

Neurostéroïdes : effets trophiques dans le système nerveux

Michael Schumacher, Françoise Robert & Etienne-Emile Baulieu

U488 INSERM, 80, rue du Général Leclerc, 94276 Le Kremlin-Bicêtre Cedex, France.

Tél. : 01 49 59 18 83. Fax : 01 45 21 19 40. e-mail: schuma@kb.inserm.fr

Reçu le 16 juillet 1999

RÉSUMÉ

Certains stéroïdes, appelés « neurostéroïdes », peuvent être synthétisés à partir du cholestérol dans le système nerveux central et périphérique. Ainsi, la prégnénolone et la progestérone restent présentes dans le cerveau et dans les nerfs bien après l'ablation des glandes endocrines stéroïdogènes. On connaît encore mal le rôle des neurostéroïdes dans la maturation du système nerveux, bien qu'ils soient déjà synthétisés par les cellules gliales et par certaines populations de neurones durant la vie embryonnaire.

Les neurostéroïdes pourraient influencer la survie et la différenciation tant des neurones que des cellules gliales selon des expériences réalisées *in vitro*. Dans le système nerveux de l'adulte, les neurostéroïdes jouent un rôle important au cours de la régénération. Ainsi, la progestérone est synthétisée par les cellules de Schwann dans les nerfs périphériques, où elle favorise la formation de nouvelles gaines de myéline après lésion. Il s'agit de la première démonstration d'une fonction vitale d'un neurostéroïde.

SUMMARY Neurosteroids: trophic effects in the nervous system

Some steroids, named "neurosteroids", can be synthesized from cholesterol within both the central and peripheral nervous systems. Thus, pregnenolone and progesterone persist in the brain and in peripheral nerves long after removal of the steroidogenic endocrine glands by castration and adrenalectomy. The role of neurosteroids during the development of the nervous system is not well known, although they are synthesized by glial cells and some populations of neurons already during embryonic life. Cell culture

experiments suggest that neurosteroids may influence the survival and differentiation of neurons and glial cells. In the adult nervous system, neurosteroids play an important role during regeneration. Progesterone is indeed synthesized by Schwann cells in peripheral nerves, where it plays an important role in the formation of new myelin sheaths after lesion. This is the first demonstration of a vital role for a neurosteroid in the nervous system.

INTRODUCTION

Les neurostéroïdes peuvent être synthétisés à partir du cholestérol dans le système nerveux (Baulieu, 1991; Robel & Baulieu, 1994). Les enzymes impliquées dans la synthèse des neurostéroïdes ont été détectées dans le cerveau et dans les nerfs périphériques par réaction de polymérisation en chaîne (RT-PCR), hybridation *in situ* et par immunocytochimie. En outre, les cellules gliales et certains neurones en culture peuvent les synthétiser à partir de leurs précurseurs radioactifs.

Ces observations posent la question de la signification biologique d'une synthèse locale de stéroïdes dans les tissus nerveux. A première vue, il n'y a aucune raison

que des stéroïdes, qui sont produits par les glandes endocrines, gonades et glandes surrénales, soient également synthétisés localement dans le cerveau, alors qu'ils traversent facilement la barrière hémato-encéphalique. Cependant, des travaux de plus en plus nombreux montrent que les fonctions des stéroïdes ne se limitent pas à la reproduction, mais qu'ils régulent de nombreuses fonctions nerveuses et gliales vitales dans le système nerveux (Bock & Goode, 1995). Il est ainsi concevable qu'une synthèse locale de neurostéroïdes dans le cerveau et dans les nerfs, indépendante des fluctuations des hormones sexuelles circulantes, soit nécessaire pour le bon fonctionnement du système nerveux. Par ailleurs, les neurostéroïdes pourraient agir rapidement par des

mécanismes paracrines/autocrines dans des régions du système nerveux qui sont difficilement accessibles aux hormones circulantes.

Certains neurostéroïdes, tels que le sulfate de prégénolone (PREG S) et la $3\alpha,5\alpha$ -tétrahydroprogestérone ($3\alpha,5\alpha$ -TH PROG), sont considérés comme « neuroactifs », ce qui signifie qu'ils modifient l'excitabilité neuronale en modulant les récepteurs membranaires de neurotransmetteurs (Paul & Purdy, 1992). Ceci a été montré par de nombreuses études pharmacologiques et électrophysiologiques. D'autre part, lorsqu'on les ajoute dans le milieu de culture, certains neurostéroïdes influent sur la survie et la différenciation des neurones et des cellules gliales (Bologna *et al.*, 1987; Del Cerro *et al.*, 1995). Mais la signification biologique de la synthèse locale de neurostéroïdes reste à établir *in vivo*. Un rôle physiologique pour les neurostéroïdes n'a été montré que dans deux cas : 1) la progestérone (PROG) synthétisée par les cellules de Schwann favorise la formation de nouvelles gaines de myéline dans les nerfs (Koenig *et al.*, 1995) et 2) le PREG S présent dans l'hippocampe a des effets pronésants (Vallée *et al.*, 1997). Les effets des neurostéroïdes sur les processus mnésiques sont résumés dans l'article d'Y. Akwa *et al.* dans ce volume. Dans la présente revue, nous nous limiterons à décrire la biosynthèse de la PREG, de la PROG et de ses métabolites dans les tissus nerveux et nous résumerons leurs effets trophiques sur les cellules gliales et nerveuses, en insistant sur leur rôle dans la myélinisation des axones.

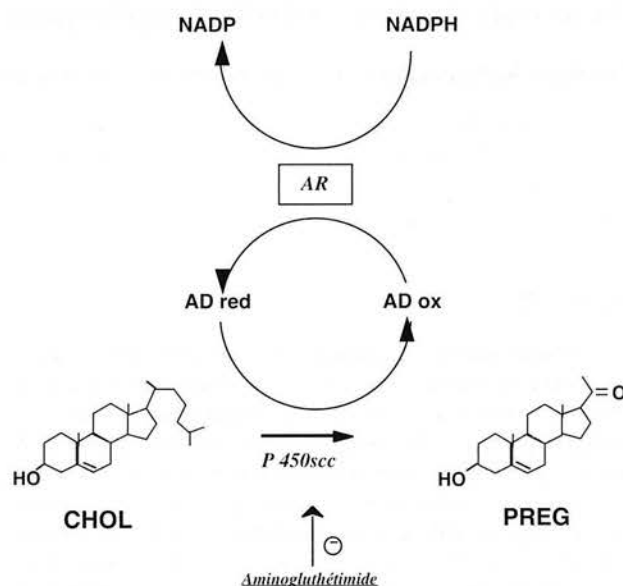
SYNTHÈSE DES NEUROSTÉROÏDES DANS LE SYSTÈME NERVEUX

Le terme « neurostéroïdes » s'applique aux stéroïdes qui peuvent être synthétisés *de novo* à partir du cholestérol dans le système nerveux (Baulieu, 1991). Cela implique que toutes les enzymes requises pour leur synthèse soient présentes, bien qu'un neurostéroïde mis en évidence dans le système nerveux puisse également provenir du métabolisme d'un précurseur issu de la circulation. En fait, les gonades, les glandes surrénales et les cellules stéroïdogènes du système nerveux contribuent toutes à l'ensemble des stéroïdes présents dans le cerveau et dans les nerfs périphériques.

Biosynthèse de la prégénolone

La première étape dans la biosynthèse des stéroïdes correspond à la formation de la PREG à partir du cholestérol. Cette réaction, qui caractérise toutes les cellules produisant des stéroïdes, se déroule à l'intérieur de la mitochondrie et implique trois protéines distinctes. Des équivalents de réductions sont transférés du NADPH à l'adrénodoxine (AD) par l'intermédiaire d'une flavoprotéine, l'adrénodoxine réductase (AR). L'adrénodoxine transfère alors les électrons au cytochrome P450scc (scc pour « side chain cleavage »), enzyme située au niveau de la membrane interne de la mitochondrie, qui coupe la

chaîne latérale de 6 carbones du cholestérol. La PREG produite quitte la mitochondrie pour le réticulum endoplasmique, où elle subit des transformations variables selon les organes.



Une première indication que la PREG puisse être synthétisée dans le système nerveux découlait de l'observation de la présence de ce stéroïde dans le cerveau à une concentration nettement supérieure à celle du sang (Corpécho *et al.*, 1983, 1993). L'hypothèse d'une accumulation cérébrale de PREG a été réfutée, car elle persiste dans le cerveau des jours après ablation des glandes surrénales et des gonades.

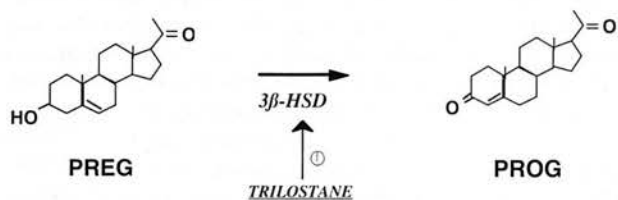
La capacité du cerveau de synthétiser la PREG à partir du cholestérol a ensuite été démontrée par différentes approches méthodologiques. Le cytochrome P450scc a été mis en évidence par immunocytochimie, particulièrement au niveau de la substance blanche (Le Goascogne *et al.*, 1987). En incubant des cellules gliales isolées à partir de cerveaux de rats nouveau-nés avec du [³H]mévalonate (un précurseur du cholestérol qui pénètre facilement dans les cellules), on obtenait de la [³H]PREG (Jung-Testas *et al.*, 1989). Plus récemment, l'expression du P450scc a été mise en évidence dans les cellules gliales en culture, oligodendrocytes et astrocytes de type 1, et dans le cerveau par RT-PCR et par hybridation *in situ* (Mellon, 1994; Sanne & Krueger, 1995; Strömstedt & Waterman, 1995). En plus des cellules gliales, certains neurones expriment les messagers et la protéine du P450scc. Celui-ci a été mis en évidence par immunohistochimie dans une sous-population de neurones du cerveau (Le Goascogne *et al.*, 1987), dans la rétine de rat (Guarneri *et al.*, 1994) et dans des neurones sensoriels de l'embryon de souris (Compagnone *et al.*, 1995). De plus, des neurones du cortex cérébral du rat expriment en culture des niveaux d'ARNm du P450scc

comparables à ceux des cellules gliales (Sanne & Krueger, 1995).

La synthèse de la PREG n'est pas restreinte au système nerveux central. Ceci a été suggéré pour la première fois par la mise en évidence de quantités importantes de ce stéroïde dans le nerf sciatique humain (Morfin *et al.*, 1992). De plus, la concentration de PREG est environ dix fois plus élevée dans le nerf sciatique du rat mâle adulte que dans le plasma et elle n'est pas sensiblement diminuée cinq jours après ablation des glandes stéroïdogènes, ce qui suggère une synthèse locale indépendante des sources glandulaires (Akwa *et al.*, 1993a). Les cellules de Schwann, préparées à partir de nerfs sciatiques de rats nouveau-nés, sont une source de PREG. Incubées en présence du [3 H]-25-OH-cholestérol (un analogue du cholestérol qui traverse facilement la membrane plasmique), les cellules de Schwann produisent de la [3 H]PREG. Cette formation de PREG n'est observée que si les cellules de Schwann sont cultivées en présence d'insuline (à des concentrations micromolaires capables d'activer les récepteurs de l'IGF-I présents sur la membrane des cellules de Schwann) et de forskoline, un activateur de l'adénylate cyclase.

Biosynthèse de la progestérone

La PREG peut être convertie en PROG par l'enzyme 3 β -hydroxystéroïde déshydrogénase (3 β -HSD). Deux activités enzymatiques, la stéroïde 5/4-isomérase et la 3 β -hydroxystéroïde déshydrogénase/3-kétostéroïde réductase, sont situées sur des sites distincts de la protéine. Cette enzyme a été localisée dans le réticulum endoplasmique et la membrane mitochondriale. Différentes isoformes de la 3 β -HSD, exprimées sélectivement selon les tissus, ont été caractérisées chez la Souris, le Rat et l'Homme (Abbaszade *et al.*, 1995).



Après castration et surrénalectomie, la PROG disparaît complètement de la circulation, mais persiste dans le cerveau des rats (Corpéchet *et al.*, 1983, 1993). Lorsqu'on administre aux animaux du trilostane, un inhibiteur réversible de la 3 β -HSD, les taux de PROG dans le cerveau sont diminués de façon significative, tandis que la PREG s'accumule. Cette expérience démontre que la conversion de la PREG en PROG est une voie métabolique importante dans le cerveau (Young *et al.*, 1994). L'ARNm de la 3 β -HSD a été détecté par RT-PCR et par hybridation *in situ* dans le cerveau et dans la moelle épinière de rats adultes, et trois des quatre iso-

zymes connues ont pu être identifiées (type I, II et IV) (Guennoun *et al.*, 1995; Sanne et Krueger, 1995).

Des cultures mixtes de cellules gliales et des cultures d'astrocytes, préparées à partir de cerveaux de rats embryonnaires ou nouveau-nés, convertissent la [3 H]PREG en [3 H]PROG et ses métabolites réduits (Jung-Testas *et al.*, 1989; Akwa *et al.*, 1993b). Le métabolisme de la PREG dans les astrocytes est régulé par la densité cellulaire, ce qui suggère un rôle pour des substances autocrines. En effet, à faible densité cellulaire, les astrocytes convertissent la [3 H]PREG en [3 H]PROG. Par contre, à confluence, ils métabolisent la [3 H]PREG en [3 H]7 α -OH-PREG (Akwa *et al.*, 1993b).

Certains types de neurones peuvent également synthétiser la PROG à partir de la PREG. Ainsi, il a été montré par hybridation *in situ* que la 3 β -HSD est exprimée dans des neurones du bulbe olfactif, du striatum, du cortex cérébral, du thalamus, de l'hypothalamus, du septum, de l'hippocampe et du cervelet. L'ADNc du cervelet, amplifié par RT-PCR, indique la présence de l'isoforme de type I, qui est celle exprimée dans les gonades et dans les glandes surrénales (Guennoun *et al.*, 1995). L'ARNm de la 3 β -HSD a également été détecté dans des neurones du cortex en culture (Sanne & Krueger, 1995). Chez les amphibiens, la localisation de la 3 β -HSD serait d'ailleurs exclusivement neuronale. Ainsi, une étude immunocytochimique a montré que, chez la grenouille *Rana ridibunda*, l'immunoréactivité de la 3 β -HSD est localisée dans les neurones de l'hypothalamus et dans des faisceaux d'axones, mais pas dans les cellules gliales (Mensah-Nyagan *et al.*, 1994).

Dans le système nerveux périphérique, la 3 β -HSD est également exprimée par les neurones sensoriels des ganglions spinaux, et ces neurones peuvent convertir la [3 H]PREG en [3 H]PROG et en [3 H]5 α -DH PROG (Guennoun *et al.*, 1997). Les cellules de Schwann sont une source de PROG dans les nerfs périphériques, qui contiennent des taux élevés de ce neurostéroïde. Ainsi, dans le nerf sciatique de rats et de souris mâles adultes, la concentration de PROG est environ dix fois plus élevée que dans le plasma et elle reste élevée après castration et surrénalectomie (Koenig *et al.*, 1995). La présence de la 3 β -HSD dans les cellules de Schwann en culture a été confirmée par RT-PCR, hybridation *in situ* et immunocytochimie. Cependant, contrairement aux neurones sensoriels qui semblent exprimer l'enzyme de façon constitutive, l'expression et l'activité de la 3 β -HSD sont régulées dans les cellules de Schwann par un signal neuronal (Robert *et al.*, 1999). En effet, des cultures pures de cellules de Schwann isolées à partir de nerfs sciatiques de rats nouveau-nés ne convertissent pas le [3 H]PREG en [3 H]PROG et ne contiennent que de faibles quantités d'ARNm de la 3 β -HSD. Par contre, lorsque les cellules de Schwann sont cultivées pendant plusieurs jours en présence de neurones sensoriels, les messagers de la 3 β -HSD sont induits et les cellules produisent de la [3 H]PROG lorsqu'elles sont incubées en présence de [3 H]PREG (Fig. 1). Cet effet inducteur peut également être observé lorsque les cellules de Schwann sont séparées des neurones par une membrane poreuse

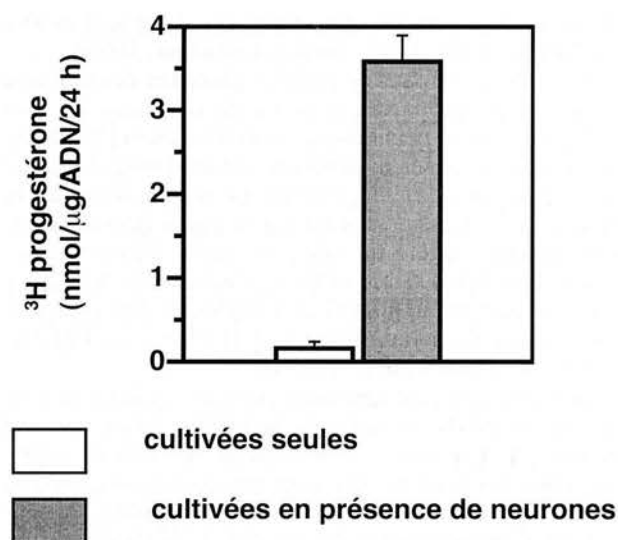
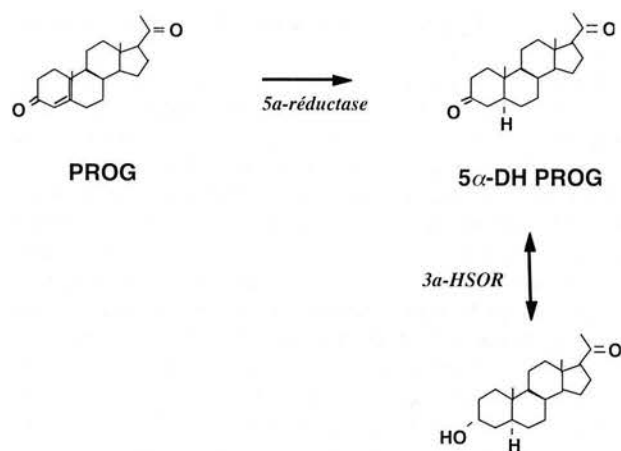


FIG. 1. — La synthèse de la PROG est augmentée dans les cellules de Schwann lorsqu'elles sont cultivées en présence de neurones sensoriels. Des cellules de Schwann de rat étaient cultivées pendant 2 semaines seules ou en contact avec des neurones sensoriels, isolés à partir de ganglions spinaux d'embryons (E18). Elles étaient alors incubées pendant 24 h en présence de 100 nM de [³H]PREG. La [³H]PROG formée était analysée et quantifiée par chromatographie sur couche mince et par spectrométrie de masse (modifié à partir de Robert *et al.*, 1999).

qui permet la diffusion de molécules larges comme des protéines, mais qui empêche un contact direct entre cellules. Ceci montre qu'un facteur neuronal diffusible est suffisant pour induire la capacité de biosynthèse de la PROG dans les cellules de Schwann. Ce facteur, qui reste à être identifié, est spécifique des neurones car d'autres types cellulaires, comme les fibroblastes des nerfs et les cellules hépatiques, n'induisent pas la 3β-HSD. Le rôle important d'un signal neuronal dans l'induction de la 3β-HSD a également pu être démontré *in vivo*, dans le nerf sciatique du rat, en régénération. L'ARNm de l'enzyme est présent dans le nerf intact, mais n'est plus détectable par RT-PCR trois jours après cryolésion, quand les axones ont dégénéré. Dans ce type de lésion, les fibres nerveuses régénèrent rapidement et dès que les cellules de Schwann rétablissent leur contact avec les axones, elles réexpriment la 3β-HSD (Robert *et al.*, 1999).

Biosynthèse de la 5α-dihydroprogesterone et de la 3α,5α-tétrahydroprogesterone

La PROG est métabolisée en 5α-dihydroprogesterone (5α-DH PROG) par la 5α-réductase, qui réduit la double liaison C4-C5. Notons que d'autres substrats, comme la testostérone et la désoxycorticostérone, peuvent être réduits en position 5α par cette enzyme. On a cloné deux gènes fonctionnels codant pour deux isoenzymes ayant des optimums de pH, des constantes d'affinité, des sensibilités aux inhibiteurs et une distribution tissulaire différentes (Russell & Wilson, 1994).



L'activité 5α-réductase est largement distribuée dans le cerveau et dans la moelle épinière, principalement au niveau de la substance blanche, et il a été suggéré que l'enzyme pourrait être présente dans les gaines de myéline (Celotti *et al.*, 1992). Dans le système nerveux périphérique, la 5α-réductase est active dans les neurones sensoriels et dans les cellules de Schwann (Guenoun *et al.*, 1997). Une étude immunocytochimique récente montre que la 5α-réductase de type 1 est présente dans les cellules de Schwann des fibres myélinisées et non-myélinisées. Dans les fibres myélinisées, l'immunoréactivité est observée au niveau des lamelles externes, des nœuds de Ranvier et des incisures de Schmidt-Lanterman (Yokoi *et al.*, 1998).

La 5α-réductase de type 1 est exprimée dans le système nerveux central et périphérique à tous les stades du développement. Par contre, celle de type 2 a été détectée dans le cerveau uniquement au cours du développement embryonnaire et au début de la vie postnatale et, contrairement à l'isoforme 1, elle est régulée par des androgènes circulants (Melcangi *et al.*, 1998b). Dans les cellules gliales, l'activité de la 5α-réductase est également influencée par des facteurs neuronaux diffusibles.

La 3α-hydroxystéroïde oxydoréductase (3α-HSOR) convertit, par une réaction réversible, la 5α-DH PROG en 3α,5α-tétrahydroprogesterone (3α,5α-TH PROG), mieux connue sous le nom d'allopregnanolone. Une étude a montré que, deux semaines après castration et surrénalectomie, la PREG, la PROG et la 5α-DH PROG restaient présentes dans le cerveau de rats mâles adultes, tandis que la 3α,5α-TH PROG n'était plus détectable (Young *et al.*, 1994). Par contre, d'autres auteurs ont rapporté que la 3α,5α-TH PROG est encore mesurable dans le cerveau trois semaines après ablation des glandes stéroïdogènes, mais que ses taux varient entre différentes régions (Cheney *et al.*, 1995). Ainsi, l'expression et l'activité de la 3α-HSOR sont plus élevées dans le bulbe olfactif que dans l'hippocampe. Par ailleurs, cette enzyme ne semble pas être exprimée dans les neurones car, lorsqu'on injecte dans le bulbe olfactif du rat de l'acide kainique, une toxine qui détruit les neurones mais

laisse les cellules gliales intactes, l'activité de la 3α -HSOR n'est pas diminuée (Krieger & Scott, 1989). La 3α -HSOR a été mise en évidence dans les astrocytes de type I et dans les oligodendrocytes (Martini *et al.*, 1993). De même, dans le système nerveux périphérique, l'enzyme est présente et active dans les cellules gliales, mais pas dans les neurones sensoriels des ganglions spinaux (Guenoun *et al.*, 1997).

EFFETS TROPHIQUES DE LA PRÉGNÉNONE ET DE LA PROGESTÉRONE

Régénération nerveuse

Des effets neurotrophiques ou neuroprotecteurs ont surtout été décrits pour les œstrogènes et pour les androgènes. Cependant, des études *in vivo* montrent que la PREG et la PROG agissent également sur les cellules nerveuses, et que ces deux neurostéroïdes jouent un rôle important dans les processus de régénération. Ainsi, la PREG favorise la réparation de lésions de la moelle épinière chez le rat. Après une compression, l'administration immédiate de la PREG diminue les modifications histopathologiques du tissu nerveux, préserve le tissu de traumatismes secondaires et facilite même la récupération des fonctions motrices (Guth *et al.*, 1994). Il reste à déterminer si la PREG agit directement ou par l'intermédiaire d'un de ses métabolites comme la PROG. En effet, il a été montré que celle-ci favorise la survie des motoneurons après section du nerf facial (Yu, 1989). De même, l'administration de PROG réduit l'œdème après contusion du cortex frontal, ce qui pourrait expliquer pourquoi les mâles ont plus d'œdèmes que les femelles suite à une lésion et que les rates pseudogestantes n'en développent quasiment pas (Roof *et al.*, 1993). Il s'agit d'une observation importante car, en réduisant l'œdème, la PROG diminue également la dégénérescence neuronale secondaire et les modifications comportementales qui accompagnent les lésions.

Réparation de la myéline

Plusieurs études ont montré que les cellules gliales myélinisantes, oligodendrocytes dans le système nerveux central et cellules de Schwann dans le système nerveux périphérique, sont la cible d'hormones stéroïdes, telles que les œstrogènes et les glucocorticostéroïdes, et qu'elles expriment des récepteurs intracellulaires pour ces hormones (Jung-Testas *et al.*, 1991a; 1996a, Warembourg *et al.*, 1981). Dans des cultures d'oligodendrocytes préparées à partir de cerveaux de rats nouveau-nés, les glucocorticostéroïdes activent les gènes codant pour la déshydrogénase du glycérol phosphate, la protéine basique de la myéline et la protéine protéolipidique, ainsi que des gènes gouvernant la synthèse lipidique (Kumar *et al.*, 1989; Warringa *et al.*, 1987; Jung-Testas *et al.*, 1996b). Dans des cultures de cellules de Schwann, préparées à partir de nerfs sciatiques de rats nouveau-nés, l'œstradiol augmente la prolifération des

cellules en synergie avec l'AMPC (Jung-Testas *et al.*, 1993), et la dexaméthasone, glucocorticostéroïde synthétique, potentialise l'activité de mitogènes (Neuberger *et al.*, 1994) et active les promoteurs de gènes codant pour les protéines de la myéline P0 et PMP-22 (Désarnaud *et al.*, 1998).

La PROG joue un rôle particulièrement important dans les cellules gliales myélinisantes. C'est dans des cultures d'explants de ganglions spinaux d'embryons de rat que nous avons montré pour la première fois un rôle de la PROG dans la myélinisation. Ajouter une faible concentration de PROG (20 nM) dans le milieu de culture augmente de façon spectaculaire le nombre de neurites myélinisés. Dans ces conditions expérimentales, la PROG active le processus de myélinisation : elle augmente le nombre de segments myélinisés, mais elle n'affecte pas le nombre de cellules de Schwann et la longueur et la densité des neurites (Koenig *et al.*, 1995) (Fig. 2). En étudiant l'incorporation d'un analogue fluorescent de céramide dans les lipides de la myéline, il a été montré que la PROG ou son analogue synthétique le R5020, accélèrent l'initiation de la myélinisation dans ce type de coculture. Le fait que le cytochrome P450_{sec}, la 3β -HSD et le récepteur de la PROG sont tous augmentés au cours de la formation des gaines de myéline suggère fortement un rôle pour la production locale de PROG (Chan *et al.*, 1998).

La PROG synthétisée par les cellules de Schwann joue en effet un rôle important dans la formation de nouvelles gaines de myéline. Ceci a été démontré *in vivo* dans le nerf sciatique du rat en régénération après cryolésion. Il s'agit d'un modèle particulièrement adapté à l'exploration des fonctions trophiques des neurostéroïdes, car les nerfs périphériques possèdent une structure relativement simple et surtout une grande plasticité et capacité de régénération (Fawcett & Keynes, 1990). Suite à une lésion par congélation locale, les axones de la partie distale au site de lésion dégénèrent rapidement selon un processus connu sous le nom de « dégénérescence wallérienne », laissant en place les cellules de Schwann qui se divisent rapidement à l'intérieur des tubes formés par la lame basale. Les cellules de Schwann en prolifération produisent de nombreux facteurs neurotrophiques, essentiels pour la régénération des fibres nerveuses endommagées (Raivich & Kreutzberg, 1993). Par la suite, elles remyélinisent les axones qui ont régénéré.

En utilisant ce système de régénération, il a été montré par microscopie électronique que la PROG, synthétisée localement dans le nerf sciatique de souris mâles, joue un rôle important dans la formation des nouvelles gaines de myéline (Koenig *et al.*, 1995). Lorsqu'on bloque la synthèse locale de la PROG dans le nerf en régénération en appliquant du trilostane, on inhibe la remyélinisation des axones régénérés. De même, en bloquant l'action locale de la PROG par des applications répétées de RU486, on inhibe la myélinisation. Par ailleurs, l'administration locale de fortes doses de PROG (100 µg) augmente l'épaisseur des gaines de myéline formées deux semaines après lésion.

Deux observations sont en faveur d'un mécanisme d'action de la PROG impliquant une action directe sur

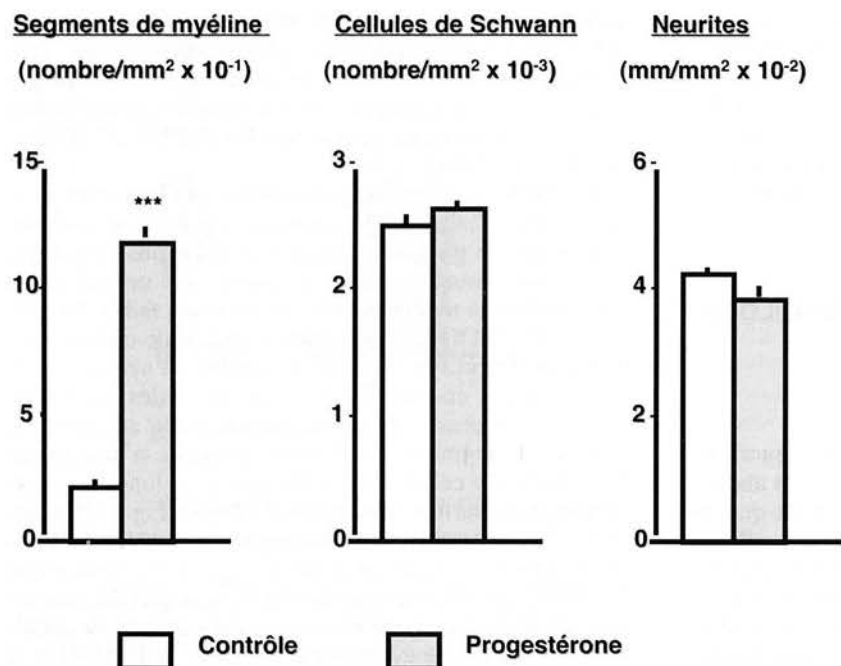


FIG. 2. — Un rôle de la PROG dans la myélinisation a été observé dans des cultures d'explants de ganglions spinaux de rats embryonnaires, constituées de neurones sensoriels et de cellules de Schwann. Les cellules de Schwann myélinisent les axones lorsqu'on ajoute de l'acide ascorbique et du sérum de veau fœtal dans le milieu de culture. Dans ce système de coculture, l'ajout journalier d'une dose faible de PROG dans le milieu de culture augmentait le nombre des segments de myéline, mais n'affectait pas le nombre des cellules de Schwann et le nombre et la longueur des neurites (modifié à partir de Koenig *et al.*, 1995).

les cellules de Schwann *via* une boucle autocrine : 1) les cellules de Schwann ne synthétisent pas seulement la PROG en réponse à un signal neuronal, elles expriment également un récepteur intracellulaire pour ce neurostéroïde ; 2) la PROG active dans les cellules de Schwann l'expression de gènes codant pour les protéines de la myéline P0 et PMP-22. Ceci a été montré en transfectant de façon transitoire des cellules de Schwann en culture avec des transgènes dans lesquels les régions promotrices de P0 ou de PMP-22 sont associées au gène de la luciférase comme rapporteur (promoteur de P0 : 1 kb ; promoteur 1 de PMP-22 : 2.5 kb ; promoteur 2 de PMP-22 : 3.4 kb). Cette approche nous a permis de montrer que la PROG et ses dérivés synthétiques (ORG-2058 et R5020) augmentent l'activité du promoteur 1 de PMP-22 et celle du promoteur de P0 de façon dose-dépendante et spécifique. L'activation de ces promoteurs par la PROG est spécifique des cellules de Schwann, car dans la lignée de tumeur mammaire T47D, qui contient des taux élevés de récepteurs de la PROG, les promoteurs n'étaient pas activés par l'hormone. Il faut d'ailleurs que les cellules de Schwann soient cultivées à haute densité et en présence de forskoline, conditions de culture qui induisent un phénotype myélinisant, pour observer l'effet de la PROG (Désarnaud *et al.*, 1998).

La formation de métabolites 5 α -réduits de la PROG pourrait jouer un rôle important dans la myélinisation. Une faible concentration de 3 α ,5 α -TH PROG ajoutée dans des cultures de cellules de Schwann augmente fortement l'expression de P0 et dans le nerf sciatique de rats âgés, l'administration prolongée de 5 α -DH PROG rétablit l'expression des gènes de la myéline (Melcangi *et al.*, 1998a). Ainsi, des progestagènes pourraient être utiles pour traiter la détérioration des gaines de myéline qui

caractérise le vieillissement du système nerveux (Peters, 1996 ; Svennerholm *et al.*, 1997).

Une question importante est celle du rôle de la PROG dans la myélinisation du système nerveux central, qui est sélectivement affecté par des maladies démyélinisantes comme la sclérose en plaques ou la maladie de Pelizaeus-Merzbacher. On doit en effet être prudent lorsqu'on extrapole au cerveau et à la moelle épinière des résultats obtenus sur les nerfs périphériques, car les processus de myélinisation sont différents. Les axones ne sont pas myélinisés par des cellules de Schwann, mais par des oligodendrocytes. En outre, la composition en protéines de la myéline centrale diffère de celle de la myéline périphérique et des facteurs de transcription distincts activent et coordonnent l'expression des gènes de la myéline dans les cellules de Schwann et dans les oligodendrocytes (Lemke, 1993). Des résultats préliminaires sont cependant encourageants. Ils montrent que la PROG augmente dans des cultures mixtes de cellules gliales préparées à partir de cerveaux de rats nouveau-nés le nombre des oligodendrocytes qui expriment la protéine basique de la myéline (Jung-Testas *et al.*, 1996b). De plus, une synthèse locale de PROG pourrait jouer un rôle dans la maturation des oligodendrocytes : dans les cellules progénitrices, on note une augmentation des taux d'ARNm codants pour le cytochrome P450scc et de la 3 β -HSD au moment de leur différenciation (Chan *et al.*, 1998).

CONCLUSIONS

La synthèse de neurostéroïdes dans le système nerveux central et périphérique est maintenant bien établie. Dans le cerveau et dans les nerfs, les concentrations de

stéroïdes comme la PREG et la PROG sont supérieures aux taux circulants, et celles-ci restent élevées pendant des jours après ablation des glandes endocrines. Les enzymes impliquées dans la biosynthèse de neurostéroïdes ont été mises en évidence dans les tissus nerveux et il a été montré que les cellules gliales et nerveuses peuvent les synthétiser à partir de précurseurs radioactifs. Cependant, plusieurs questions importantes concernant la biosynthèse des neurostéroïdes restent à être étudiées, en particulier celle de la régulation. Alors que le contrôle de la stéroïdogenèse dans les gonades et les glandes surrénales est assez bien connu, nous ne savons pas grand chose de la régulation de la synthèse des stéroïdes dans le système nerveux. Nos connaissances se limitent aux quelques expériences résumées dans cette revue, qui montrent qu'elle est influencée par des interactions cellulaires. Par ailleurs, d'autres travaux ont montré que des agonistes du récepteur périphérique des benzodiazépines, qui facilitent le passage du cholestérol à l'intérieur de la mitochondrie, augmentent la synthèse de la PREG par les cellules gliales en culture (Papadopoulos, 1993).

Actuellement, nos efforts de recherche s'orientent surtout vers la compréhension de la signification d'une synthèse de neurostéroïdes dans le système nerveux. Les expériences qui montrent que bloquer la synthèse ou l'action de la PROG dans le nerf sciatique en régénération inhibe la remyélinisation, démontrent pour la première fois un rôle de la synthèse locale de l'hormone dans le système nerveux. Bloquer sélectivement des voies biosynthétiques de neurostéroïdes par des inhibiteurs ou par des approches de biologie moléculaire, sera une bonne stratégie pour élucider progressivement les différentes fonctions des neurostéroïdes dans le cerveau et dans les nerfs. L'observation que les taux de PREG et de PROG sont élevés dans les tissus nerveux même en absence de lésion, suggère fortement que ces neurostéroïdes n'interviennent pas seulement dans des processus de régénération, mais qu'ils pourraient jouer également un rôle important dans le maintien de certaines structures, comme par exemple les gaines de myéline.

Ce n'est que 18 ans après que ce concept a été proposé pour la première fois (Baulieu, 1981), que sont explorés les problèmes de la régulation et des fonctions des neurostéroïdes. Cette évolution lente de la thématique s'explique en partie par la difficulté d'admettre que des stéroïdes comme la PROG sont bien plus que des hormones de reproduction, mais qu'ils régulent par des actions para/autocrines des fonctions vitales comme la myélinisation. Une fois qu'une étiquette comme celle d'« hormone de reproduction » a été associée à une molécule, il devient difficile de s'en débarrasser. La découverte que les neurostéroïdes jouent un rôle important dans la plasticité et la régénération du système nerveux ainsi que dans des processus mnésiques (chapitre d'Y. Akwa dans ce volume), ouvre également la voie à des applications thérapeutiques des neurostéroïdes pour traiter des blessures du système nerveux et des problèmes de la mémoire.

BIBLIOGRAPHIE

- Abbaszade I. G., Clarke T. R., Park C. H. J. & Payne A., The mouse 3β -hydroxysteroid dehydrogenase multigene family includes two functionally distinct groups of proteins. *Mol. Endocrinol.*, 1995, 9, 1214-1222.
- Akwa Y., Schumacher M., Jung-Testas I. & Baulieu E. E., Neurosteroids in rat sciatic nerves and Schwann cells. *C. R. Acad. Sci. (III)*, Paris, 1993a, 316, 410-414.
- Akwa Y., Sananès N. G., Robel P., Baulieu E. E. & Le Goas-cogne C., Astrocytes and neurosteroids: metabolism of pregnenolone and dehydroepiandrosterone. Regulation by cell density. *J. Cell. Biol.*, 1993b, 121, 135-143.
- Baulieu E. E., Steroid hormones in the brain: several mechanisms? Dans : Steroid hormone regulation of the brain. Fuxe K., Gustafsson J. A., Wetterberg L. (eds), Oxford, Pergamon Press, 1981, 3-14.
- Baulieu E. E., Neurosteroids: a new function in the brain. *Biol. Cell.*, 1991, 71, 3-10.
- Bock G. R., Goode J. A. (eds), Non-reproductive actions of sex steroids, *Ciba Foundation Symposium*. Chichester, John Wiley & Sons, 1995, 1, 307.
- Bologna L., Sharma J. & Roberts E., Dehydroepiandrosterone and its sulfated derivative reduce neuronal death and enhance astrocytic differentiation in brain cell cultures. *J. Neurosci. Res.*, 1987, 17, 225-234.
- Celotti F., Melcangi R. C. & Martini L., The 5α -reductase in the brain: molecular aspects and relation to brain function. *Front. Neuroendocrinol.*, 1992, 13, 163-215.
- Chan J. R., Phillips L. J. & Glaser M., Glucocorticoids and progesterins signal the initiation and enhance the rate of myelin formation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1998, 95, 10459-10464.
- Cheney D. L., Uzunov D., Costa B. & Guidotti A., Gas chromatographic mass fragmentographic quantitation of 3α -hydroxy- 5α -pregnan-20-one (allopregnenolone) and its precursors in blood and brain of adrenalectomized castrated rats. *J. Neurosci.*, 1995, 15, 4641-4650.
- Compagnone N. A., Bulfone A., Rubenstein J. L. & Mellon S. H., Expression of the steroidogenic enzyme P450_{scc} in the central and peripheral nervous systems during rodent embryogenesis. *Endocrinology*, 1995, 136, 2689-2696.
- Corpénot C., Synguelakis M., Talha S., Axelsson M., Sjövall J., Vihko R., Baulieu E. E. & Robel P., Pregnenolone and its sulfate ester in the rat brain. *Brain Res.*, 1983, 270, 119-125.
- Corpénot C., Young J., Calvel M., Wehrey C., Veltz J. N., Trouyer G., Mourén M., Prasad V. V. K., Banner C., Sjövall S., Baulieu E. E. & Robel P., Neurosteroids: 3α -hydroxy- 5α -pregnan-20-one and its precursors in the brain, plasma, and steroidogenic glands of male and female rats. *Endocrinology*, 1993, 133, 1003-1009.
- Del Cerro S., Garcia-Estrada J. & Garcia-Segura L. M., Neuroactive steroids regulate astroglia morphology in hippocampal cultures from adult rats. *Glia*, 1995, 14, 65-71.
- Désarnaud F., Do Thi A. N., Brown A., Lemke G., Suter U., Baulieu E. E. & Schumacher M., Progesterone stimulates the activity of the promoters of peripheral myelin protein-22 and P0 genes in Schwann cells. *J. Neurochem.*, 1998, 71, 1765-1768.
- Fawcett J. W. & Keynes R. J., Peripheral nerve regeneration. *Annu. Rev. Neurosci.*, 1990, 13, 43-60.
- Guarneri P., Guarneri R., Cascio C., Pavaasant P., Piccoli F. & Papadopoulos V., Neurosteroidogenesis in rat retinas. *J. Neurochem.*, 1994, 63, 86-96.
- Guenoun R., Fiddes R. J., Gouérou M., Lombès M. & Baulieu E. E., A key enzyme in the biosynthesis of neurosteroids, 3β -hydroxysteroid dehydrogenase/ Δ^5 - Δ^4 -isomerase (3β -HSD), is expressed in rat brain. *Mol. Brain Res.*, 1995, 30, 287-300.

- Guenoun R., Schumacher M., Robert F., Delespierre B., Gouézou M., Eychenne B., Akwa Y., Robel P. & Baulieu E. E., Neurosteroids: expression of functional 3β -hydroxysteroid dehydrogenase by rat sensory neurons and Schwann cells. *Eur. J. Neurosci.*, 1997, 9, 2236-2247.
- Guth L., Zhang Z. & Roberts E., Key role for pregnenolone in combination therapy promotes recovery after spinal cord injury. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1994, 91, 12308-12312.
- Jung-Testas I., Hu Z. Y., Robel P. & Baulieu E. E., Biosynthesis of pregnenolone and progesterone in primary cultures of rat glial cells. *Endocrinology*, 1989, 125, 2083-2091.
- Jung-Testas I., Renoir J. M., Gasc J. M. & Baulieu E. E., Estrogen-inducible progesterone receptor in primary cultures of rat glial cells. *Exp. Cell. Res.*, 1991, 193, 12-19.
- Jung-Testas I., Schumacher M., Bugnard H. & Baulieu E. E., Stimulation of rat Schwann cell proliferation by estradiol: synergism between the estrogen and cAMP. *Dev. Brain Res.*, 1993, 72, 282-290.
- Jung-Testas I., Schumacher M., Robel P. & Baulieu E. E., Demonstration of progesterone receptors in rat Schwann cells. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.*, 1996a, 58, 77-82.
- Jung-Testas I., Schumacher M., Robel P. & Baulieu E. E., The neurosteroid progesterone increases the expression of myelin proteins (MBP and CNPase) in rat oligodendrocytes in primary culture. *Cell. Mol. Neurobiol.*, 1996b, 16, 439-443.
- Koenig H., Schumacher M., Ferzaz B., Do Thi A. N., Res-souches A., Guennoun R., Jung-Testas I., Robel P., Akwa Y. & Baulieu E. E., Progesterone synthesis and myelin formation by Schwann cells. *Science*, 1995, 268, 1500-1503.
- Krieger N. R. & Scott R. G., Nonneuronal localization for steroid converting enzyme: 3α -hydroxysteroid oxidoreductase in olfactory tubercle of rat brain. *J. Neurochem.*, 1989, 52, 1866-1870.
- Kumar S., Cole R., Chiappelli F. & de Vellis J., Differential regulation of oligodendrocyte markers by glucocorticoids: post-transcriptional regulation of both proteolipid protein and myelin basic protein and transcriptional regulation of glycerol phosphate dehydrogenase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1989, 86, 6807-6811.
- Le Goascogne C., Robel P., Gouézou M., Sananès N., Baulieu E. E. & Waterman M. R., Neurosteroids: cytochrome P450sc in rat brain. *Science*, 1987, 237, 1212-1215.
- Lemke G., The molecular genetics of myelination: an update. *Glia*, 1993, 7, 263-271.
- Martini L., Melcangi R. C. & Maggi R., Androgen and progesterone metabolism in the central and peripheral nervous system. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.*, 1993, 47, 195-205.
- Melcangi R. C., Magnagi V., Cavarretta L., Martini L. & Piva F., Age-induced decrease of glycoprotein P0 and myelin basic protein gene expression in the rat sciatic nerve. Repair by steroid derivatives. *Neuroscience*, 1998a, 85, 569-578.
- Melcangi R. C., Poletti A., Cavarretta L., Celotti F., Colciago A., Magnagi V., Motta M., Negri-Cesi P., Martini L., The 5α -reductase in the central nervous system: expression and modes of control. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.*, 1998b, 65, 295-299.
- Mellon S. H., Neurosteroids: biochemistry, modes of action, and clinical relevance. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 1994, 78, 1003-1008.
- Mensah-Nyagan A. G., Feuilloley M., Dupont E., Do-Rego J. L., Leboulenger F., Pelletier G. & Vaudry H., Immunocytochemical localization and biological activity of 3β -hydroxysteroid dehydrogenase in the central nervous system of the frog. *J. Neurosci.*, 1994, 14, 7306-7318.
- Morfin R., Young J., Corpéchet C., Egestad B., Sjövall J. & Baulieu E. E., Neurosteroids: pregnenolone in human sciatic nerves. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1992, 89, 6790-6793.
- Neuberger T. J., Kalimi O., Regelson W., Kalimi M. & De Vries G. H., Glucocorticoids enhance the potency of Schwann cell mitogens. *J. Neurosci. Res.*, 1994, 38, 300-313.
- Papadopoulos V., Peripheral-type benzodiazepine/diazepam binding inhibitor receptor: biological role in steroidogenic cell function. *Endocr. Rev.*, 1993, 14, 222-240.
- Paul S. M. & Purdy R. H., Neuroactive Steroids. *FASEB J.*, 1992, 6, 2311-2322.
- Peters A., Age-related changes in oligodendrocytes in monkey cerebral cortex. *J. Comp. Neurol.*, 1996, 371, 153-163.
- Raivich G. & Kreutzberg G. W., Peripheral nerve regeneration: role of growth factors and their receptors. *Int. J. Neurosci.*, 1993, 11, 311-324.
- Robel P. & Baulieu E. E., Neurosteroids. Biosynthesis and function. *Trends Endocrinol. Metab.*, 1994, 5, 1-8.
- Robert F., Guennoun R., Désarnaud F., Do-Thi A., Baulieu E. E., & Schumacher M., Neurons induce progesterone synthesis in Schwann cells., 1999, soumis pour publication.
- Roof R. L., Duvdevani R. & Stein D. G., Gender influences outcome of brain injury – progesterone plays a protective role. *Brain Res.*, 1993, 607, 333-336.
- Russell D. W. & Wilson J. D., Steroid 5α -reductase: two genes/two enzymes. *Annu. Rev. Biochem.*, 1994, 63, 25-61.
- Sanne J. L. & Krueger K. E., Expression of cytochrome P450 side-chain cleavage enzyme and 3β -hydroxysteroid dehydrogenase in the rat central nervous system: a study by polymerase chain reaction and in situ hybridization. *J. Neurochem.*, 1995, 65, 528-536.
- Strömstedt M. & Waterman M. R., Messenger RNA encoding steroidogenic enzymes are expressed in rodent brain. *Mol. Brain Res.*, 1995, 4, 75-88.
- Svennerholm L., Boström K. & Jungbjer B., Changes in weight and compositions of major membrane components of human brain during the span of adult human life of Swedes. *Acta Neuropathol. (Berl)*, 1997, 94, 345-352.
- Vallée M., Mayo W., Darnaudéry M., Corpéchet C., Young J., Koehl M., Le Moal M., Baulieu E. E., Robel P. & Simon H., Neurosteroids: deficient cognitive performance in aged rats depends on low pregnenolone sulfate levels in the hippocampus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1997, 94, 14865-14870.
- Warembourg M., Otten U. & Schwab M. E., Labelling of Schwann and satellite cells by [3 H]dexamethasone in a rat sympathetic ganglion and sciatic nerve. *Neuroscience*, 1981, 6, 1139-1143.
- Warringa R. A. J., Hoebein R. C., Koper J. W., Sykes J. E. C., Van Golde L. M. G. & Lopes-Cardozo M., Hydrocortisone stimulates the development of oligodendrocytes in primary glial cultures and affects glucose metabolism and lipid synthesis in these cultures. *Dev. Brain Res.*, 1987, 34, 79-86.
- Yokoi H., Tsuruo Y. & Ishimura K., Steroid 5α -reductase type 1 immunolocalized in the rat peripheral nervous system and paraganglia. *Histochem. J.*, 1997, 30, 731-739.
- Young J., Corpéchet C., Perche M., Haug M., Baulieu E. E. & Robel P., Neurosteroids: pharmacological effects of a 3β -hydroxy-steroid dehydrogenase inhibitor. *Endocrine J.*, 1994, 2, 505-509.
- Yu W. H., Survival of motoneurons following axotomy is enhanced by lactation or by progesterone treatment. *Brain Res.*, 1989, 491, 379-382.