuropsychopharmacology : official publication of the American College of Neuropsychopharmacology 4:237–244.

Kruse HJ, Kuch H (1985) Etifoxine: evaluation of its anticonvulsant profile in mice in comparison with sodium valproate, phenytoin and clobazam. Arzneimittel-Forschung 35:133–135.

Lambert PA, Delaunay J (1963) The benzodiazepine derivatives in anxiety states. Semaine thérapeutique 39:494–496.

Landgraf R, Neumann ID (2004) Vasopressin and oxytocin release within the brain: a dynamic concept of multiple and variable modes of neuropeptide communication. Frontiers in neuroendocrinology 25:150–176.

Lang PJ, Davis M, Ohman A (2000) Fear and anxiety: animal models and human cognitive psychophysiology. Journal of affective disorders 61:137–159.

Lanuza E, Moncho-Bogani J, Ledoux JE (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 155:959–968.

Le Merrer J, Becker JAJ, Befort K, Kieffer BL (2009) Reward processing by the opioid system in the brain. Physiological reviews 89:1379–1412.

LeDoux J (2003) The emotional brain, fear, and the amygdala. Cellular and molecular neurobiology 23:727–738.

LeDoux JE (1996) The Emotional Brain. New York: Simon and Schuster.

LeDoux JE (2000) Emotion circuits in the brain. Annual review of neuroscience 23:155–184.

LeDoux JE, Farb C, Ruggiero DA (1990) Topographic organization of neurons in the acoustic thalamus that project to the amygdala. The Journal of neuroscience 10:1043–1054.

LeDoux JE, Farb CR, Romanski LM (1991) Overlapping projections to the amygdala and striatum from auditory processing areas of the thalamus and cortex. Neuroscience letters 134:139–144.

LeDoux JE, Iwata J, Cicchetti P, Reis DJ (1988) Different projections of the central amygdaloid nucleus mediate autonomic and behavioral correlates of conditioned fear. The Journal of neuroscience 8:2517–2529.

Li Q, Luo T, Jiang X, Wang J (2012) Anxiolytic effects of 5-HT1A receptors and anxiogenic effects of 5-HT1C receptors in the amygdala of mice. Neuropharmacology 62:474–484.

Li XF, Phillips R, LeDoux JE (1995) NMDA and non-NMDA receptors contribute to synaptic transmission between the medial geniculate body and the lateral nucleus of the amygdala. Experimental brain research Experimentelle Hirnforschung Expérimentation cérébrale 105:87–100.

Liske E, Forster FM (1963) Clinical study of a new benzodiazepine as an anticonvulsant agent. The Journal of new drugs 41:241–244.

Lisman J (2012) Excitation, inhibition, local oscillations, or large-scale loops: what causes the symptoms of schizophrenia? Current opinion in neurobiology 22:537–544.

Lu B, Wang KH, Nose A (2009) Molecular mechanisms underlying neural circuit formation. Current opinion in neurobiology 19:162–167.

Luis-Delgado OE, Barrot M, Rodeau J-L, Schott G, Benbouzid M, Poisbeau P, Freund-Mercier M-J, Lasbennes F (2006) Calibrated forceps: a sensitive and reliable tool for pain and analgesia studies. The journal of pain 7:32–39.

Luskin MB, Price JL (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 216:264–291.

Macdonald RL, Olsen RW (1994) GABAA receptor channels. Annual review of neuroscience 17:569–602.

Mahanty NK, Sah P (1999) Excitatory synaptic inputs to pyramidal neurons of the lateral amygdala. The European journal of neuroscience 11:1217–1222.

Maren S (1999) Long-term potentiation in the amygdala: a mechanism for emotional learning and memory. Trends in neurosciences 22:561–567.

Maren S (2001) Neurobiology of Pavlovian fear conditioning. Annual review of neuroscience 24:897–931.

Maren S, Quirk GJ (2004) Neuronal signalling of fear memory. Nature reviews Neuroscience 5:844–852.

Marowsky A, Fritschy J-M, Vogt KE (2004) Functional mapping of GABA A receptor subtypes in the amygdala. The European journal of neuroscience 20:1281–1289.

Martina M, Royer S, Paré D (1999) Physiological properties of central medial and central lateral amygdala neurons. Journal of neurophysiology 82:1843–1854.

Mascagni F, McDonald AJ (2003) Immunohistochemical characterization of cholecystokinin containing neurons in the rat basolateral amygdala. Brain research 976:171–184.

Mascagni F, McDonald AJ, Coleman JR (1993) Corticoamygdaloid and corticocortical projections of the rat temporal cortex: a Phaseolus vulgaris leucoagglutinin study. Neuroscience 57:697–715.

Mason P (1999) Central mechanisms of pain modulation. Current opinion in neurobiology 9:436–441.

Mayer ML, Westbrook GL, Guthrie PB (1984) Voltage-dependent block by Mg2+ of NMDA responses in spinal cord neurones. Nature 309:261–263.

McDonald AJ (1982a) Neurons of the lateral and basolateral amygdaloid nuclei: a Golgi study in the rat. The Journal of comparative neurology 212:293–312.

McDonald AJ (1982b) Cytoarchitecture of the central amygdaloid nucleus of the rat. The Journal of comparative neurology 208:401–418.

McDonald AJ (1984) Neuronal organization of the lateral and basolateral amygdaloid nuclei in the rat. The Journal of comparative neurology 222:589–606.

McDonald AJ (1991) Topographical organization of amygdaloid projections to the caudatoputamen, nucleus accumbens, and related striatal-like areas of the rat brain. Neuroscience 44:15–33.

McDonald AJ (1992) Projection neurons of the basolateral amygdala: a correlative Golgi and retrograde tract tracing study. Brain research bulletin 28:179–185.

McDonald AJ (1998) Cortical pathways to the mammalian amygdala. Progress in neurobiology 55:257–332.

McDonald AJ, Betette RL (2001) Parvalbumin-containing neurons in the rat basolateral amygdala: morphology and co-localization of Calbindin-D(28k). Neuroscience 102:413–425.

McDonald AJ, Mascagni F (1997) Projections of the lateral entorhinal cortex to the amygdala: a Phaseolus vulgaris leucoagglutinin study in the rat. Neuroscience 77:445–459.

McDonald AJ, Mascagni F (2001) Colocalization of calcium-binding proteins and GABA in neurons of the rat basolateral amygdala. Neuroscience 105:681–693.

McDonald AJ, Mascagni F (2002) Immunohistochemical characterization of somatostatin containing interneurons in the rat basolateral amygdala. Brain research 943:237–244.

Mcdonald AJ, Mascagni F, Guo L (1996) Projections of the medial and lateral prefrontal cortices to the amygdala: a Phaseolus vulgaris leucoagglutinin study in the rat. Neuroscience 71:55–75.

McDonald AJ, Shammah-Lagnado SJ, Shi C, Davis M (1999) Cortical afferents to the extended amygdala. Annals of the New York Academy of Sciences 877:309–338.

McKernan MG, Shinnick-Gallagher P (1997) Fear conditioning induces a lasting potentiation of synaptic currents in vitro. Nature 390:607–611.

Mellon SH, Griffin LD, Compagnone NA (2001) Biosynthesis and action of neurosteroids. Brain research Brain research reviews 37:3–12.

Melzack R, Casey K (1968) Sensory, motivational and central control determinants of pain: a new conceptual model. In: The skin senses (Kenshalo D, ed), pp 423–443. Springfield, IL: Charles C Thomas.

Meyer L, Venard C, Schaeffer V, Patte-Mensah C, Mensah-Nyagan AG (2008) The biological activity of 3alpha-hydroxysteroid oxido-reductase in the spinal cord regulates thermal and mechanical pain thresholds after sciatic nerve injury. Neurobiology of disease 30:30–41.

Meynert T (1867) Der Bau der Großhirnrinde und seine örtliche Verschiedenheiten nebst einem pathologisch-anatomischen Korollarium. Vjschr Psychiat 1:77–93, 126–170, 198–217.

Micallef J, Soubrouillard C, Guet F, Le Guern ME, Alquier C, Bruguerolle B, Blin O (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 15:209–216.

Millan MJ (1999) The induction of pain: an integrative review. Progress in neurobiology 57:1–164.

Millan MJ (2002) Descending control of pain. Progress in neurobiology 66:355–474.

Miller TR, Wetter JB, Jarvis MF, Bitner RS (2012) Spinal microglial activation in rat models of neuropathic and osteoarthritic pain: An autoradiographic study using [(3) H]PK11195. European journal of pain.

Millhouse OE, DeOlmos J (1983) Neuronal configurations in lateral and basolateral amygdala. Neuroscience 10:1269–1300.

Milner B, Squire LR, Kandel ER (1998) Cognitive neuroscience and the study of memory. Neuron 20:445–468.

Moga MM, Herbert H, Hurley KM, Yasui Y, Gray TS, Saper CB (1990) Organization of cortical, basal forebrain, and hypothalamic afferents to the parabrachial nucleus in the rat. The Journal of comparative neurology 295:624–661.

Mogil JS, Marek P, Flodman P, Spence MA, Sternberg WF, Kest B, Sadowski B, Liebeskind JC (1995) One or two genetic loci mediate high opiate analgesia in selectively bred mice. Pain 60:125–135.

Morris JS, Friston KJ, Büchel C, Frith CD, Young AW, Calder AJ, Dolan RJ (1998) A neuromodulatory role for the human amygdala in processing emotional facial expressions. Brain : a journal of neurology 121 (Pt 1:47–57.

Morris JS, Frith CD, Perrett DI, Rowland D, Young AW, Calder AJ, Dolan RJ (1996) A differential neural response in the human amygdala to fearful and happy facial expressions. Nature 383:812–815.

Mosconi T, Kruger L (1996) Fixed-diameter polyethylene cuffs applied to the rat sciatic nerve induce a painful neuropathy: ultrastructural morphometric analysis of axonal alterations. Pain 64:37–57.

Möhler H (2006) GABA(A) receptor diversity and pharmacology. Cell and tissue research 326:505–516.

Nakashima M, Uemura M, Yasui K, Ozaki HS, Tabata S, Taen A (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 36:297–309.

Naylor JC, Li Q, Kang-Park M, Wilson W a, Kuhn C, Moore SD (2010) Dopamine attenuates evoked inhibitory synaptic currents in central amygdala neurons. The European journal of neuroscience 32:1836–1842.

Neugebauer V, Li W, Bird GC, Bhave G, Gereau RW (2003) Synaptic plasticity in the amygdala in a model of arthritic pain: differential roles of metabotropic glutamate receptors 1 and 5. The Journal of neuroscience 23:52–63.

Neugebauer V, Zinebi F, Russell R, Gallagher JP, Shinnick-Gallagher P (2000) Cocaine and kindling alter the sensitivity of group II and III metabotropic glutamate receptors in the central amygdala. Journal of neurophysiology 84:759–770.

Nitecka L, Ben-Ari Y (1987) Distribution of GABA-like immunoreactivity in the rat amygdaloid complex. The Journal of comparative neurology 266:45–55.

Nowak L, Bregestovski P, Ascher P, Herbet A, Prochiantz A (1984) Magnesium gates glutamate-activated channels in mouse central neurones. Nature 307:462–465.

Odeh F, Antal M (2001) The projections of the midbrain periaqueductal grey to the pons and medulla oblongata in rats. The European journal of neuroscience 14:1275–1286.

Olsen RW, Tobin AJ (1990) Molecular biology of GABAA receptors. FASEB journal 4:1469–1480.

Papadopoulos V, Berkovich A, Krueger KE (1991) The role of diazepam binding inhibitor and its processing products at mitochondrial benzodiazepine receptors: regulation of steroid biosynthesis. Neuropharmacology 30:1417–1423.

Pathirathna S, Todorovic SM, Covey DF, Jevtovic-Todorovic V (2005) 5alpha-reduced neuroactive steroids alleviate thermal and mechanical hyperalgesia in rats with neuropathic pain. Pain 117:326–339.

Paxinos G, Watson C (2001) The Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates, Second edi. Academic Press, Sydney.

Pedersen LH, Scheel-Krüger J, Blackburn-Munro G (2007) Amygdala GABA-A receptor involvement in mediating sensory-discriminative and affective-motivational pain responses in a rat model of peripheral nerve injury. Pain 127:17–26.

Petrou M, Pop-Busui R, Foerster BR, Edden RA, Callaghan BC, Harte SE, Harris RE, Clauw DJ, Feldman EL (2012) Altered excitation-inhibition balance in the brain of patients with diabetic neuropathy. Academic radiology 19:607–612.

Petrovich GD, Canteras NS, Swanson LW (2001) Combinatorial amygdalar inputs to hippocampal domains and hypothalamic behavior systems. Brain research Brain research reviews 38:247–289.

Pitkänen A (2000) Connectivity of the rat amygdaloid complex. In: The Amygdala: A Functional Analysis (Aggleton J, ed), pp 31–115. Oxford, UK: Oxford University Press.

Pitkänen A, Amaral DG (1998) Organization of the intrinsic connections of the monkey amygdaloid complex: projections originating in the lateral nucleus. The Journal of comparative neurology 398:431–458.

Pitkänen A, Savander V, LeDoux JE (1997) Organization of intra-amygdaloid circuitries in the rat: an emerging framework for understanding functions of the amygdala. Trends in neurosciences 20:517–523.

Pitkänen A, Stefanacci L, Farb CR, Go GG, LeDoux JE, Amaral DG (1995) Intrinsic connections of the rat amygdaloid complex: projections originating in the lateral nucleus. The Journal of comparative neurology 356:288–310.

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

Poisbeau P, Patte-Mensah C, Keller AF, Barrot M, Breton J-D, Luis-Delgado OE, Freund-Mercier MJ, Mensah-Nyagan AG, Schlichter R (2005) Inflammatory pain upregulates spinal inhibition via endogenous neurosteroid production. The Journal of neuroscience 25:11768–11776.

Porreca F, Burgess SE, Gardell LR, Vanderah TW, Malan TP, Ossipov MH, Lappi DA, Lai J (2001) Inhibition of neuropathic pain by selective ablation of brainstem medullary cells expressing the mu-opioid receptor. The Journal of neuroscience 21:5281–5288.

Porro CA, Carli G (1988) Immobilization and restraint effects on pain reactions in animals. Pain 32:289–307.

Price JL, Russchen F, Amaral D (1987) The Limbic Region. II: The Amygdaloid Complex. In: Handbook of Chemical Neuroanatomy (Hökfelt T, Björklund A, Swanson LW, eds), pp 279–388. Amsterdam: Elsevier.

Pritchett DB, Sontheimer H, Shivers BD, Ymer S, Kettenmann H, Schofield PR, Seeburg PH (1989) Importance of a novel GABAA receptor subunit for benzodiazepine pharmacology. Nature 338:582–585.

Puelles L (2001) Thoughts on the development, structure and evolution of the mammalian and avian telencephalic pallium. Philosophical transactions of the Royal Society of London Series B, Biological sciences 356:1583–1598.

Quirk GJ, Armony JL, LeDoux JE (1997) Fear conditioning enhances different temporal components of tone-evoked spike trains in auditory cortex and lateral amygdala. Neuron 19:613–624.

Rainnie DG, Asprodini EK, Shinnick-Gallagher P (1991) Inhibitory transmission in the basolateral amygdala. Journal of neurophysiology 66:999–1009.

Rainnie DG, Holmes KH, Shinnick-Gallagher P (1994) Activation of postsynaptic metabotropic glutamate receptors by trans-ACPD hyperpolarizes neurons of the basolateral amygdala. The Journal of neuroscience 14:7208–7220.

Rainnie DG, Shinnick-Gallagher P (1992) Trans-ACPD and L-APB presynaptically inhibit excitatory glutamatergic transmission in the basolateral amygdala (BLA). Neuroscience letters 139:87–91.

Rexed B (1952) The cytoarchitectonic organization of the spinal cord in the cat. The Journal of comparative neurology 96:414–495.

Rivat C, Becker C, Blugeot A, Zeau B, Mauborgne A, Pohl M, Benoliel J-J (2010) Chronic stress induces transient spinal neuroinflammation, triggering sensory hypersensitivity and long-lasting anxiety-induced hyperalgesia. Pain 150:358–368.

Rizvi TA, Ennis M, Behbehani MM, Shipley MT (1991) Connections between the central nucleus of the amygdala and the midbrain periaqueductal gray: topography and reciprocity. The Journal of comparative neurology 303:121–131.

Roberts GW, Woodhams PL, Polak JM, Crow TJ (1982) Distribution of neuropeptides in the limbic system of the rat: the amygdaloid complex. Neuroscience 7:99–131.

Rodrigues SM, Schafe GE, LeDoux JE (2001) Intra-amygdala blockade of the NR2B subunit of the NMDA receptor disrupts the acquisition but not the expression of fear conditioning. The Journal of neuroscience 21:6889–6896.

Rogan MT, Stäubli U V, LeDoux JE (1997) Fear conditioning induces associative long-term potentiation in the amygdala. Nature 390:604–607.

Roozendaal B, Schoorlemmer GH, Koolhaas JM, Bohus B (1993) Cardiac, neuroendocrine, and behavioral effects of central amygdaloid vasopressinergic and oxytocinergic mechanisms under stress-free conditions in rats. Brain research bulletin 32:573–579.

Rowbotham MC, Twilling L, Davies PS, Reisner L, Taylor K, Mohr D (2003) Oral opioid therapy for chronic peripheral and central neuropathic pain. The New England journal of medicine 348:1223–1232.

Royer S, Martina M, Paré D (1999) An inhibitory interface gates impulse traffic between the input and output stations of the amygdala. The Journal of neuroscience 19:10575–10583.

Rupprecht R, Holsboer F (1999) Neuroactive steroids: mechanisms of action and neuropsychopharmacological perspectives. Trends in neurosciences 22:410–416.

Rush CR (1998) Behavioral pharmacology of zolpidem relative to benzodiazepines: a review. Pharmacology, biochemistry, and behavior 61:253–269.

Sah P, Faber ESL, Lopez De Armentia M, Power J (2003) The amygdaloid complex: anatomy and physiology. Physiological reviews 83:803–834.

Sah P, Lopez De Armentia M (2003) Excitatory synaptic transmission in the lateral and central amygdala. Annals of the New York Academy of Sciences 985:67–77.

Saha S, Batten TF, Henderson Z (2000) A GABAergic projection from the central nucleus of the amygdala to the nucleus of the solitary tract: a combined anterograde tracing and electron microscopic immunohistochemical study. Neuroscience 99:613–626.

Sajdyk TJ, Schober DA, Gehlert DR (2002) Neuropeptide Y receptor subtypes in the basolateral nucleus of the amygdala modulate anxiogenic responses in rats. Neuropharmacology 43:1165–1172.

Sanders SK, Shekhar A (1995) Regulation of anxiety by GABAA receptors in the rat amygdala. Pharmacology, biochemistry, and behavior 52:701–706.

Savander V, Go CG, LeDoux JE, Pitkänen A (1995) Intrinsic connections of the rat amygdaloid complex: projections originating in the basal nucleus. The Journal of comparative neurology 361:345–368.

Savander V, Miettinen R, Ledoux JE, Pitkänen A (1997) Lateral nucleus of the rat amygdala is reciprocally connected with basal and accessory basal nuclei: a light and electron microscopic study. Neuroscience 77:767–781.

Sawchenko PE, Swanson LW (1982) Immunohistochemical identification of neurons in the paraventricular nucleus of the hypothalamus that project to the medulla or to the spinal cord in the rat. The Journal of comparative neurology 205:260–272.

Scalia F, Winans SS (1975) The differential projections of the olfactory bulb and accessory olfactory bulb in mammals. The Journal of comparative neurology 161:31–55.

Schiess MC, Callahan PM, Zheng H (1999) Characterization of the electrophysiological and morphological properties of rat central amygdala neurons in vitro. Journal of neuroscience research 58:663–673.

Schlichter R, Rybalchenko V, Poisbeau P, Verleye M, Gillardin J (2000) Modulation of GABAergic synaptic transmission by the non-benzodiazepine anxiolytic etifoxine. Neuropharmacology 39:1523–1535.

Scholz J, Woolf CJ (2002) Can we conquer pain? Nature neuroscience 5 Suppl:1062–1067.

Sherrington C (1906) The integrative action of the nervous system. Oxford: Oxford University Press.

Shi C, Davis M (2001) Visual pathways involved in fear conditioning measured with fear-potentiated startle: behavioral and anatomic studies. The Journal of neuroscience 21:9844–9855.

Shi CJ, Cassell MD (1998) Cortical, thalamic, and amygdaloid connections of the anterior and posterior insular cortices. The Journal of comparative neurology 399:440–468.

Shimada S, Cutting G, Uhl GR (1992) gamma-Aminobutyric acid A or C receptor? gamma-Aminobutyric acid rho 1 receptor RNA induces bicuculline-, barbiturate-, and benzodiazepine-insensitive gamma-aminobutyric acid responses in Xenopus oocytes. Molecular pharmacology 41:683–687.

Sieghart W (1995) Structure and pharmacology of gamma-aminobutyric acidA receptor subtypes. Pharmacological reviews 47:181–234.

Sieghart W, Sperk G (2002) Subunit composition, distribution and function of GABA(A) receptor subtypes. Current topics in medicinal chemistry 2:795–816.

Sigel E, Buhr A (1997) The benzodiazepine binding site of GABA A receptors. Trends in Pharmacological Sciences 18:425–429.

Sindrup SH, Bach FW, Madsen C, Gram LF, Jensen TS (2003) Venlafaxine versus imipramine in painful polyneuropathy: a randomized, controlled trial. Neurology 60:1284–1289.

Soltis RP, Cook JC, Gregg AE, Sanders BJ (1997) Interaction of GABA and excitatory amino acids in the basolateral amygdala: role in cardiovascular regulation. The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience 17:9367–9374.

Spampanato J, Polepalli J, Sah P (2011) Interneurons in the basolateral amygdala. Neuropharmacology 60:765–773.

Stanley BG, Urstadt KR, Charles JR, Kee T (2011) Glutamate and GABA in lateral hypothalamic mechanisms controlling food intake. Physiology & behavior 104:40–46.

Stein C, Davidowa H, Albrecht D (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, NY) 38:328–337.

Stief F, Zuschratter W, Hartmann K, Schmitz D, Draguhn A (2007) Enhanced synaptic excitation-inhibition ratio in hippocampal interneurons of rats with temporal lobe epilepsy. The European journal of neuroscience 25:519–528.

Stoehr JD, Cramer CP, North WG (1992) Oxytocin and vasopressin hexapeptide fragments have opposing influences on conditioned freezing behavior. Psychoneuroendocrinology 17:267–271.

Stoop R (2012) Neuromodulation by oxytocin and vasopressin. Neuron 76:142–159.

Swanson LW, Petrovitch G (1998) What is the amygdala ? Trends in Neurosciences 21:323–331.

Tasmuth T, Härtel B, Kalso E (2002) Venlafaxine in neuropathic pain following treatment of breast cancer. European journal of pain 6:17–24.

Tomaz C, Dickinson-Anson H, McGaugh JL, Souza-Silva MA, Viana MB, Graeff FG (1993) Localization in the amygdala of the amnestic action of diazepam on emotional memory. Behavioural brain research 58:99–105.

Towler ML (1962) The clinical use of diazepam in anxiety states and depressions. Journal of neuropsychiatry 3(Suppl 1):S 68–72.

Treviño M, Vivar C, Gutiérrez R (2011) Excitation-inhibition balance in the CA3 network--neuronal specificity and activity-dependent plasticity. The European journal of neuroscience 33:1771–1785.

Tsou K, Brown S, Sañudo-Peña MC, Mackie K, Walker JM (1998) Immunohistochemical distribution of cannabinoid CB1 receptors in the rat central nervous system. Neuroscience 83:393–411.

Tsvetkov E, Carlezon WA, Benes FM, Kandel ER, Bolshakov VY (2002) Fear conditioning occludes LTP-induced presynaptic enhancement of synaptic transmission in the cortical pathway to the lateral amygdala. Neuron 34:289–300.

Van der Kooy D, Koda LY, McGinty JF, Gerfen CR, Bloom FE (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 224:1–24.

Veinante P (2009) Complexe amygdalien, douleurs et analgésie. Douleurs : Evaluation - Diagnostic - Traitement 10:292–302.

Verleye M, Akwa Y, Liere P, Ladurelle N, Pianos A, Eychenne B, Schumacher M, Gillardin J-M (2005) The anxiolytic etifoxine activates the peripheral benzodiazepine receptor and increases the neurosteroid levels in rat brain. Pharmacology, biochemistry, and behavior 82:712–720.

Verleye M, Pansart Y, Gillardin J (2002) Effects of etifoxine on ligand binding to GABA(A) receptors in rodents. Neuroscience research 44:167–172.

Wafford K a., Bain CJ, Quirk K, McKernan RM, Wingrove PB, Whiting PJ, Kemp J a. (1994) A novel allosteric modulatory site on the GABAA receptor β subunit. Neuron 12:775–782.

Washburn MS, Moises HC (1992) Inhibitory responses of rat basolateral amygdaloid neurons recorded in vitro. Neuroscience 50:811–830.

Weiskrantz L (1956) Behavioral changes associated with ablation of the amygdaloid complex in monkeys. Journal of comparative and physiological psychology 49:381–391.

Weisskopf MG, Bauer EP, LeDoux JE (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 19:10512–10519.

Weisskopf MG, LeDoux JE (1999) Distinct populations of NMDA receptors at subcortical and cortical inputs to principal cells of the lateral amygdala. Journal of neurophysiology 81:930–934.

Whalen PJ, Shin LM, McInerney SC, Fischer H, Wright CI, Rauch SL (2001) A functional MRI study of human amygdala responses to facial expressions of fear versus anger. Emotion (Washington, DC) 1:70–83.

Whiting PJ, McKernan RM, Wafford KA (1995) Structure and pharmacology of vertebrate GABAA receptor subtypes. International review of neurobiology 38:95–138.

Wisden W, Gundlach AL, Barnard EA, Seeburg PH, Hunt SP (1991) Distribution of GABAA receptor subunit mRNAs in rat lumbar spinal cord. Brain research Molecular brain research 10:179–183.

Wolfe GI, Trivedi JR (2004) Painful peripheral neuropathy and its nonsurgical treatment. Muscle & nerve 30:3–19.

Woodruff AR, Monyer H, Sah P (2006) GABAergic excitation in the basolateral amygdala. The Journal of neuroscience 26:11881–11887.

Woolf CJ, Salter MW (2000) Neuronal plasticity: increasing the gain in pain. Science 288:1765–1769.

Woolfe G, MacDonald A (1944) The evaluation of the analgesic action of pethidine hydrochloride. Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics 80:300–307.

Yalcin I, Bohren Y, Waltisperger E, Sage-Ciocca D, Yin JC, Freund-Mercier M-J, Barrot M (2011) A time-dependent history of mood disorders in a murine model of neuropathic pain. Biological psychiatry 70:946–953.

Yizhar O, Fenno LE, Prigge M, Schneider F, Davidson TJ, O'Shea DJ, Sohal VS, Goshen I, Finkelstein J, Paz JT, Stehfest K, Fudim R, Ramakrishnan C, Huguenard JR, Hegemann P, Deisseroth K (2011) Neocortical excitation/inhibition balance in information processing and social dysfunction. Nature 477:171–178.

Zhang Z, Sun Q-Q (2011) The balance between excitation and inhibition and functional sensory processing in the somatosensory cortex. International review of neurobiology 97:305–333.

Zhao Z, Yang Y, Walker DL, Davis M (2009) Effects of substance P in the amygdala, ventromedial hypothalamus, and periaqueductal gray on fear-potentiated startle. Neuropsychopharmacology 34:331–340.

Résumé

L'amygdale est une structure du système nerveux central impliquée dans l'intégration des émotions comme la peur et l'anxiété. Des études ont également montré que l'amygdale peut moduler de façon positive ou négative la douleur par le biais des projections de son noyau de sortie, le noyau central de l'amygdale (CeA), sur les structures impliquées dans les contrôles nociceptifs descendants. Le complexe basolatéral de l'amygdale (BLA), placé en amont du noyau central, est intimement connecté à ce dernier et peut ainsi réguler son fonctionnement.

Les données obtenues au cours de ma thèse ont montré l'existence d'un contrôle tonique amygdalien de la nociception et de la douleur. A l'aide d'expériences *in vivo* d'injections dans le BLA de souris saines ou neuropathiques, et de mesure de leurs effets sur la sensibilité mécanique des animaux, nous avons pu analyser le fonctionnement de ce contrôle. Ainsi le blocage de l'inhibition dans le BLA conduit à un effet pro-nociceptif. Le blocage de l'excitation induit, quant à lui, un effet analgésique temporaire chez les animaux neuropathiques, et cette même action est observée après la potentialisation de l'inhibition dans la structure. Ces résultats indiquent que le contrôle de la douleur effectué par le BLA est dépendant de l'équilibre entre l'excitation et l'inhibition au sein de la structure.

Par ailleurs, nous nous sommes également intéressés à l'étude précise du mode d'action d'une molécule anxiolytique non benzodiazépinique, l'étifoxine (EFX), et à son effet sur le comportement douloureux. Des travaux précédents au laboratoire avaient déjà montré le potentiel analgésique de cette molécule, lorsqu'elle est injectée par voie intrapéritonéale dans un modèle de douleur neuropathique chimio-induite. Les résultats des injections d'EFX dans le BLA indiquent qu'elle induit une action analgésique chez les animaux neuropathiques, mais ne modifie pas les seuils de sensibilité des animaux sains. Cette action analgésique est dépendante de l'effet indirect neurostéroïdogène de l'EFX. Ceci, associé au fait que l'EFX ne présente pas ou peu d'effets secondaires, en fait une molécule particulièrement intéressante pour un traitement alternatif des douleurs neuropathiques. Dans une dernière partie, nous avons cherché à observer les mécanismes en jeu au niveau cellulaire lorsque l'EFX est appliquée sur les neurones du BLA. Pour cela, nous avons utilisé l'approche électrophysiologique du patch-clamp. Ainsi, nous avons montré que l'EFX potentialise l'inhibition au sein de la structure, *via* trois mécanismes indépendants ; l'augmentation de la fréquence des courants post-synaptiques inhibiteurs miniatures (mCPSIs), l'augmentation de leur amplitude, et l'augmentation de leur constante de déactivation. Ces deux derniers effets sont dépendants de l'action neurostéroïdogène de l'EFX, tandis que l'effet sur la fréquence des mCPSIs est du à l'action de l'EFX sur le récepteur $GABA_A$.

Les résultats de ma thèse ont ainsi permis de montrer l'existence d'un contrôle tonique amygdalien de la douleur, dans le cadre d'animaux neuropathiques, mais également de la nociception, chez des animaux sains. Par ailleurs, la place du complexe basolatéral de l'amygdale, souvent peu prise en compte dans les études sur la douleur, a été redéfinie. Ce complexe doit être pris en considération dans le circuit de la douleur et son rôle de pilote du noyau central de l'amygdale ne doit pas être négligé.