



**HAL**  
open science

# Étude comparative de trois modèles de douleurs neuropathiques chez le rat : étude comportementale, pharmacologique et analyse transcriptomique.

Karine Thibault

## ► To cite this version:

Karine Thibault. Étude comparative de trois modèles de douleurs neuropathiques chez le rat : étude comportementale, pharmacologique et analyse transcriptomique.. Neurosciences [q-bio.NC]. Université Pierre et Marie Curie - Paris VI, 2009. Français. NNT : . pastel-00575942

**HAL Id: pastel-00575942**

**<https://pastel.hal.science/pastel-00575942v1>**

Submitted on 11 Mar 2011

**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.



# THÈSE DE DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ PIERRE ET MARIE CURIE

Spécialité  
NEUROSCIENCES  
ED158 : Cerveau Cognition Comportement

Présentée par

**Karine THIBAULT**

Pour obtenir le grade de

**DOCTEUR de l'UNIVERSITÉ PIERRE ET MARIE CURIE**

Étude comparative de trois modèles de douleurs neuropathiques chez le rat : étude comportementale, pharmacologique et analyse transcriptomique.

soutenue le 30 septembre 2009

devant le jury composé de :

**Dr. Didier ORSAL**, Université Paris VI (Paris)  
**Pr. Pierre CESARO**, C.H.U. Henri Mondor (Créteil)  
**Dr. Alain ESCHALIER**, Faculté de Médecine (Clermont-Ferrand)  
**Dr. Marie CONRATH**, Hôpital Pitié-Salpêtrière (Paris)  
**Dr. Jean Jacques BENOLIEL**, Hôpital Pitié-Salpêtrière (Paris)  
**Dr. Didier BOUHASSIRA**, Hôpital Ambroise Paré (Boulogne-Billancourt)  
**Pr. Bernard CALVINO**, ESPCI (Paris)

Président  
Rapporteur  
Rapporteur  
Examineur  
Examineur  
Examineur  
Directeur de Thèse



# Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier sincèrement chaque membre du jury :

Le Professeur Didier Orsal d'avoir accepté de présider ce jury. Je tiens à le remercier tout particulièrement de m'avoir permis de faire mon stage de master au sein de son laboratoire.

Le Docteur Alain Eschalier et le Professeur Pierre Cesaro d'avoir accepté d'être rapporteurs de cette thèse et d'accorder du temps à la lecture de ce manuscrit.

Le Docteur Didier Bouhassira et le Docteur Jean-Jacques Benoliel d'avoir accepté d'être examinateurs de cette thèse.

Je voudrais remercier chaleureusement le Docteur Marie Conrath d'avoir accepté d'être examinateur de ma thèse et plus particulièrement de m'avoir encadrée lors de mon stage de master. Cela a été un véritable plaisir de travailler avec toi au cours de cette année et je te remercie pour le temps que tu m'as accordé dans mes débuts d'« apprenti-chercheur ».

J'adresse mes remerciements les plus sincères au Professeur Bernard Calvino pour m'avoir permis de réaliser ce travail sous sa direction. Il me paraît évident que sans toi je n'aurais pas pu réaliser l'ensemble de ce travail. Merci de m'avoir fait confiance et de m'avoir acceptée comme étudiante même sans bourse ministérielle. Merci pour tes qualités humaines qui ont fait que tu as toujours fait passer mes intérêts en premier. Merci pour les discussions que nous avons eu malgré un emploi du temps surchargé de Professeur. Enfin je te remercie de m'avoir toujours fait confiance pour les manip et la gestion de mon temps. Je pense avoir beaucoup mûrie au cours de ces années et je crois pouvoir dire que tu y es pour beaucoup.

Je voudrais également remercier deux directeurs de laboratoire pour m'avoir accueillie au sein de leur unité : le Professeur Jean Rossier et le Docteur Serge Birman.

Tous mes remerciements vont naturellement au Docteur Sophie Pezet pour ses nombreux conseils avisés. Sache que les nombreuses choses que j'ai apprises à ton contact ont facilité le déroulement de cette thèse. Je te remercie de ta disponibilité au cours de ces quatre années et pour les nombreuses discussions autour d'un thé, d'un petit gâteau ou autre... Merci pour le partage de tous tes petits secrets de manip et tous les 'truc truc truc' et 'tchuk tchuk tchuk' qui m'ont énormément facilité la vie. Pour tout ça : merci beaucoup !

Je tiens à remercier tout particulièrement le Docteur Isabelle Férezou pour les nombreuses discussions que nous avons pu avoir. Merci pour l'intérêt que tu as toujours porté à mon

travail et pour m'avoir longuement écouté parlé de mes problèmes de manip au cours de soirée en tête-à-tête (souvent autour d'une bière...).

Je tiens à remercier très chaleureusement Mr Marcel Léopoldie pour s'être si bien occupé de mes petites bêtes pendant quatre ans. Même si tu as souvent râlé mois après mois, série d'animaux après série d'animaux, je sais qu'au fond tu as toujours préféré les rats aux souris, n'est-ce pas ? Plus sérieusement, je voudrais te remercier de l'énorme travail que tu as fourni pour que cette thèse voit le jour (parce que sans un animalier en or, je n'aurais pas réussi)! Merci à toi 'grand chef supérieur' !

Je voudrais remercier tous les membres du laboratoire qui m'ont soutenue, écoutée et conseillée au cours de ces années. Je tiens à remercier plus particulièrement le Docteur Thierry Gallopin, pour son humour parfois décalé mais toujours là ! Hélène Goeffroy, pour sa vision parfois acérée du labo... Et Sylvie Boulet, pour sa gentillesse et sa gestion de la drogue de tout thésard : le café ! Je ne citerais qu'eux, mais naturellement j'adresse mes remerciements les plus sincères à tous les membres de l'unité pour leur présence et leur bonne humeur.

J'en arrive aux étudiants du labo !!! Un énorme merci à tous sans qui cette thèse n'aurait sûrement pas été la même...

Je voudrais sincèrement remercier Jack pour sa bonne humeur, son humour, son écoute, sa présence (la liste peut être longue...). Merci pour avoir accepté un jour de tenter un rapprochement des étudiants du labo et d'avoir ainsi co-créé cette secte un peu spéciale des 'jeudis bière'. Parce que « qui dit jeudi, dit : 'je dis bière' » !!!! Merci d'avoir été là et merci d'avoir été toi ...

Je tiens à remercier chaleureusement Quentin. Merci pour ces nombreuses soirées en tête-à-tête juste pour discuter, juste comme ça... Pour ces parties mémorables de bataille corse... Pour ces soirées équilibristes à la Montagne au grand damne de Steeve... De nous avoir apporté le Dourak au sein des jeudis bières... Pour le pain au chocolat ce fameux lundi noir de mon écriture de thèse... Pour les innombrables pauses clopes sur le balcon... Pour l'ensemble des choses qui font ce que tu es : 'Tout ça, la vie, les choses' quoi...

Je voudrais également remercier Eric pour sa présence inflexible aux jeudis bières ! Merci pour ta gentillesse et ta grande générosité envers les autres. Je sais qu'avec toi je n'ai aucun souci à me faire sur la reprise des cartes 'made in home'...

Je tiens à remercier Alexandre. Merci pour cette présence masculine le midi, tant chargé en œstrogène autour de la table!!! Arrivé un peu tardivement parmi nous, les jeudis bières ne seraient pas pareil sans toi...

Je remercie également Julien 'des mouches'. Présent depuis le début, tes apparitions ont toujours été courtes mais elles en ont été que plus attendues...

Je voudrais également remercier Séverine. Merci pour ta joie de vivre et ton rire présent dans toutes les soirées ! Merci d'augmenter notre culture Normande par ces quelques 'Heula' bien placés dont certains resteront graver dans nos mémoires...


Enfin un grand merci aux occasionnels de la première ou de la dernière heure: Guillaume, toujours souriant, Anne, pour une cohabitation de tiroir de frigo impeccable pendant quelques années !, Anne Lise, PCène dans l'âme mais qui vient de passer du côté obscure des « gens du labo de bio », Pierre-Yves, merci pour ton côté langue de vipère si savoureux...

Mais également aux nouveaux qui participent à reprendre le flambeau : Léna et Thomas, tout nouveaux mais déjà des grands adeptes je vois...

Je n'oublie pas les « anciens » qui sont partis plus ou moins loin. Je pense évidemment à Julien 'des puces' : merci pour tous les bons moments passés ensemble... Je pense également à Julien 'le suisse' : un brin lourd (c'est ce qui fait ton charme) mais toujours très drôle... Je pense évidemment à Ben : je te souhaite beaucoup de bonheur et un super post-doc. Je pense à Randall : pour ces quelques soirées improbables dans des bars parisiens. Mais je pense surtout à Sophie : deux ans de travail ensemble et des nombres incalculables de manips de puces. Merci pour ta bonne humeur et d'être toujours là deux ans après !

Merci à vous d'avoir fait de cette thèse une grande étape dans ma vie !!!! Merci pour toutes les soirées au bar de PC ou ailleurs, merci pour tous ces week-end en France ou ailleurs, merci d'avoir été vous !

Je tiens à remercier le plus chaleureusement possible Florence pour tout et pour rien ! Pour ces cinq années passées en remercier pour le soutien toujours apporté ! Pour ces maintes et maintes soirées !!!) que parler de tout et de rien. Et parce que « Vive la thèse » restera notre hymne officiel malgré tout!!!! Un grand merci à toi !



Je voudrais remercier Aurélie pour ces 11 dernières années ! Et oui le temps passe !!! Merci pour le soutien pendant cette thèse qui n'a pas été de tout repos malgré tout... Merci pour les nombres incalculables de fou rire qu'on a pu avoir : de St Germain à La Baule en passant par Tignes, de St Malo à l'Ardèche en passant par Gruissan, de Paris à Villers-sur-Mer en passant par Hautecombe... Que de chemin parcouru et que de souvenirs!!!

Je tiens à remercier également François et Cédric pour leur éternel présence envers et contre tout. Merci à toi François pour ces millions d'heures passées ensemble dans la 'salle de jeux' à regarder tout et n'importe quoi à la télé (surtout n'importe quoi généralement)... Merci à toi Cédric pour ton sens de l'humour bien à toi et ton merveilleux fairplay aux jeux.

Un grand 'big up' pour Charles !!! Je n'ose calculer le nombre d'année... Je pense pouvoir dire pas loin de 15 !!! Et il s'en est passé des choses en 15 ans mais tu as toujours été là...

Pour ça, tu sais que tu auras toute ma reconnaissance. Je ne peux pas dire grand-chose d'autre que merci pour ton amitié ! Je pense qu'on est bien partis pour une nouvelle quinzaine non ?

Je tiens à remercier tout particulièrement ma mère pour son soutien inconditionnel depuis le début. Tu as été là à chaque étape de ma vie et tu m'as permis de réaliser mon chemin en me laissant toujours faire mes propres choix et mes propres erreurs. Cette liberté avec laquelle j'ai grandi m'a permis de me construire et d'être arrivée là je suis maintenant. Loin de moi l'idée de dire que je suis sans défaut mais je te remercie pour ce que je suis devenue grâce à toi...

Je voudrais remercier chaleureusement mes frères et ma sœur. Xavier ! Oh toi, qui as toujours si bien tenu ce rôle d'aîné : « l'art d'avoir toujours raison »!!! Audrey ! Sister ! Ça toujours été plus ou moins en dent de scie toutes les deux mais je voudrais te remercier pour ta présence dans tous les moments bons ou mauvais que nous avons partagé. Franck ! Après une enfance mouvementée, je pense qu'on a réussi à enterrer la hache de guerre et pour ça merci beaucoup ! Plus sérieusement, merci à tous les trois d'avoir tenté de nombreuses fois de comprendre ce que je faisais pendant ces quatre années. Je tenais à vous dire à quel point vous comptez pour moi malgré nos enguellades et nos divergences... Merci à vous 'Big Brothers' pour tout !

Enfin et pour finir (je vous promets...), je voudrais remercier tout ce que je n'ai pas cité plus haut qui ont compté pour moi: la famille, proche ou lointaine, et les amis, du collègue à la prépa... Et parce que je me devais de faire cette dédicace pour mon frère, je tiens à remercier Denis Roussos, en même temps j'ai envie de dire pourquoi pas...

Merci à vous...





## Résumé

La prise en charge des douleurs chroniques neuropathiques, définies comme une « douleur secondaire à une lésion ou à une maladie affectant le système somatosensoriel », reste encore un véritable défi pour les thérapeutes. La compréhension des mécanismes sous-tendant l'apparition et le maintien des douleurs chroniques neuropathiques permettrait la mise en évidence de nouvelles cibles thérapeutiques et ainsi l'élaboration de nouveaux traitements. C'est dans ce but que nous avons réalisé ce travail sur l'étude de trois modèles animaux de douleurs neuropathiques chroniques : deux modèles de douleurs neuropathiques iatrogènes générées par des molécules anticancéreuses (Vincristine et Oxaliplatine) et un modèle de sclérose en plaque : l'EAE (« *Experimental Autoimmune Encephalomyelitis* »).

Nous avons réalisé une étude comportementale aussi complète que possible de ces trois modèles, associée à une étude d'analyse différentielle de gènes concernant les deux modèles générés par l'activité iatrogéniques de molécules anticancéreuses. Nous avons également réalisé des études pharmacologiques concernant les modèles de douleurs neuropathiques générées par la Vincristine et le modèle de sclérose en plaque (EAE).

Nous avons ainsi mis en évidence dans les trois modèles étudiés l'apparition de signes cliniques communs (allodynie et hyperalgésie mécanique statique ou dynamique, et allodynie et hyperalgésie thermique au froid...) mais avec des décours temporel différents suivant le modèle suggérant une atteinte différentielle des fibres afférentes primaires de petits et de larges diamètres.

L'étude de l'expression différentielle de gènes, par la technique des puces à ADN, a permis de mettre en évidence de nombreuses modifications d'expression de gènes dans les ganglions des racines dorsales à la fin du traitement par la Vincristine. La recherche de marqueurs de lésions cellulaires (ATF3, Caspase 12) révélés initialement par cette analyse en puce à ADN, nous a permis de faire l'hypothèse d'une altération des fibres myélinisées de gros diamètre chez le rat. En revanche, l'Oxaliplatine semble induire préférentiellement des modifications centrales. En effet, les résultats obtenus avec les puces à ADN indiquent un nombre de gènes différentiellement exprimés négativement très important dans le cortex somatosensoriel après traitement par l'Oxaliplatine tandis que l'on observe très peu de gènes différentiellement exprimés dans les ganglions des racines dorsales et dans la corne dorsale de la moelle

épineière. Ce résultat semble validé par l'observation d'une augmentation importante du nombre de cellules p-Erk positives dans différents cortex somatosensoriels primaires correspondant à différentes régions corporelles mais également dans des cortex limbiques comme le cortex cingulaire ou insulaire suggérant une sensibilisation centrale de certains neurones corticaux présents dans des structures clés de l'intégration du message douloureux dans ces composantes affectives et émotionnelles à la suite d'un traitement par l'Oxaliplatine.

Enfin les études pharmacologiques ont permis de mettre en évidence de nouvelles cibles pharmacologiques dans le modèle de douleur neuropathique généré par la Vincristine. En effet, nous avons mis en évidence l'implication du récepteur 5-HT<sub>2A</sub> dans la sensibilisation des neurones des ganglions des racines dorsales et dans le traitement du message nociceptif dans la corne dorsale de la moelle épinière dans ce modèle. Les antagonistes de ce récepteur pourraient constituer, du moins en partie, des analgésiques de choix pour soulager les douleurs neuropathiques générées par la Vincristine. Nous avons également mis en évidence le rôle des enképhalines endogènes dans le soulagement des douleurs neuropathiques induites dans ce modèle par l'utilisation d'un inhibiteur mixte de la dégradation des enképhalines (le PL37). Enfin, l'étude pharmacologique complète réalisée sur le modèle EAE a permis de mettre en évidence que chaque symptôme (allodynie, hyperalgésie, hyperesthésie) rend compte de mécanismes distincts puisque l'efficacité des molécules testées diffère suivant le symptôme observé.

## Abstract

The management of chronic neuropathic pain, which has been defined as a "secondary pain in a hurt or a disease affecting the somatosensorial system ", stays a challenge for clinicians. The understanding of mechanisms underlying appearance and maintenance of chronic neuropathic pain would allow the discovery of new therapeutic targets and would give rise to new treatments. It is in this purpose that we realized this work on the study of three animal models of chronic neuropathic pain: two models of chemotherapy-induced peripheral neuropathy (CPN) (Vincristine and Oxaliplatin) and a model of multiple sclerosis: the EAE ("*Experimental Autoimmune Encephalomyelitis* ").

We performed i) a complete behavioral study of these three models, followed by ii) a study of differential genes expression in CPN model. We also performed pharmacological studies for the model of neuropathic pain generated by Vincristine and a model of multiple sclerosis.

While we observed common neuropathic signs such as mechanical or thermal allodynia and hyperalgesia, the time-course changes of these clinical signs varied in the different models studied suggesting a differential affect of the primary concerned fibres of small and large diameters.

The study of the differential expression of genes, using DNA microarrays, showed a large number of genes dysregulated in dorsal root ganglions at the end of the treatment by Vincristine. At the protein level, analysis of proteins linked to neuronal damage/ cell death suggested a selective lesion of large myelinated fibres. On the other hand, Oxaliplatin seems to lead preferentially to central modifications. Indeed, the results obtained with DNA microarrays indicate a large number of genes differentially expressed in the somatosensory cerebral cortex after treatment by Oxaliplatin whereas we observe very few genes differentially expressed in the dorsal roots ganglion and in spinal cord dorsal horn. This result seems validated by the increased number of p-Erk positive neurons in different cortical areas suggesting a central sensitization of certain cortical neurons in key structures of the integration of the painful message following a treatment by Oxaliplatin.

Finally the pharmacological studies brought to light new pharmacological targets in different model of neuropathic pain: i) we demonstrated that 5-HT<sub>2A</sub> receptor is an important mediator

of neuropathic pain development generated by Vincristine. ii) We also demonstrated that endogenous enkephalins are involved peripherally in neuropathic pain induced by Vincristine alleviation. iii) Finally, the complete pharmacological study realized on the model of EAE suggests that the symptoms observed (allodynia, hyperalgesia, hyperaesthesia) which are clinically relevant, symptoms are due to different mechanisms alleviated by different molecules.

<b>INTRODUCTION.....</b>	<b>3</b>
<b>1. LA DOULEUR.....</b>	<b>3</b>
1.1. <i>Douleur et Société</i> .....	3
1.2. <i>Définition de la douleur</i> .....	5
1.3. <i>Physiologie de la douleur</i> .....	7
1.3.1. De la périphérie à la moelle .....	7
1.3.2. De la moelle épinière au cerveau.....	9
1.4. <i>La prise en charge et le traitement de la douleur</i> .....	17
<b>2. PHYSIOPATHOLOGIE DE LA DOULEUR : LA DOULEUR CHRONIQUE.....</b>	<b>19</b>
2.1. <i>Les douleurs chroniques inflammatoires</i> .....	19
2.2. <i>Les douleurs chroniques neuropathiques</i> .....	21
2.2.1. Définition des douleurs neuropathiques.....	21
2.2.2. Traitement des douleurs neuropathiques utilisés en clinique .....	26
<b>3. LES MODELES ANIMAUX D'ETUDE DE LA DOULEUR CHRONIQUE.....</b>	<b>28</b>
3.1. <i>L'arthrite chronique induite par l'adjuvant de Freund chez le rat</i> .....	30
3.2. <i>Les modèles animaux de douleurs neuropathiques</i> .....	30
3.2.1. Les modèles lésionnels .....	30
3.2.2. Les modèles chimiotoxiques.....	32
<b>4. PHYSIOPATHOLOGIE DES DOULEURS NEUROPATHIQUES .....</b>	<b>35</b>
4.1. <i>Des modifications en périphérie</i> .....	35
4.1.1. Modifications électrophysiologiques .....	35
4.1.2. Modifications morphologiques .....	36
4.1.3. Blessure et mort cellulaire .....	37
4.1.4. Régulations de l'expression de protéines dans des modèles de douleur chronique neuropathique .....	39
4.2. <i>Des modifications centrales</i> .....	46
4.2.1. Des modifications dans la corne dorsale de la moelle épinière.....	46
4.2.2. Des modifications dans les structures supraspinales.....	47
<b>OBJECTIFS DE NOTRE ETUDE .....</b>	<b>49</b>
<b>CHAPITRE I : LA VINCRISTINE.....</b>	<b>52</b>
1. LA VINCRISTINE .....	52
1.1. <i>La Vincristine</i> .....	52
1.2. <i>Vincristine et douleurs neuropathiques</i> .....	53
2. ETUDE COMPORTEMENTALE, ANALYSE DE L'EXPRESSION DIFFERENTIELLE DE GENES ET EXPRESSION DE FOS DANS LA CORNE DORSALE DE LA MOELLE EPINIERE, DANS UN MODELE DE DOULEUR NEUROPATHIQUE INDUIT PAR UN TRAITEMENT A LA VINCRISTINE. ....	55
2.1. <i>Analyse de l'expression différentielle de gènes utilisant des puces à ADN</i> .....	55
2.2. <i>Résultats</i> .....	57
3. LA SEROTONINE ET LE RECEPTEUR 5-HT <sub>2A</sub> .....	102
3.1. <i>Classification et nomenclature des récepteurs sérotoninergiques</i> .....	102

3.2.	<i>Le rôle de la sérotonine et du récepteur 5HT<sub>2A</sub> dans les douleurs chroniques.</i>	103
3.3.	<i>Résultats</i>	106
4.	LES SYSTEMES OPIOÏDES ENDOGENES	126
4.1.	<i>Le rôle du système opioïde endogène dans les douleurs chroniques.</i>	126
4.2.	<i>Résultats</i>	128
<b>CHAPITRE II : L'OXALIPLATINE</b>		<b>138</b>
1.	L'OXALIPLATINE	138
1.1.	<i>L'Oxaliplatine</i>	138
1.2.	<i>Oxaliplatine et douleurs neuropathiques</i>	139
2.	ETUDE COMPORTEMENTALE, ANALYSE DE L'EXPRESSION DIFFERENTIELLE DE GENES ET ACTIVATION DE P-ERK DANS LE CORTEX SOMATOSENSORIEL, DANS UN MODELE DE DOULEUR NEUROPATHIQUE INDUIT PAR UN TRAITEMENT A L'OXALIPLATINE	140
2.1.	<i>Implication de la MAPkinase ERK dans la transduction du message douloureux</i>	140
2.2.	<i>Résultats</i>	143
<b>CHAPITRE III : LA SCLEROSE EN PLAQUE</b>		<b>184</b>
1.	LA SCLEROSE EN PLAQUE	184
1.1.	<i>Définition de la sclérose en plaque</i>	184
1.2.	<i>Epidémiologie</i>	185
1.3.	<i>Les différentes formes de la SEP et ses symptômes</i>	185
2.	CARACTERISATION DES MODIFICATIONS COMPORTEMENTALES SENSORIELLES OBSERVEES DANS UN MODELE DE SCLEROSE EN PLAQUE CHEZ LE RAT : ETUDE COMPORTEMENTALE ET PHARMACOLOGIQUE	188
2.1.	<i>Le modèle animal</i>	188
2.2.	<i>Résultats</i>	190
<b>DISCUSSION GENERALE</b>		<b>232</b>
1.	DIVERSITE DES MECANISMES SOUS-TENDANT L'APPARITION DES DOULEURS NEUROPATHIQUES	233
2.	DECOUVERTE DE NOUVELLE CIBLE THERAPEUTIQUE	237
2.1.	<i>Des canalopathies</i>	237
2.2.	<i>Le système sérotoninergique</i>	239
2.3.	<i>Le système opioïde endogène</i>	240
2.4.	<i>Les stimulations périphériques analgésiques</i>	241

# **Introduction**

# Introduction

## 1. La Douleur

### 1.1. Douleur et Société

La douleur n'est pas considérée ni prise en compte de la même manière selon les cultures. C'est ainsi que chaque peuple a sa propre conception de la douleur. Historiquement, dans de nombreuses sociétés, la douleur a souvent été associée à des valeurs religieuses. Ainsi, au sein de la religion catholique, la douleur est intimement liée à une notion de dévotion pour Dieu : «L'acceptation de la douleur est une forme possible de dévotion qui rapproche de Dieu, purifie l'âme. Elle fût longtemps considérée, surtout dans l'Antiquité et au Moyen Âge, comme une grâce particulière. (...) La mort de Jésus sur la croix est essentiellement un mystère de la souffrance, un récit de la rédemption par une douleur infinie seule propre à absorber l'infini péché de l'homme. Longtemps pour le chrétien la douleur est participation sur un mode mineur aux souffrances exemplaires du Christ... » ((Le Breton, 1995), p.89-91). Nous observons également une vision de la douleur comme « punition » d'une faute commise chez les individus hors du contexte religieux : « La douleur est une incisive figure du mal. Constant rappel de la fragilité morale de l'homme. (...) L'idée de la maladie méritée, de la souffrance venant punir la conduite réprouvée d'un individu est encore profondément enracinée dans les consciences contemporaines. » ((Le Breton, 1995), p. 104-105).





*Figure 1 : Jésus Christ au désert par Ivan Kramskoy (1872). «Lorsque vous en serez venu à trouver la souffrance douce et à l'aimer pour Jésus-Christ, alors estimez-vous heureux, parce que vous avez trouvé le paradis sur la terre. Mais, tandis que la souffrance vous sera amère et que vous la fuirez, vous vivrez dans le trouble, et la tribulation que vous fuirez vous suivra partout.» L'imitation de Jésus Christ, Livre 2, Chapitre 12 ; Traduction de Lamennais.*

Cette conception de la douleur est très présente dans notre culture, ce qui expliquerait que dans nos sociétés occidentales, principalement judéo-chrétiennes, la douleur a longtemps été vécue comme une fatalité et sous estimée, voir complètement occultée. Alain Serrie présente ainsi deux raisons au fait que la douleur n'a pas été suffisamment prise en compte dans sa totalité : « d'une part, la douleur est considérée comme un moyen de salut, d'autre part, parce qu'il n'existait que peu de traitements pour la soulager » (Serrie, 2009). Les avancées de la médecine au début du XX<sup>ème</sup> siècle, avec la découverte des sulfamides et des antibiotiques, ont permis de faire passer le médecin de l'état de spectateur à celui d'acteur. Le médecin peut ainsi intervenir et modifier l'évolution des pathologies. On voit apparaître un nouveau concept au sein de nos sociétés : celui de « sauver » les patients. Malheureusement, la prise en charge de la douleur reste négligée et on oublie qu'elle peut persister après la disparition des symptômes de la maladie.

## 1.2. Définition de la douleur

C'est finalement très récemment, à la fin du XX<sup>ème</sup> siècle, que la douleur commence à être perçue autrement et que la prise en charge de la douleur chez le patient devient un véritable enjeu pour la médecine. Il faut attendre 1979 pour que le Comité de Taxonomie de l'IASP (The International Association for the Study of Pain) donne une définition précise de la douleur : on appelle douleur « une expérience sensorielle et émotionnelle désagréable liée à des lésions tissulaires réelles ou potentielles ou décrites en des termes évoquant de telles lésions » (1979).

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

- Les douleurs par excès de nociception, qui sont provoquées par la mise en jeu des voies neuro-physiologiques de la douleur. Elles correspondent à la mise en jeu des mécanismes les plus fréquents : c'est-à-dire lorsqu'un processus pathologique active au niveau périphérique le système physiologique de genèse et de transmission des messagers nociceptifs. L'information est générée au niveau des récepteurs périphériques des tissus concernés, les nocicepteurs, à la suite d'un traumatisme, d'une infection, d'une inflammation, etc. Elle est ensuite transmise vers la moelle épinière puis vers les structures supraspinales.
- Les douleurs d'origine neuropathique, qui résultent d'une lésion soit du système nerveux périphérique, soit du système nerveux central. Ce type de lésion provoque des douleurs spontanées continues pouvant être ressentie comme des décharges électriques, des élancements, des brûlures et des picotements dans le territoire des nerfs atteints. C'est aussi la douleur que ressentent les malades amputés et en particulier la sensation perçue dans un membre qui a disparu (membre fantôme).
- Les douleurs idiopathiques, souvent d'origine psychologique, qui regroupent toutes les douleurs que l'on ne sait pas classer dans une des deux catégories précédentes. Ce sont des douleurs sans lésions apparentes, malgré un bilan médical approfondi. Il semble probable que des phénomènes psychiques amplifient cette sensation douloureuse, et que l'origine

psychologique de ces douleurs repose sur une psychopathologie effective comme la somatisation d'états anxieux ou une dépression masquée.

Il est également important de souligner le rôle du facteur temps dans l'appréhension de la douleur. On peut alors caractériser deux types de douleur selon son profil évolutif dans le temps:

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

- La douleur chronique : au delà de trois à six mois, c'est une douleur persistante et rebelle aux traitements usuels, dite alors chronique. Une douleur chronique ne possède aucune fonction physiologique et ne peut être envisagée que comme inutile et destructrice. On parle alors de « douleur-maladie » persistante au cours du temps, « ne protège pas l'homme, elle le diminue » disait Leriche (Leriche, 1936).

	<b>Aiguë Symptôme</b>	<b>Chronique Syndrome</b>
<b>Finalité biologique</b>	Utile, protectrice	Inutile, destructrice
<b>Mécanisme générateur</b>	Unifactoriel	Plurifactoriel
<b>Réactions somatovégétatives</b>	Réactionnelles	Habitude ou entretien
<b>Composante affective</b>	Anxiété	Dépression
<b>Comportement</b>	Réactionnel	Renforcé
<b>Modèle</b>	Médical classique	Pluridimensionnel Somato-psycho-social
<b>Objectif thérapeutique</b>	Curatif	Réadaptatif

*Tableau comparatif des douleurs aiguës et chronique (Boureau, 1988).*

### 1.3. Physiologie de la douleur

#### 1.3.1. De la périphérie à la moelle

##### *1.3.1.1. Genèse et propagation du message nociceptif: les neurones sensoriels primaires*

Le message nociceptif (à l'origine du message douloureux) résulte d'une stimulation d'intensité élevée des terminaisons nerveuses présentes dans les tissus cutanés, musculaires et articulaires et également des viscères. Ces stimulations sont encodées par des « nocicepteurs » constituant les terminaisons des fibres sensorielles périphériques. Les nocicepteurs sont des récepteurs sensoriels qui, lorsqu'ils sont cutanés, peuvent être de trois types différents :

- Les nocicepteurs unimodaux ou mécano-nocicepteurs qui répondent aux stimulations mécaniques intenses, de type pression, étirement, pincement, coupure. Ils sont presque toujours en relation avec les fibres A $\delta$ ;
- Les nocicepteurs multimodaux qui sont activés indifféremment par des stimulations nociceptives mécaniques ou thermiques ;
- Les nocicepteurs polymodaux, connectés essentiellement à des fibres C qui sont sensibles à toutes les variétés de stimulation intenses, mécaniques, électriques, thermiques ou chimiques. En effet, ces nocicepteurs peuvent être activés par certaines substances algogènes libérées au site de la lésion à la suite d'un traumatisme ou au cours d'un processus inflammatoire. A ce titre, ces nocicepteurs peuvent être considérés comme des chimiorécepteurs.

Les nocicepteurs cutanés ont pour caractéristiques un seuil de réponse élevé, nécessitant une stimulation intense, une absence d'activité spontanée et une sensibilisation par une

stimulation nociceptive répétée. Les fibres des nerfs périphériques jouent un rôle majeur dans le codage et la transmission de l'intensité de la douleur cutanée.

L'activation des terminaisons périphériques peut être la conséquence d'une stimulation nociceptive directe ou indirecte. En effet des substances algogènes qui activent ou sensibilisent les nocicepteurs sont libérées lors d'une lésion tissulaire. Dans cette « soupe inflammatoire » tissulaire les molécules libérées sont directement algogènes : la bradykinine, les prostaglandines, la sérotonine, le proton, certaines cytokines, les neuropeptides parmi lesquels la substance P et le CGRP, l'adrénaline ou encore l'histamine. La réaction inflammatoire est une réponse physiologique de défense, immédiate et transitoire, déclenchée par une lésion cellulaire ou tissulaire. Cette réponse peut devenir pathologique si elle est anormalement sévère ou durable. On observe alors le développement de douleur chronique de type inflammatoire.

Après leur trajet dans les nerfs périphériques, les fibres afférentes rejoignent le système nerveux central au niveau des racines postérieures du rachis ou bien au niveau des nerfs crâniens.

#### 1.3.1.2.

*Le premier relais : dans la corne dorsale de la moelle épinière*

Après activation des nocicepteurs, le message généré est véhiculé jusqu'à la corne postérieure de la moelle par les fibres de petit calibre myélinisées ( $A\delta$ , vitesse de propagation de 4 à 30 m/s), à l'origine de la douleur localisée et précise à type de pique, et par les fibres non myélinisées (C, vitesse de propagation de 0,4 à 2 m/s) à l'origine de la douleur diffuse, mal localisée, tardive à type de brûlure.

Les afférences primaires de gros diamètre myélinisées (A-alpha-bêta ( $A\alpha\beta$ ), vitesse de propagation de 30 à 120 m/s) sont associées aux récepteurs qui répondent aux stimulations mécaniques statiques ou dynamiques de faible intensité, comme le tact ou le toucher, mais ne répondent pas aux stimulations nociceptives.

Tous les corps cellulaires et les noyaux des neurones sensoriels primaires sont anatomiquement rassemblés dans les ganglions de la racine dorsale (GRD) (Figure 2).

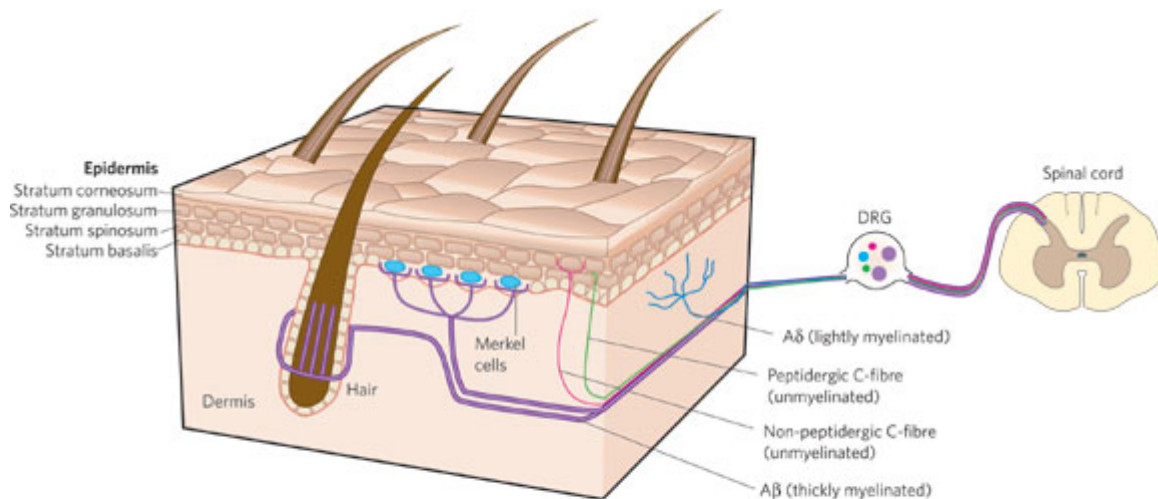


Figure 2 : Diversité des neurones sensoriels de la peau (Lumpkin and Caterina, 2007). Les fibres afférentes de gros diamètres myélinisées (violet) répondent aux stimulations de faible intensité tactile et ne répondent pas aux stimulations nociceptives. Les fibres myélinisées de petit diamètre A $\delta$  (bleu) répondent aux stimulations nociceptives localisées et précises. Les fibres non myélinisées C (rose et vert) répondent aux stimulations nociceptives diffuses, mal localisées et tardives. L'ensemble des corps cellulaires de ces fibres afférentes sont rassemblés dans les ganglions des racines dorsales (DRG).

### 1.3.2. De la moelle épinière au cerveau

Les fibres afférentes primaires rejoignent la moelle épinière par les racines dorsales. Les fibres A $\delta$  et C se séparent anatomiquement des grosses fibres tactiles, pour se terminer dans les couches superficielles et profondes de la corne dorsale de la moelle épinière (couches I, II, V, VI et VII). Elles émettent également des collatérales qui se prolongent dans les segments médullaires sus et sous-jacents sur deux ou trois segments spinaux de part et d'autre de leur segment d'entrée, constituant le tractus de Lissauer et réalisant un recouvrement important entre des territoires différents.

Les fibres de gros diamètres (A $\alpha\beta$ ) se divisent en 2 branches, l'une ascendante, l'autre segmentaire et descendante. La branche ascendante remonte jusqu'au bulbe rachidien par la voie des colonnes dorsales de la substance blanche spinale où elle établira sa première synapse dans les noyaux des colonnes dorsales. Les branches segmentaires et descendantes distribuent des collatérales dans 5 ou 6 segments spinaux où elles se terminent principalement dans les couches intermédiaires de la corne dorsale (III-IV) (Figure 3).

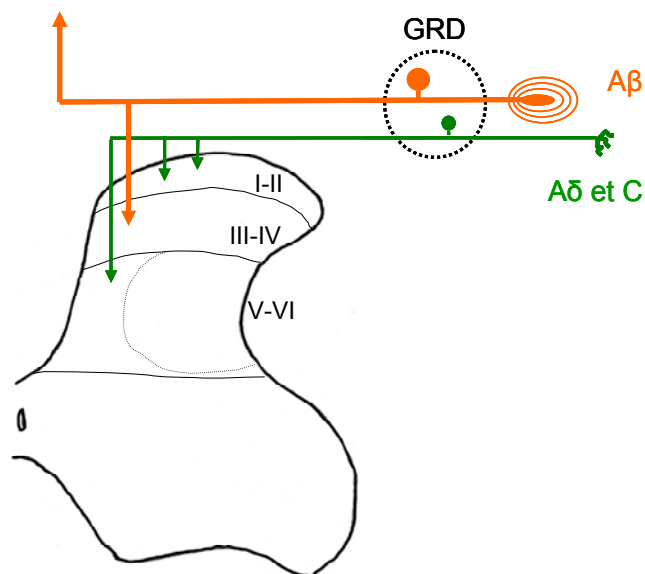


Figure 3 : Représentation schématique des terminaisons des fibres afférentes primaires au niveau de la corne dorsale de la moelle épinière lombaire. I-II : couches superficielles ; III-IV : couches intermédiaires ; V-VI : couches profondes ; GRD : ganglion des racines dorsales.

La première synapse dans la corne dorsale de la moelle épinière entre les neurones périphériques et les neurones spinaux se fait alors avec trois types de neurones.

Les neurones nociceptifs spécifiques répondent exclusivement à un stimulus nociceptif, de type thermique ou mécanique par exemple. Ils sont localisés principalement dans les couches superficielles (I et II). Leur champ récepteur, zone de genèse d'une activité neuronale, est de petite taille. Ils codent dans une certaine mesure l'intensité de la stimulation. Ces neurones ne reçoivent comme afférences périphériques que des fibres A $\delta$  et C.

Les neurones nociceptifs non spécifiques, sont aussi appelés « neurones à convergence » ou « neurone à large gamme dynamique » (*wide dynamic range* ou WDR). Leur corps cellulaire est localisé principalement dans les couches profondes (V-VI). Leur champ récepteur périphérique cutané présente un gradient de sensibilité : en effet, dans la partie centrale du champ périphérique, toute stimulation, qu'elle soit nociceptive ou non, active le neurone ; en revanche dans une zone plus périphérique, seules les stimulations nociceptives mettant en jeu les fibres A $\delta$  et/ou C déclenchent leur activité neuronale. Ces neurones sont activés à la fois par des stimuli nociceptifs et non nociceptifs. Ces neurones sont aussi dénommés à

convergence car ils répondent à des stimulations venant d'un champ récepteur cutané, viscéral, et/ou musculaire.

Les neurones non nociceptifs spécifiques répondent exclusivement à un stimulus non nociceptif. Ils sont localisés principalement dans les couches intermédiaires (III-IV).

#### *1.3.2.1. Neurochimie de la corne dorsale*

Les fibres afférentes primaires A $\delta$  et C libèrent dans l'espace synaptique des acides aminés excitateurs (glutamate, aspartate) et des peptides (substance P, Neurokinine A, CGRP, somatostatine, CCK, VIP). Le glutamate joue un rôle très important mais non exclusif dans la transmission du message douloureux aux neurones post-synaptique. On distingue plusieurs types de récepteurs du glutamate : les récepteurs ionotropiques comme le récepteur AMPA, le récepteur Kainate (KA) ou le récepteur NMDA (N Methyl D Aspartate), et les récepteurs métabotropiques liés aux protéines G. L'entrée massive de calcium dans la cellule via les récepteurs ionotropiques, ou l'activation des voies de transduction intracellulaires via les récepteurs métabotropiques vont déclencher une cascade de mécanismes intracellulaires: synthèse de NO et de prostaglandines, activation de différentes protéines kinases (PKC...) et expression de proto-oncogènes, comme les facteurs de transcription c-Fos et c-Jun. L'expression de ces gènes dits « gènes d'expression précoce » est un phénomène non spécifique d'activation neuronale, également mis en jeu dans la nociception, conduisant à la synthèse des protéines FOS et JUN. Ces gènes sont encore appelés proto-oncogènes car ils furent initialement découverts dans des processus associés au développement de cancers. Ces protéines contribuent à la régulation de la transcription de nombreux gènes, dont ceux de la pro-enképhaline et de la dynorphine.

#### *1.3.2.2. Les contrôles inhibiteurs médullaires*

Trois grands types d'inhibition de l'information douloureuse ont été décrits dans la corne dorsale de la moelle épinière.



Les phénomènes de convergence entre influx somatiques nociceptifs et non nociceptifs sur les neurones nociceptifs non spécifiques des couches profondes de la corne dorsale sont à l'origine d'un modèle proposé par Ronald Melzack et Patrick Wall, mettant en jeu un contrôle segmentaire spinal de l'activité de ces neurones. C'est la théorie du « contrôle de la porte » (« Gate control theory ») (Melzack and Wall, 1965) (Figure 4). Ainsi l'activation des fibres myélinisées de gros diamètre dans le champ cutané segmentaire stimulé met en jeu celle d'interneurones inhibiteurs qui vont bloquer la transmission de l'influx nociceptif vers les neurones nociceptifs non spécifiques des couches profondes de la corne dorsale : lorsque l'activité des fibres de gros diamètres A $\beta$  prédomine, les messages nociceptifs sont ainsi bloqués. Par contre lorsque les messages nociceptifs sont les plus importants, l'activité des fibres de petits diamètres A $\delta$  et C prédomine et inhibe celle des interneurones inhibiteurs : la « porte » s'ouvre et la transmission de l'information douloureuse vers le cerveau est assurée. Ces mécanismes peuvent également être contrôlés par d'autres systèmes de régulation qui s'exercent par l'intermédiaire d'acides aminés inhibiteurs comme la glycine ou l'acide gamma amino butyrique (GABA). Dès la publication de ce modèle, qui depuis a été largement modifié, Melzack et Wall avaient envisagé la mise en jeu de contrôles supraspinaux, non représenté sur ce schéma.

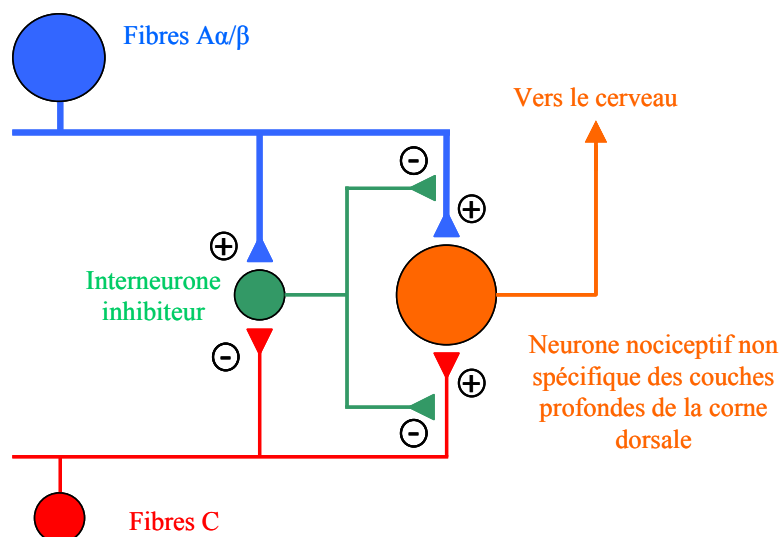


Figure 4 : Représentation schématique du contrôle de la porte (« Gate control ») selon Melzack et Wall (1965)

Le deuxième système d'inhibition dans la corne dorsale est le système opioïde endogène. Ainsi il existe de nombreux récepteurs pré- et post-synaptiques aux opioïdes. On en distingue trois familles : Mu, Delta et Kappa. Les agonistes du récepteur Mu, comme la morphine, bloquent l'activité des neurones nociceptifs spinaux. Ces récepteurs sont très largement distribués dans tout le système nerveux central, mais en particulier au niveau de la corne dorsale de la moelle épinière. Les endorphines sont des peptides endogènes qui miment l'action de la morphine et se fixent sur les récepteurs opioïdes. On dénombre trois grandes familles principales d'endorphines endogènes: la proenképhaline à l'origine des enképhalines, la pro-opio-mélanocortine à l'origine des bêta-endorphines et la prodynorphine à l'origine des dynorphines. Ces peptides opioïdes sont distribués largement dans les structures cérébrales, principalement celles impliquées dans la nociception, ainsi que dans la corne dorsale de la moelle épinière au niveau d'interneurones enképhalinerigiques. Ces peptides opioïdes endogènes modulerait alors, par des mécanismes pré- et/ou post-synaptique, le transfert de l'information douloureuse (Figure 5).

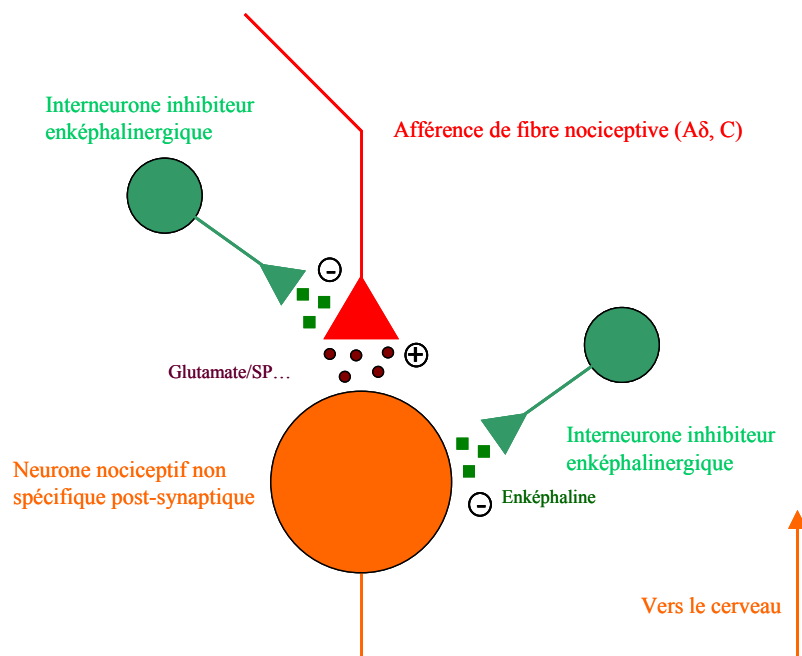


Figure 5 : Représentation schématique des synapses enképhalinerigiques dans la corne dorsale de la moelle épinière. On trouve des connexions au niveau pré-synaptique, sur les afférences primaires, et également au niveau post-synaptique, directement sur le neurone post-synaptique nociceptif non spécifique.

Enfin, le dernier type de contrôle inhibiteur mis en évidence dans la corne dorsale est exercé par « les contrôles inhibiteurs descendants ». Dès leur arrivée dans la corne dorsale de la moelle épinière, les influx douloureux sont soumis à des contrôles descendants issus principalement de structures du tronc cérébral (Figure 6). On distingue trois types principaux : les contrôles toniques, les contrôles déclenchés par stimulation de certaines régions cérébrales et les contrôles inhibiteurs diffus mis en jeu lors d'une stimulation nociceptive.

- Les contrôles inhibiteurs descendants toniques sont issus de la région bulbaire rostroventrale plus particulièrement à partir du Noyau Réticulaire Latéral (NRL). Ces contrôles s'exercent par l'intermédiaire de terminaisons monoaminergiques (sérotonine et noradrénaline) sur les neurones nociceptifs spinaux. La mise en évidence d'un contrôle inhibiteur tonique a été démontrée au début des années 70 (Hillman and Wall, 1969). L'existence d'un tel système inhibiteur tonique reste cependant controversée chez l'homme.

- Les contrôles inhibiteurs descendants déclenchés par des stimulations cérébrales sont également issus du tronc cérébral. Dans la région bulbaire rostroventrale, plusieurs noyaux ont été identifiés comme exerçant une fonction inhibitrice analgésique dont le noyau magnus du raphé ou le locus coeruleus par exemple. Ces noyaux sont eux même sous le contrôle de la Substance Grise Périaqueducule (SGPA) ventrale, située en amont dans le tronc cérébral. Originaires de cette région bulbaire, des fibres descendantes empruntent le funiculus dorso-latéral et vont établir des synapses avec les neurones spinaux à chaque étage segmentaire spinal exerçant un effet inhibiteur sur les neurones nociceptifs non spécifiques. Les neuromédiateurs impliqués dans ce système inhibiteur descendants sont les substances opioïdes (SGPA), la sérotonine (Noyau Raphé magnus) et la noradrénaline (locus coeruleus).

- Les contrôles inhibiteurs diffus déclenchés par des stimulations nociceptives font intervenir une boucle spino-bulbo-spinale, dont la partie ascendante est constituée par le faisceau spinoréticulaire. L'application d'un stimulus nociceptif sur une zone du corps éloignée du champ récepteur d'un neurone nociceptif non spécifique activé déclenche ce type d'inhibition sur ce même neurone. Ils sont exclusivement déclenchés par la mise en jeu de fibres A $\delta$  et C (principe de la contre irritation selon laquelle une douleur peut masquer une autre douleur).

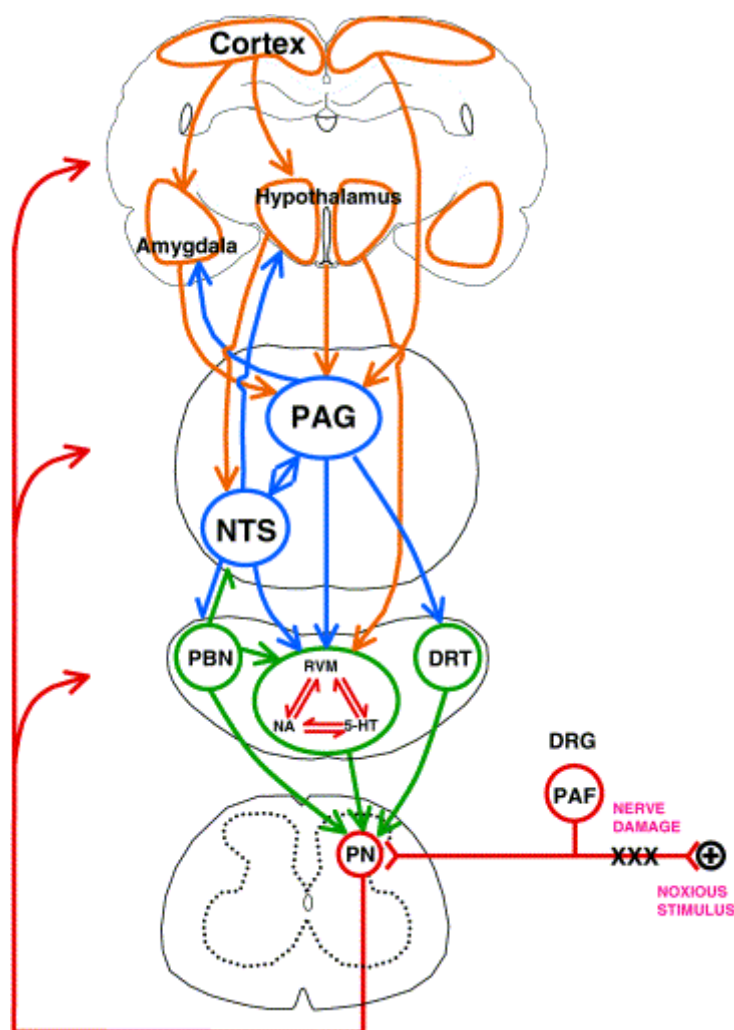


Figure 6 : Représentation schématique des interconnexions entre les structures supraspinales impliquées dans l'initiation et la modulation des contrôles inhibiteurs descendants. Abréviations : substance grise périaqueducal (PAG) ; NTS, noyau du tractus solitaire, PBN, noyau parabrachial, DRT, noyau dorso-réticulaire, RVM, noyau médullaire rostro-ventral, NA, noradrénaline ; 5-HT, sérotonine ; PAF : fibre afférente primaire ; DRG, ganglion des racines dorsale ; PN : neurone de projection. (Millan, 2002)

### 1.3.2.3.

### Les différentes voies ascendantes

Deux grandes divisions principales sont impliquées dans la transmission du message nociceptif vers les structures supra-spinales (Figure 7).

- La grande division latérale principalement constituée par le faisceau spino-thalamique. Il chemine au niveau du cordon antéro-latéral de la substance blanche de la moelle pour se projeter dans le thalamus ventro-postéro latéral spécifique de la somesthésie et de la

nociception, dans le cortex somatosensoriel primaire S1, puis dans le cortex somatosensoriel secondaire S2. Cette voie est également appelée « voie de la composante sensori-discriminative de la douleur » puisque c'est dans ces aires corticales que le caractère qualitatif, temporel et quantitatif du message douloureux va être analysé.

- La deuxième grande division, la grande division médiane, est principalement constituée par le faisceau spino-réticulaire qui chemine également au niveau du cordon antéro-latéral de la moelle pour se projeter dans le thalamus médian non spécifique en relayant au préalable dans la formation réticulée. Cette voie se prolonge ensuite vers les structures limbiques et le cortex pré-moteur pour se terminer dans différentes aires corticales comme le cortex cingulaire, le cortex insulaire et le cortex préfrontal. Cette voie est donc appelée « voie de la composante émotive et cognitive de la douleur », par l'intermédiaire de laquelle la composante émotionnelle du message douloureux va être intégrée. Mais c'est également par cette voie que va être mémorisée la douleur et va être générée une adaptation comportementale face à la situation.

- En plus de ces deux grandes divisions, plus récemment deux autres voies ont été décrites :

- la voie spino-ponto-amygdalienne par l'intermédiaire de laquelle la composante affective et émotionnelle de la douleur va être intégrée.

- et la voie spino-ponto-hypothalamique par l'intermédiaire de laquelle la composante végétative de la douleur va être intégrée.

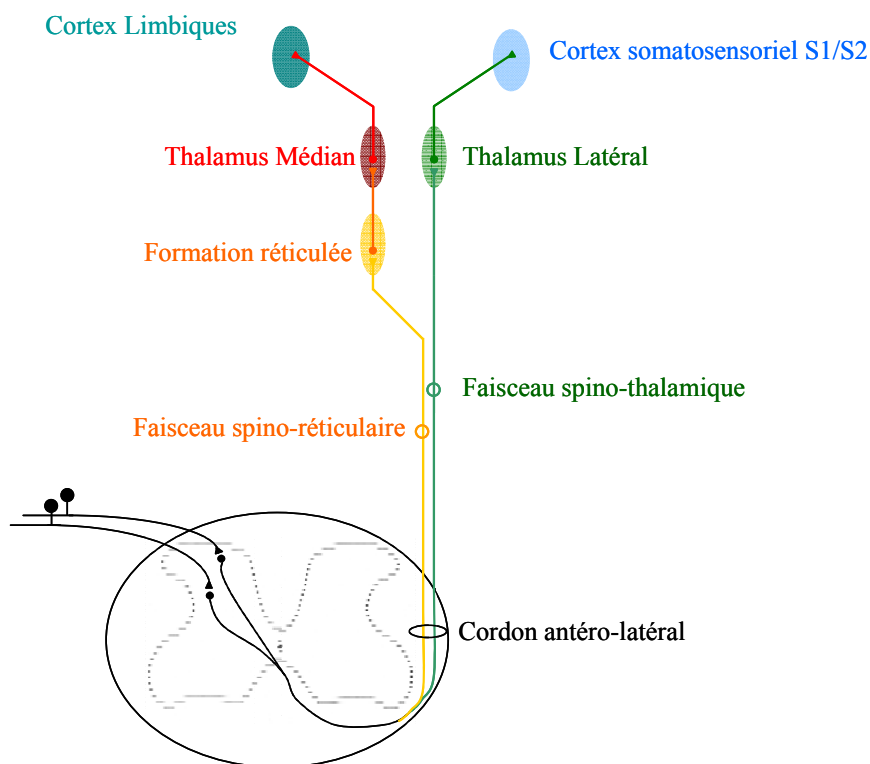


Figure 7 : Représentation schématique des deux principaux grands faisceaux ascendants de la transmission du message douloureux vers les structures supraspinales.

#### 1.4. La prise en charge et le traitement de la douleur

Les douleurs par excès de nociception sont prises en charge selon les cinq principes de l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) basés sur une prescription de traitement par la voie la moins invasive, à intervalles réguliers, selon une échelle d'intensité de la douleur, de façon adaptée aux besoins individuels et avec un constant souci du détail. L'OMS a publié, depuis longtemps, des échelles de la douleur avec une prise en charge par des médicaments antalgiques de plus en plus forts. Ainsi les traitements des douleurs par excès de nociception sont prescrits en respectant l'échelle de l'OMS à 3 paliers :

- I<sup>er</sup> palier de l'OMS : Antalgiques non opioïdes.

La douleur est en général peu intense et correspond à une évaluation du patient de 1 à 4 sur l'échelle visuelle analogique (Figure 8). Les antalgiques de palier I sont les anti-inflammatoires non-stéroïdiens (AINS), le paracétamol et l'aspirine. Une évaluation de

l'efficacité du traitement est alors réalisée et en cas de persistance de la douleur, le patient se voit prescrire des antalgiques de palier II.

- II<sup>ème</sup> palier de l'OMS : Association d'opioïdes faibles avec des antalgiques de palier I.

La douleur est plus intense et correspond à une évaluation du patient 4 à 8 sur l'échelle visuelle analogique. Les opioïdes faibles prescrits en association avec des antalgiques de palier I sont la codéine et le tramadol. De la même manière en cas de persistance de la douleur, le patient se voit prescrire des antalgiques de palier III.

- III<sup>ème</sup> palier de l'OMS : Opioïdes forts en association ou non avec des antalgiques non-opioïdes.

Les opioïdes forts sont la morphine, le fentanyl, l'oxycodone ou l'hydromorphone. La prescription d'antalgiques de palier III nécessite une surveillance très rigoureuse du patient et une rotation des opioïdes afin de s'affranchir des phénomènes de tolérance observés avec ces antalgiques.

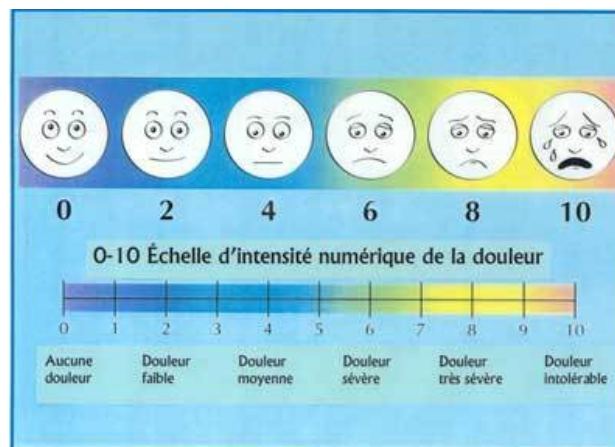


Figure 8 : Échelle visuelle analogique utilisée pour évaluer l'intensité de la douleur ressentie par le patient.

## 2. Physiopathologie de la douleur : la douleur chronique

Une douleur chronique n'est pas une douleur aiguë qui se prolonge dans le temps. Ainsi, la douleur persiste... pour rien. Mais qu'est-ce qu'une douleur chronique? Pourquoi certaines douleurs ne disparaissent-elles pas avec le temps et les traitements? On considère de plus en plus la douleur chronique comme une maladie du système nerveux en raison des changements physiopathologiques et neurochimiques qui surviennent chez les personnes atteintes de ce type de douleur. Avec le temps, la douleur entraînerait des changements dans les circuits nerveux du cerveau et de la moelle épinière. On voit ainsi apparaître la notion de « neuroplasticité » du système nerveux avec des sensibilisations périphériques dans les cas de douleur inflammatoire et de modification phénotypique des neurones du GRD dans les cas de douleur neuropathique. C'est pourquoi certains médecins et chercheurs estiment que la douleur chronique est une maladie en soi.

Il existe différentes causes possibles de douleur chronique comme par exemple :

- Une douleur associée à une maladie chronique qu'on ne peut traiter de façon adéquate et qui occasionne des douleurs chroniques: l'arthrose, la polyarthrite, le diabète, la sclérose en plaques, le cancer, le sida, la névralgie du trijumeau, etc.
- Une douleur aiguë mal soulagée, qui persiste au-delà du délai normal de guérison ou qui dure plus de six mois : après un accident de travail, une chirurgie, un épisode de zona, etc.
- Une douleur fantôme, à la suite d'une amputation, assimilée à une douleur neuropathique.

### 2.1. Les douleurs chroniques inflammatoires

On a coutume de séparer l'inflammation aiguë de l'inflammation chronique. Ces états diffèrent certes par leur durée d'évolution mais surtout par leur issue : l'un est un phénomène limité qui laisse peu ou pas de séquelles, l'autre en revanche finit par entraîner des remaniements et des destructions tissulaires, sources de douleurs et d'une incapacité fonctionnelle pérennes, voire définitives (Figure 9). Ainsi la prise en charge des douleurs



induites par des maladies comme la polyarthrite rhumatoïde, la spondylarthrite ankylosante, le rhumatisme psoriasique et bien d'autres encore est au cœur des préoccupations actuelles des rhumatologues. Une douleur inflammatoire est un phénomène complexe tant du fait des mécanismes initiateurs et de la physiopathologie que de la démarche clinique envisagés pour l'établissement d'un diagnostic étiologique. La prise en charge médicamenteuse des douleurs inflammatoires est indissociable de celle de l'inflammation dans sa globalité. C'est pourquoi cette prise en charge repose essentiellement sur la prescription des anti-inflammatoires non-stéroïdiens ou stéroïdiens. Malheureusement si les AINS sont très efficaces, il n'en reste pas moins qu'ils entraînent de nombreux effets secondaires d'autant plus importants que le traitement est long. Parmi les effets indésirables les plus classiques, les effets secondaires digestifs et cardiovasculaires sont très fréquents et limitent l'utilisation des AINS en situation chronique. Il en est de même pour les anti-inflammatoires stéroïdiens ou les corticoïdes dont les effets secondaires en chronique sont très importants. Il faut enfin savoir que le recours au traitement immunomodulateur, dont les biothérapies, permet une amélioration progressive de l'inflammation dans sa globalité et, de ce fait, des douleurs inflammatoires, sur le long terme. Ces nouveaux immunomodulateurs, également appelés traitements biologiques, sont des biomédicaments issus de procédures de fabrication par génie biologique. Dans la plupart des cas, il s'agit d'anticorps monoclonaux réalisés pour être dirigés contre une cible spécifique, comme par exemple un anticorps monoclonal anti-TNF. Il peut également s'agir d'une protéine recombinante mimant les effets d'une cytokine ou d'un antagoniste naturel. Ces molécules ont l'avantage de ne pas avoir d'interférence avec d'autres médicaments et de ne pas subir les modifications liées au métabolisme hépatique ou rénal. Les voies de recherche des biothérapies sont immenses, non seulement dans les rhumatismes inflammatoires chroniques mais également dans de nombreux autres domaines où les biothérapies ne suscitent pas un intérêt spéculatif à des fins thérapeutiques.

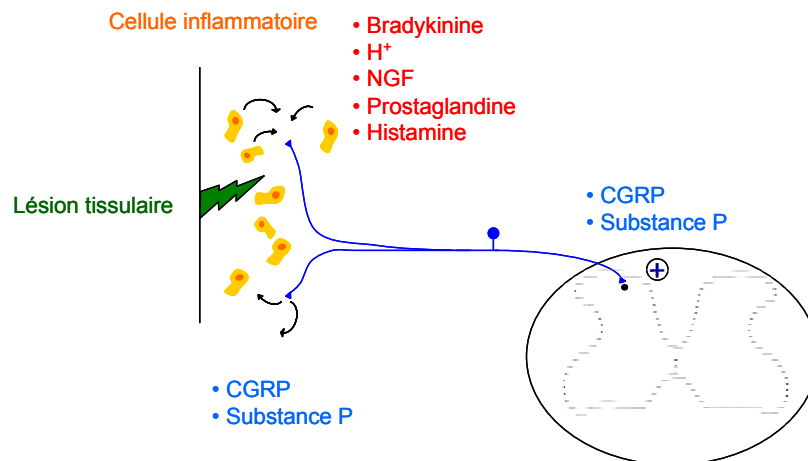


Figure 9 : Représentation schématique des mécanismes inflammatoires.

## 2.2. Les douleurs chroniques neuropathiques

### 2.2.1. Définition des douleurs neuropathiques

Le terme de « douleur neuropathique » a été introduit en 1994 par l’IASP. Durant ces dernières années, des tentatives pour définir plus précisément les douleurs neuropathiques se sont succédées. De nombreuses définitions ont été proposées générant des critiques plus ou moins importantes quand aux termes employés. Gary Bennett posa même le problème dans son éditorial dans « Anesthesia and Analgesia » en 2003 : « Douleur Neuropathique : une crise de la définition » (Bennett, 2003). Une nouvelle définition a été proposée et adoptée par un groupe d’expert de l’IASP en août 2008 : « douleur secondaire à une lésion ou une maladie affectant le système somatosensoriel ».

De nombreuses controverses persistent encore actuellement en ce qui concerne les critères pris en compte dans l'élaboration du diagnostic d'une neuropathie périphérique. Certains privilégient la manifestation de symptômes cliniques caractéristiques très particuliers comme la manifestation de sensation anormale non douloureuse spontanée ou provoquée. On observe ainsi un grand nombre de patients présentant des paresthésies, caractérisées par un trouble de la sensibilité, désagréable pouvant être de type fourmillement, picotements ou engourdissements. Les neuropathies périphériques se caractérisent également par la manifestation de dysesthésie, qui correspond à une tonalité désagréable, obsédante, inquiétante de ces phénomènes inhabituels. Elles s'expriment généralement par l'exacerbation d'un certain type de sensibilité et se manifestent par des sensations d'engourdissement ou de picotements.

Les douleurs neuropathiques sont caractérisées par l'apparition de douleurs spontanées qui peuvent être continues, elles sont alors décrites comme une "douleur de fond", le plus souvent comme une sensation de brûlure, parfois comme une striction, un arrachement, un broiement. Ces douleurs spontanées peuvent également être paroxystiques, à type de fulgurances perçues comme des décharges électriques.

Enfin ces douleurs neuropathiques sont caractérisées par l'apparition de modifications sensorielles en réponse à une douleur provoquée, symptômes cliniques décrits comme les allodynies ou les hyperalgésies (Figure 10). L'allodynie est une sensation douloureuse générée par une stimulation de faible intensité normalement non douloureuse. L'hyperalgésie est une réponse exagérée à une stimulation douloureuse. Ces réponses provoquées peuvent être observées à la suite de stimulation mécanique, statique ou dynamique, ou thermique. Ainsi les patients présentant des douleurs neuropathiques peuvent ressentir des douleurs très importantes à la suite d'un simple frottement cutané léger qui correspond alors à une allodynie mécanique dynamique. De la même manière, ils peuvent ressentir des douleurs intenses au contact d'eau froide ou tiède, on parle alors d'allodynie thermique au froid ou au chaud. On observe également des formes d'hyperesthésie chez les patients neuropathiques, qui correspondent à une exagération physiologique ou pathologique de la réponse à une stimulation. Enfin dans certains cas, on observe des hypoalgésies : c'est-à-dire une diminution paradoxale de la douleur évoquée par un stimulus normalement douloureux.

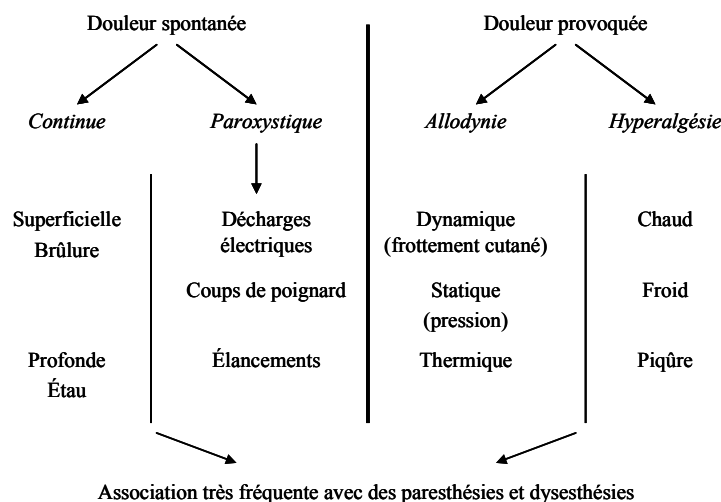


Figure 10 : Symptômes caractéristiques d'une douleur neuropathique d'après Guastella V (2009).

La priorité clinique des praticiens est d'établir le diagnostic d'une douleur neuropathique à partir des symptômes décrits par le patient lors d'une consultation. Le vocabulaire employé par le patient pour décrire sa douleur est alors l'élément le plus important pour le médecin pour établir son diagnostic. Mais il a également à sa disposition des instruments qui lui permettent de caractériser des douleurs neuropathiques, tels que les filaments de Von Frey pour le diagnostic des allodynies mécaniques statiques, les sondes thermiques pour celui des allodynies thermiques au chaud ou au froid, le diapason pour les troubles de la sensibilité profonde. De nombreux autres outils d'aide au diagnostic ont été élaborés pour faciliter la pratique des médecins sous la forme de questionnaires, validés comme outil de diagnostic et d'évaluation pour la douleur neuropathique. Par exemple, l'outil diagnostic DN4 (Douleur Neuropathique en 4 questions) a été validé sur une cohorte de 160 patients douloureux dont 89 présentaient des douleurs attribuées à une lésion nerveuse périphérique et 71 des douleurs liées à des lésions arthrosiques. Le DN4 comporte dix items répartis en quatre questions. L'étude de validation a permis d'établir qu'un score d'au moins quatre permettait d'orienter vers le diagnostic de douleur neuropathique avec une spécificité de 89.9% et une sensibilité de 82.9% (Bouhassira et al., 2005). Le DN4 a été validé en français. Cet outil utilise tous les descriptifs communs considérés comme les plus discriminants pour les douleurs neuropathiques (Figure 11). On retrouve les descriptifs comme « brûlure », « décharges électriques », « fourmillements/picotements » ou encore « douleur induite par le frottement ».

## QUESTIONNAIRE DN4 : un outil simple pour rechercher les douleurs neuropathiques

Pour estimer la probabilité d'une douleur neuropathique, le patient doit répondre à chaque item des 4 questions ci dessous par « oui » ou « non ».

**QUESTION 1 :** la douleur présente-t-elle une ou plusieurs des caractéristiques suivantes ?

	Oui	Non
1. Brûlure	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
2. Sensation de froid douloureux	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
3. Décharges électriques	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

**QUESTION 2 :** la douleur est-elle associée dans la même région à un ou plusieurs des symptômes suivants ?

	Oui	Non
4. Fourmillements	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
5. Picotements	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
6. Engourdissements	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
7. Démangeaisons	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

**QUESTION 3 :** la douleur est-elle localisée dans un territoire où l'examen met en évidence :

	Oui	Non
8. Hypoesthésie au tact	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
9. Hypoesthésie à la piqûre	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

**QUESTION 4 :** la douleur est-elle provoquée ou augmentée par :

	Oui	Non
10. Le frottement	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

OUI = 1 point

NON = 0 point

Score du Patient : /10

### MODE D'EMPLOI

Lorsque le praticien suspecte une douleur neuropathique, le questionnaire DN4 est utile comme outil de diagnostic.

Ce questionnaire se répartit en 4 questions représentant 10 items à cocher :

- ✓ Le praticien interroge lui-même le patient et remplit le questionnaire
- ✓ A chaque item, il doit apporter une réponse « oui » ou « non »
- ✓ A la fin du questionnaire, le praticien comptabilise les réponses, 1 pour chaque « oui » et 0 pour chaque « non ».
- ✓ La somme obtenue donne le Score du Patient, noté sur 10.

Si le score du patient est égal ou supérieur à 4/10, le test est positif (sensibilité à 82,9 % ; spécificité à 89,9 %)

D'après Bouhassira D *et al. Pain* 2004 ; 108 (3) : 248-57.

Figure 11 : L'outil diagnostic DN4 (Bouhassira *et al.*, 2005)

Il existe plusieurs origines possibles pour l'apparition de douleur neuropathique.

Ainsi, on observe l'apparition de douleurs neuropathiques à la suite de traumatismes centraux. Une lésion du système nerveux central, comme la moelle épinière, peut être à l'origine de douleur neuropathique. De même, il est fréquent d'observer des patients présentant des douleurs neuropathiques à la suite d'un accident vasculaire cérébral (AVC).

Les douleurs centrales post-AVC sont connues en particulier depuis le syndrome de Déjerine-Roussy ou encore appelé « syndrome thalamique » résultant de la lésion d'aires plus ou moins discrètes du VPL thalamique. Le syndrome thalamique est caractérisé par une perturbation de la sensation corticale associée à une hyperesthésie et des douleurs marquées. Les sensations et les sentiments tant plaisants que déplaisants sont exagérés. La prise en charge de ces douleurs neuropathiques centrales est très difficile. Un progrès thérapeutique récent est apparu avec la stimulation du cortex moteur qui semble jouer un rôle de neuromodulation des zones corticales de contrôle de la douleur (Tsubokawa et al., 1991a; Tsubokawa et al., 1991b).

Des douleurs neuropathiques peuvent également apparaître à la suite d'une amputation d'un membre. Les douleurs du membre fantôme sont ressenties par au moins deux tiers des nouveaux amputés, et au-delà d'un an près d'un tiers s'en plaignent encore. Il y a une très grande variabilité dans les douleurs du membre fantôme. Elles sont complexes et souvent résistantes aux traitements antalgiques usuels. Ces douleurs sont liées à la disparition d'un champ périphérique ou à la déafférentation du champ périphérique qui en est à l'origine. L'amputation d'un membre entraîne une réorganisation des cartes corticales de l'Homoculus sensoriel de Penfield et donc une atteinte de l'image corporelle du patient. Les douleurs du membre fantôme semblent corrélées avec l'importance des modifications corticales.

Enfin des douleurs neuropathiques peuvent survenir lors d'une maladie chronique. On peut alors les séparer en deux classes : les douleurs générées par la maladie et les douleurs générées par les traitements prescrits contre une maladie que l'on appelle « douleurs iatrogènes ».

Dans le premier cas, on peut citer les douleurs neuropathiques générées à la suite d'une infection comme un épisode de zona. L'herpès zoster est une infection virale résultant d'une rougeole. Après une rougeole, le virus peut rester dormant pendant des années et être réactivé

à n'importe quel moment déclenchant alors un zona. Ceux qui ont souffert d'un zona connaissent les douleurs dues à l'éruption du zona, mais celles-ci peuvent revenir en l'absence de traitement. Certains patients continuent de souffrir des zones qui ont été infectées, même lorsque le zona a disparu. Cet état s'appelle névralgie post-herpétique.

Des maladies chroniques comme le diabète, la sclérose en plaque ou encore le cancer, entraînent également l'apparition de douleurs neuropathiques. Les douleurs iatrogènes sont quant à elles implicitement liées au traitement prescrit. Parmi ces derniers, on peut citer les traitements contre le virus de l'immunodéficience humaine (VIH) ou encore les chimiothérapies anticancéreuses.

## 2.2.2. Traitement des douleurs neuropathiques utilisés en clinique

La multiplicité des mécanismes et des symptômes cliniques évoqués ci-dessus rend difficile la mise au point d'un traitement unique des douleurs neuropathiques. Il est vraisemblable que chaque symptôme (douleurs spontanées, allodynie, hyperalgésie, hyperesthésie) rend compte de mécanismes distincts et doit donc bénéficier d'un traitement spécifique. Les études cliniques ont montrées la faible efficacité des antalgiques usuels, y compris la morphine pourtant considérée comme un antalgique parmi les plus puissants utilisés. Il a donc fallu trouver de nouveaux antalgiques afin de soulager ce type de douleurs chez les patients, et c'est souvent de manière fortuite que ces antalgiques ont été trouvés. La description qui suit n'a pas pour but d'être exhaustive quant aux médicaments prescrits pour le soulagement des douleurs neuropathiques mais de présenter de manière succincte les différentes classes de médicaments présentant une certaine efficacité pour soulager les douleurs.

### 2.2.2.1. *Les antidépresseurs*

L'efficacité des antidépresseurs pour le soulagement des douleurs neuropathiques a été mise en évidence par Paoli et collaborateurs en 1960 (PAOLI et al., 1960), et est maintenant bien établie. Les antidépresseurs agissent sur la plupart des différents types de douleurs

neuropathiques: aiguës, sourdes, à type de brûlures, lancinantes, y compris l'allodynie. Plusieurs anciennes molécules ont fait la preuve de leur efficacité sur la base d'études contrôlées (Imipramine, Clomipramine, Amitriptyline). Mais les inhibiteurs mixtes de recapture sérotonine / noradrénaline (Venlafaxine ou plus récemment Duloxétine) semblent aujourd'hui plus efficaces bien que certains auteurs distinguent des patients répondeurs aux inhibiteurs sélectifs de la noradrénaline seule et d'autres aux inhibiteurs de la sérotonine seule.

#### 2.2.2.2. *Les antiépileptiques*

L'efficacité des anticonvulsivants dans le traitement des douleurs neuropathiques est également bien établie. La Carbamazépine est l'une des premières molécules à avoir obtenu l'Autorisation de Mise sur le Marché dans la prise en charge des douleurs neuropathiques. Le Clonazepam, la Gabapentine ou encore la Prégabaline ont également montré leur efficacité sur ce type de douleurs. L'efficacité de cette classe de molécules résulte de leur propriété inhibitrice de l'activité des canaux ioniques activateurs (sodique et calcique).

#### 2.2.2.3. *Les anesthésiques locaux*

L'efficacité des anesthésiques locaux a été bien démontrée dans les douleurs liées aux neuropathies diabétiques et zostériennes. La Lidocaïne par exemple agit en bloquant les canaux sodiques membranaires, inhibant ainsi les décharges ectopiques au site lésionnel. Les anesthésiques locaux peuvent également être utilisés en application locale lorsque la zone douloureuse n'est pas trop étendue.



Les opioïdes restent toutefois utilisés y compris la Morphine en deuxième intention. Ainsi, il n'est pas rare de prescrire du Tramadol, de la Codeïne, seuls ou en association avec du paracétamol, ou encore du Fentanyl, tous des dérivés opioïdes, pour le traitement des douleurs neuropathiques.

Cette pharmacothérapie des douleurs neuropathiques reste très empirique et malheureusement seul 30 à 35% des patients répondent aux traitements actuels. Il est évident qu'il existe un réel manque de traitement efficace en clinique. C'est pourquoi il est essentiel de développer de nouveaux modèles d'étude et de chercher de nouvelle cible pharmacologique afin d'améliorer la prise en charge des douleurs neuropathiques.

### **3. Les modèles animaux d'étude de la douleur chronique**

Dans ce paragraphe, je me focaliserai sur l'étude des douleurs chroniques chez le petit animal. En effet, jusqu'à il y a peu de temps, les études expérimentales effectuées chez l'animal ont concerné principalement l'étude de la nociception. Tout l'enjeu de la recherche fondamentale dans le domaine de l'étude de la douleur chronique a été d'établir de nouveaux modèles expérimentaux chez l'animal pour mieux comprendre les mécanismes qui sous-tendent ces douleurs. Les nouveaux modèles se sont développés en recherchant des analogies avec ce qui est décrit en clinique. Le but principal de l'étude de ces modèles en recherche fondamentale est d'acquérir des connaissances qui pourront ensuite être utilisées pour le traitement des douleurs chroniques chez l'homme. De telles études réalisées chez l'animal, en particulier pour les modèles de douleur chronique, sont limitées par des règles éthiques très bien définies par des recommandations publiées par l'IASP, des directives de la Commission des Communautés Européennes et de l'Institut National de la Santé des USA.

En effet, l'utilisation expérimentale de l'animal, notamment dans le domaine de la douleur, impose le respect de principes qui confèrent à l'expérimentateur de grandes responsabilités. En outre, le chercheur doit épargner à l'animal toute souffrance inutile et mettre en œuvre les méthodes permettant de limiter les douleurs quand elles sont inévitables. Ces principes s'appliquent à la fois aux modèles animaux de douleur aiguë et de douleur chronique. À ce titre, les chercheurs travaillant dans le domaine de la douleur, fédérés au sein de l'IASP, ont créé des guides standards éthiques dès 1980. De cette réflexion sont nées une législation et une réglementation relatives à la protection des animaux d'expérience, tant au niveau national qu'europpéen. L'expression « expérimentation animale » est entendue au sens de la réglementation en vigueur selon les articles r214-87 à r214-90 du code rural. L'expérimentation animale s'inscrit dans les dispositions prévues de la loi du 10 juillet 1976 relative à la protection de la nature, et le décret d'application y inclut des dispositions relatives aux expériences pratiquées sur les animaux. Par ailleurs, la directive n° 86/609/CEE du 24 novembre 1986, concernant la protection des animaux utilisés à des fins expérimentales, est en cours de modification. Il est notamment question de rendre obligatoire l'évaluation éthique des protocoles expérimentaux. Un Comité national de réflexion éthique en expérimentation animale a été créé par le décret n° 2005-264 du 22 mars 2005. La charte éthique créée par ce comité illustre la légitimité de l'utilisation de l'animal en expérimentation biomédicale, tout en rappelant que les animaux sont des êtres sensibles et pourvus de capacités cognitives et émotionnelles et qu'à ce titre, l'expérimentateur doit s'assurer de leur bien-être. Enfin, le Comité national promeut la règle anglo-saxonne des méthodes alternatives, dite règle des 3R (Replace-Reduce-Refine), c'est-à-dire : remplacer chaque fois que possible l'utilisation des animaux par une méthode alternative ; réduire au maximum le nombre des animaux ; améliorer les méthodes expérimentales pour atténuer les douleurs de l'animal.

Deux types de modèles sont principalement utilisés pour étudier les douleurs chroniques chez le petit animal : l'un de type inflammatoire chez le rat par déclenchement d'une arthrite chronique, l'autre se rapprochant des douleurs neuropathiques.

### 3.1. L'arthrite chronique induite par l'adjuvant de Freund chez le rat

Ce modèle consiste à permettre le développement d'une arthrite auto-immune disséminée chez le rat, par injection intradermique d'une solution concentrée d'adjuvant de Freund à la base de la queue. La première description de ce syndrome a été faite par Pearson et collaborateurs dans laquelle ils ont précisé l'évolution de l'inflammation et la nature des lésions essentiellement articulaires. Ce modèle est très bien caractérisé et présente quatre phases : (I) la phase préclinique ; (II) à partir du 12<sup>ème</sup> jour après l'inoculation, la phase aiguë entre la 3<sup>ème</sup> et la 4<sup>ème</sup> semaine, au cours de laquelle on observe le développement d'une hyperalgésie ; (III) une phase post-aiguë au cours de laquelle les symptômes observés sont toujours présents mais régressent petit à petit pour atteindre (IV) la phase de guérison à partir de la 9<sup>ème</sup> semaine. L'ensemble des travaux réalisés sur ce modèle en particulier au cours de la phase aiguë ont permis de le valider comme modèle de douleur chronique inflammatoire chez le rat (Calvino et al., 1987; Colpaert et al., 1982; de Castro et al., 1981).

### 3.2. Les modèles animaux de douleurs neuropathiques

#### 3.2.1. Les modèles lésionnels

A l'origine se sont surtout des sections de nerfs sciatiques (Wall et al., 1979) ou des racines dorsales des nerfs cervico-thoraciques (Lombard et al., 1979) qui ont été utilisés chez le rat dans le but d'introduire des symptômes pouvant être proches de ceux observés chez l'homme à la suite de déafférentation ou de névrome. Plusieurs semaines après ce type de lésion, le rat présente des signes d'automutilation par autophagie progressive des doigts de la patte déafférentée. Un tel résultat est difficilement acceptable du point de vue éthique et ces modèles ne sont plus utilisés. Des modèles se sont alors développés mettant en jeu des lésions du tronc nerveux moins massives. C'est ainsi qu'on a décrit des modèles de lésions partielles de nerfs chez le rat et la souris, préservant en partie l'innervation sensorielle et

motrice du membre lésé, à l'origine de manifestations comportementales évoquant des douleurs neuropathiques.

L'un des premiers modèles validé a été celui de Bennett et Xie, basé sur la pose de ligatures partielles lâches le long du tronc commun du nerf sciatique (CCI) (Bennett and Xie, 1988). Les animaux présentent alors des modifications comportementales comme une hyperalgésie mécanique et thermique au chaud par exemple. En s'inspirant de cette procédure, d'autres modèles ont été mis en place : une ligature serrée d'une partie (entre un tiers et la moitié) du tronc commun du nerf sciatique, modèle de « Seltzer » (PSNI) (Seltzer et al., 1990) ; ou une ligature serrée ipsilatérale des racines dorsales L5 et L6, modèle de « Kim and Chung » (SNL) (Kim and Chung, 1992) (Figure 12). Ces deux modèles reproduisent également des symptômes de douleurs neuropathiques du même type que ceux qui ont été décrits avec le modèle de « Bennett and Xie » mais avec des caractéristiques différentes.

On peut également citer le modèle de la ligature du nerf infra orbitaire. Ce modèle est basé sur une constriction du nerf et a été caractérisé pour la première fois par Vos et collaborateurs (Vos et al., 1994). Les rats présentent alors des modifications comportementales persistantes dans le temps. Pendant les deux premières semaines postopératoires, les rats présentent une augmentation de l'activité de toilettage du côté lésé tandis que la réactivité à la stimulation de cette région diminue. A partir de la troisième semaine postopératoire, les rats présentent une augmentation limitée des réponses à la stimulation sur le territoire de la ligature mais une augmentation très importante dans les aires entourant ce territoire (Vos et al., 1994).

modèle	Spontané	Autotomie	Hyperalgésie mécanique	Allodynie mécanique	Hyperalgésie au chaud	Allodynie au froid	Latéralité
CCI (1988)	+	(+)	+	+	+	?	Uni
PSNI (1990)	+	-	+	+	+	-	Bi
SNL (1992)	+	-	?	+	+	+	Bi

*Tableau comparatif des différentes composantes des modèles lésionnels*

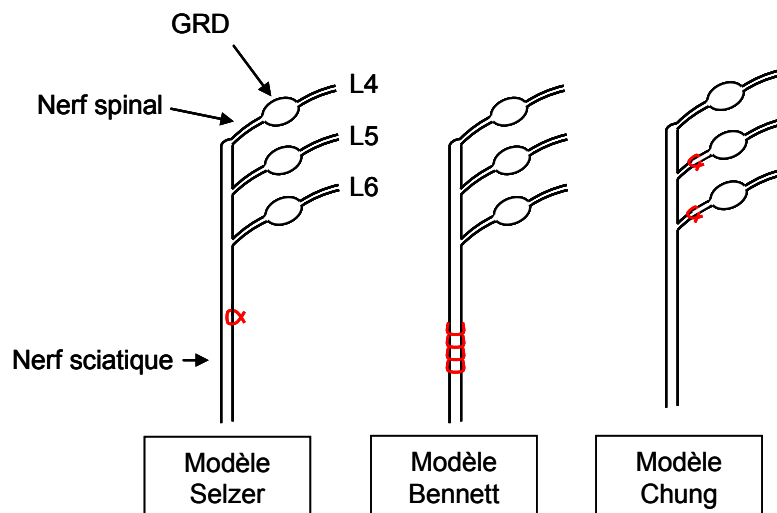


Figure 12 : Représentation schématique des différents modèles lésionnels

L'ensemble de ces modèles ont entraîné de nombreuses controverses notamment sur la non reproductibilité des expériences de ligature lâche ou partielle des nerfs. Le modèle de Kim et Chung présente la plus grande reproductibilité puisqu'on réalise une ligature serrée des nerfs malheureusement ce modèle produit une composante inflammatoire importante résultante des lésions générées. Enfin ce dernier modèle présente le désavantage d'avoir une chirurgie lourde.

### 3.2.2. Les modèles chimiotoxiques

#### 3.2.2.1. Divers modèles physiopathologiques

Le modèle de diabète expérimental à la streptozocine chez le rat comme modèle de douleur chronique a été validé en 1986 par Forman et collaborateur (Forman et al., 1986) qui ont mis en évidence d'une diminution des seuils de réponse à la plaque chaude chez des rats diabétiques (STZ). Depuis ce modèle a essentiellement été caractérisé par Courteix et

collaborateur (Courteix et al., 1993). Dans ce modèle, les rats, rendus diabétiques par injection de streptozocine par voie intra-péritonéale, présentent des signes caractéristiques des douleurs neuropathiques deux semaines après induction du diabète. Les expérimentateurs ont observés des modifications des réactions des animaux à des stimulations nociceptives et non-nociceptives pouvant correspondre à l'apparition d'une hyperalgésie et d'une allodynie. Ce modèle a été controversé du fait de l'état de santé général détérioré des animaux (réduction de la prise de poids corporel, polyurie, diarrhée, vessie distendue). Il a été montré qu'un traitement chronique à l'insuline, à une dose ajustée pour rétablir une normo-glycémie, permet d'améliorer l'état général des rats.

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

Un modèle de douleur neuropathique induit par le cancer des os a été développé chez les souris en 1999 (Schwei et al., 1999). Ce modèle est induit par injection de cellules de sarcome ostéolytique dans l'espace médullaire du fémur de la souris. Les expérimentateurs ont observé que la palpation du genou, qui est un stimulus non nociceptif chez l'animal contrôle, induisait un comportement nociceptif positivement corrélé avec l'extension des destructions osseuses. Ce modèle a été récemment adapté chez le rat par injection intra-tibiale de cellules de carcinome de glande mammaire de rat (Medhurst et al., 2002). Les animaux traités présentent une allodynie mécanique. Ce modèle a l'avantage de présenter une procédure chirurgicale utilisée pour l'inoculation des cellules cancéreuses beaucoup moins invasive que celle utilisée dans le modèle souris (injection nécessitant une chirurgie intra-articulaire) qui de fait n'interfère pas avec le comportement nociceptif de l'animal.

Enfin un modèle de sclérose en plaque chez le petit animal a été développé. En effet, expérimentalement, on peut produire des leuco-encéphalo-myélites par injection à certaines souches de souris avec un adjuvant de Freund et un extrait de myéline (ou de protéine basique de la myéline, ou de certains peptides de cette protéine) ; c'est le modèle de l'Encéphalite dite allergique expérimentale (EAE). **Ce modèle sera développé dans le chapitre III de notre thèse.**

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

Les agents anticancéreux sont prescrits au cours de chimiothérapies faisant ainsi partie des méthodes de lutte anticancéreuse, au même titre que la chirurgie et la radiothérapie. Il s'agit d'un traitement systémique, diffusant dans tout l'organisme, qui a pour objectif de détruire les cellules malignes issues de la tumeur d'origine. Ces substances chimiques agissent sur la division des cellules, entraînant leur mort, mais leur cytotoxicité leur permet de s'attaquer à toutes les cellules de l'organisme en cours de division et provoque donc de nombreux effets secondaires au traitement.

La classification des agents anticancéreux se fait selon leur mécanisme d'action sur le cycle cellulaire et selon leur appartenance à des familles chimiques. On distingue cinq familles d'anticancéreux :

- Les médicaments altérant l'ADN comprenant :
  - les agents alkylants (chlométhine)
  - les agents intercalants (daunorubicine)
  - les inhibiteurs de la topoisomérase I et II (irinotécan, étoposide)

- les intermédiaires électrophiles ; les dérivés du platine (cisplatine, carboplatine, oxaliplatine : **ce modèle sera développé dans le chapitre II de notre thèse**)

- Les antimétabolites comprenant:

- le 5-fluoro-uracile  
- le mercaptopurine

- Les inhibiteurs enzymatiques :

- de la thymidylate synthase = raltitrexed  
- de la ribonucléide diphosphate réductase = hydroxyurée  
- de la dihydrofolate réductase = méthotrèxate

- Les cytokines comme l'interféron alpha

- Les médicaments altérant le fuseau mitotique comprenant:

- les alcaloïdes de la pervenche : vinblastine, vincristine (**ce modèle sera développé dans le chapitre I de notre thèse**), vindésine, navelbine  
- les taxanes : taxol, paclitaxel.

## 4. Physiopathologie des douleurs neuropathiques

### 4.1. Des modifications en périphérie

#### 4.1.1. Modifications électrophysiologiques

Les modifications périphériques décrites dans les modèles animaux sont multiples, et leur rapport avec les différents symptômes est loin d'être élucidé. En périphérie, on observe des décharges ectopiques dans les fibres myélinisées et amyéliniques dans les modèles lésionnels



comme le modèle de constriction du nerf sciatique (Kajander and Bennett, 1992). De nombreuses études ont montré des modifications électrophysiologiques au niveau des fibres afférentes primaires. Des modifications de la sensibilité des fibres afférentes primaires ont été observées dans d'autres modèles de douleurs neuropathiques. Ainsi, dans le modèle de douleur neuropathique induite par le diabète (streptozocine STZ), une hypersensibilité aux stimuli mécaniques a été observée (Ahlgren and Levine, 1994). De plus, il a été montré une augmentation du nombre de décharges cinq minutes après l'arrêt de la stimulation dans une sous-population de fibres C chez les animaux STZ :  $38.7 \pm 13.1$  potentiels d'action pendant 5 min comparé à  $9.3 \pm 2.3$  potentiels d'action pendant 5 min pour les animaux contrôles (Ahlgren et al., 1992). Cette augmentation du nombre de potentiels d'action cinq minutes après l'arrêt de la stimulation peut être qualifiée d'hyperexcitabilité. Cette même modification électrophysiologique a également été observée chez des patients présentant des douleurs chroniques de type névralgique (Koltzenburg et al., 1994).

#### 4.1.2. Modifications morphologiques

Il a été décrit dans le modèle de Bennett et Xie, de nombreuses modifications morphologiques des fibres afférentes primaires. Les différentes études ont montrés une perte des fibres myélinisées et non-myélinisées (Basbaum et al., 1991). Cette étude révèle une diminution de 34 à 71% des fibres non-myélinisées dans la partie distale du nerf en comparaison avec la partie proximale. De manière intéressante, il a été observé que la perte des fibres myélinisées était corrélée au développement de l'hyperalgésie thermique observée dans ce modèle (Coggeshall et al., 1993). Enfin, les études sur ce type de modèle lésionnel ont montré que les axones des fibres qui survivent présentent des modifications de leur aspect général et sont déformés (Basbaum et al., 1991).

### 4.1.3. Blessure et mort cellulaire

#### 4.1.3.1. *Mort cellulaire et apoptose*

Au niveau des ganglions des racines dorsales, le devenir des neurones lésés dépend fortement du type de lésion effectuée. Les études réalisées sur un modèle de section complète du nerf sciatique ont permis de mettre en évidence une mort neuronale tardive qui affecte de 30 à 37% des cellules ganglionnaires, principalement des petits neurones (Himes and Tessler, 1989; Tandrup et al., 2000).

L'apoptose est un processus physiologique entraînant la mort cellulaire programmée de la cellule. Ce processus permet un contrôle de l'organisme sur le nombre de cellule et la taille des tissus. Il permet également une protection de l'homéostasie cellulaire et tissulaire en cas de modifications physiologiques. Le mécanisme d'apoptose est gouverné par deux voies principales d'activation : une voie dite extrinsèque, impliquant des récepteurs appartenant à la superfamille des récepteurs au TNF et une voie dite intrinsèque mettant particulièrement en jeu la mitochondrie, cette voie est gouvernée par des protéines appartenant à la superfamille de Bcl-2. Ces deux voies conduisent à l'activation de protéases à cystéine appelées caspases, responsables des phénomènes morphologiques et biochimiques observés : arrêt de la réplication, fragmentation du noyau et du cytosquelette entraînant la formation de corps apoptotiques phagocytés par les cellules environnantes.

L'incapacité des cellules à se soumettre à la mort cellulaire apoptotique pourrait être impliquée dans la pathogenèse de diverses maladies humaines y compris le cancer, les maladies auto-immunes et les infections virales. A l'opposé, un grand nombre de pathologies pourrait résulter d'une augmentation du taux de mort cellulaire. En effet, il a été montré que dans certains modèles de douleurs neuropathiques comme ceux induits par le diabète (Obrosova et al., 2002), les traitements anticancéreux (Groninger et al., 2002) ou encore le traitement contre le sida (Cory et al., 2000), une mort cellulaire est décrite. Des études ont également montré qu'une inhibition des activateurs et des effecteurs de certaines caspases entraînait une diminution des douleurs observées chez les rats dans le modèle ddC (Joseph and Levine, 2004). Il est intéressant de noter qu'une activation partielle des voies

apoptotiques n'engendre pas forcément une mort cellulaire (Perfettini and Kroemer, 2003) mais pourrait contribuer au développement des douleurs neuropathiques observées dans ces modèles.

#### 4.1.3.2.

#### *Blessure cellulaire*

L'un des marqueurs de blessure cellulaire les plus connus est le facteur de transcription ATF3 (*activating transcription factor 3*). Le facteur ATF a été caractérisé pour la première fois en 1987 par sa capacité à se fixer sur une séquence consensus 'CGTCA' (Lee et al., 1987). Les premières expériences visant à déterminer le rôle physiologique d'ATF3 ont révélé qu'il s'agissait d'un facteur induit par divers stress cellulaires. C'est dans le cas de lésions du système nerveux que le rôle d'ATF3 en tant que marqueur spécifique de « blessures cellulaires » a été mis en évidence. Ainsi une axotomie ou une atteinte nerveuse induite par l'injection de formaline dans la patte postérieure du rat entraîne une augmentation de l'expression d'ATF3 dans les neurones périphériques. En revanche, une inflammation locale induite par injection d'adjuvant de Freund par voie sous-cutanée dans la patte postérieure n'induit pas ce facteur (Tsujino et al., 2000). L'induction du facteur ATF3 semble corrélée à l'importance de la lésion tissulaire (Obata et al., 2003). Les conséquences de l'induction d'ATF3 dans des états pathologiques sont encore controversées. En effet, le rôle de cette induction lors de lésions nerveuses n'est pas encore clairement défini. La surexpression d'ATF3 a été rapportée comme délétère à la physiologie de la cellule, contribuant à la mort cellulaire dans un modèle animal de sclérose latérale amyotrophique (Vlug et al., 2005), et au contraire bénéfique c'est-à-dire s'opposant à la mort cellulaire induite par injection d'acide kaïnique (Francis et al., 2004). Il a même été proposé l'hypothèse selon laquelle l'induction du facteur ATF3 favoriserait la croissance neuritique et participerait ainsi à la régénérescence des nerfs périphériques après lésion (Seijffers et al., 2007). De tous ces éléments contradictoires, on ne peut formuler que l'hypothèse selon laquelle l'expression du facteur ATF3 dans les neurones à la suite de lésions de nerfs périphériques pourrait être considérée comme un marqueur d'altérations fonctionnelles de ces cellules.

#### 4.1.4. Régulations de l'expression de protéines dans des modèles de douleur chronique neuropathique

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

##### 4.1.4.1. Canaux ioniques

- Les canaux sodiques

La nomenclature des canaux sodiques/ $\text{Na}^+$  suit la nomenclature de l'ensemble des canaux ioniques (Figure 13).

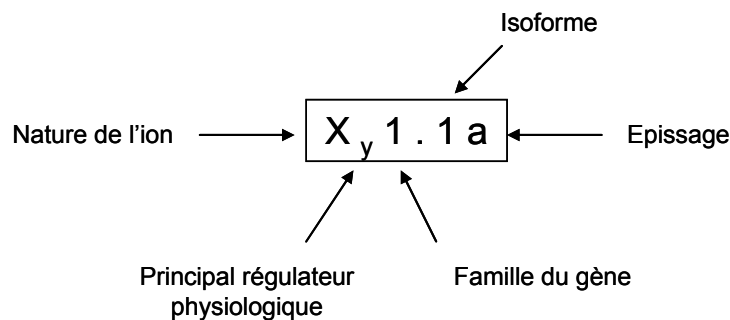


Figure 13 : Nomenclature des canaux ioniques

Les canaux  $\text{Na}^+$  voltage dépendant ( $\text{Na}_v$  x.x) sont des hétérotrimères  $\alpha\beta_1\beta_2$  (Figure 14). Seule la sous-unité  $\alpha$  est indispensable à l'activité électrique, mais les sous-unités  $\beta$  stabilisent le

canal. La sous-unité alpha est transmembranaire (4 domaines avec séquences homologues, D1-D4, contenant chacun 6 hélices alpha (S1-S6). Elle forme le pore du canal c'est dans cette sous-unité que l'on trouve le senseur de potentiel et les différents sites de liaisons de drogues (tétrodotoxine...).

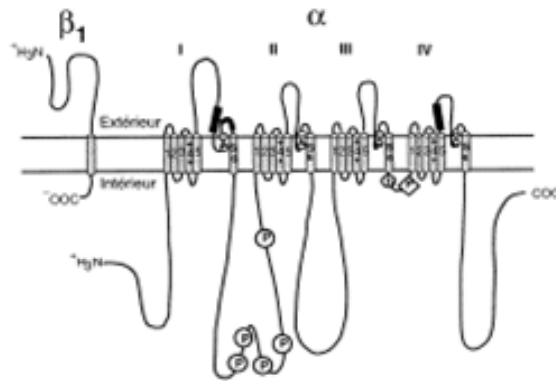


Figure 14 : Structure du canal  $\text{Na}^+$  voltage dépendant (la sous-unité  $\beta 2$  n'est pas représentée dans cette figure)

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

Depuis de nombreux sous types de canaux  $\text{Na}^+$  ont été identifiés comme étant impliqués dans le développement et/ou le maintien des douleurs neuropathiques. Ainsi, des études utilisant le principe de la « perte de fonction » par la technique des oligonucléotides antisens et des 'siRNA' ont mis en évidence l'importance du canal sodique  $\text{Na}_v1.8$  dans la neurophysiologie et les effets comportementaux observés dans des modèles de douleurs neuropathiques après ligature du nerf spinal ou une lésion par constriction des nerfs (Porreca et al., 1999;Lai et al., 2002;Dong et al., 2007). Une étude récente propose un transport axonal local de l'ARNm du canal  $\text{Na}_v1.8$  au niveau du site de la lésion, l'augmentation de la protéine sur ce site pourrait

contribuer à l'hyperexcitabilité observée dans la partie proximale du nerf lésé (Thakor et al., 2009). D'autres sous-types de canaux sodiques ont également été décrits pour leur implication dans l'hyperexcitabilité engendrée par les douleurs neuropathiques :  $Na_v1.3$  et  $Na_v1.7$ . En effet, le premier semble contribuer à l'excitabilité neuronale dans un modèle de ligature chez le rat (Black et al., 1999). Le deuxième a été mis en évidence comme contribuant à l'hyperexcitabilité neuronale dans différents modèles de douleur chez l'homme (Fertleman et al., 2006; Cox et al., 2006; Catterall and Yu, 2006). Il est intéressant de noter que l'une de ces études chez l'homme a montré qu'une mutation par perte de fonction de ce canal entraînait une insensibilité congénitale à la douleur (Cox et al., 2006). La mutation par gain de fonction de ce canal chez l'homme génère quant à elle, une diminution des seuils nociceptifs en condition d'inflammation chronique. Il a également été montré que des mutations empêchant l'inactivation de ce canal semblent causer des douleurs aiguës paroxystiques (Yang et al., 2004; Fertleman et al., 2006).

- Les canaux calciques

Les canaux calciques voltage dépendant représentent une des voies majeures d'entrée de calcium dans la cellule nerveuse. Sur la base de propriétés électrophysiologiques, cette famille est subdivisée en deux classes: les canaux à « bas seuil d'activation » activés par de faibles dépolarisations membranaires et les canaux à « haut seuil d'activation » activés pour de plus fortes dépolarisations membranaires. La classe des canaux à bas seuil d'activation regroupe exclusivement les canaux de type T alors que la classe des canaux à haut seuil d'activation comprend les canaux de type L, P/Q, N, et R. Chacun de ces canaux présente des propriétés biophysiques et pharmacologiques propres.

	Sous-unité $\alpha_1$	Courant	Localisation
Canaux à haut seuil d'activation	$\alpha_{1S}$ (Ca <sub>v</sub> 1.1)	Type L	Muscle squelettique
	$\alpha_{1C}$ (Ca <sub>v</sub> 1.2)		Neurones, cœur, muscles lisses, cellules endocrines
	$\alpha_{1D}$ (Ca <sub>v</sub> 1.3)		Neurones, cœur, cellules endocrines
	$\alpha_{1F}$ (Ca <sub>v</sub> 1.4)		Rétine
	$\alpha_{1A}$ (Ca <sub>v</sub> 2.1)	Type P/Q	Neurones, cellules pancréatiques $\beta$
	$\alpha_{1B}$ (Ca <sub>v</sub> 2.2)	Type N	Neurones
	$\alpha_{1E}$ (Ca <sub>v</sub> 2.3)	Type R	Neurones, cellules endocrines
	Canaux à bas seuil d'activation	$\alpha_{1G}$ (Ca <sub>v</sub> 3.1)	Type T
$\alpha_{1H}$ (Ca <sub>v</sub> 3.2)		Neurones, cœur, muscles lisses, cellules endocrines	
$\alpha_{1I}$ (Ca <sub>v</sub> 3.3)		Neurones, spermatozoïdes	

*Classification moléculaire et localisation tissulaire des canaux calciques dépendants du voltage.*

Au niveau structural, les canaux Ca<sup>2+</sup> voltage dépendant se composent d'une sous-unité principale  $\alpha_1$ , centrée autour de sous-unités auxiliaires  $\beta$ ,  $\gamma$  et  $\alpha_2\delta$  dont les principales fonctions sont de moduler l'expression membranaire de la sous-unité  $\alpha_1$ , son comportement biophysique ainsi que ses propriétés pharmacologiques (Figure 15).

Ces canaux calciques semblent également contribuer au développement et/ou au maintien des douleurs neuropathiques. En effet, on sait que l'entrée de calcium, Ca<sup>2+</sup>, dans la cellule participe à la régulation de nombreux mécanismes, incluant l'activation de kinases impliquées dans les voies de transduction du message douloureux ou encore la libération par exocytose des neurotransmetteurs et des neuromodulateurs stockés dans les vésicules pré-synaptiques dans les terminaisons centrales des fibres sensorielles primaires.

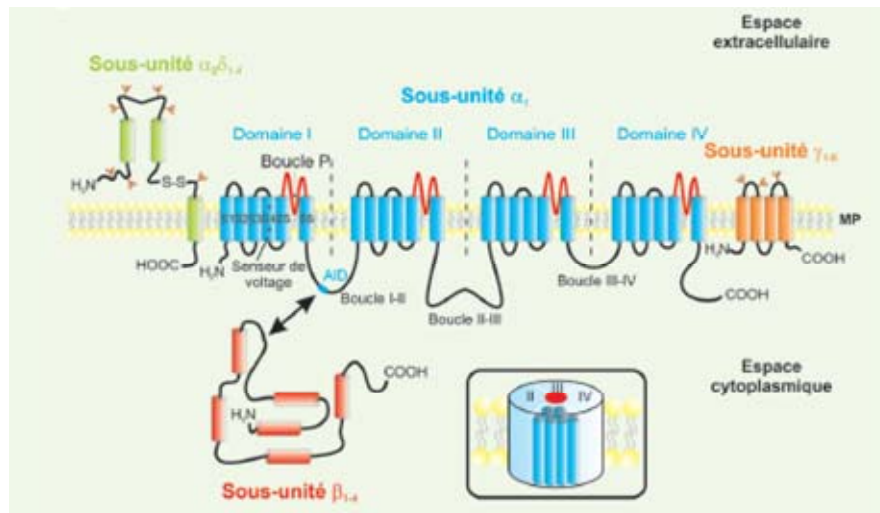


Figure 15 : Organisation membranaire présumée des canaux calciques dépendants du voltage et des sous-unités régulatrices. Les canaux calciques voltage dépendant se composent d'une sous-unité principale  $\alpha 1$  (en bleu) formant le pore ionique. Les sous-unités régulatrices des canaux à haut seuil d'activation sont également représentées. Ces sous-unités auxiliaires modulent les propriétés biophysiques de la sous-unité  $\alpha 1$ . La sous-unité  $\beta$  (en rouge) est entièrement cytoplasmique. La sous-unité  $\gamma$  (en orange) est entièrement membranaire et glycosylée. La sous-unité  $\alpha 2\delta$  (en vert) est essentiellement extracellulaire et ancrée à la membrane plasmique par la partie  $\delta$  de la protéine (Weiss and De Waard, 2006).

Il est intéressant de noter que de nombreuses études ont montré une augmentation significative de la sous-unité  $\alpha 2\delta$ -1 dans de nombreux modèles de douleurs neuropathiques. La sous-unité  $\alpha 2\delta$ -1 contribue à la régulation des propriétés des canaux calciques voltage dépendant de type N et L en augmentant la fonctionnalité de ces canaux ce qui aurait pour conséquence une augmentation du «trafficking» des canaux (Canti et al., 2005). L'augmentation de cette sous-unité semble contribuer au développement des douleurs neuropathiques. Cette augmentation d'expression, observée pour l'ARNm de la sous-unité  $\alpha 2\delta$ -1 (Newton et al., 2001; Wang et al., 2002) mais également pour la protéine dans les ganglions des racines dorsales (Li et al., 2004), coïncide avec l'apparition de l'allodynie mécanique dans le modèle de ligature des nerfs spinaux (Li et al., 2004). La surexpression de la sous-unité  $\alpha 2\delta$ -1 chez la souris entraîne l'apparition d'une allodynie mécanique en absence de toute lésion nerveuse (Li et al., 2006). De plus, il est intéressant de noter que la gabapentine et la prégabaline, qui présentent des effets bénéfiques sur le traitement des douleurs neuropathiques chez l'homme, sont des ligands de cette sous-unité (Brown and Gee, 1998; Field et al., 2006). Enfin, Field et collaborateur ont montré qu'une souris exprimant une sous-unité  $\alpha 2\delta$ -1 présentant une mutation empêchant la fixation des gabapentinoïdes développait des douleurs neuropathiques insensibles à la gabapentine et à la prégabaline



(Field et al., 2006). Tous ces arguments contribuent à valider le fait que cette sous-unité joue un rôle important dans les douleurs neuropathiques. Récemment, il a été montré que la gabapentine produisait une inhibition des courants calciques par réduction de l'expression des sous-unités des canaux calciques  $Ca_v\alpha1$  et  $\alpha2\delta$  à la membrane plasmique inhibant alors le « trafficking » des ces canaux calciques (Hendrich et al., 2008).

Enfin d'autres types de canaux calciques ont été découverts comme étant impliqués dans les douleurs neuropathiques. Ainsi il a été décrit que les canaux calciques de type T (famille des canaux calciques de type  $Ca_v3$ ) participaient à la transmission du message nociceptif mais également aux douleurs chroniques associées à une lésion périphérique (Todorovic et al., 2004; Jevtovic-Todorovic and Todorovic, 2006). Ainsi, il a été montré récemment qu'une constriction du nerf sciatique entraînait une augmentation des courants calciques des canaux  $Ca_v3.2$  de type T dans les neurones de petits diamètres (Jagodic et al., 2008).

- Les canaux potassiques

Les canaux potassiques semblent également jouer un rôle dans les douleurs neuropathiques. Par exemple, les canaux potassiques ATP-sensibles ( $K_{ATP}$ ), qui sont connus pour réguler l'excitabilité membranaire et la libération des neurotransmetteurs, ont été rapportés comme atténuant l'hyperexcitabilité des neurones sensoriels induite par une inflammation périphérique (Chi et al., 2007). De plus, une étude récente a montré que ces canaux étaient présents sur les neurones sensoriels de petit et de large diamètre et que leur activité dans les neurones de large diamètre diminuait à la suite d'une lésion de nerf périphérique (Kawano et al., 2009). Les courants générés par ces canaux,  $I_{K(ATP)}$ , participent, à l'état basal, au maintien du potentiel membranaire des neurones de large diamètre. Mais cette contribution est atténuée après axotomie, suggérant ainsi un rôle dans l'hyperexcitabilité des neurones de large diamètre dans les douleurs neuropathiques (Kawano et al., 2009). Il a également été montré une diminution de l'expression de certains gènes de canaux potassium voltage dépendant ( $K_v$ ) dans les ganglions des racines dorsales dans le modèle de douleurs neuropathiques après constriction du nerf sciatique (Kim et al., 2002). Cette diminution d'expression des canaux potassiques voltage dépendant pourrait contribuer à l'excitabilité neuronale et à la genèse des décharges ectopiques observée dans ces modèles.

#### 4.1.4.2.

#### *Peptides*

De la même manière, de nombreuses études ont révélé des modifications d'expression de peptides activateurs, comme par exemple une diminution de l'expression de la substance P, du CGRP et une augmentation de l'expression de neuropeptides inhibiteurs comme la galanine dans les corps cellulaires des fibres périphériques à la suite d'une axotomie (Hokfelt et al., 1994). Noguchi et collaborateurs ont également montré que cette diminution d'expression de la substance P était spécifique des neurones de petits diamètres et que simultanément on observait une augmentation de l'expression de ce peptide dans les neurones de moyens et larges diamètres (Noguchi et al., 1994). On observerait donc un changement phénotypique des fibres A $\beta$  qui exprimeraient la substance P, ce qui aurait pour conséquence une libération de ce peptide après stimulation des fibres de gros diamètres. Ce processus pourrait fournir un mécanisme potentiel supplémentaire pour expliquer qu'une stimulation normalement non nociceptive soit intégrée comme nociceptive par l'organisme.

#### 4.1.4.3.

#### *Récepteurs*

Un grand nombre de récepteurs ont également été rapportés comme étant impliqués dans les douleurs neuropathiques. Pour ne citer qu'un exemple, des études ont montré une diminution de l'expression des récepteurs  $\mu$ -opioïdes sur les terminaisons axonales pré-synaptique et sur les corps cellulaires des neurones nociceptifs post-synaptiques après lésion de nerf (Kohno et al., 2005). En situation physiologique basale, la libération de glutamate par les terminaisons pré-synaptiques est inhibée par l'activation de nombreux récepteurs couplés aux protéines G y compris les récepteurs  $\mu$ -opioïdes. La diminution de l'expression de ces récepteurs pourrait alors contribuer à l'augmentation de la libération de glutamate dans de la corne dorsale de la moelle épinière.

L'ensemble de ces études ont permis ainsi de mettre en évidence le rôle d'un certain nombre de protéines potentiellement impliquées dans le développement et/ou le maintien des douleurs

neuropathiques. Il n'en reste pas moins que ces études restent focalisées sur un petit nombre de protéines spécifiques connues pour être impliquées dans la douleur chronique, et empêchent ainsi d'avoir une vision d'ensemble des modifications phénotypiques observées dans ces modèles.

## 4.2. Des modifications centrales

### 4.2.1. Des modifications dans la corne dorsale de la moelle épinière

Les douleurs neuropathiques génèrent des modifications de l'activité neuronale, également appelées : « sensibilisation centrale », du fait de la neuroplasticité du système nerveux central dès la corne dorsale de la moelle épinière. Cette sensibilisation centrale peut se traduire sur trois niveaux : une augmentation de l'excitabilité des neurones post-synaptiques générant une augmentation de leur réponse aux stimuli ; une activation de la microglie qui contribue au développement de cette sensibilisation ; des changements dans l'activité des contrôles descendants. Toutes ces modifications ont pour conséquence de générer une hyperexcitabilité auto-entretenu des neurones nociceptifs de la corne dorsale qui se traduit par la survenue de décharges spontanées.

De nombreuses études ont montré le rôle des modifications de l'activité des neurones post-synaptiques dans la sensibilisation centrale. La dépolarisation initialement induite par le glutamate, la substance P et d'autres peptides excitateurs, permet l'activation des récepteurs glutamatergiques NMDA post-synaptiques par la levée de l'inhibition tonique exercée par l'ion  $Mg^{2+}$  obturant le pore du canal dans les conditions physiologiques et donc l'ouverture d'un canal cationique. Cette ouverture entraîne une entrée de calcium dans la cellule participant à l'activation des neurones post-synaptiques (Dougherty et al., 1993; Yoshimura and Yonehara, 2006). Les récepteurs glutamatergiques AMPA (alpha-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionate) semblent également participer à la sensibilisation centrale. Une augmentation du  $Ca^{2+}$  dans les neurones post-synaptiques lors de la transmission synaptique est une cible importante pour les changements à court et à long terme dans le système nerveux central des vertébrés. Il a été démontré que les récepteurs AMPA étaient

exprimés dans une sous-population de neurones de la corne dorsale de la moelle épinière et qu'ils participaient à une entrée du  $\text{Ca}^{2+}$  dans les cellules post-synaptiques. Ce mécanisme pourrait contribuer à la création d'une potentialisation à long terme (LTP) des neurones de la corne dorsale (Gu et al., 1996). De plus, l'expression des récepteurs AMPA est augmentée dans les couches superficielles de la corne dorsale de la moelle épinière dans le modèle SNL (Harris et al., 1996). Enfin, une augmentation d'expression des ARNm des récepteurs AMPA et NMDA a été démontrée dans le modèle du rat diabétique (Tomiyama et al., 2005).

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

#### 4.2.2. Des modifications dans les structures supraspinales

De nombreuses études ont été menées sur les modifications générées par les lésions à l'origine de douleurs neuropathiques dans les centres modulateurs supraspinaux de la douleur localisés dans la région bulbaire rostroventrale: la substance grise périaqueducale (SGPA), le noyau magnus du raphé, le locus coeruleus. Les données rapportées sur les effets de lésion d'un nerf montrent que l'activité des neurones de ces régions semble dépendant du type de modèle de neuropathie induit chez le rat. Ainsi Pertovaara et Kauppila rapportent une augmentation unilatérale de l'activité des neurones de la région bulbaire rostroventrale après section d'un nerf sciatique (Pertovaara and Kauppila, 1989), tandis qu'une étude menée par

Luukko et Pertovaara sur le modèle de douleur neuropathique CCI ne révèle aucun changement dans les activités spontanées ou évoquées de ces mêmes neurones (Luukko and Pertovaara, 1993). A l'opposé par utilisation de la technique de dosage quantitative de deoxyglucose radioactif afin de mesurer le taux d'utilisation local du glucose, Mao et collaborateurs ont montré une augmentation de l'activité métabolique dans la SGPA, le locus coeruleus ou encore dans des structures pontiques dans le même modèle CCI chez le rat (Mao et al., 1993). Une étude plus récente menée avec un modèle de ligature partielle du nerf sciatique, montre des modifications évoquant une activité pronociceptive dans les activités spontanées et évoquées des neurones de la medulla rostro-ventro-médiale (Goncalves et al., 2007). Ces auteurs ont montré une augmentation de l'activité des cellules activatrices et une diminution de l'activité des cellules inhibitrices, pouvant ainsi contribuer à l'amplification de la transduction du message douloureux dans la corne dorsale de la moelle épinière.

Des modifications de l'activité neuronale ont également été observées dans le thalamus. Parmi ces changements, il a été décrit une augmentation de l'activité spontanée des neurones du noyau ventro-postéro-médian du thalamus de manière bilatérale après ligature du nerf infraorbitaire chez le rat (Vos et al., 2000). Enfin, il a été montré dans le modèle SNL une diminution de la quantité de sérotonine (5-HT) et de norépinephrine (NE) dans le thalamus ventro-basal du côté contralatéral à la lésion (Goettl et al., 2002).

L'implication des aires corticales limbiques dans les manifestations observées dans les douleurs neuropathiques a été mise en évidence par une augmentation de l'activité des neurones du cortex chez les rats CCI (Paulson et al., 2000; Paulson et al., 2002).

## Objectifs de notre étude

Les données fondamentales et cliniques rapportées dans la littérature mettent en évidence la complexité des mécanismes à l'origine des douleurs neuropathiques et la faible efficacité des traitements antalgiques actuellement disponibles susceptibles de les soulager.

L'objectif de notre travail a été de tenter de mieux comprendre les mécanismes physiopathologiques à l'origine des douleurs chroniques neuropathiques afin de mettre en évidence de nouvelles cibles pharmacologiques dans des modèles animaux de telles douleurs, dans le but de générer de nouveaux traitements afin d'améliorer la prise en charge de ces douleurs. Dans ce but, nous avons étudié trois modèles : les deux premiers ont porté sur la description des effets de deux molécules anticancéreuses, la Vincristine et l'Oxaliplatine, présentant une activité chimique neurotoxique sur les neurones sensoriels ; le troisième modèle a porté sur la description des modifications comportementales associées à la douleur chez le rat, au cours du développement de l'encéphalite auto-immune expérimentale (EAE).

Dans un premier temps, à l'aide du modèle Vincristine, nous avons réalisé trois études :

- Une description détaillée des altérations comportementales générées par un traitement chronique avec la Vincristine (allodynies et hyperalgésies) suivie de l'étude de l'expression différentielle de gènes observée dans les ganglions de la racine dorsale prélevés chez ces mêmes animaux. En effet, l'évolution des techniques d'analyse de biologie moléculaire ont permis d'obtenir une vision plus exhaustive et plus approfondie de la régulation des gènes afin de mieux comprendre les mécanismes moléculaires mis en jeu au cours du développement de la douleur neuropathique dans les modèles de douleurs chroniques avec par exemple l'utilisation des puces à ADN.
- Une étude des systèmes sérotoninergiques, en particulier celle du rôle récepteur 5HT<sub>2A</sub>, et de son implication dans la sensibilisation des nocicepteurs périphériques et dans le traitement du message douloureux dans la corne dorsale de la moelle épinière.
- Une étude des systèmes opioïdiques, en particulier le fait que l'inhibition des enzymes de dégradation des enképhalines endogènes (les enképhalinases) diminue l'hypersensibilité

mécanique générée par le traitement par la Vincristine. L'augmentation de la concentration extracellulaire d'enképhalines endogènes induit par l'inhibition des enképhalinases, offre une nouvelle voie d'approche pour soulager les douleurs neuropathiques tout en éliminant les effets secondaires indésirables des opiacés.

Dans un deuxième temps, nous avons cherché à caractériser les mécanismes à l'origine des douleurs neuropathiques dans un nouveau modèle de douleurs neuropathiques générées par une autre molécule anticancéreuse : l'Oxaliplatine. D'un point de vue préclinique, les données de la littérature décrivent des types de douleurs neuropathiques semblables après injection d'Oxaliplatine et de Vincristine, alors que la cible cellulaire est totalement différente. Une meilleure définition de l'action de l'Oxaliplatine à l'échelle cellulaire permettrait à terme de proposer des hypothèses à l'origine d'approches thérapeutiques pharmacologiques pour limiter les effets secondaires associés à cet agent anticancéreux ou pour soulager les douleurs neuropathiques qu'il génère. Nous avons réalisé une description détaillée des altérations comportementales générées par un traitement chronique avec l'Oxaliplatine (allodynies et hyperalgésies) suivie de l'étude de l'expression différentielle de gènes observée dans trois structures (GRD, CDME et cortex SI/SII) consécutive à ces injections chroniques d'Oxaliplatine à l'aide de puces à ADN.

Dans un troisième temps, nous avons cherché à caractériser l'évolution au cours du temps des modifications comportementales observées dans le modèle EAE. En effet, de nouvelles données de la littérature clinique décrivent l'apparition de douleurs neuropathiques au cours de l'évolution de la sclérose en plaque. Après avoir décrit les modifications comportementales des rats EAE au cours de l'évolution du syndrome, nous avons étudié les effets des molécules classiquement utilisées pour le soulagement des douleurs neuropathiques sur ces comportements pathologiques.

# Chapitre I



# Chapitre I : La Vincristine

## 1. La Vincristine

### 1.1. La Vincristine

L'un des traitements anticancéreux le plus communément administré chez l'homme a été l'utilisation de la Vincristine prescrite pour traiter principalement la leucémie, les lymphomes, les sarcomes mais aussi de nombreux autres cancers.

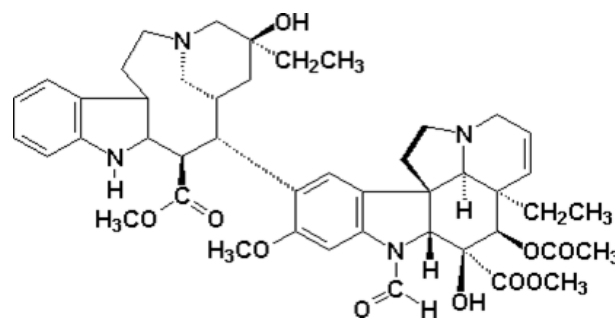


Figure 16 : Formule de la Vincristine

La Vincristine est un vinca-alcaloïde (Figure 16) extrait de la pervenche de Madagascar. Sa cible moléculaire est constituée par les microtubules, polymères de tubuline formant une partie du cytosquelette ce qui en fait un inhibiteur du développement du fuseau mitotique. Après son entrée dans la cellule, la vincristine se lie aux dimères de tubuline via la sous unité  $\beta$ , ou directement sur les microtubules au niveau de leur extrémité (+) (Figure 17) (Lobert et al., 1994). Cette stabilisation des microtubules modifie la dynamique du fuseau mitotique au

moment de la division cellulaire ce qui induit un arrêt de la mitose entre la métaphase et l'anaphase. Ce blocage de la mitose conduit alors à une sortie de mitose anormale et une entrée en apoptose de la cellule.

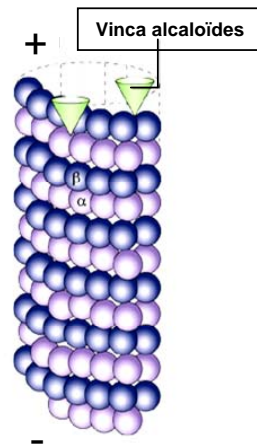


Figure 17 : Schématisation du mode d'action de la Vincristine sur l'extrémité (+) des microtubules.

## 1.2. Vincristine et douleurs neuropathiques

Un des effets secondaires délétères majeur de ce traitement repose sur l'apparition de perturbations d'ordre sensoriel dont la sévérité est proportionnelle à la dose utilisée et à la durée d'administration (Casey et al., 1973). Des traitements prolongés induisent chez presque tous les patients des douleurs neuropathiques, notamment des membres inférieurs (Sandler et al., 1969;Forman, 2004).

Un modèle de douleur neuropathique induite par un traitement à la Vincristine, fondé sur une injection intraveineuse quotidienne pendant deux cycles de cinq jours avec deux jours d'arrêt entre les deux, a été développé chez le rat (Aley et al., 1996). Dans cette étude, les auteurs ont observé le développement d'une allodynie et d'une hyperalgésie mécanique chez les rats traités à la Vincristine. La sensibilité à la chaleur a également été mesurée chez les animaux, montrant une augmentation de ce paramètre à la fin du traitement. Ce modèle a été modifié par Authier et al, en réalisant une injection intraveineuse quotidienne pendant dix jours sans interruption (Authier et al., 1999). De la même manière, les rats développent une hyperalgésie et une allodynie mécanique. En revanche, dans cette étude, les auteurs ont observé une

diminution de la sensibilité des rats aux stimuli nociceptifs thermique, les rats développant une hypolagésie thermique au chaud. Un nouveau modèle de douleur neuropathique induit par un traitement Vincristine a ensuite été développé par Weng et al en 2003 (Weng et al., 2003). Ce modèle est basé sur celui d'Aley et al, gardant le même décours temporel d'injections mais en modifiant le mode d'injection, en utilisant la voie intrapéritonéale, et la dose. Les tests comportementaux réalisés montrent le développement d'une allodynie et d'une hyperalgésie mécanique, en revanche aucune modification comportementale aux stimuli nociceptifs thermiques n'a été observée. Le modèle que nous avons développé est apparenté à ce dernier modèle.

Des enregistrements extracellulaires *in vivo* des fibres du nerf saphène chez des rats traités par la Vincristine ont montré une diminution de la moyenne des vitesses de conduction des fibres A et C. De plus ce travail a permis de mettre en évidence une augmentation de la sensibilité à une stimulation mécanique nociceptive d'une partie des fibres C (Tanner et al., 1998b). Cette hypersensibilité pourrait contribuer en partie à l'apparition des hyperalgésies induites par le traitement par la Vincristine par une augmentation des messages nociceptifs afférents dans la corne dorsale de la moelle épinière.

D'autres études ont également montré des modifications morphologiques des fibres afférentes primaires. Tanner et collaborateurs n'ont observé aucune diminution du nombre de fibres non-myélinisées ou du nombre de microtubules par axone. En revanche, la densité des microtubules dans les fibres myélinisées est diminuée chez les rats traités par la Vincristine. Cette diminution serait due à une augmentation de l'aire de la section des axones, suggérant un gonflement axonal (Tanner et al., 1998a). De la même manière, il a été montré que le traitement à la Vincristine entraînait une augmentation de la surface de la section des axones des fibres myélinisées (Topp et al., 2000) : au niveau du ganglion spinal, le traitement par la Vincristine induit un gonflement des neurones sensoriels de grand diamètre et une accumulation de neurofilaments dans les corps cellulaires ainsi que dans la partie proximale des axones, suggérant une altération du transport axonal antérograde.

## 2. Etude comportementale, analyse de l'expression différentielle de gènes et expression de Fos dans la corne dorsale de la moelle épinière, dans un modèle de douleur neuropathique induit par un traitement à la Vincristine.

### 2.1. Analyse de l'expression différentielle de gènes utilisant des puces à ADN.

Au début des années 1990 (Fodor et al., 1991), le développement de la technique des puces à ADN sur une membrane de nylon d'abord, puis sur une lame de verre, a permis pour la première fois d'analyser l'expression de milliers de gènes en parallèle dans un échantillon. Les techniques utilisées jusque là, Northern Blots ou encore RT-PCR, ne permettaient en effet d'analyser qu'un nombre limité de gènes en parallèle.

Les puces à ADN sont généralement des lames de verre sur lesquelles sont disposés quelques milliers de spots. Chaque spot correspond au dépôt de nombreuses copies d'une séquence d'ADN spécifique d'un gène donné appelée « sonde ». Ces sondes sont dessinées en amont par un logiciel pour garantir une complémentarité spécifique avec les séquences de gènes référencés dans les bases de données. Pour chaque expérience, une condition expérimentale est comparée à une condition contrôle de référence. Pour ce faire, tous les ARN extraits des animaux mis en situation pour les deux conditions expérimentales sont préparés puis convertis en ADN ou en ARN complémentaires et chaque lot est marqué avec une molécule fluorescente différente. Les fluorophores classiquement utilisés sont la cyanine 5 et la cyanine 3 qui émettent respectivement dans le rouge et dans le vert. Ces molécules marquées sont appelés « cibles ». Les ARN cibles sont ensuite mis en présence des sondes déposées sur la lame au cours d'une étape d'hybridation. Pour chaque spot, les ARN cibles entrent en compétition pour s'hybrider avec les sondes correspondantes. Après lavage, on recueille à l'aide d'un scanner la fluorescence émise par chaque sonde. L'intensité du signal est proportionnelle au nombre de molécules fluorescentes hybridées et donc à la quantité d'ARN présente initialement dans les échantillons.

Le développement de cette technique a permis de mettre au point plusieurs types de puces à ADN. Les différences portent essentiellement sur le support (silice, lame de verre, micro-billes, membrane de nylon), le mode de détection des cibles (fluorescence, chemoluminescence, radioactivité), le type des sondes (produits PCR, oligonucléotides courts ou longs) qui peuvent être soit déposées sur la lame ou bien synthétisées *in situ*, le type des cibles (ADN, ADNc, ARNc) et le nombre d'échantillons hybridés sur chaque lame (puces mono ou bi-couleurs).

Nous avons utilisé une des dernières puces à ADN mise au point, la puce à ADN Illumina® (Figure 18). Illumina est une société américaine basée à San Diego qui a mis au point des puces à ADN basées sur la technologie 'BeadArray' inventée par le Dr. David Walt, professeur de chimie à l'université de Tufts (Boston, USA) en 1998. Les cibles marquées avec de la Cy3 sont hybridées sur des billes sur lesquelles sont attachées des sondes spécifiques. Chaque sonde est représentée de nombreuses fois pour augmenter la précision. Les puces que nous avons utilisées 'RatRef-12 Expression BeadChips' contiennent environ 22 000 sondes différentes couvrant l'ensemble du génome du rat. Ce sont des puces monochromes, un seul échantillon est hybridé sur chaque puce. L'analyse des résultats se fait par la quantification de l'intensité de fluorescence de chaque échantillon. Douze puces sont contenues sur chaque lame, ce qui permet d'analyser en parallèle 12 échantillons.

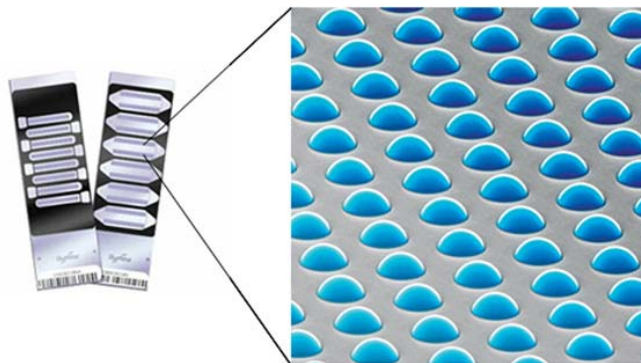


Figure 18 : Principe des puces Illumina : des billes sur lesquelles sont attachées les sondes sont dispersées aléatoirement sur une lame.

2.2. Résultats

Behavioural study , differential gene expression analysis and Fos expression at the spinal level in Vincristine-induced chronic neuropathic pain in the rat.

Karine Thibault, Sophie Pezet, Sophie Dubacq, Fethi Bensaid, Isabelle Rivals,  
Bernard Calvino

Manuscrit en préparation

**RESUME DE L'ARTICLE**

Le but de cette étude était d'étudier les modifications d'expression différentielle de gènes dans les ganglions des racines dorsales associées à l'apparition des douleurs neuropathiques induites par la Vincristine, et d'autre part d'analyser les patterns d'expression de la protéine c-Fos dans la corne dorsale de la moelle épinière au cours de différents protocoles de stimulations. Ce travail nous a permis de proposer une hypothèse concernant l'identification de la nature des fibres périphériques préférentiellement atteintes, i.e. les fibres myélinisées de gros diamètres A $\beta$ .

**Méthodologie** : Les animaux ont été traités par la Vincristine par injection intrapéritonéale quotidienne pendant deux cycles de cinq jours.

Dans un premier temps, nous avons réalisé une étude comportementale complète chez le rat afin de caractériser de manière très précise l'évolution des paramètres associés aux douleurs neuropathiques induites par un traitement par la Vincristine.

Dans un deuxième temps, nous avons recherché les gènes différentiellement exprimés dans les ganglions des racines dorsales chez les animaux traités par la molécule anticancéreuse par comparaison avec les animaux contrôle, par la technique des puces à ADN. Nous avons ensuite validé la modification d'expression de gènes d'intérêt par des techniques d'immunohistochimie et de western blot. Deux protéines ont été choisies : ATF3 (*Activating Transcription Factor*) (cf. p.36) et la caspase 12 (cf. p.35).

Enfin, nous avons réalisé une étude immunohistochimique complète du marqueur d'activité neuronale c-Fos dans la corne dorsale de la moelle épinière après traitement par la Vincristine à l'état basal ou à la suite de différents stimuli mécaniques.

**Résultats** : D'un point de vue comportemental, les rats traités par la Vincristine développent une allodynie et une hyperalgésie mécanique statique mesurées dès le huitième jour du traitement. Nous avons également observé une allodynie et hyperesthésie mécanique dynamique chez les rats traités par la Vincristine à la fin du traitement. Cette sensibilisation mécanique est associée à une allodynie et une hyperalgésie thermique au froid ainsi qu'une hypoalgésie thermique au chaud.

Chez les rats traités par la Vincristine, nous avons observé un grand nombre de gènes différentiellement exprimés dans les ganglions des racines dorsales par la technique des puces à ADN, pouvant être classés dans de nombreux processus biologiques parmi lesquels des gènes impliqués dans la régulation de la transcription, dans la survie ou la mort cellulaire ou encore des gènes codant des canaux ioniques.

Nous avons observé une augmentation de l'expression de ATF3 dans les neurones sensoriels de gros diamètres après traitement par la Vincristine. Cette augmentation d'expression est corrélée avec l'augmentation de l'expression de la caspase 12 chez les animaux traités.

Enfin, nous avons montré une augmentation du nombre de neurones c-Fos positifs dans les couches intermédiaires de la corne dorsale de la moelle épinière. Après une stimulation mécanique nociceptive, nous n'avons pas observé de différence du nombre de neurones c-Fos positifs dans les couches superficielles entre les animaux traités par la Vincristine et les animaux contrôles. En revanche, une stimulation mécanique non-nociceptive entraîne une augmentation très importante du nombre de neurones c-Fos positifs dans les couches intermédiaires de la corne dorsale chez les animaux neuropathiques, tandis que cette stimulation n'entraîne aucune modification chez les animaux contrôles.

**Conclusion** : L'ensemble de ces résultats suggère que la Vincristine entraîne une atteinte des fibres périphériques. A la fin du traitement, les fibres afférentes de large diamètre A $\beta$  expriment des marqueurs de blessures cellulaires et répondent de manière plus importante à une stimulation tactile non-nociceptive. Ces modifications pourraient contribuer aux modifications comportementales observées chez les rats traités par la Vincristine, c'est-à-dire une allodynie mécanique dynamique sous-tendue par une sensibilisation des fibres non-nociceptives A $\beta$ .



**Behavioural study, differential gene expression analysis and Fos expression at the spinal level in Vincristine-induced chronic neuropathic pain in the rat.**

Karine Thibault<sup>1</sup>, Sophie Pezet<sup>1</sup>, Sophie Dubacq<sup>1</sup>, Fethi Bensaid<sup>1</sup>, Isabelle Rivals<sup>2</sup>, Bernard Calvino<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> Laboratoire de Neurobiologie, CNRS UMR 7637, Ecole Supérieure de Physique et de Chimie Industrielles, 10 rue Vauquelin, 75005 Paris, France

<sup>2</sup> Equipe de Statistique Appliquée, Ecole Supérieure de Physique et de Chimie Industrielles, 10 rue Vauquelin, 75005 Paris, France

Abbreviated title:

Key words: Vincristine; neuropathic pain; large diameter A $\beta$  fibres; DNA microarray; c-Fos; ATF3; caspase 12

Number of text pages: 29

Number of figures: 9

Number of tables: 5

\* Correspondence should be sent to:

Pr Bernard Calvino, UMR CNRS 7637, Ecole Supérieure de Physique et Chimie Industrielles, 10 rue Vauquelin, 75005 Paris, France.

Tel: (33) 1 40 79 51 80; Fax: (33) 1 40 79 47 57; e-mail: [bernard.calvino@espci.fr](mailto:bernard.calvino@espci.fr)

## ABSTRACT

Vincristine is one of the most common anti-cancer drug therapy administered for the treatment of many types of cancers. Its dose-limiting side effect is the production of peripheral neuropathy, resulting in chronic neuropathic pain in many patients. An animal model of Vincristine-induced sensory neuropathy was developed using repeated intraperitoneal injections in male rats. This study aimed at validating this model from a behavioural point of view and dissect by which mechanisms neurotoxicity induced by Vincristine leads to the development of neuropathic pain. Vincristine-treated rats displayed static mechanical allodynia and hyperalgesia associated with dynamic mechanical allodynia and hyperaesthesia. The behavioral assessment revealed also cold allodynia and hyperalgesia symptoms paradoxically associated with heat thermal hypoalgesia. To identify the molecular changes that may lead to neuropathic pain, we used DNA microarray technology. Our results showed a large number of genes differentially expressed in dorsal root ganglions after Vincristine treatment. Among them, we showed that activating transcription factor 3 (ATF3) was up-regulated in large diameter neurons in Vincristine treated rats. Moreover, a particularly caspase involved in endoplasmic-reticulum-specific apoptosis, caspase12 (Casp12), was up-regulated in Vincristine treated rats. We showed that ATF3 and Casp12 expressions were strongly correlated. In order to know whether cell injury observed could be involved in a central sensitization process of dorsal horn neurons in this model of peripheral neuropathy, we considered c-Fos expression. We showed an increased of c-Fos neurons labeling in intermediate layers of spinal cord dorsal horn in various experimental situations, without any stimulation, and after activation of large A $\beta$ -fibres by a non-noxious stimulation. Our results put forward the hypothesis according which large diameter A $\beta$ -fibres could mainly contribute to Vincristine-induced sensory abnormalities.

## INTRODUCTION

Vincristine is one of the most common anti-cancer drug therapeutically administered for the treatment of many types of cancers such as leukaemias, lymphomas and sarcomas. However, Vincristine has important dose-limiting side effects including peripheral neuropathy, which in many patients is accompanied by a chronic neuropathic pain syndrome that requires discontinuation of treatment and thus greatly impacts on the survival of cancer patients (Sandler et al., 1969; Casey et al., 1973). The main clinical manifestation of Vincristine-induced neurotoxicity is a disturbance in both sensory and motor function (Sandler et al., 1969; Weiden and Wright, 1972; Casey et al., 1973). The sensory disturbances range from mild tingling to spontaneous painful burning paresthesia and hypersensitivity to painful stimuli (Forman, 1990; Postma et al., 1993). The incidence and severity of Vincristine-induced neuropathic pain is positively correlated with the period and doses used. The anti-tumor action of Vincristine is due to its binding to  $\beta$ -tubulin, which leads to its antimitotic property leading to aborted cell division and cell death (Lobert et al., 1996; Wilson et al., 1975). Axonal microtubules also contain  $\beta$ -tubulin, and Vincristine property to bind to  $\beta$ -tubulin is thought to induce peripheral neuropathies leading to chronic pain through its neurotoxic action on peripheral sensory fibres.

Using doses close to those clinically used, an animal model of Vincristine-induced nociceptive sensory neuropathy was developed after repeated intravenous injections in male rats (Aley et al., 1996; Authier et al., 2003; Nozaki-Taguchi et al., 2001). This model was modified by Weng and collaborators to produce a simpler method with daily intraperitoneal injection (Weng et al., 2003). We observed static and dynamic mechanical allodynia and hyperalgesia associated with cold thermal allodynia and hyperalgesia in Vincristine treated rats. We used the modified model to evaluate mechanisms of Vincristine neurotoxicity at the origin of neuropathic pain described. In Vincristine model, myelinated and unmyelinated fibres displayed abnormal microtubule assemblies and axonal swelling (Tanner et al., 1998a) and C-fiber nociceptors responded more vigorously than normal to suprathreshold stimulation (Tanner et al., 1998b; Topp et al., 2000). However, it is essential to identify the molecular changes that may lead to neuropathic pain, both for understanding underlying mechanisms and developing new therapies.

While in situ hybridization, Western blotting and other methods have been extensively used to study expressional changes of individual genes after chemotherapeutic treatment, a limiting factor with these methods comes from the fact that there is a lack of a comprehensive

overview of large-scale changes of multiple genes in a single study. The recent advancement of microarray technology represents a potentially approach for such a task. The fact that this technique gives the ability to examine the expression profile of potentially the all genome in a single experiment gives the possibility to identify the cellular consequences of Vincristine treatment and thus to identify target specific drug affects. In the present study, we used DNA microarray technology to differentiate expressional changes of multiple genes in dorsal roots ganglions in Vincristine treated rats from those in control rats. We chose to examine some injury-induced gene expression to characterize which cells were injured.

In order to know whether cell injury observed may be involved in a central sensitization process of dorsal horn neurons in this model of peripheral neuropathy, we considered c-Fos expression, in the absence of any intentional stimulation (basal expression), and c-Fos expression evoked by different modalities of peripheral stimulation.

DNA microarray data analysis revealed that molecules belonging to biological processes, for instance cell injury/death, were preferentially differentially expressed in Vincristine treated rats compared to controls rats. Our results put forward the hypothesis according which large diameter A-fibres could mainly contribute to the Vincristine-induced sensory abnormalities.

## **MATERIELS AND METHODS**

### **Animals**

Male Sprague Dawley rats weighing 150-175 g at the beginning of the experiments (Janvier, Le Genest St Isle, France). Experiments were performed according to the European Community Council Directive of 24 November 1986 (86/609/EEC) and to guidelines published in a Guest Editorial in Pain on ethical standards for the investigation of experimental pain in animals (Committee for Research and Ethical issues of the I.A.S.P., 1980) and were in accordance with the French ‘‘Ministère de l’Agriculture et de la Pêche’’ rules. Great care was taken, particularly with regard to housing conditions, to avoid or minimize discomfort of the animals: rats were housed four to a cage to minimize the possibility of painful interactions. The animals were kept on solid floor cages with a deep layer of sawdust to accommodate the excess of urination and cages were changed daily. They were kept at a constant temperature of 22°C, with a 12h alternative light/dark cycle. Food and water were available *ad libitum*. All animals were housed during two weeks before the beginning of the experiments, a period during which they were able to familiarize with the investigator and get used to the experimental room and to the various apparatus likely to be used for pain or allodynia tests.

Nociceptive behaviour (see below) was tested in two groups of rats, one control and one treated by Vincristine. Animals were randomly chosen and tested by an experimenter blinded to the treatment. Rats received intraperitoneal (i.p.) injections of vincristine (Oncovin-1 mg, EG LABO, Boulogne-Billancourt, France) at 0.1 mg/kg/day for two 5-day cycles with a 2-day pause between cycles as described by Weng et al.. Control rats received i.p. injections of the vehicle (0.9% NaCl) according to the same protocol.

### **Behavioural tests**

#### ***Assessment of mechanical static allodynia***

Rats were individually placed on an elevated wire mesh floor in a clear plastic cylinder (22cm diameter) and were adapted to the testing environment for 10min. An Electronic Von Frey hair unit (EVF-3, Bioseb, Chaville, France) was used: the sensitivity threshold is measured in one test, measurement ranging from 0 to 500 grams with a 0.2 gram accuracy. Punctuate stimulus is delivered to the mid-plantar area of each hind paw from below the mesh floor

through a plastic spring tip and sensibility threshold result is displayed on a screen. Paw sensitivity threshold was defined as the minimum pressure required eliciting a robust and immediate withdrawal reflex of the paw. Voluntary movement associated with locomotion was not taken as a withdrawal response. The stimulus was applied on each hind paw five times with a five seconds interval and the value adopted as a threshold for a rat was the average of the ten values measured. Mechanical allodynia was defined as a significant decrease in withdrawal thresholds to EVF-3 application.

#### ***Assessment of mechanical static hyperalgesia***

Rats were individually taken by experimenter and were kept free movement of all on him for 5min. A Pincher (Bioseb, Chaville, France) was used: the sensitivity threshold is measured in one test, measurement ranging from 0 to 800 grams. Punctuate stimulus is delivered to the mid-plantar area of each hind paw. Paw sensitivity threshold was defined as the minimum pressure required eliciting a robust and immediate withdrawal reflex of the paw. Voluntary movement associated with locomotion was not taken as a withdrawal response. The stimulus was applied on each hind paw tree times with a minute interval and the value adopted as a threshold for a rat was the average of the six values measured. Mechanical hyperalgesia was defined as a significant decrease in withdrawal thresholds to pincher application.

#### ***Assessment of mechanical dynamic allodynia and hyperaesthesia: the “Paint-brush test”***

This behavioural test, the “Paint-brush” test allowed to explore dynamic responses to a mechanical stimulus. Animals were placed in the plastic cylinder on the wire mesh floor and a paint-brush was used to rub the plantar area of each hind paw from the heel to the toes as a stimulus. Two paint-brushes were used, one very smooth made of marten hairs and the other rough made of bristles pig, as previously described in (Thibault et al., 2008a). The smooth paint-brush was firstly used then followed by the rough paint-brush. The stimulus was applied on each hind paw five times with a five seconds interval and the value adopted using each paint-brush for a rat was the average score of withdrawals (for each paw between 0 and 5) got from each hind paw. Vincristine-induced responses to smooth paint-brush are best described as allodynia because normal rats never or shortly (less than 5%) withdraw from this stimulus and responses to rough paint-brush are probably described as hyperaesthesia because normal rats withdraw from this stimulus 5-10% of the time.

### ***Assessment of cold thermal allodynia***

Animals were placed in a plastic cylinder on the wire mesh floor and a drop (0.05 ml) of acetone was put down in the centre of the ventral side of the hind paw. During the following 40s after acetone application, the rat's response was monitored. Responses of the rat to acetone were graded to a 4-point scale as defined by Flatters and Bennett (2004): 0, no response; 1, quick withdrawal, flick or stamp of the paw; 2, prolonged withdrawal or repeated flicking; 3, repeated flicking of the paw with licking directed at the ventral side of the paw. Acetone was applied alternately three times to each paw and the responses scored categorically. Cumulative scores were then generated by adding the six scores together for each rat, the minimum score being 0 and the maximum possible score being 18.

### ***Assessment of cold thermal sensibility***

For the assessment of allodynia and hyperalgesia to a cold stimulus, the Cold Plate Analgesia Meter (Bioseb) was used. Rats were placed on a wire plate at room temperature (22°C) kept at the beginning of the experiment and covered with a transparent plastic cylinder (22cm diameter, 28cm high). Five minutes later, temperature of the plate was decreased, driven by a computer, from 22°C to 0°C at a rate of 5°C/min. This slope was determined in preliminary experiments in order to have the opportunity to record easily with as small variations as possible the real thresholds at which an animal manifests particular behaviour. Two thresholds were recorded: the first one, the attention threshold, occurring between 10°C and 13°C in controls rats when the animal clearly orientated his head towards its hind paws, a behaviour interpreted as an intentional manifestation of cold detection: as this behaviour occurred at temperatures significantly higher in Vincristine-treated than in control animals, it could be interpreted as a cold allodynia. The second one, the withdrawal threshold, when the animal very briskly lifted its hind paw, a behaviour counted as a nociceptive response, occurring at temperatures lower than 4°C in control rats. These behaviours were assessed at room temperature (22 ± 1°C) and scored by an observer who was unaware of the treatment condition.

### ***Assessment of hot thermal hyperalgesia***

In the Hargreaves' paw flick test for heat hypersensitivity (Hargreaves et al., 1988), a radiant heat produced by a light source (Plantar test®, BioSeb, France) was administered to the plantar surface of the hind paw, with an intensity such that no tissue damage occurs at the duration of the cut-off latency of 20 s. The heat stimulus was given until the animal withdrew

its paw or until the cut-off time was reached. Withdrawal was defined as lifting, licking or flinching of the paw. For each animal 3 measurements of each hind paw were taken with a 5 min interval between measurements.

### ***Statistical analysis***

Treatments were randomized within each cage. Behavioural data, Von Frey electronic, Pinch test, and cold plate were examined using two-way analysis of variance (ANOVA) followed by Student Newman–Keuls test to detect differences between treatment and control group at each time point. For paint-brush test and acetone test, behavioural data were examined using Kruskal–Wallis test followed by Wilcoxon matches pairs test and Mann–Whitney U test to compared specific data points. Data were expressed as means  $\pm$  standard error of the mean (SEM), and the levels of significance were set at: \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ ; \*\*\* $p < 0.001$ .

### **Tissues RNA preparation for microarray analysis and microarray hybridization**

Rats were decapitated at the end of treatment (D15). DRGs L2 to L5 were dissected and placed in an eppendorf and immediately frozen in dry ice then stocked at  $-80^{\circ}\text{C}$ . Total RNA from individually dissected frozen DRGs was extracted and treated with DNase using RNeasy® Lipid Tissue Mini kit (Qiagen) for DRGs in accordance to the manufacturer's protocol. The quality and quantity of each RNA sample was checked using the Agilent 2100 Bioanalyzer with RNA 6000 NanoChips (Agilent Technologies). Five hundred ng of RNA were converted to cDNA then to biotinylated cRNA, labelled with Cy3 and hybridized to RatRef-12 Expression BeadChips (Illumina) on the Integragen Illumina microarray platform (Evry, France), according to the Illumina procedures. Scans were performed on the BeadStation 500 scanner (Illumina) with a  $0.8\mu\text{m}$  resolution at a wavelength of 532nm and data were extracted with the Beadstudio software (Illumina). This experiment included 4 rats treated Vincristine and 4 control rats.

### ***Statistical analysis***

All manipulations and statistical analysis were implemented with the R freeware. For Illumina beadchip data, all the spots with a detection p-value higher than 0.05% were excluded. To find differentially expressed genes between Vincristine treated rats and controls, we performed Student's t -tests. P-values were deduced from comparison with  $\alpha$  under the null



hypothesis. Significant enrichments of GO categories among genes of interest were obtained using the web-based tool eGOn (explore GeneOntology, [www.genetools.no](http://www.genetools.no)) with a p-value of 5%. Only GO categories with at least 3 genes were considered.

For the expression correlation study, the Pearson product-moment correlation coefficient is measure between ATF3 and Casp12 expression in the two groups of animals. We used this test to measure the strength of linear dependence between the two variables.

### **Tissue preparation for immunohistochemistry**

Rats were deeply anaesthetized with pentobarbital (60 mg/kg i.p) (Ceva Santé Animale, Libourne, France) and perfused transcardially with 200 ml of 0.9% NaCl followed with 4% paraformaldehyde (PFA) in 0.2 M phosphate buffer (PB), pH 7.4. The lumbar spinal cord was dissected out and postfixed overnight in 4% PFA at 4°C. Lumbar L4 DRG were dissected out, postfixed 2 hours in 4% PFA at room temperature. Lumbar spinal cord and DRG were cryoprotected in 30% sucrose in 0.2 M PB, pH 7.4, overnight à 4°C. Fourteen µm-thick longitudinal DRG sections were serially cut using a cryostat (HM550, Microm Microtech). Every six section was mounted onto a Superfrost slide so that we obtained two series of six slides corresponding to the whole ganglion. Thirty µm-thick spinal cord sections were cut using a cryostat and stocked in PBS 0.02M containing 0.02% sodium azide.

### **ATF3 labelling**

Triple label immunohistochemistry was performed using ATF3 (rabbit anti-ATF3, 1:500, Santa Cruz), a neuronal marker (mouse anti-βIII tubulin, 1:2000, Promega), an antibody to 200 kDa Neurofilament (mouse anti-NF200, 1:12000, Sigma), an antibody to CGRP (rabbit anti-CGRP, 1:60000, Sigma) or a isolectine IB4 conjugated FITC (1:700, Sigma). The first primary antibody (NF200 or CGRP) was applied overnight at room temperature in PBS (0.02M) containing 0.3% Triton and 0.02% sodium azide, at a dilution that was undetectable by secondary antibody Alexa and was detected by TSA amplification. After washing in PBS, tissues were incubated for 1 h at room temperature in 1:300 biotinylated anti-rabbit or anti-mouse IgG (Vector, Burlingame, USA). A second washing was performed in PBS and tissue were incubated for 1 h in the avidin-biotin-peroxidase complex (Vector, Burlingame, USA) diluted (1/500) in PBS. Tissues were successively washed three times in PBS followed by a 10 min application of fluorescein-tyramide (Perkin Elmer) diluted in 1:400 in PBS. After an

additional washing, the second and the third primary antibody (anti-ATF3 and anti- $\beta$ III tubulin) were applied overnight at room temperature. Once more after washing, tissues were incubated for 2 h at room temperature in 1:1000 Alexa488 anti-rabbit and Alexa350 anti-mouse IgG (Invitrogen). Tissues were finally washed in PBS, and mounted in Vectashield medium (Vector, Burlingame, USA).

Concerning the triple label experiments using anti-ATF3, anti-IB4 and anti- $\beta$ III tubulin, all three antibodies were applied overnight at room temperature in PBS (0.02M) containing 0.3% Triton and 0.02% sodium azide. After an additional washing, tissues were incubated for 2 h at room temperature in 1:1000 Alexa546 anti-rabbit and Alexa350 anti-mouse IgG (Invitrogen). Tissues were finally washed in PBS, and mounted in Vectashield medium (Vector, Burlingame, USA).

### **c-Fos labeling**

Eight experimental groups were determined: four control groups and four experimental groups receiving i.p. injections of Vincristine (see Figure 1).

#### ***Basal Fos-labelling***

Basal Fos-labelling is considered as an absence of any intentional stimulation. This protocol was assessed in 4 control rats and 4 Vincristine treated rats. Rats were anaesthetized with urethane 25 mg/ml (1.5 g/kg i.p) and perfused 2 hours later.

#### ***Noxious mechanical stimulation***

A noxious mechanical stimulation was performed under urethane 25 mg/ml (1.5 g/kg i.p) anaesthesia. Fifteen minutes later, a brief pressure of 700 g was applied using the Pincher Test (Bioseb, Chaville, France) ten times every 30 seconds for 5 min on the right hind paw of control (n=4) and Vincristine treated (n=4) rats. The experimenter was able to easily deliver a reproducible and calibrated stimulus. Rats were then perfused 2 hours after the end of stimulations.

#### ***Non-noxious mechanical stimulation***

In this group two experimental series were performed.

In the first experimental series, a non-noxious mechanical stimulation was performed under anaesthesia. Fifteen minutes after urethane injection, a gentle touch stimulus was applied

manually with the flat surface of the experimenter's thumb to the palm surface of hind paw as previously described by Ma and Woolf (Ma and Woolf, 1996). Each touch lasted 2 s, moving from the middle position of the palm surface to the distal foot pad. This stimulus was applied every 4 s for 10 min. This stimulus was applied in right hind paw control (n=4) and Vincristine treated (n=4) rats. Rats were perfused 2 hours later.

In a second series of experiments, non-noxious mechanical stimulations were performed without any anaesthesia. The same protocol was performed, then rats were anaesthetized with urethane 30 minutes after the end of stimulations. Rats were perfused 2 hours later.

### ***Immunohistochemical detection of Fos protein***

Serial sections from the lumbar segment L4-L5 were immunostained for c-Fos immunoreactivity (c-Fos IR) according to the avidin-biotin-peroxidase method. Tissue sections were incubated overnight at room temperature in primary antiserum directed against the c-Fos protein (Calbiochem, Ab5 (4-17) Rabbit, diluted at 1:5000) in PBS (0.02M) containing 0.3% Triton and 0.02% sodium azide. Incubated sections were washed in three successive PBS baths and incubated in 1:300 biotinylated goat anti-rabbit IgG (Vector, Burlingame, USA) in PBST for 1 h at room temperature. They were then washed three times in PBS and incubated for 1 h in avidin-biotin-peroxidase complex (Vectastain, Vector Laboratories) diluted (1/500) in PBS. Finally, sections were washed three times in PBS and revealed with peroxidase substrate kit (Vector Laboratories, SK-4100) according to the protocol proposed by supplier. The reaction proceeded at 20 °C under the control of a light microscope and was stopped 5 min after washing in distilled water. Sections were sequentially differentiated in 70%, 90%, 95% and absolute alcohol, and finally air dried, xylene treated, and cover-slipped with DPX Mountant for histology (Sigma).

Due to the fact that immunochemistry might vary from one experiment to the other, spinal cord sections of rats of the same experimental groups were immunoreacted at the same time in order to perform statistical tests.

### ***Counting of c-Fos IR labeling neurons***

Tissue sections were first examined using dark-field microscopy to determine the segmental level according to (Molander et al., 1984). Cells with labelled nuclei were counted using a camera lucida attachment. The numbers of Fos-IR neurons per specific laminar region of the spinal cord grey matter were counted in ten sections of L4–L5 segment.

For this purpose, five regions were defined: superficial dorsal horn (laminae I–II, superficial), nucleus proprius (laminae III–IV), neck of the dorsal horn (laminae V–VI), laminae X, and the ventral grey (laminae VII–IX). All Fos-IR neurons were counted without consideration of staining intensity. The investigator counting Fos-IR neurons was blind to the experimental situation of each animal.

### **Tissue preparation for western-blot**

Rats were deeply anaesthetized with pentobarbital (60 mg/kg i.p.) (Ceva Santé Animale, Libourne, France) and then euthanized by decapitation. DRGs of Vincristine-treated (n = 5) and vehicle-treated (n = 4) animals were homogenized in RIPA (radioimmunoprecipitation assay) buffer (50 mM Tris, pH 8, 150 mM NaCl, 1% NP-40, 0.5% deoxyxcholate, 0.1% SDS, 1 mM sodium orthovanadate, and Complete protease inhibitor mixture). The protein concentrations of lysates were determined using a Biorad D<sub>C</sub> Protein Assay kit (BioRad). Proteins (15 µg/sample) were separated using 10% SDS-PAGE, and transferred to polyvinylidene difluoride (PVDF) membranes. Membranes were then incubated with primary antibody, rabbit anti-Caspase 12 (1:2000 in 20 mM Tris, pH 7.5, 500 mM NaCl, 0.1% Tween 20 (TBST); ref. 62484; Abcam). After several TBST washes, membranes were incubated with donkey anti-rabbit HRP-linked secondary antibody (1:10000; GE Healthcare) for 1 h at room temperature, and revealed using ECL-plus reagent (5 min) for detection by autoradiography. Gels were scanned and bands were quantified by densitometric analysis using Scion Image software. Results are expressed as mean density of pro-caspase 12 and caspase 12 active for each animal. T-tests were performed using SigmaStat software to test the statistical significance of the results.

## RESULTS

### **Vincristine treatment induced neuropathic pain**

Vincristine-treated rats failed to gain weight during the treatment period, whereas control rats increased their weight during the same period (data not shown).

#### ***- Dynamic mechanical allodynia and hyperaesthesia***

Vincristine treated rats, but not saline treated rats, displayed significant increased responses to smooth and rough paintbrush stimulations. Using the smooth paint-brush, Vincristine-treated rats displayed a significantly different number of positive responses from  $0.3 \pm 0.1$  on D1 at the beginning of the treatment to  $1.7 \pm 0.34$  on D15 ( $p < 0.001$ ) (Figure 2A).

Using the rough paint-brush Vincristine treated rats displayed an increased in the number of positive responses from  $1 \pm 0.16$  on D1 to  $2.3 \pm 0.24$  on D8 ( $p < 0.001$ ) (Figure 2B), an increase which was more important on D15 ( $3.15 \pm 0.27$ ) (significantly different from D8,  $p < 0.01$ ).

#### ***- Static mechanical allodynia***

Vincristine treated rats with, but not saline treated rats, displayed significant decreased responses to electronic Von Frey stimulation by the eighth day of Vincristine treatment (Figure 2C) ( $p < 0.001$ ). This decreased response persisted throughout the treatment. Before the first injection, mean withdrawal thresholds measured with the paw pressure test as baseline values were not significantly different between saline and Vincristine-treated groups. The mean withdrawal thresholds in Vincristine-treated group decreased from  $83.72 \pm 0.75$  A.U. (pressure, arbitrary unit) on day 1 before the first injection to  $57.34 \pm 1.39$  on day 8 and  $51.93 \pm 0.99$  on day 15 (Figure 2C). At the same time, control rats did not show any significant variation of the mechanical threshold.

#### ***- Mechanical hyperalgesia***

Before the beginning of Vincristine or saline treatment, baseline withdrawal thresholds measured in the two groups with the “pincher” test did not significantly differ. Threshold values then significantly decreased ( $p < 0.001$ ) from  $476.28 \pm 10.05$  A.U. (on day 0 before the first injection) to  $385.74 \pm 13.89$  A.U. on day 8 and  $348.74 \pm 11.84$  A.U. on day 15 in

Vincristine treated rats (Figure 2D). By contrast, vehicle-treated rats did not display any significant variation of the mechanical threshold during the whole treatment period.

**- Cold thermal allodynia**

Control rats rarely reacted to acetone (mean “cold score”  $0.4 \pm 0.24$  during the all treatment). On day 8, Vincristine-treated rats displayed an increase in their cold score ( $3.3 \pm 0.98$ ) compared to control ( $p < 0.05$ ) (Figure 3A). This increased response persisted on D15.

**- Hot thermal hypoalgesia**

Paradoxically, Vincristine treated rats displayed a significant increase in withdrawal latencies using the plantar test: withdrawal thresholds were significantly higher on D15 as compared to D1 ( $p < 0.01$ ) (Figure 3B).

**- Cold thermal allodynia and hyperalgesia**

Using the Cold Plate test, Vincristine treated rats displayed a significant increased in the “attention” threshold ( $14.18 \text{ }^\circ\text{C} \pm 0.82$ ) on day 8 as compared to control rats ( $10.54 \text{ }^\circ\text{C} \pm 0.53$ ) ( $p < 0.01$ ) and on D15 ( $16.94 \text{ }^\circ\text{C} \pm 0.99$ ) as compared to D8 ( $p < 0.01$ ) (Figure 3C). In the same way, a significant increased of withdrawal threshold was observed in Vincristine treated rats on D8 ( $6.15 \text{ }^\circ\text{C} \pm 0.91$ ) as compared to control rats ( $3.95 \text{ }^\circ\text{C} \pm 0.39$ ) ( $p < 0.05$ ) (Figure 3D). This increased response persisted during the all treatment period (D8 and D15).

**Identification of differentially expressed genes induced by Vincristine treatment in DRGs.**

To identify differentially expressed genes by Vincristine treatment, L2-L5 DRGs of 4 treated rats and 4 control rats were dissected and analyzed individually on microarrays. Illumina pangenomic rat microarrays were used including 22 517 probes. In this study, we used t-test analysis and comparative results between control and Vincristine treated rats were considered to be significantly differentially expressed as an out of line when p value was less than 0.05.

Of the 22 517 probes included in Illumina microarrays, 10 274 were expressed. Among them, only 6% (616 probes corresponding to 174 genes) were found to be significantly differentially expressed. From a general point of view, the most prominent changes of gene expression were mainly observed in up-regulation patterns.

Among the 174 genes that showed significantly differential expression, 157 were up-regulated and 17 were down-regulated mainly found in functional classes including receptors and signaling molecules, ion channels, genes involved in cell cycle regulation and cell death, transcription and translation regulation, neuroinflammation, genes involved in cell metabolism and oxydative system, proteins of cytoskeleton and involved in cell adhesion and genes of immune system and erythroïde system (Figure 4).

Down-regulated genes were mainly involved in maintenance of immune system (29.4%) and inflammatory response (10.5%). We also observed that 10.5% of down-regulated genes were involved in erythroïde system cell adhesion, metabolism and oxidative system. On the opposite, up-regulated genes were in majority genes involved in cell metabolism (21.5%), transduction signal (15.8%) and transcription (14.8%).

Genes of interest are classified below according to GO categories (Gene Ontology enrichment analysis).

- Changes in transcriptional gene expression in Vincristine treated animals.

Genes regulated transcription are listed in Table1. Twenty seven genes were classified in this GO category (GO: 0045449). We found genes involved in apoptosis regulation either in pro-apoptotic regulation or anti-apoptotic regulation.

- Changes in expression of genes governing balance of survival/death cells in Vincristine treated animals.

Genes regulating apoptosis are listed in Table2. Thirteen genes were classified in this GO category: apoptosis (GO: 0006915). Surprisingly, a quasi similar number of genes governing positive and negative regulation of apoptosis were up-regulated in Vincristine treated animals. In fact, 7 genes were classified in the GO category: negative regulation of apoptosis (GO: 0043066) while 6 genes were involve in positive regulation of apoptosis and 3 of them were classified in the GO category: regulation of programmed cell death (GO: 0043067) (Figure 5). These results suggest that modifications in DRG may relate to regulated balance between neuronal degeneration and regeneration processes at the same time.

- Changes in ion channels gene expression in Vincristine treated animals.

Genes regulating ion channels or pore transporter activity are listed in Table3. Twelve genes were classified in this GO category (GO: 0015267). Among these 12 genes, all of them are up-regulated.

### **Up-regulation of ATF3 and Casp12 expression in Vincristine treated rats.**

Vincristine treatment induced an up-regulation of ATF3 positive neurons number in DRGs. We observed that Vincristine treated rats showed a significant increased percentage of immuno-reactive cells ( $1.63 \pm 0.3$ ) compared to control rats ( $0.21 \pm 0.14$ ) ( $p < 0.01$ ). Labeling using ATF3-IR,  $\beta$ III-Tubulin-IR with NF200-IR, CGRP-IR or IB4-IR showed that a majority of ATF3 positive neurons were also NF200 positive ( $84.17 \pm 6.14$ ). Only  $12.5 \pm 7.22$  % of ATF3 positive neurons were CGRP positive and no ATF3 positive neurons was IB4 positive (Figure 6A-G). Percentage of ATF3/NF200 positives cells was  $3.6 \pm 0.72$  % of NF200 positive neurons total (Figure 6F).

Vincristine treatment induced an up-regulation of Casp12 active in DRGs (Figure 7A). Quantification of mean density of Casp12 active showed a 354% increase ( $p < 0.05$ ) in Vincristine-treated rats compared to control rats. We observed also that Vincristine treated rat showed a non-significant increase of 42% of procaspase12 form (Figure 7B).

In Vincristine treated rats, the correlation coefficient between ATF3 and Casp12 expression rate was  $r = 0.995$  with a p-value of 0.00493. This value, close of 1, implied that a linear equation describes the relationship between ATF3 and Casp12 expressions quasi perfectly, with all data points lying on a line for which ATF3 expression increases as Casp12 expression increases (Figure 8). However, we observed no correlation between ATF3 and Casp12 expression in control rats.

### **Fos-labeling**

#### ***- Basal Fos labeling***

A quantitative analysis of Fos-IR cells was performed at the L4 level, the main termination area of afferent fibres from the sciatic nerve.

We showed that, in absence of any stimulation, the number of Fos-IR neurons in Vincristine treated animals was significantly increased in laminae III-IV ( $2,78 \pm 0,52$  and  $2,63 \pm 0,26$  Fos-IR neurons/section for the right and left side spinal cord, respectively) in comparison with values of control rats ( $0,91 \pm 0,13$  and  $0,41 \pm 0,17$  Fos-IR neurons/section for the right side and left side, respectively) ( $p < 0.01$ ) (Figure 9A). There was no statistical difference between left and right spinal cord hemisection in counted Fos-IR neurons. In all other laminae



where Fos-IR neurons were counted, there was no statistical difference between Vincristine treated rats and control groups of animals (Table4).

**- Noxious mechanical stimulation.**

In superficial laminae (I-II), the number of Fos-IR neurons was significantly increased ipsilaterally to the stimulated hind paw in control and Vincristine treated groups, but this increase was not significantly different between the two groups (Figure 9B and Table4). In intermediate laminae (III-IV), the number of Fos-IR neurons was significantly increased ipsilaterally and contralaterally to the stimulated hind paw in Vincristine treated animals compared to control rats, but there was no significant difference between the two hind paws. In all other laminae (V-VI, X, VII-VIII-IX) there was no significant difference neither ipsilaterally and contralaterally to the stimulated hind paw, neither between the two groups of animals.

**- Non noxious mechanical stimulation**

Non noxious mechanical stimulations under anesthesia did not evoke any significantly increased of Fos-expression in the two groups of animals either ipsilaterally or contralaterally to the stimulated hind paw in comparison with basal Fos-labelling (Figure 9C and Table4). But, interestingly, in intermediate laminae (III-IV), Fos-labelling was significantly increased ipsilaterally to the stimulated hind paw in Vincristine treated animals but not in control animals.

In contrast, non noxious mechanical stimulations without anesthesia induced a markedly increased of Fos-IR neurons in lamina III-IV on the right side in Vincristine treated rats ipsilaterally to the stimulated hind paw (Figure 9D and Table4). This increase in Fos-IR was significantly different from the increase of Fos-IR neurons described above with the same stimulation under anesthesia ( $9,55 \pm 1,81$  and  $3,43 \pm 0,44$  Fos-IR neurons/section respectively) ( $p < 0.05$ ). This non-noxious stimulation did not evoke Fos-IR neurons on the left side and in all other laminae bilaterally.

## DISCUSSION

In this study, we joint a behavioural study and usinf DNA microarrays, a differential gene expression analysis in DRG in Vincristine-treated rats. The aim of this study was to identify which genes expression was modified after Vincristine injections, a result which could help to better characterize peripheral processes at the origin of chronic neuropathic pain and possibly which type of peripheral fibres are affected by Vincristine neurotoxicity. Interpreting DNA microarrays results, we chose two (i.e. ATF3 and caspase 12) which we studied as markers in order to distinguish which process, either degeneration or morphological reorganization, could affect peripheral fibres after Vincristine injections. Furthermore, we studied Fos expression at the spinal level in various experimental situations to precise which projection sites of peripheral fibres are preferentially activated (i.e. dorsal horn laminae), a result which help to confirm the type of peripheral fibres involved in this model of neuropathic pain.

As previously described (Weng et al., 2003), Vincristine pretreated rats displayed all the characteristics of a peripheral sensory neuropathy, i.e. static mechanical allodynia and hyperalgesia and cold thermal allodynia and hyperalgesia (Aley et al., 1996;Authier et al., 1999). Moreover, our results showed that repeated daily i.p. injections of Vincristine induced also mechanical dynamic allodynia and hyperaesthesia as measured with the “paint-brush” test, and a cold allodynia as evaluated with an increased so called “attention” threshold we described with the cold plate test.

An interesting point is the difference in the time-courses of the occurrence of these various behaviours during the Vincristine injection protocole. In fact, cold allodynia measured by acetone test appeared on D8 of treatment and is maintained at D15, while cold allodynia evaluated with the cold plate test is markedly increased at D15 of Vincristine treatment (Figure 3). The difference in time courses of these two parameters evaluating cold allodynia, as measured by these two tests, could be interpreted as an involvement in different receptors at the origin of these behaviours. In fact, recent study showed that transient receptor potential melastatin 8 (TRPM8) may be involved in oxaliplatin-induced cold allodynia as measured with the acetone test in mice (Gauchan et al., 2009). However, Brignell et al. showed that intraplantar icilin injection (a TRPM8 and TRPA1 agonist) or ice application on receptive fields of hind paws of neuropathic rats displayed different effects on dorsal horn neurons

(Brignell et al., 2008). This result could suggest two different mechanisms of action. Moreover, clinical studies could not show any evidence for sensitization of responses to TRPM8 or TRPA1-stimulation in patients with cold injury and authors concluded from these observations that mechanisms for the induction of cold allodynia in these patients with cold injury are independent of TRPM8 or TRPA1 (Namer et al., 2008). In our point of view, the acetone test is not such a good test to evaluate the cold thermal allodynia since it involves a spinal nociceptive reflex, while the behaviour measured with the cold plate test seems to involve a more integrated nociceptive component. Indeed, this parameter, the 'attention' threshold, could represent an intentional manifestation of cold detection by the rat which could result from the integration of a message of allodynia at supraspinal level.

Moreover, mechanical static allodynia and hyperalgesia and dynamic allodynia and hyperaesthesia occurred also at different times during the course of Vincristine treatment. Maximal chronic effect of Vincristine on static mechanical behaviours was observed on Day 8 of the treatment (Figure 2) as previously described by Aley and collaborators (Aley et al., 1996). It is generally admitted that small diameter C- and A $\delta$ -fibres are mainly involved in the response to intense mechanical stimulus (corresponding to mechanical hyperalgesia) whereas large A $\beta$ -fibres (low threshold fibres) respond to light tactile stimuli (corresponding to mechanical allodynia). Our results showed that during the time-course of Vincristine effects on dynamic mechanical allodynia, maximum effect is seen Day 15. Vincristine treatment is supposed to trigger a degeneration of unmyelinated fibres (Authier et al., 2003) and a significant decrease in microtubule density suggesting swelling unmyelinated axons (Tanner et al., 1998a); but myelinated fibres are also supposed to degenerate (Authier et al., 2003; Topp et al., 2000). Behavioural results may suggest that dysfunction of small-diameter and large-diameter primary afferents could occur at different time points of the treatment, the former being able to dysfunction before (on D8) the latter (on D15). How these different types of fibres may degenerate, or not, will be discussed in a paragraph below.

Using DNA microarrays, we described that repeated daily i.p. injections of Vincristine induced many differentially expressed genes in DRGs as observed on day 15 (Figure 4). Among them, 13 genes up-regulated were involved in apoptosis process. It is interesting to note that half of these genes are pro-apoptotic ones and the other half anti-apoptotic (Figure 5). We can thus ask the question of the differential expression of genes during the time-course of the experiment: expression either in C-fibres more precociously for pro-apoptotic

genes (a results which is note able to be measured due to the protocol) followed by anti-apoptotic ones on D15 (time of the DNA microarray analysis), whereas pro-apoptotic genes could be expressed in A $\beta$  fibres more tardively as evaluated on D15. We can put forward the hypothesis according which small diameter fibres, affected more prematurely, could be on D15 in a phase of neuronal survival and express anti-apoptotic genes, whereas large diameters fibres, affected later, express pro-apoptotic proteins associated with cellular injuries. This DNA microarray analysis allowed us to select two up-regulated genes of interest in Vincristine treated rats. We thus studied the variations of expression of these two proteins and try to identify the type of fibres in which they were expressed.

Our results showed that ATF3 protein (Activating transcription factor 3) was up-regulated in Vincristine treated rats (Figure 6). ATF-3 expression is generally induced by cellular damages and a variety of stress stimuli in different tissue types. The role of this expression during alterations of peripheral nervous is not still clearly defined. Up-regulation of ATF3 was reported as a signal of deleterious events in the cell physiology, contributing to cellular death in an animal model of amyotrophic lateral sclerosis (Vlug et al., 2005). On the opposite, it has been described as associated with beneficial events (opposite to cellular death) following kainic acid injection (Francis et al., 2004). Moreover, it has been proposed that the induction of ATF3 would facilitate neuritic growth and in that way would participate in peripheral nerve regeneration after peripheral axonal damage (Seijffers et al., 2007). These data are contradictory and thus it seems difficult to decide if, following peripheral nerves lesions, ATF3 expression in DRGs neurons could be considered as a sign of functional changes of these cells. In our study, ATF3 up-regulation induced by Vincristine is observed by a majority in large diameter neurons ( $84.17\% \pm 6.14$ ) (Figue 6) and furthermore, systemic Vincristine administration causes large diameter sensory neurons swelling (Authier et al., 2003;Topp et al., 2000), but no loss of myelinated axons (Topp et al., 2000). It seems thus that ATF3 overexpression could be a sign of large diameter fibres suffering better these functional cellular changes would explain mechanical allodynia we described on D15. Moreover, our results showed that ATF3 over-expression was very well correlated with caspase 12 expression (Figure 8). Caspase-12 mediates endoplasmic-reticulum-specific apoptosis (Nakagawa et al., 2000). It was reported that partial caspase activation is not necessarily lethal and caspase activation is also required for processes that are unrelated to apoptosis. Caspase activation is involved in selective destruction of organelles, for example selective destruction of synapses required for neuronal plasticity (for review see (Perfettini and Kroemer, 2003)).

Thus, cells which co-express ATF3 and Casp12 could be engaged not in a dying process but in full neuronal 'plasticity'.

To characterize neuronal activation induced by Vincristine in the spinal cord, we studied c-Fos protein expression in the dorsal horn (Figure 9A). Our results showed that Fos labelling was markedly enhanced in intermediate laminae (III-IV) of dorsal horn of spinal cord in baseline situations, i.e. without any stimulation. This result is in accordance with our previous results obtained with the same model (Thibault et al., 2008b). In this previous study, we showed that Fos labelling was significantly enhanced in the whole dorsal horn compared to control rats including intermediate laminae (III-IV) but also superficial (I-II) and deep laminae (V-VI). This difference may come from the strain rats used (Wistar vs. Sprague-Dawley) or to different protocol of anesthesia used (pentobarbital vs. urethane). In this study, the increased of neurons c-Fos labeling in laminae III-IV, the site of myelinated A $\beta$ -fibres projection, confirmed that large diameter fibres were affected. Recent data showed that spontaneous discharge of A $\beta$ -fibres may participate in the central sensitization of layers III-IV neurons (Xiao and Bennett, 2008). In control rats, we described noxious mechanical evoked c-Fos labeling in numerous neurons in segments L4-L5 of the spinal cord, which correspond to the sciatic nerve spinal segments: c-Fos immunoreactive neurons were mainly located in superficial dorsal horn (Laminae I-II) (Figure 9B). In Vincristine treated rats, noxious mechanical stimulations evoked the same c-Fos labeling neurons pattern in the superficial dorsal horn as compared to control rats, though, systemic administration of Vincristine caused enhanced responsiveness in C-fibres in the rat (Tanner et al., 1998b). Our result showed that the number of activated cells by an intense mechanical stimulus does not vary after Vincristine treatment. An other possibility could come the fact that it would be better that their activity level is more increased in neuropathic animals.

As previously described (Chapman and Besson, 1997), non-noxious stimulations in control rats induced extremely weak or no c-Fos labeling. In Vincristine treated rats, we showed in our study (Figure 9D) that a non-noxious mechanical stimulation without anesthesia evoked c-Fos labeling in numerous neurons in dorsal horn Laminae III-IV. Xiao and Bennett showed that 21% of A-fibres presenting spontaneous activity, responded to brushing of the skin (Xiao and Bennett, 2008). Our result suggests that Vincristine may cause enhanced responsiveness in A $\beta$ -fibres in the rat. Spontaneous discharges and hyper-responsiveness in A $\beta$ -fibres will engage central mechanisms that could be at the origin and amplify neuropathic pain

abnormalities. An interesting point is the difference in the c-Fos neurons labeling evoked under or without anesthesia. Indeed, non-noxious stimulations in Vincristine-treated rats under anesthesia induced no increased c-Fos labeling in comparison with baseline situation (Figure 9C). In the same way as our results differed of results previously obtained with the same model, we observed that anesthesia influence is very important for the induction of c-Fos neurons labeling. Anesthesia brought an inhibition of c-Fos neurons labeling increase evoked by the non-noxious stimulation. A $\beta$ -fibres seem not to be hyper-responsiveness. Anesthesia choice is crucial to observe physiological changes.

Our DNA microarrays data also showed an up-regulation of calcium channel  $\alpha$ 2- $\delta$ 1 subunit (Table 3). This subunit is expressed in dorsal root ganglion neurons particularly in a subset of small neurons (diameter less than 20  $\mu$ m). But large diameter neurons (diameter > 40  $\mu$ m) also slightly expressed this subunit (Taylor and Garrido, 2008). Up-regulation of voltage-gated calcium channel  $\alpha$ 2- $\delta$ 1 subunit in sensory neurons and spinal cord dorsal horn by peripheral nerve injury has been suggested to contribute to neuropathic pain (Li et al., 2006; Li et al., 2004). This up-regulation may participate to hypersensitivity observed in A $\beta$ -fibres in our model.

In conclusion, DNA microarray analysis, c-Fos expression study and behavioural study, suggest that A $\beta$ -fibres were particularly affect at the end of Vincristine treatment. Indeed, our results put forward the hypothesis according which large diameter A $\beta$ -fibres may contribute to the Vincristine-induced sensory abnormalities. Our results suggest that this factor may be important in pathogenesis of painful neuropathies induced by Vincristine treatment and may be new pharmacological target for neuropathic pain therapy.

## FIGURE LEGENDS

**Figure 1:** Schematic representation of the experimental design of the c-Fos experiment.

**Figure 2:** Time-course of dynamic (A, B) and static (C, D) mechanical allodynia and hyperalgesia. A: Mean number of positive responses to the smooth paint-brush test. At D15, the mean number of positive response was significantly increased in Vincristine-treated rats (black bars) compared to control rats ( $++ P<0.01$ ). B: Mean number of positive responses to the rough paint-brush test. The mean number of positive responses was significantly different in Vincristine-treated rats (black bars) compared to control rats (empty bars) as soon as D8 and was significantly increased in D15. ( $*** p<0.001$  Vincristine-treated rats between D1 and D8;  $+++ p<0.001$  Vincristine-treated rats vs. controls rats). C: Threshold of mechanical allodynia measured using electronic Von Frey. The withdrawal threshold was significantly different in Vincristine-treated rats (black bars) compared to control rats (empty bars) as soon as D 8 and maintained at D15 ( $*** p<0.001$  Vincristine-treated rats between D1 and D8,  $+++ p<0.001$  Vincristine-treated rats vs. controls rats) D: Changes in mechanical hyperalgesia measured by the “Pinch Test”. The withdrawal threshold was significantly different in Vincristine-treated rats (black bars) compared to control rats (empty bars) as soon as D8 and maintained at D15 ( $*** p<0.001$  Vincristine-treated rats between D1 and D8,  $+++ p<0.001$  Vincristine-treated rats vs. controls rats). All data are expressed in mean  $\pm$  SEM.

**Figure 3:** Time-course of cold (A, C, D) and heat sensitivity (B). A: Cold score obtained with the acetone test. Mean cold scores were significantly increased in Vincristine-treated rats (black bars) compared to control rats (empty bars) as soon as D8 and maintained at D15 ( $+ p<0.05$  Vincristine-treated rats vs. controls rats). B: Threshold of heat sensibility measured using Hargreaves test. At D15, the withdrawal threshold was significantly increased in Vincristine-treated rats (black bars) compared to control rats ( $+ P<0.05$ ). C: Changes in the threshold of cold allodynia, measured using the cold plate (Bioseb). The temperature of the plate was decreased, from 22°C to 0°C at a rate of 5°C/min. The temperature at which the animal showed a prototypic behavior was noted. ‘Attention’: the animal stopped exploring or grooming and turned his head towards his hindpaws, examining the floor of the chamber. At D8, the ‘attention’ threshold was significantly increased in Vincristine-treated rats (black bars) compared to control rats ( $++ P<0.01$ ) and was significantly increased in D15 ( $** p<0.01$

Vincristine-treated rats between D8 and D15; +++  $p < 0.001$  Vincristine-treated rats vs. controls rats). D: Threshold of nociceptive response: the animal exhibits one of the following behaviour: licking or shaking one of his hindpaws or jumping. Withdrawal threshold were significantly increased in Vincristine-treated rats (black bars) compared to control rats (empty bars) as soon as D8 and maintained at D15 (+  $p < 0.05$  Vincristine-treated rats vs. controls rats). All data are expressed in mean  $\pm$  SEM.

**Figure 4:** Schematic representation of classes genes differentially express in DRGs after Vincristine treatment. On the left panel: up-regulated genes; on the right panel: down-regulated genes. Genes are classified in 15 categories: erythroïde system, oxidative system, cell adhesion, channel, cytoskeleton, cell cycle, receptor, transduction, immune system, inflammatory response, transcription, translation, apoptosis and others.

**Figure 5:** Schematic representation of genes involved in apoptosis process. Thirteen genes were classified in GO category 'Apoptosis' (GO: 0006915). Upper panel: 7 genes were classified in the GO category: negative regulation of apoptosis (GO: 0043066). Bottom panel: 6 genes were involved in positive regulation of apoptosis and 3 of them were classified in the GO category: regulation of programmed cell death (GO: 0043067).

**Figure 6:** Vincristine treatment increases activating transcription factor 3 (ATF3)-immunoreactive (IR) neuronal profiles in lumbar (L4) dorsal root ganglia. A: ATF3-IR is present in sensory neuron cell bodies of Vincristine-treated rats. B-C: The highest number of ATF3-IR (green) was observed co-localized with NF200-IR neurons (red) ( $84.17\% \pm 6.14$ ). D: Non doubly stained ATF3-IR (red) and IB4-IR (green) neurons could be observed ( $0\% \pm 0$ ). E: Few neurons doubly labelled ATF3-IR (green) and CGRP-IR (red) were observed ( $12.5\% \pm 7.22$ ). F: Quantification of percentage of ATF3 in NF200-IR neuron subpopulations after Vincristine treatment. Percentage of ATF3/NF200-IR cells was  $3.6 \pm 0.72\%$  of NF200 positive neurons total (\*\*  $p < 0.01$  Vincristine-treated rats vs. controls rats).

**Figure 7:** Vincristine treatment increases caspase 12 (Casp12) expression in lumbar (L4) dorsal root ganglia. A: A representative example in which two samples (one control and one treated rat) are immunoblotted for Casp12. Two bands were observed: one at 42 kDa, which corresponds to the pro-caspase 12 and one band at 38 kDa (corresponding to caspase 12 active). B: Quantification western blot analysis (n=5 Vincristine treated rats and n=4 control



animals) showed significant higher level of expression of the active caspase 12 in Vincristine-treated rats (\*  $p < 0.05$ ). Data are expressed in mean  $\pm$  SEM.

**Figure 8:** Schematic representation of correlation between casp12 and ATF3 expression. The correlation coefficient between ATF3 and Casp12 expression rate was  $r = 0.995$  with a p-value of 0.00493. Statistical analysis realized with Pearson product-moment correlation coefficient.

**Figure 9:** Vincristine treatment increases c-Fos expression in the spinal dorsal horn. Histograms presenting the laminar distribution of c-Fos-IR neurons in the L4–L5 segment after different protocols. For all histograms results are presented using the following order, from right to left: right side of spinal cord of control rats: white bars, left side of the control rats: light grey bars, right side of spinal cord of Vincristine-treated rats: black bars and left spinal cord of Vincristine-treated rats: dark grey bars. Results are expressed as the mean  $\pm$  SEM number of c-Fos-IR neurones/30  $\mu$ m thick section. A: Without any stimulation, Vincristine induced a significant increase in c-Fos-IR neurons number in laminae III-IV in both side of spinal cord. B: Two hours after noxious stimulation, repeatedly (ten times) applied pincher every 30 seconds during 5 min on the right hind paw, we observed a significant increase of c-Fos-IR neurons number in laminae I-II in control ( $++ p < 0.01$ ) and Vincristine-treated rats ( $+ p < 0.05$ ) in right side of spinal cord compared to left side. C: Two hours after non-noxious stimulation under anesthesia, a gentle touch stimulus was applied manually with the flat surface of the experimenter's thumb to the palm surface of hind paw every 4 s for 10 min, we observed no difference with the protocol without stimulation. D: Two hours after non-noxious stimulation without anesthesia, Vincristine induced a significant increase in the number of c-Fos-IR neurons in laminae III-IV in the right spinal cord compared to left side ( $+ p < 0.05$ ).

**Table1:** Genes classified in GO category 'Regulation of transcription'. Twenty seven genes were classified in this GO category (GO: 0045449). Along them, we found an up-regulation of ATF3 (Activating transcription factor 3).

**Table2:** Genes classified in GO category 'Apoptosis'. Thirteen genes were classified in this GO category (GO: 0006915). Along them, we found an up-regulation of caspase 12 involved in positive regulation of apoptosis.

**Table3:** Genes classified in GO category ‘Chanel or pore class transporter activity’. Twelve genes were classified in this GO category (GO: 0015267). Along them, we found an up-regulation of voltage-gated calcium channel  $\alpha 2$ - $\delta 1$  subunit.

**Table4:** Numbers of c-Fos labelled neurons in different laminae: superficial (I-II), intermediate (III-IV) and deep laminae (V-VI). Four conditions were analysed: basal Fos labeling (i.e. without any stimulation), noxious mechanical stimulation and non-noxious mechanical stimulation under or without anesthesia. Stimulations were performed on right paw of rat. \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ ; \*\*\* $p < 0.001$  vs. control rats; +  $p < 0.05$ ; ++  $p < 0.01$  right side vs. left side for each groups; \$  $p < 0.05$  vs. basal condition.

## Reference List

- Aley KO, Reichling DB, Levine JD (1996) Vincristine hyperalgesia in the rat: a model of painful vincristine neuropathy in humans. *Neuroscience* 73:259-265.
- Authier N, Coudore F, Eschalier A, Fialip J (1999) Pain related behaviour during vincristine-induced neuropathy in rats. *Neuroreport* 10:965-968.
- Authier N, Gillet JP, Fialip J, Eschalier A, Coudore F (2003) A new animal model of vincristine-induced nociceptive peripheral neuropathy. *Neurotoxicology* 24:797-805.
- Brignell JL, Chapman V, Kendall DA (2008) Comparison of icilin- and cold-evoked responses of spinal neurones, and their modulation of mechanical activity, in a model of neuropathic pain. *Brain Res* 1215:87-96.
- Casey EB, Jellife AM, Le Quesne PM, Millett YL (1973) Vincristine neuropathy. Clinical and electrophysiological observations. *Brain* 96:69-86.
- Forman A (1990) Peripheral neuropathy in cancer patients: clinical types, etiology, and presentation. Part 2. *Oncology (Williston Park)* 4:85-89.
- Francis JS, Dragunow M, During MJ (2004) Over expression of ATF-3 protects rat hippocampal neurons from in vivo injection of kainic acid. *Brain Res Mol Brain Res* 124:199-203.
- Gauchan P, Andoh T, Kato A, Kuraishi Y (2009) Involvement of increased expression of transient receptor potential melastatin 8 in oxaliplatin-induced cold allodynia in mice. *Neurosci Lett* 458:93-95.
- 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.
- Li CY, Song YH, Higuera ES, Luo ZD (2004) Spinal dorsal horn calcium channel alpha2delta-1 subunit upregulation contributes to peripheral nerve injury-induced tactile allodynia. *J Neurosci* 24:8494-8499.
- Li CY, Zhang XL, Matthews EA, Li KW, Kurwa A, Boroujerdi A, Gross J, Gold MS, Dickenson AH, Feng G, Luo ZD (2006) Calcium channel alpha2delta1 subunit mediates spinal hyperexcitability in pain modulation. *Pain* 125:20-34.
- Lobert S, Vulevic B, Correia JJ (1996) Interaction of vinca alkaloids with tubulin: a comparison of vinblastine, vincristine, and vinorelbine. *Biochemistry* 35:6806-6814.
- Ma QP, Woolf CJ (1996) Basal and touch-evoked fos-like immunoreactivity during experimental inflammation in the rat. *Pain* 67:307-316.
- Molander C, Xu Q, Grant G (1984) The cytoarchitectonic organization of the spinal cord in the rat. I. The lower thoracic and lumbosacral cord. *J Comp Neurol* 230:133-141.

- Nakagawa T, Zhu H, Morishima N, Li E, Xu J, Yankner BA, Yuan J (2000) Caspase-12 mediates endoplasmic-reticulum-specific apoptosis and cytotoxicity by amyloid-beta. *Nature* 403:98-103.
- Namer B, Kleggetveit IP, Handwerker H, Schmelz M, Jorum E (2008) Role of TRPM8 and TRPA1 for cold allodynia in patients with cold injury. *Pain* 139:63-72.
- Nozaki-Taguchi N, Chaplan SR, Higuera ES, Ajakwe RC, Yaksh TL (2001) Vincristine-induced allodynia in the rat. *Pain* 93:69-76.
- Perfettini JL, Kroemer G (2003) Caspase activation is not death. *Nat Immunol* 4:308-310.
- Postma TJ, Benard BA, Huijgens PC, Ossenkoppele GJ, Heimans JJ (1993) Long-term effects of vincristine on the peripheral nervous system. *J Neurooncol* 15:23-27.
- Sandler SG, Tobin W, Henderson ES (1969) Vincristine-induced neuropathy. A clinical study of fifty leukemic patients. *Neurology* 19:367-374.
- Seiffers R, Mills CD, Woolf CJ (2007) ATF3 increases the intrinsic growth state of DRG neurons to enhance peripheral nerve regeneration. *J Neurosci* 27:7911-7920.
- Tanner KD, Levine JD, Topp KS (1998a) Microtubule disorientation and axonal swelling in unmyelinated sensory axons during vincristine-induced painful neuropathy in rat. *J Comp Neurol* 395:481-492.
- Tanner KD, Reichling DB, Levine JD (1998b) Nociceptor hyper-responsiveness during vincristine-induced painful peripheral neuropathy in the rat. *J Neurosci* 18:6480-6491.
- Taylor CP, Garrido R (2008) Immunostaining of rat brain, spinal cord, sensory neurons and skeletal muscle for calcium channel alpha2-delta (alpha2-delta) type 1 protein. *Neuroscience* 155:510-521.
- Thibault K, Elisabeth B, Sophie D, Claude FZ, Bernard R, Bernard C (2008a) Antinociceptive and anti-allodynic effects of oral PL37, a complete inhibitor of enkephalin-catabolizing enzymes, in a rat model of peripheral neuropathic pain induced by vincristine. *Eur J Pharmacol* 600:71-77.
- Thibault K, Van SJ, Brisorgueil MJ, Fischer J, Hamon M, Calvino B, Conrath M (2008b) Serotonin 5-HT<sub>2A</sub> receptor involvement and Fos expression at the spinal level in vincristine-induced neuropathy in the rat. *Pain* 140:305-322.
- Topp KS, Tanner KD, Levine JD (2000) Damage to the cytoskeleton of large diameter sensory neurons and myelinated axons in vincristine-induced painful peripheral neuropathy in the rat. *J Comp Neurol* 424:563-576.
- Vlug AS, Teuling E, Haasdijk ED, French P, Hoogenraad CC, Jaarsma D (2005) ATF3 expression precedes death of spinal motoneurons in amyotrophic lateral sclerosis-SOD1 transgenic mice and correlates with c-Jun phosphorylation, CHOP expression, somatodendritic ubiquitination and Golgi fragmentation. *Eur J Neurosci* 22:1881-1894.
- Weiden PL, Wright SE (1972) Vincristine neurotoxicity. *N Engl J Med* 286:1369-1370.

Weng HR, Cordella JV, Dougherty PM (2003) Changes in sensory processing in the spinal dorsal horn accompany vincristine-induced hyperalgesia and allodynia. *Pain* 103:131-138.

Wilson L, Creswell KM, Chin D (1975) The mechanism of action of vinblastine. Binding of [acetyl-3H]vinblastine to embryonic chick brain tubulin and tubulin from sea urchin sperm tail outer doublet microtubules. *Biochemistry* 14:5586-5592.

Xiao WH, Bennett GJ (2008) Chemotherapy-evoked neuropathic pain: Abnormal spontaneous discharge in A-fiber and C-fiber primary afferent neurons and its suppression by acetyl-L-carnitine. *Pain* 135:262-270.

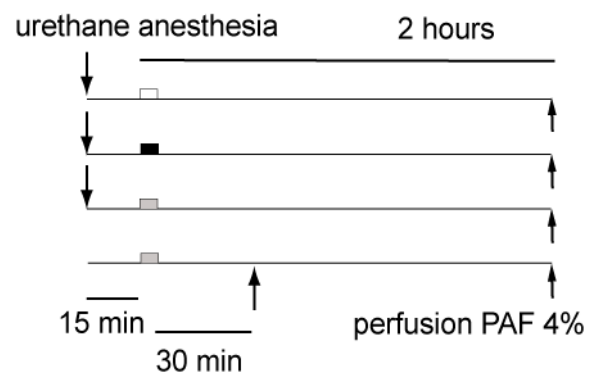


Figure 1

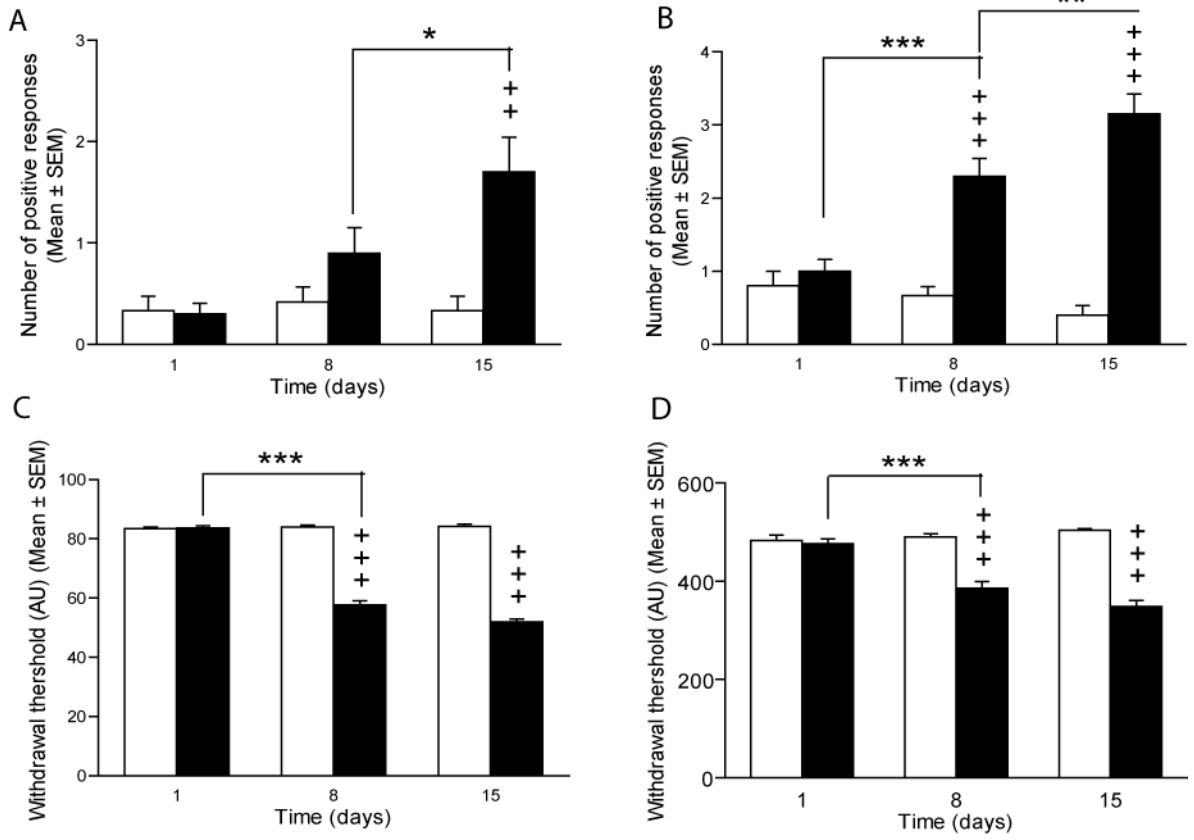


Figure 2

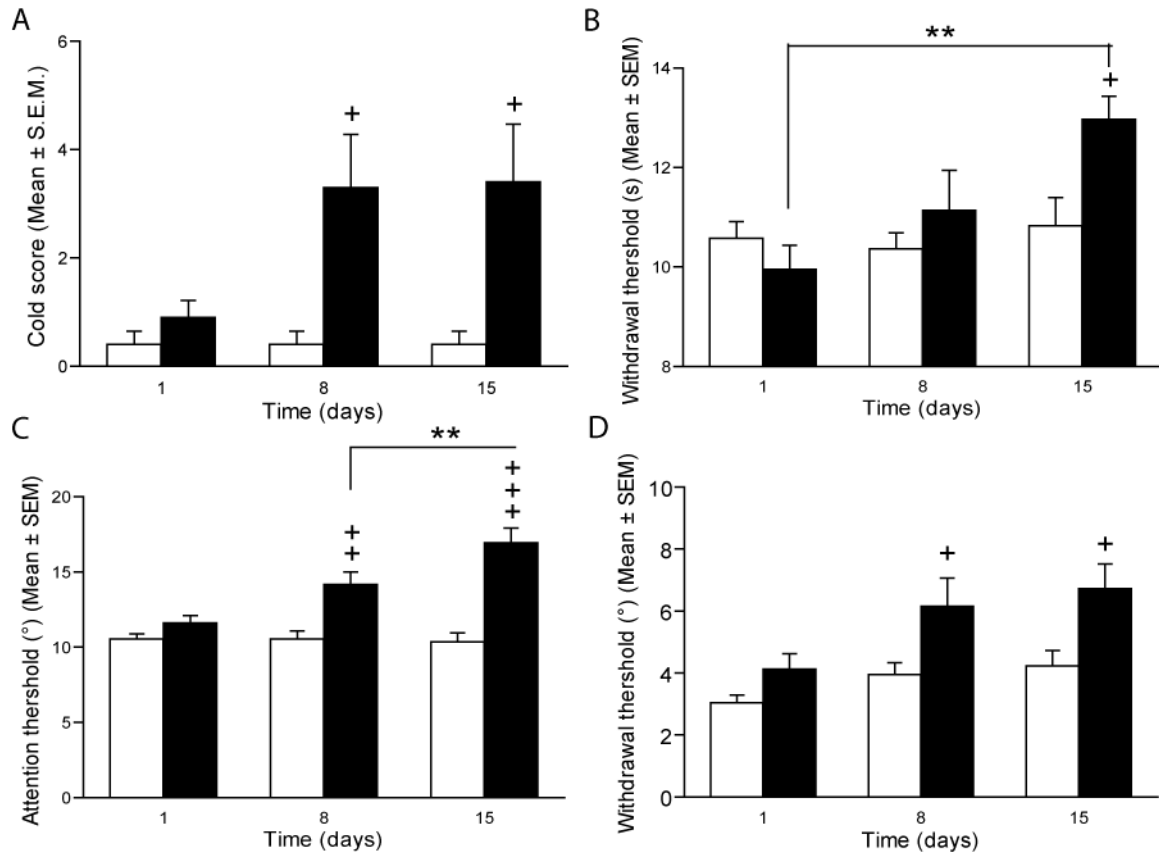


Figure 3



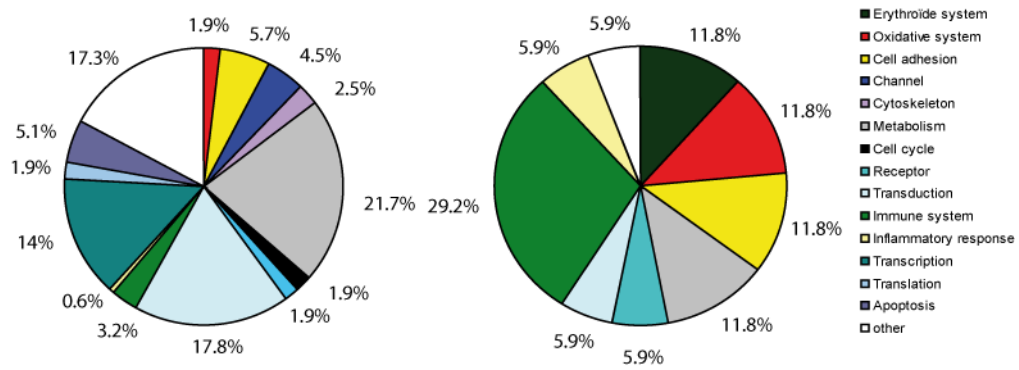


Figure 4

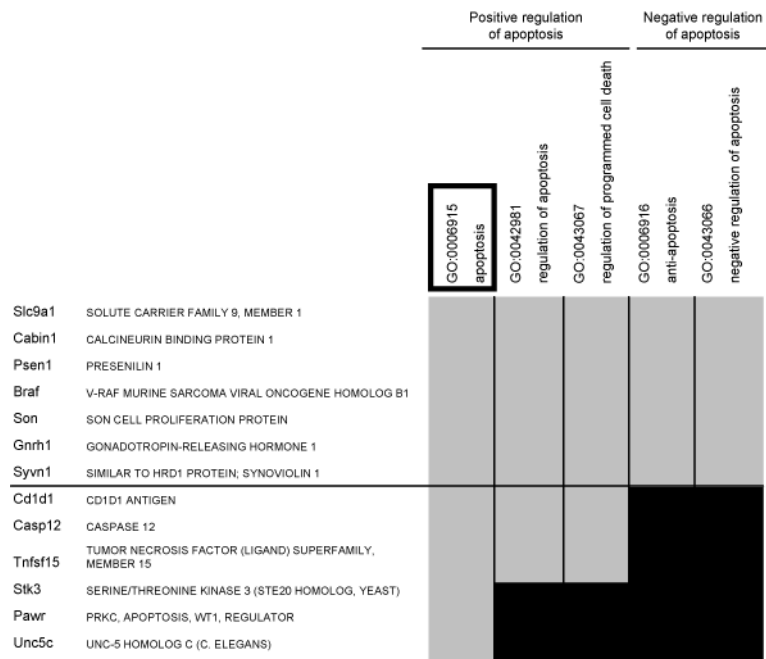


Figure 5

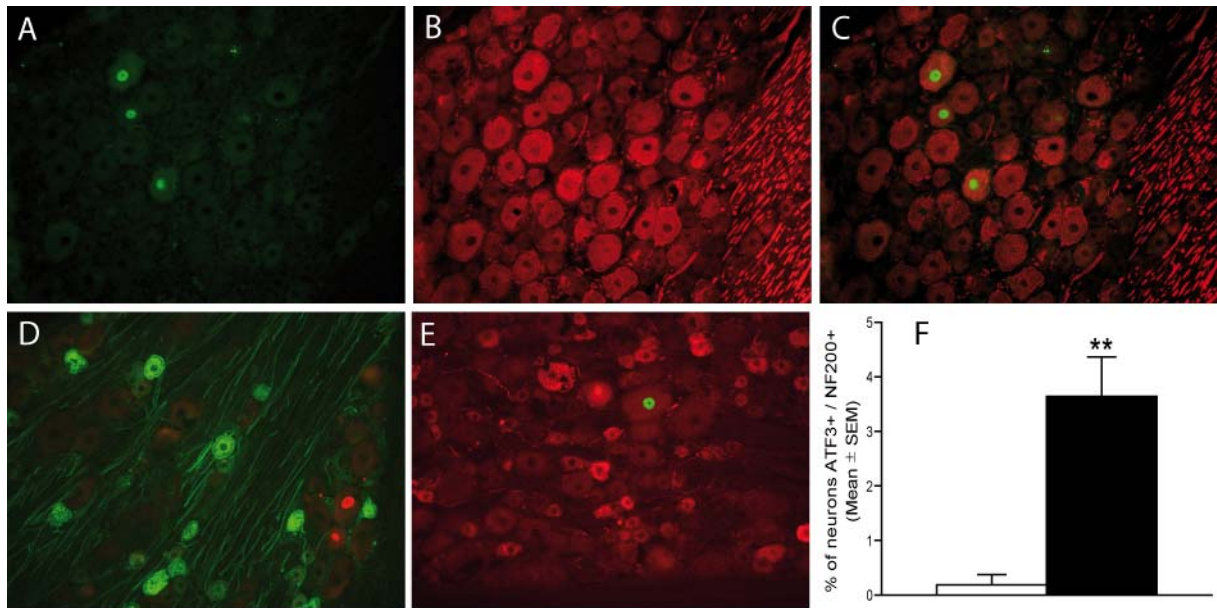


Figure 6

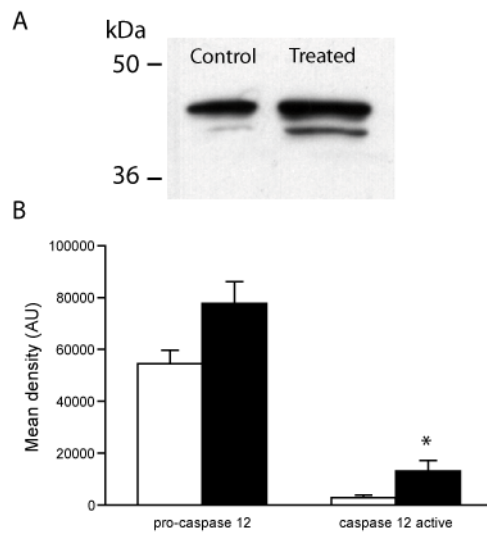


Figure 7

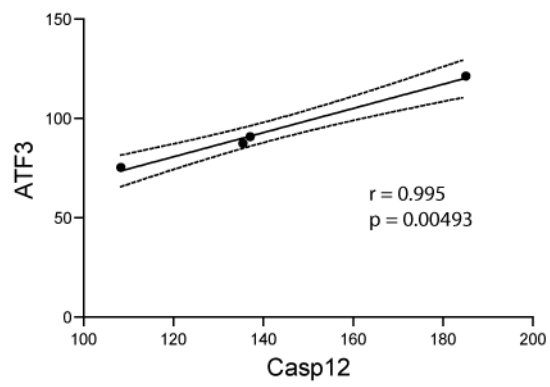


Figure 8

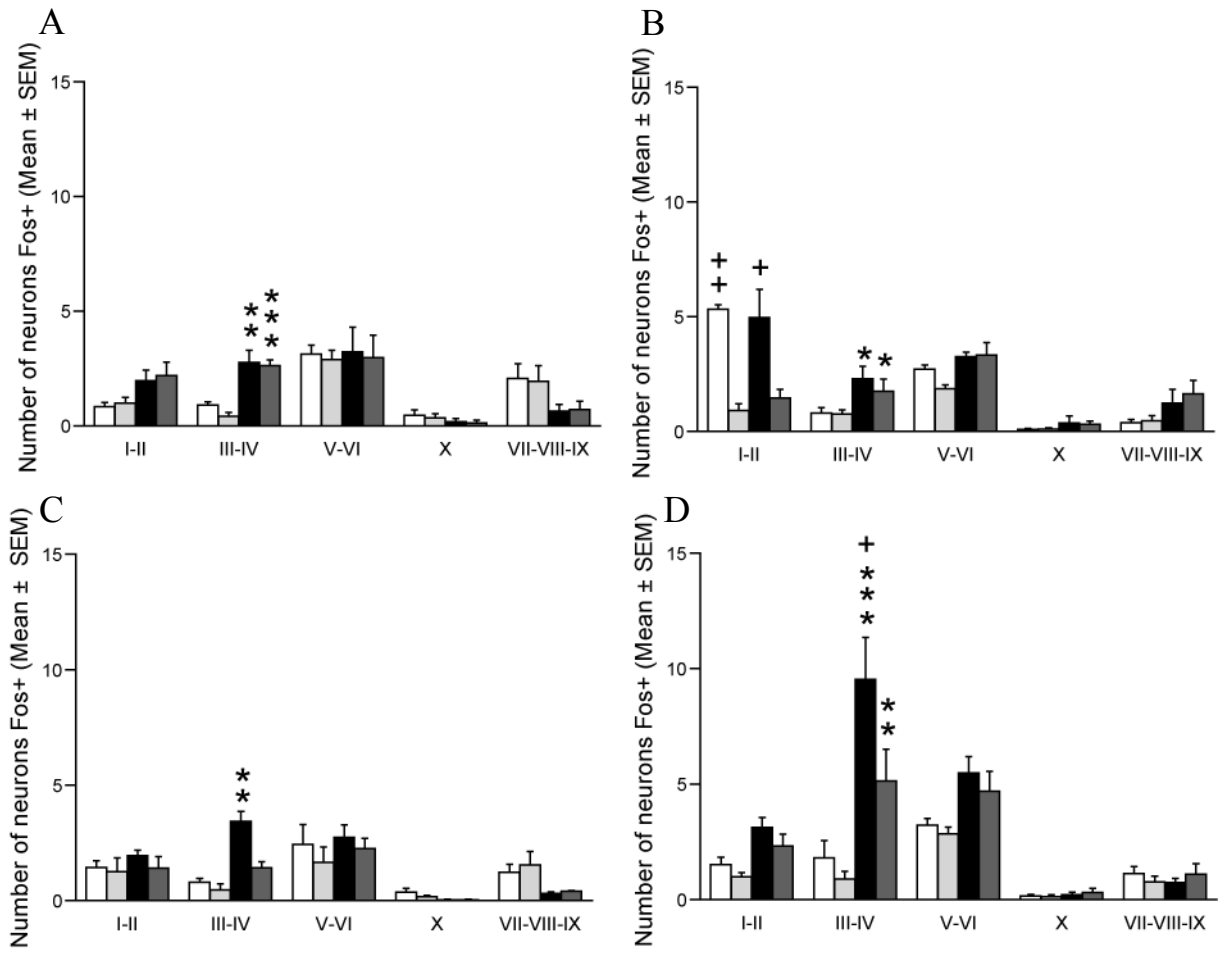


Figure 9

---

GO: GO:0045449

Term: regulation of transcription

Identifier	Symbol	Name	rapport	SD	p-value
NM_031553	Nfyb	Nuclear transcription factor-Y beta	1.124282	0.036186	0.000579
NM_031094	Rbl2	Retinoblastoma-like 2	1.183602	0.058349	0.001059
NM_031647	Sfmbt1	Scm-like with four mbt domains 1	1.097544	0.033517	0.001300
XM_578542	Garnl1	GTPase activating RANGAP domain-like 1	1.118203	0.056350	0.006763
NM_053499	Mterf	Mitochondrial transcription termination factor 1	1.135066	0.066503	0.008107
NM_031583	Cspg6	Chondroitin sulfate proteoglycan 6	1.229146	0.112817	0.009722
NM_001009362	Pask	PAS domain containing serine/threonine kinase	1.133135	0.070775	0.011324
NM_001008357	Hcfc2	Host cell factor C2	1.150064	0.080138	0.011932
NM_199117	Cbx7	Chromobox homolog 7	1.285498	0.149682	0.014086
NM_012912	Atf3	Activating transcription factor 3	1.278439	0.153121	0.016969
NM_133563	Giot1	Gonadotropin inducible ovarian transcription factor 1	1.223440	0.129214	0.018973
NM_182823	Krim1	KRAB box containing zinc finger protein	1.091508	0.056765	0.019886
XM_220888	Hoxb8	Homeo box B8	1.249714	0.146328	0.020898
NM_012967	Icam1	Intercellular adhesion molecule 1	1.146029	0.089839	0.021238
XM_232354	Chd4	Chromodomain helicase DNA binding protein 4	1.171824	0.105438	0.021992
NM_053727	Nfil3	Nuclear factor, interleukin 3 regulated	1.212470	0.131066	0.024036
NM_033485	Pawr	PRKC, apoptosis, WT1, regulator	1.142198	0.095565	0.029624
NM_052798	Zfp354	Zinc finger protein 354A	1.181401	0.121881	0.031554
NM_001004210	Xbp1	X-box binding protein 1	1.215732	0.144060	0.032567
NM_022441	Acvrl1	Activin A receptor type II-like 1	1.227444	0.152053	0.033298
XM_345832	Gli1	GLI-Kruppel family member GLI1	1.204040	0.140001	0.035292
NM_053536	Klf15	Kruppel-like factor 15	1.156234	0.110066	0.036007
XM_213633	Hoxd3	Homeo box D3	1.136987	0.098474	0.037527
XM_227104	Zfp131	Zinc finger protein 131	1.157115	0.112762	0.038520
NM_031152	Rab11a	RAB11a, member RAS oncogene family	1.141895	0.105517	0.042582
NM_019620	Znf386	Zinc finger protein 386 (Kruppel-like)	1.220473	0.159786	0.043842
NM_212501	Gtf2h4	General transcription factor II H, polypeptide 4	1.210222	0.157176	0.048013

---

Table 1

GO		GO:0006915				
Term: apoptosis						
	Identifier	Symbol	Name	rapport	SD	p value
Negative regulation of apoptosis	NM_012652	Slc9a1	Solute carrier family 9, member 1	1.143261	0.107271	0.043699
	NM_053575	Cabin1	Calcineurin binding protein 1	1.161580	0.104719	0.026692
	NM_019163	Psen1	Presenilin 1	1.081561	0.057766	0.032454
	XM_231692	Braf	V-raf murine sarcoma viral oncogene homolog B1	1.239817	0.127822	0.013950
	XM_221656	Son	Son cell proliferation protein	1.264560	0.137039	0.012910
	NM_012767	Gnrh1	Gonadotropin-releasing hormone 1	1.194988	0.069900	0.002016
	XM_341999	Syvn1	Synovial apoptosis inhibitor 1, synoviolin	1.133307	0.098247	0.040730
Positive regulation of apoptosis	NM_017079	Cd1d1	CD1d1 antigen	1.130287	0.066044	0.009143
	NM_130422	Casp12	Caspase 12	1.213926	0.076934	0.002134
	NM_145765	Tnfsf15	Tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 15	1.122448	0.061892	0.016822
	NM_031735	Stk3	Serine/threonine kinase 3 (STE20 homolog, yeast)	1.201863	0.133635	0.030866
	NM_033485	Pawr	PRKC, apoptosis, WT1, regulator	1.142198	0.095565	0.029624
	NM_199407	Unc5c	Unc-5 homolog C (C. elegans)	1.226128	0.127949	0.017449

Table 2



---

GO: GO:0015267

Term: channel or pore class transporter activity

Identifier	Symbol	Name	Rapport	SD	p value
NM_012919	Cacna2d1	Calcium channel, voltage-dependent, alpha2/delta subunit 1	1.270453	0.118196	0.006133
NM_173103	Clcnkb	Chloride channel Kb	1.153396	0.073970	0.007657
NM_017261	Gria2	Glutamate receptor, ionotropic, AMPA2	1.244009	0.114742	0.008148
NM_133414	Clcc1	Chloride channel CLIC-like 1	1.163632	0.084587	0.010638
NM_012528	Chrnbl	Cholinergic receptor, nicotinic, beta polypeptide 1 (muscle)	1.086702	0.050716	0.015515
NM_030875	Scn1a	Sodium channel, voltage-gated, type I, alpha	1.234579	0.153827	0.031370
NM_013040	Abcc9	ATP-binding cassette, sub-family C (CFTR/MRP), member 9	1.135616	0.098992	0.039526
NM_012652	Slc9a1	Solute carrier family 9, member 1	1.143261	0.107271	0.043699
NM_012721	P2rx1l	Purinergic receptor P2X-like 1, orphan receptor	1.206529	0.151746	0.045023
NM_019314	Kcnn2	Potassium intermediate/small conductance calcium-activated channel, subfamily N, member 2	1.075098	0.059034	0.046362
NM_017099	Kcnj8	Potassium inwardly-rectifying channel, subfamily J, member 8	1.136595	0.106192	0.049119
NM_013039	Abcc8	ATP-binding cassette, sub-family C (CFTR/MRP), member 8	1.224774	0.168319	0.049272

---

Table 3

Basal Fos labeling				
	Vincristine Righth Side	Vincristine Left Side	Control Righth Side	Control Left Side
I-II	1,97 ± 0,47	2,2 ± 0,58	0,85 ± 0,17	0,99 ± 0,25
III-IV	2,78 ± 0,52 **	2,63 ± 0,26 ***	0,91 ± 0,13	0,41 ± 0,17
V-VI	3,23 ± 1,08	2,99 ± 0,96	3,13 ± 0,4	2,89 ± 0,4
X	0,18 ± 0,14	0,13 ± 0,13	0,45 ± 0,24	0,36 ± 0,17
VII-VIII-IX	0,65 ± 0,28	0,70 ± 0,37	2,06 ± 0,65	1,94 ± 0,7

Noxious mechanical stimulation				
	Vincristine Righth Side	Vincristine Left Side	Control Righth Side	Control Left Side
I-II	4,96 ± 1,23 +, \$	1,46 ± 0,37	5,33 ± 0,19 ++, \$	0,9 ± 0,3
III-IV	2,3 ± 0,55 *	1,76 ± 0,52 *	0,8 ± 0,25	0,76 ± 0,18
V-VI	3,25 ± 0,21	3,33 ± 0,54	2,71 ± 0,18	1,85 ± 0,18
X	0,37 ± 0,30	0,31 ± 0,15	0,08 ± 0,05	0,1 ± 0,06
VII-VIII-IX	1,23 ± 0,59	1,64 ± 0,58	0,39 ± 0,14	0,46 ± 0,22

Non-noxious mechanical stimulation				
	Vincristine Righth Side	Vincristine Left Side	Control Righth Side	Control Left Side
I-II	1,94 ± 0,23	1,41 ± 0,5	1,43 ± 0,3	1,26 ± 0,59
III-IV	3,43 ± 0,44 **	1,42 ± 0,26	0,79 ± 0,17	0,47 ± 0,26
V-VI	2,75 ± 0,53	2,26 ± 0,43	2,43 ± 0,86	1,66 ± 0,65
X	0,03 ± 0,03	0,03 ± 0,03	0,36 ± 0,17	0,17 ± 0,06
VII-VIII-IX	0,31 ± 0,07	0,4 ± 0,02	1,23 ± 0,34	1,54 ± 0,59

Non-noxious mechanical stimulation without anesthesia				
	Vincristine Righth Side	Vincristine Left Side	Control Righth Side	Control Left Side
I-II	3,12 ± 0,43	2,32 ± 0,51	1,53 ± 0,31	0,97 ± 0,19
III-IV	9,55 ± 1,81 ***, +, \$	5,14 ± 1,36 **	1,8 ± 0,76	0,9 ± 0,32
V-VI	5,48 ± 0,71	4,7 ± 0,86	3,23 ± 0,29	2,85 ± 0,29
X	0,2 ± 0,12	0,3 ± 0,18	0,15 ± 0,06	0,12 ± 0,07
VII-VIII-IX	0,73 ± 0,19	1,1 ± 0,45	1,12 ± 0,31	0,77 ± 0,25

Table 4

### 3. La sérotonine et le récepteur 5-HT<sub>2A</sub>

#### 3.1. Classification et nomenclature des récepteurs sérotoninergiques

La libération de la sérotonine (5HT) par les neurones sérotonergiques lors de leur activation conduit à modifier l'activité des neurones cibles en utilisant la médiation de récepteurs spécialisés, ensembles protéiques complexes qui reconnaissent spécifiquement la structure chimique de la 5HT. Le récepteur sérotoninergique type est un récepteur couplé aux protéines G avec ses sept domaines transmembranaires (Figure 19). Seul le récepteur 5HT<sub>3</sub> ne répond pas à ce mode d'activation et est couplé à un canal ionique (récepteur ionotropique).

L'activation des récepteurs métabotropiques entraîne la stimulation (ou l'inhibition) d'un système fonctionnel produisant l'activation des seconds messagers, parmi lesquels l'adénosine monophosphate cyclique (cAMP), le phosphate d'inositol (IP3), le diacylglycerol (DAG) etc... La synthèse de ces seconds messagers est dépendante de la présence d'enzymes (adénylcyclase, phospholipase C), elles-mêmes activées par des protéines G activatrices (Gs) ou inhibitrices (Gi/Go).

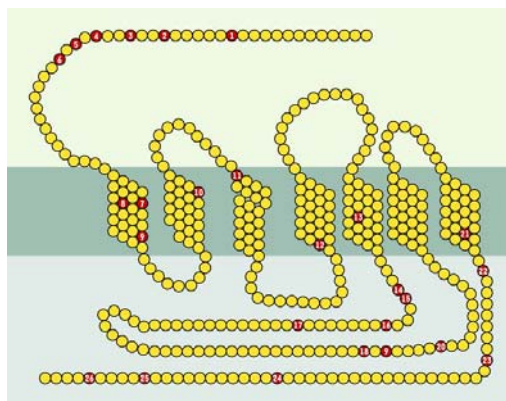


Figure 19: Représentation schématique de la séquence en acides aminés des différents récepteurs sérotoninergiques montrant les résidus concernés par des polymorphismes génétiques chez l'homme.

Famille	Sous type	Protéine G	Transduction	Agonistes	Localisation
5-HT <sub>1</sub>	5HT <sub>1A</sub>	Gs	Adénylcyclase	8-OH-DPAT, buspirone	SNC (système limbique surtout)
	5HT <sub>1B</sub>	Gs	Adénylcyclase	CP 93129, 5-CP	SNC (ganglions de la base, nerfs périph.)
	5HT <sub>1D</sub>	Gs	Adénylcyclase	Sumatriptan, 5-CT	SNC (ganglions de la base principalement)
	5HT <sub>1E</sub>	Gs	Adénylcyclase	5 HT	SNC
	5HT <sub>1F</sub>	Gs	Adénylcyclase	5 HT	SNC
	5HT <sub>1-like</sub>	Gs	Adénylcyclase	Sumatriptan, 5-CT	Vaisseaux cérébraux
5HT <sub>2</sub>	5HT <sub>2A</sub>	Gi/Go	Phospholipase C	a -methyl-5-HT, DOI	Muscle lisse, SNC plaquettes, poumons
	5HT <sub>2B</sub>	Gi/Go	Phospholipase C	a -methyl-5-HT, DOI	Estomac surtout
	5HT <sub>2C</sub>	Gi/Go	Phospholipase C	a -methyl-5-HT, DOI	SNC (plexus choroïde)
5HT <sub>3</sub>	-	-	Ouverture canal	2-methyl-5-HT, m-cp	Neurones centraux et périphériques
5HT <sub>4</sub>	-	Gs	Adénylcyclase	Cisapride, SC 53116	SNC, cœur, vessie, digestif
5HT <sub>5</sub>	-		?	5HT	SNC
5HT <sub>6</sub>	-	Gs	Adénylcyclase	5HT	SNC
5HT <sub>7</sub>	-	Gs	Adénylcyclase	5HT	SNC

*Classification des récepteurs sérotoninergiques*

### 3.2. Le rôle de la sérotonine et du récepteur 5HT<sub>2A</sub> dans les douleurs chroniques.

Il est maintenant bien admis que les voies descendantes, en particulier sérotoninergiques issues essentiellement du noyau raphé magnus (NRM) sont impliquées dans les douleurs neuropathiques, au moins dans leur persistance dans le temps (Millan, 2002; Pertovaara, 2000; Porreca et al., 2002; Ren and Dubner, 2002). Ce serait les voies facilitatrices descendantes qui seraient principalement mises en jeu par la stimulation soutenue à la périphérie des fibres afférentes nociceptives primaires se projetant sur les cellules nociceptive-spécifiques des couches superficielles (I-II) de la corne dorsale de la moelle épinière exprimant le récepteur NK1 de la substance P (Figure 20). Ces dernières activent les cellules du NRM par une voie indirecte (Suzuki et al., 2004; Rahman et al., 2006). En effet, la destruction sélective des « cellules NK1 » des couches superficielles de la corne dorsale entraîne une diminution importante de la douleur neuropathique ainsi qu'une diminution de la sensibilisation des cellules nociceptives non spécifiques des couches profondes de la corne dorsale (Mantyh et al., 1997; Suzuki et al., 2002; Khasabov et al., 2002). De plus, les effets

produits par la destruction des « cellules NK1 » sont reproduits par la destruction des voies descendantes 5-HT (Oatway et al., 2004; Rahman et al., 2006; Suzuki et al., 2002; Suzuki et al., 2005). Il a été montré que cette facilitation mise en jeu par des voies descendantes implique le récepteur 5-HT<sub>3</sub> (Rahman et al., 2006; Suzuki et al., 2002; Suzuki et al., 2005). Toutefois le récepteur 5-HT<sub>2A</sub> pourrait également jouer un rôle dans cette facilitation spinale. Il a été montré que ce récepteur est fortement exprimé dans la corne dorsale de la moelle épinière du rat en particulier dans les couches superficielles où se trouvent les cellules nociceptives spécifiques et différentes classes d'interneurones (Doly et al., 2004). Ces couches sont aussi celles qui reçoivent l'innervation 5-HT descendante la plus dense (Maxwell et al., 1983). Enfin, il a été montré que les « cellules NK1 » reçoivent des afférences synaptiques 5-HT (Stewart and Maxwell, 2000). Les cellules des couches profondes de la corne dorsale expriment également le récepteur 5-HT<sub>2A</sub>.

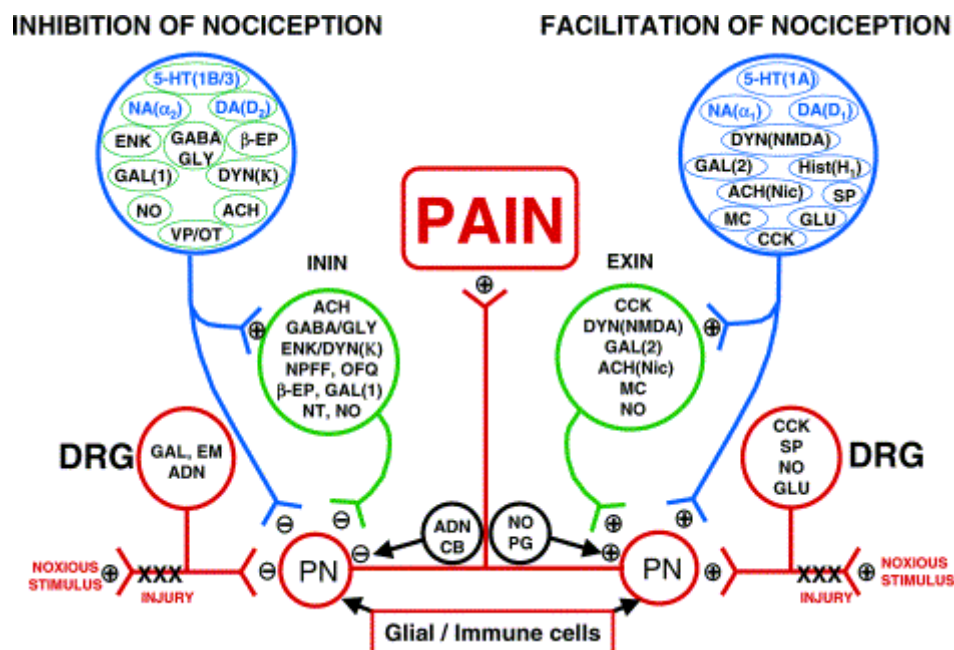


Figure 20 : Représentation schématique de la multiplicité des neurotransmetteurs et des modulateurs impliqués dans la modulation de l'information douloureuse dans la corne dorsale de la moelle épinière. Dans le pan gauche sont représentés les neurotransmetteurs et les modulateurs impliqués dans les processus anti-nociceptifs (inhibition descendante) et dans le pan droit, ceux impliqués dans les processus pro-nociceptifs (facilitation descendante). Abréviations; PN, neurone de projection; DRG, ganglion des racines dorsales; CCK, cholecystokinine; SP, substance P; CGRP, calcitonin gene related peptide; GLU, glutamate; DYN, dynorphine; NMDA, N-méthyl-D-aspartate; MC, melanocortine; 5-HT, sérotonine; NA, noradrénaline; DA, dopamine; Hist, histamine; GAL, galanine; EM, endomorphine; ACh, acétylcholine; GABA, acide γ-hydroxy-butyrice; GLY, glycine; ENK, enképhaline; NPFF, neuropeptide FF; OFQ, orphanine FQ (nociceptine); β-EP, β-endorphine; VP, vasopressine and OT, oxytocine. (Millan, 2002)

Le récepteur 5-HT<sub>2A</sub> est exprimé dans des cellules du GRD. Sa distribution a été récemment caractérisée par Van Steenwinckel et collaborateurs. Ainsi 40% des corps cellulaires du GRD du segment lombaire L3 expriment le récepteur 5-HT<sub>2A</sub>. Ce récepteur est principalement exprimé dans les cellules de petits et moyens diamètres et est colocalisé avec la substance P, le récepteur TRPV1 ou l'isolectine B4 (marqueur des fibres de petits diamètres non peptidergiques) (Van Steenwinckel et al., 2009). La présence de ce récepteur excitateur sur les terminaisons périphériques des fibres nociceptives induit une potentialisation de la douleur (Abbott et al., 1996; Doi-Saika et al., 1997; Tokunaga et al., 1998; Kjorsvik et al., 2003) et rend compte de son rôle dans les douleurs de type inflammatoire. Ses effets sont d'autant plus marqués que l'expression du récepteur dans les GRD est nettement augmentée dans le modèle d'inflammation chronique induit par l'injection d'adjuvant de Freund (Wu et al., 2001; Okamoto et al., 2002). Enfin, il a été récemment démontré que les récepteurs périphériques et spinaux étaient impliqués dans un modèle de douleur neuropathique induite par est un analogue nucléosidique inhibiteur de la transcriptase inverse virale (le ddC) chez le rat (Van Steenwinckel et al., 2008).

3.3. Résultats

Serotonin 5-HT<sub>2A</sub> receptor involvement and Fos expression at the spinal level in vincristine-induced neuropathy in the rat

Karine Thibault, Juliette Van Steenwinckel, Marie-Jeanne Brisorgueil, Jacqueline Fischer, Michel Hamon, Bernard Calvino, Marie Conrath

Pain 2008, 140 : 305–322

**RESUME DE L'ARTICLE**

Le but de cette étude était de démontrer l'implication du récepteur 5-HT<sub>2A</sub> dans les douleurs neuropathiques induites par un traitement anticancéreux : la Vincristine

**Méthodologie** : Les animaux ont été traités par la Vincristine par injection intrapéritonéale quotidienne pendant deux cycles de cinq jours.

Dans un premier temps, nous avons réalisé une étude comportementale chez le rat afin de valider ce protocole comme modèle de développement de douleurs neuropathiques chez les animaux traités par la Vincristine comme modèle d'étude du récepteur 5-HT<sub>2A</sub>. Cette étude a été réalisée après injection épidurale d'antagoniste du récepteur 5-HT<sub>2A</sub>. Une étude comportementale a également été réalisée sur des souris dont le gène du récepteur 5-HT<sub>2A</sub> a été invalidé (5-HT<sub>2A</sub> <sup>-/-</sup>) traitées par la Vincristine, comparées avec des souris de souche sauvages 5-HT<sub>2A</sub> <sup>+/+</sup>.

Dans un deuxième temps, nous avons recherché si le protocole d'injections de Vincristine modifiait l'expression du récepteur 5-HT<sub>2A</sub> dans les ganglions de racines dorsales et dans la corne dorsale de la moelle épinière.

Enfin pour évaluer les effets activateurs du protocole d'injections de Vincristine, nous avons réalisé une étude immunohistochimique du marqueur d'activité neuronale c-Fos dans la corne dorsale de la moelle épinière.

**Résultats** : D'un point de vue comportemental, dans notre protocole, les rats traités par la Vincristine développent une allodynie thermique au froid ainsi qu'une allodynie et une hyperalgésie mécanique. Une injection d'antagoniste du récepteur 5-HT<sub>2A</sub> par voie épidurale diminue ces douleurs neuropathiques de manière dépendante de la dose. De plus, les souris 5-HT<sub>2A</sub> <sup>-/-</sup> ne développent pas de douleurs neuropathiques après un traitement par la Vincristine.

Chez les rats traités par la Vincristine, le nombre de neurones exprimant le récepteur 5-HT<sub>2A</sub> dans les ganglions des racines dorsales est augmenté de 38%. On observe également une augmentation du marquage du récepteur 5-HT<sub>2A</sub> dans les couches I à IV de la corne dorsale de la moelle épinière. De plus les études menées en microscopie électronique montrent une augmentation de 76.3% de la densité des terminaisons axonales immunopositives pour le récepteur 5-HT<sub>2A</sub> dans les couches superficielles de la corne dorsale de la moelle épinière.

Enfin, nous avons montré une augmentation du nombre de neurones c-Fos positifs dans l'ensemble des couches de la corne dorsale de la moelle épinière, superficielles, intermédiaires et profondes. Les expériences de double marquage ont révélé que certains neurones c-Fos positifs étaient également 5-HT<sub>2A</sub> positif après traitement par la Vincristine.

**Conclusion** : L'ensemble de ces résultats indique que le récepteur 5-HT<sub>2A</sub> serait impliqué dans la sensibilisation des neurones des ganglions des racines dorsales et dans le traitement du message nociceptif dans la corne dorsale de la moelle épinière, ce qui laisse envisager, d'un point de vue pharmacologique, que les antagonistes de ce récepteur pourraient constituer, du moins en partie, des analgésiques de choix pour soulager les douleurs neuropathiques générées par la Vincristine.





## Serotonin 5-HT<sub>2A</sub> receptor involvement and Fos expression at the spinal level in vincristine-induced neuropathy in the rat

Karine Thibault<sup>a,b,1</sup>, Juliette Van Steenwinckel<sup>a,1</sup>, Marie-Jeanne Brisorgueil<sup>a</sup>,  
Jacqueline Fischer<sup>a</sup>, Michel Hamon<sup>c</sup>, Bernard Calvino<sup>b</sup>, Marie Conrath<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> *Neurobiologie des Signaux Intercellulaires, CNRS, UMR 7101, Université Pierre et Marie Curie-Paris 6, 7 Quai St. Bernard, 75252 Paris Cedex 05, France*

<sup>b</sup> *CNRS UMR 7637, ESPCI, 10 rue Vauquelin, 75231 Paris Cedex 05, France*

<sup>c</sup> *INSERM UMR 677, Université Pierre et Marie Curie-Paris 6, Faculté de Médecine, site Pitié-Salpêtrière, 91 boulevard de l'Hôpital, 75634 Paris Cedex 13, France*

Received 13 May 2008; received in revised form 30 July 2008; accepted 3 September 2008

### Abstract

We recently showed that peripheral and spinal 5-HT<sub>2A</sub> receptors (5-HT<sub>2AR</sub>) are involved in a rodent model of neuropathy induced by a nucleoside analogue reverse transcriptase inhibitor. In this paper, we show that 5-HT<sub>2AR</sub> are also involved in neuropathy induced by an anti-neoplastic drug, vincristine. Vincristine-treated rats (0.1 mg/kg, daily i.p. administration for two 5-day cycles) developed thermal allodynia and mechanical hypersensitivity, which decreased in a dose-related manner after epidural injection a 5-HT<sub>2A</sub> receptor antagonist. Moreover, 5-HT<sub>2A</sub><sup>-/-</sup> mice did not develop vincristine-induced neuropathy contrarily to their 5-HT<sub>2A</sub><sup>+/+</sup> littermates. In vincristine-treated rats, the number of nociceptive dorsal root ganglion cells expressing the 5-HT<sub>2AR</sub> was increased by 38%, and 5-HT<sub>2AR</sub> immunolabelling was enhanced in layers I–IV of the dorsal horn. At the EM level, a 76.3% increase in the density of 5-HT<sub>2AR</sub> immunopositive axon terminals within superficial layers of the dorsal horn was noted after vincristine treatment. Immunocytochemical study of Fos expression in vincristine-treated rats revealed a significant increase in the number of Fos-positive neurons not only in regions where nociceptive fibres terminate superficial (I–II) and deep layers (V–VI) of the spinal cord, but also in intermediate layers, suggesting that Aβ fibres could be involved in the spinal sensitization observed in this model. Double labelling experiments showed that Fos-positive neurons were endowed with 5-HT<sub>2AR</sub> immunolabelling in the dorsal horn of vincristine-treated rats. These data provide support to the idea that, in vincristine-induced neuropathy, 5-HT<sub>2AR</sub> are involved in the sensitization of peripheral nociceptors and spinal nociceptive processing.

© 2008 International Association for the Study of Pain. Published by Elsevier B.V. All rights reserved.

**Keywords:** Chemotherapy; Dorsal root ganglia; Immunocytochemistry; MDL 11,939; Pain behaviour; Ultrastructure

### 1. Introduction

The 5-HT<sub>2A</sub> receptor (5-HT<sub>2AR</sub>), which is strongly expressed by primary sensory neurons [9,38,41,44], is involved in the sensitization of peripheral nociceptive fibers [24,46], a phenomenon involved in 5-HT-induced

hyperalgesia [1,14,31,41,54,59]. Accordingly, 5-HT<sub>2A</sub><sup>-/-</sup> mutant mice differed from wild-type mice by a dramatic decrease in the formalin-induced nociceptive response during the second phase, corresponding to the inflammatory response [29]. In addition, the 5-HT<sub>2AR</sub> is also widely expressed in the neurons of the spinal cord dorsal horn [15], where it may be involved in spinal sensitization [26,33]. We have recently demonstrated that peripheral and spinal 5-HT<sub>2AR</sub> are involved in neuropathic pain in a rodent model of neu-

\* Corresponding author. Tel.: +33 144273272; fax: +33 144272508.  
E-mail address: marie.conrath@snv.jussieu.fr (M. Conrath).

<sup>1</sup> These authors equally contributed to this work.

ropathy induced by 2′3′-dideoxycytidine (ddC), a nucleoside analogue with reverse transcriptase inhibitory properties used for the treatment of AIDS [56]. Vincristine, an anti-neoplastic drug used to treat a wide variety of cancers, presents a peripheral neurotoxicity leading to severe side effects including neuropathic pain [8,47]. Vincristine-induced neuropathic pain is characterized by paresthesias and dysesthesias at limb extremities, and hypersensitivity to noxious and non-noxious stimuli [21]. In the rodent models of vincristine-induced neuropathy [4,5,40,60], animals develop mechanical and thermal hyperalgesia and allodynia associated with morphological and functional alterations of peripheral afferent fibers [6,51–53,55].

In order to assess whether the 5-HT<sub>2A</sub>R may be involved in the sensitization of dorsal horn neurons in a model of peripheral neuropathy induced by vincristine, we studied in this work the role of the 5-HT<sub>2A</sub>R at the spinal and peripheral levels in rats that had been treated with this neurotoxic agent. We studied the effect of a 5-HT<sub>2A</sub>R antagonist (or the absence of the 5-HT<sub>2A</sub>R in knock-out mice) on the mechanical hypersensitivity induced by vincristine. We also studied the expression of 5-HT<sub>2A</sub>R in the lumbar spinal cord and dorsal root ganglia (DRG) by immunocytochemistry under light and electron microscopes. In order to gain further insights into the alterations of sensory information processing caused by vincristine treatment, we quantified Fos immunolabelling, a marker of activation [10], with particular attention to neurons expressing both this marker of neuronal activity and 5-HT<sub>2A</sub>R.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Animals and experimental groups

Male Wistar rats weighing 200–240 g at the beginning of the experiments (Elevage Janvier, Le Genest St Isle, France) and 5-HT<sub>2A</sub>–/– mutant mice [18] and their paired wild-type mice were used in these studies. Genotyping was carried out by polymerase chain reaction on genomic DNA from tail biopsies using appropriate primers [18]. Wild-type and 5-HT<sub>2A</sub>–/– mice were the product of mating between heterozygous couples raised on C57BL/6J genetic background. Males and females were separated at weaning, and only male mice were used, at 2–3 months of age. Rats and mice were kept under a regular 12-h light/dark cycle in a temperature and humidity controlled environment with free access to food and water. Experiments were performed according to the European Community Council Directive of 24 November 1986 (86/609/EEC) and to guidelines published in a Guest Editorial in *Pain* on ethical standards for the investigation of experimental pain in animals (Committee for Research and Ethical issues of the I.A.S.P., 1980) and were in accordance with the

French “Ministère de l’Agriculture et de la Pêche” rules.

Nociceptive behaviour (see below) was tested in two groups of rats, one control and one treated by vincristine (12 control and 20 vincristine-treated rats for the Von Frey hair test; 20 control and 21 vincristine-treated rats for the Randall-Selitto test and 10 animals in each group for the acetone test). Animals were randomly chosen and tested by an experimenter blinded to the treatment. Among them, 4 control and 4 vincristine-treated rats, randomly chosen, were analyzed for 5-HT<sub>2A</sub>R immunoreactivity in the spinal cord and DRG. Two additional groups of rats, one treated by vincristine ( $n = 10$ ) and one control ( $n = 10$ ), were used to study the Fos immunoreactivity. Pharmacological experiments were conducted on 54 rats ( $n = 44$  vincristine-treated,  $n = 10$  vehicle-treated) that received (on day 15 after starting the vincristine/saline injections), just before behavioural testing, an epidural injection of MDL 11,939 (Tocris, Ellisville, MO, USA), a specific 5-HT<sub>2A</sub>R antagonist [17,43] at three different doses, or artificial cerebro-spinal fluid (aCSF, Harvard Apparatus, Les Ulis, France) (11 rats per group). Four groups of male mice were studied for nociceptive behaviour: wild type mice treated by vincristine ( $n = 10$ ), wild-type control mice, injected with 0.9% NaCl ( $n = 8$ ), 5-HT<sub>2A</sub>–/– mutants treated with vincristine ( $n = 12$ ) and 5-HT<sub>2A</sub>–/– controls injected with saline ( $n = 8$ ).

### 2.2. Drugs and treatments

Rats received intraperitoneal (i.p.) injections of vincristine (Oncovin-1 mg, EG LABO, Boulogne-Billancourt, France) at 0.1 mg/kg/day for two 5-day cycles with a 2-day pause between cycles as described by Weng et al. [60]. Control rats received i.p. injections of the vehicle (0.9% NaCl) according to the same protocol. Wild-type and 5-HT<sub>2A</sub>–/– mice were subjected to the same respective treatments, except that vincristine was injected at the daily dose of 0.2 mg/kg i.p. MDL 11,939 was prepared as a 10 mM solution in saline acidified with acetic acid (final pH, 6.5). Epidural injections of MDL 11,939 were performed directly through the intact skin of rats between L5 and L6 vertebrae. Using a Hamilton syringe with a 26-gauge needle, MDL 11,939 was given in a volume of 25  $\mu$ l at a concentration of 1, 10 or 100  $\mu$ M from the 10 mM solution diluted in aCSF (Harvard Apparatus). Rats were injected under transient volatile anaesthesia with 33% O<sub>2</sub>, 67% N<sub>2</sub>O and 2% isoflurane (Aerrane, Baxter, Maurepas, France), delivered via a tight-fitting mask.

### 2.3. Behavioural tests

Behavioural tests were conducted in a quiet room (at 21 °C). They were first performed on days 1, 8 and 15

before vincristine injection. Rats were familiarised with the investigator and the testing procedures one week before the start of the experiment. All behavioural tests, in rats and mice were performed by an experimenter blinded to the treatment on animals randomly chosen so that vehicle-treated animals were tested concurrently with vincristine-treated animals. The same conditions were applied to rats pretreated with MDL 11,939 or aCSF before testing. Body weights were measured before each injection and clinical observations were made every day.

To assess mechanical allodynia, we used a protocol similar to that described by Flatters and Bennett [19]. Animals were placed on a wire mesh floor in a plexiglas cylinder and allowed to accommodate for at least 30 min. For rats, von Frey filaments (BioSeb, Chaville, France) of 4, 8 and 15 g were used. Series of 5 stimuli with each filament were applied with 5 s intervals to the mid-plantar area of each hind-paw. A positive response was counted when an immediate withdrawal of hind-paw was observed. A negative response corresponded to no reaction or a delayed ( $\geq 3$  s) withdrawal of the hind-paw. The percentage of response was calculated as the average response for both hind-paws. The same procedure was used in mice but with von Frey filaments of 0.04 and 0.4 g.

The mechanical hyperalgesia was also assessed in rats using the paw pressure test [45]. Nociceptive thresholds were measured by the application of increasing pressure onto the hindpaw using an Ugo Basile analgesimeter (Apelex, Passy, France). The nociceptive threshold was defined as the minimal force at which the rat withdrew its paw. Measurements were performed on both paws at 5 min intervals until four similar consecutive threshold pressure values were obtained for each paw. Thus, for each rat, the nociceptive threshold was determined as the average of eight measurements.

Cold allodynia was evaluated using the acetone test in rats. Animals were placed in a plexiglas cylinder and a drop of 0.05 ml of acetone was applied onto the mid-plantar area of the hind-paw. Responses were monitored for 1 min after acetone application in order to measure pain-related behaviour instead of startle “surprise” responses. Pain behaviour was graded according to a 4-point scale, as previously described by Flatters and Bennett [19]: 0, no response; 1, quick withdrawal, flick or stamp of the paw; 2, prolonged withdrawal or repeated flicking ( $\geq 2$ ) of the paw; 3, repeated flicking with licking of the ventral side of the paw. Acetone was applied alternately three times to each paw with a time interval of at least 1 min between each test. For each rat, cumulative “cold scores”, from 0 to a maximum of 18, were then generated by summing the six scores (three for each paw).

### 2.3.1. Statistical analyses

One-tail unpaired *t*-tests were used to compare control and vincristine-treated groups before, 8 or 15 days after the beginning of the treatment. Repeated measures one-way ANOVA with Bonferroni post hoc test were used to compare vincristine-induced responses on 8 or 15 days treatment with responses before treatment in the von Frey filament and Randall–Selitto tests. For the acetone test, the Mann and Whitney unpaired *t*-test was used to compare the cold scores of vincristine-treated and vehicle-treated rats; the Wilcoxon matched-pair test was used to compare cold score before and after vincristine treatment.

In the study of the effect of MDL 11,939 on mechanical withdrawal, one-tail paired *t*-tests were used to compare withdrawal frequency to von Frey stimulation in all experimental groups (vincristine/aCSF or vincristine/1–100  $\mu$ M MDL 11,939) before and 15 days after the beginning of the treatment. Von Frey withdrawal frequencies at 30, 60 and 120 min after MDL 11,939 injection were compared to pre-MDL 11,939 values (Time 0) using repeated measures one-way ANOVA with Bonferroni post hoc test. One-way ANOVA with Bonferroni post hoc test was also used to compare AUCs (areas under the curves) corresponding to MDL 11,939 (1–100  $\mu$ M) and aCSF treatments.

In mice, repeated measures one-way ANOVA with Bonferroni post hoc test were used to compare withdrawal frequency to von Frey stimulation before vincristine treatment and after 8 or 15 days treatment. At each time post-injection, the response frequencies were compared between the experimental groups (5-HT2A+/+, 5-HT2A–/– and heterozygous mice) using one-way ANOVA with Bonferroni post hoc test.

### 2.4. Tissue preparation for immunocytochemistry

Rats were deeply anaesthetized with pentobarbital (Ceva Santé Animale, Libourne, France) at the dose of 60 mg/kg i.p. and perfused transcardially with 100 ml of 0.9% NaCl containing 0.1% sodium nitrite, as vasodilator, followed by 800 ml of 4% paraformaldehyde (PFA) in 0.1 M phosphate buffer (PB), pH, 7.4. The lumbar spinal cord was dissected out and postfixed overnight in 4% PFA at room temperature. Lumbar L4 DRG were dissected out, postfixed overnight in the same fixative at 4 °C, and cryoprotected in 20% sucrose in 0.1 M PB, pH 7.4, for 24 h at 4 °C. DRG were then frozen in isopentane cooled at –30 °C and kept at –20 °C until to be used. Immunocytochemistry was performed on the lumbar L4–L5 segments, corresponding to the central region of spinal hind-paw sensory projection [32], and L4 DRG. Fourteen  $\mu$ m-thick longitudinal DRG sections were serially cut using a cryostat. Every fifth section was mounted onto a Superfrost slide so that

we obtained five slides corresponding to the whole ganglion. Thirty  $\mu\text{m}$ -thick spinal cord sections were made using a vibratome.

### 2.5. Fos immunolabelling

Sections of lumbar (L4–L5) spinal cord from vincristine-treated and control animals were processed in parallel. Free-floating sections were preincubated for 30 min at room temperature in 0.02 M PB, pH, 7.4, containing 0.9% NaCl (PBS) and 3% bovine serum albumin (PBS-BSA), then incubated for 15 h at room temperature with 1/2000 rabbit anti-Fos antibodies (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, USA) diluted in PBS-BSA. Pre-incubation and incubation baths were supplemented with 0.4% Triton X-100. After extensive washing in PBS-BSA, sections were incubated for 1 h in 1/250 biotinylated anti-rabbit IgG (Vector, Burlingame, CA). Sections were then washed in PBS and incubated for 1 h in the avidin-biotin-peroxidase complex (Vector, Burlingame, USA) diluted (1/200) in PBS. After 10 min washing in 0.05 M Tris-HCl, pH, 7.4, sections were incubated in the same buffer supplemented with 0.04% (w/v) 3,3'-diaminobenzidine (DAB) (Sigma, Saint-Quentin-Fallavier, France) and 0.01% (v/v) hydrogen peroxide. The reaction proceeded at 20 °C under light microscope control and was stopped after 10 min by washing in Tris-HCl buffer. Sections were then washed in PBS, transferred onto glass slides and mounted using PBS/glycerol (1/1) mounting medium.

#### 2.5.1. Quantification of Fos immunolabelling

Tissue sections were examined using light-field microscope (Leica DMRB, Leica, Rueil-Malmaison, France) at low magnification (4 $\times$ ) to determine the segmental level according to Molander et al. [36]. They were then examined at higher magnification (10 $\times$ ) to localize Fos-positive nuclei in the different layers, and the number of Fos-positive nuclei per lamina was counted. Quantifications were performed on seven sections at the L4 lumbar level, chosen randomly. Four regions were defined: the superficial dorsal horn corresponding to layers I and II, the nucleus proprius (layers III–IV), the neck of the dorsal horn (layers V–VI) and the ventral horn (see schematic diagram in Fig. 8). Five vincristine-treated and five control animals were analysed on day 8 and on day 15 of the vincristine/vehicle injection protocol. The investigator who performed the countings was blinded to the animal treatment. For each animal, the mean cell count in each region was determined on the left and right sides, and data were statistically analysed using the software 'Origin 7.5'. A *t*-test was performed. Data are expressed as mean  $\pm$  SEM. Statistical significance was set at  $p < 0.05$ .

### 2.6. 5-HT<sub>2A</sub>R immunolabelling

#### 2.6.1. Antibodies

We used affinity purified rabbit polyclonal anti-5-HT<sub>2A</sub>R antibodies directed against the 22–41 (LGDGPRLYHNDNFNSRDANTS) sequence of the rat receptor (Diasorin, 24288, Antony, France or Sigma, Saint Quentin Fallavier, France). We previously demonstrated the specificity of these antibodies for immunocytochemistry (adsorption control with the synthetic peptide) and also showed a total absence of immunolabelling in 5-HT<sub>2A</sub>–/– mice, whereas wild-type mice of the same genetic background exhibited a labelling distribution comparable to that observed in rats [15,56].

#### 2.6.2. Light microscopy

For light microscopy, fluorescent 5-HT<sub>2A</sub>R immunolabelling was performed on spinal cord and lumbar DRG. Free-floating spinal cord sections from vincristine-treated ( $n = 4$ ) and control animals ( $n = 4$ ) were processed in parallel. Sections were preincubated for 30 min at room temperature in PBS-BSA and then incubated for 15 h at room temperature with 1/100 rabbit anti-5-HT<sub>2A</sub>R antibodies. Pre-incubation and incubation baths were supplemented with 0.4% Triton X-100. After washes, sections were incubated for 1 h at room temperature in 1/250 biotinylated anti-rabbit IgG (Vector). They were then washed in PBS and incubated for 2 h in 1/1000 streptavidin-Cy3 (Sigma). Finally, they were washed in PBS, and mounted in Vectashield medium (Vector). 5-HT<sub>2A</sub>R immunolabelling in DRG was performed on slide-mounted sections. Slides were preincubated for 30 min in PBS-BSA supplemented with 0.2% Triton X-100, then incubated for 3 days at room temperature with 1/100 rabbit anti-5-HT<sub>2A</sub>R antibodies. Slides were then washed in PBS and sections were incubated for 2 h in 1/2000 anti-rabbit IgG coupled to Alexa-555 (Molecular Probes, Paris, France). Sections were then washed in PBS, and mounted in Vectashield medium (Vector).

#### 2.6.3. Quantification of 5-HT<sub>2A</sub>R immunolabelling in the spinal cord

Quantification of 5-HT<sub>2A</sub>R immunolabelling was performed on 5 vehicle- and 5 vincristine-treated rats. We previously verified that the vincristine-treated rats were neuropathic. Analysis was performed by an experimenter blinded to the treatment of the animals. In order to avoid bias caused by immunolabelling fading, pictures were digitized immediately after immunocytochemistry using a Q-imaging cooled camera Leica DMRB. For each animal, eight sections were randomly chosen in the lumbar L4–L5 segments, and the intensity of staining was measured using 'Image-Pro Plus' (Media Cybernetics, Silver Spring, MD, USA). The analysis was performed on five regions highly labelled and corre-

sponding to the laminar organisation of the spinal cord (see schematic diagram of Fig. 3). Layer II was arbitrarily delimited as the most intensely immunolabelled layer with anti-5-HT<sub>2A</sub>R antibodies, layer I was determined as the upper adjacent layer and layer III was the region ventral to the highly labelled layer II. Only the lateral part of the latter layer was counted. A band ventral to this region but dorsal to layer V was considered as layer IV. The lateral part of layer V, easily identified from its fascicular organisation, was counted. We also quantified 5-HT<sub>2A</sub>R immunolabelling in a region localized in the medial border of the grey matter in the neck of the dorsal horn, corresponding to a ventral extension of lamina IV (IV<sub>v</sub>) [36]. For each region, the whole area was delimited, and its average grey level was measured. Data are expressed as mean grey level (mean ± SEM.). A *t*-test was performed, and *p* value <0.05 was considered as significant.

#### 2.6.4. Quantification of 5-HT<sub>2A</sub>R immunolabelling in the DRG

DRG sections (every fifth section) from vincristine-treated (*n* = 4) and control (*n* = 4) rats were analysed. Pictures were digitized using a cooled camera (see above) with an objective X10. Images of the whole DRG section were then reconstituted using Photoshop CS (Adobe, Paris, France). Only immunoreactive neurons exhibiting their nucleus in the plan of the section were counted and their size measured. They were manually depicted using “Image-Pro Plus”. The measurement of the total surface area of each section allowed data to be expressed as the number of immunoreactive neurons per surface area. Comparison of the mean number and mean diameter of 5-HT<sub>2A</sub>R positive neurons in DRG between vincristine-treated and saline-treated rats was made using the one-tail unpaired *t*-test. Statistical significance was accepted at *p* < 0.05.

#### 2.6.5. 5-HT<sub>2A</sub>R immunolabelling for electron microscopy

For electron microscopy, 5-HT<sub>2A</sub>R immunoperoxidase labelling was performed on free floating spinal cord vibratome sections. Sections were preincubated for 30 min at room temperature in PBS-BSA supplemented with 0.02% Triton X-100 and then incubated for two days at room temperature with 1/100 rabbit anti-5-HT<sub>2A</sub>R antibodies. The indirect avidin-biotin-peroxidase immunolabelling was processed as previously described for Fos-labelling using the Elite Kit (Vector). Sections from one vincristine-treated and one saline-treated animal were processed in parallel with the same revelation time in DAB. One section from each animal was mounted onto glass slide in glycerol-PBS (v/v). The other sections were postfixed for 10 min in 1% osmium tetroxide at room temperature in PB and, after two 10 min washings in PBS, they were dehydrated in graded alcohol. Sections were then incubated succes-

sively in alcohol/araldite (v/v) for 1 h, araldite (Fluka, Steinheim, Switzerland) for 15 h, and araldite supplemented with 2% accelerator (Fluka) for 5 h at 37 °C. Finally, they were embedded in araldite between two siliconed slides. Polymerisation proceeded at 60 °C for two days. Small blocks of the dorsal horn were cut in “silver” ultrathin sections using an ultramicrotome (LKB, Broma, Sweden). Ultrathin sections were collected on copper grids and then counterstained with lead citrate for 10 min at room temperature in a drying chamber. They were observed with a Leo 912 (Carl Zeiss, Le Pecq, France) electron microscope. Numerical images were acquired for the quantification of the immunolabelling.

#### 2.6.6. Quantification of 5-HT<sub>2A</sub>R immunolabelling at the ultrastructural level

Four sections from four pairs of animals (each pair comprising a control and a vincristine-treated rat) were processed in parallel up to final embedding in araldite. Images from ultrathin sections were acquired at 2000 magnification, and analysed by using Image ProPlus software. Somas, dendrites and axon terminals endowed with peroxidase reaction product were considered as immunolabelled provided that the labelling was at least associated with discrete subcellular organelles.

#### 2.6.7. Double 5-HT<sub>2A</sub>R/Fos immunolabelling

For double 5-HT<sub>2A</sub>R/Fos immunolabelling, sections were first incubated with anti-5-HT<sub>2A</sub>R antibodies (1/100) and revealed by using biotinylated anti-rabbit IgG and Streptavidine Cy3 as described above. Sections were then incubated with 1/1000 uncoupled anti-rabbit IgG (Vector) for 2 h at room temperature before being incubated with 1/2000 rabbit anti-c-Fos antibodies (Santa Cruz Biotechnology) for one night at room temperature. After washing, sections were incubated in 1/2000 anti-rabbit IgG-Alexa 488 (Molecular Probe, Invitrogen, Cergy-Pontoise, France), and immunofluorescence was analyzed as described above.

### 3. Results

#### 3.1. Clinical signs and behavioural tests

Before the beginning of the treatment, the baseline paw-withdrawal frequencies determined by mechanical stimulation with von Frey filaments were not significantly different between the two groups of rats randomly chosen for vehicle or vincristine administration (Fig. 1A–C). On day 8 after starting the treatment, responses to 8 and 15 g von Frey filament stimulation were significantly (*p* < 0.001) enhanced by 22% ± 5.1 and 27% ± 6.7, respectively, in vincristine-treated rats compared to baseline responses obtained before injection and to responses of vehicle-treated rats (Fig. 1B and C). On day 15, responses to von Frey filament stim-

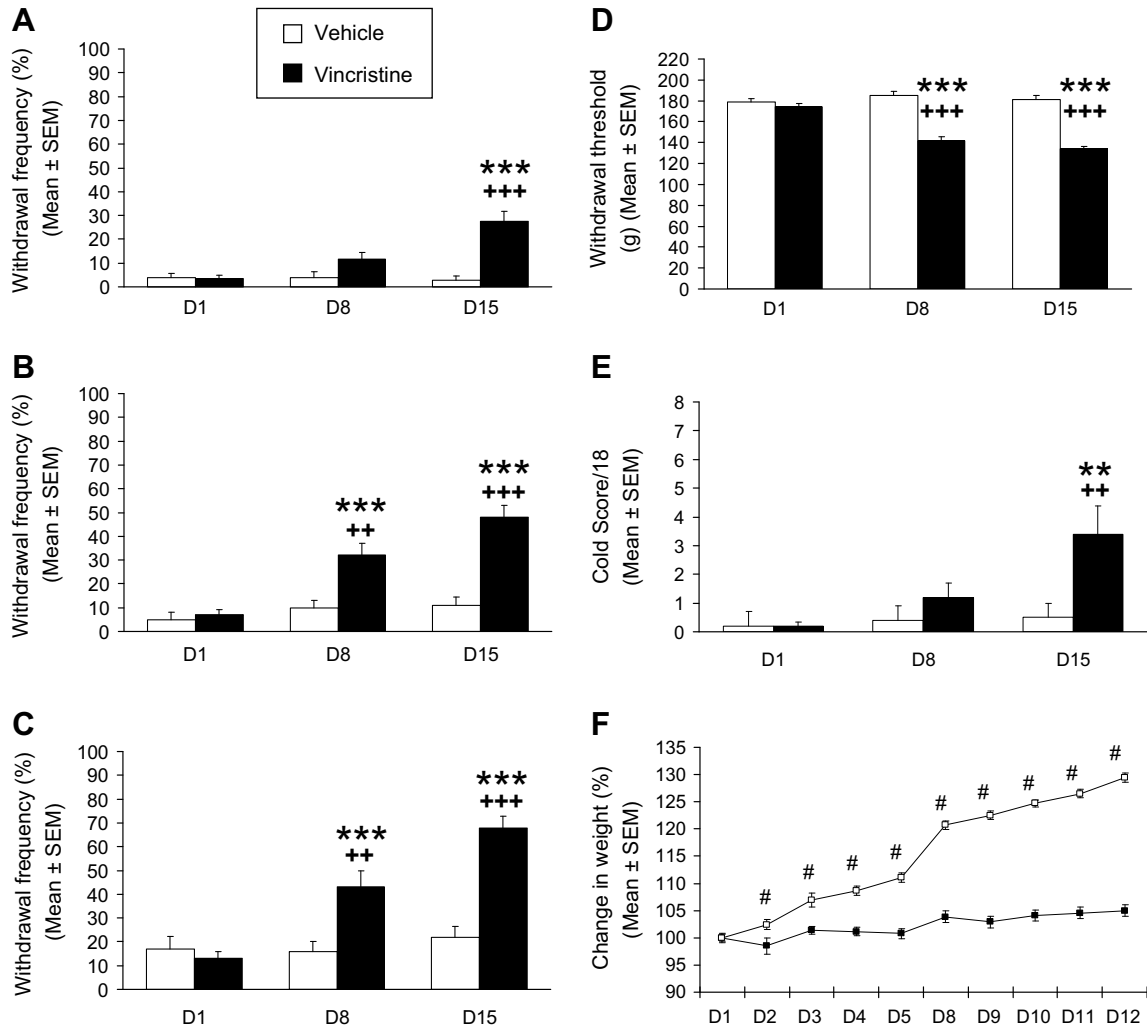


Fig. 1. Effect of vincristine treatment on pain behavior and body weight in rats. (A–C) Paw withdrawal response to von Frey filament stimulation. Response frequencies are shown before the treatment on day 1 (D1), and after 8 days (D8) and 15 days (D15) of treatment with vincristine (black bars) or vehicle (empty bars). Data are expressed as mean  $\pm$  SEM response frequency in 12 control (vehicle-treated) and 20 vincristine-treated rats. The mean response frequencies measured with von Frey filaments of 4 g (A), 8 g (B) and 15 g (C) bending force on days 8 and 15 are significantly increased in vincristine-treated compared to vehicle-treated rats and to withdrawal frequency before treatment.  $^{++}p < 0.01$ ,  $^{+++}p < 0.001$  vincristine compared to vehicle at each time point (*t*-test),  $^{***}p < 0.001$ , values of vincristine-treated rats compared to pre-vincristine treatment values (repeated measures one-way ANOVA with Bonferroni post hoc test). (D) Paw-withdrawal threshold determined with an Ugo-Basile analgesimeter (Randall and Selitto test). Data are expressed as mean  $\pm$  SEM withdrawal threshold in grams. The paw-withdrawal threshold is lower on days 8 and 15 in vincristine-treated rats ( $n = 21$ ) compared to baseline threshold and to vehicle-treated rats ( $n = 20$ ).  $^{+++}p < 0.001$ , vincristine compared to vehicle at each time point (*t*-test),  $^{***}p < 0.001$ , values of vincristine-treated rats compared to pre-vincristine treatment values (repeated measures one-way ANOVA with Bonferroni post hoc test). (E) Effect of vincristine treatment on responses to cold stimulation (acetone test). Data are expressed as mean “cold score”  $\pm$  SEM (see details in Section 2,  $n = 10$ /group).  $^{**}p < 0.01$ , “cold score” of vincristine-treated rats compared to vehicle-treated rats at each time point (Mann and Whitney unpaired *t*-test).  $^{**}p < 0.01$ , “cold score” of vincristine-treated rats compared to baseline values before treatment (Wilcoxon matched-paired test). (F) Changes in the mean daily body weight in vincristine-treated (black dots,  $n = 74$ ) and saline-treated rats (empty squares,  $n = 40$ ). Vincristine-treated rats failed to gain weight in contrast to the saline-treated group.  $^{\#}p < 0.001$  (*t*-test, vincristine compared to vehicle at each time point).

ulation in vincristine-treated rats were further enhanced compared to responses on day 8 ( $p < 0.01$  for 4 and 8 g filaments and  $p < 0.001$  for 15 g filament). The respective increases were  $+24.5\% \pm 4.4$  for 4 g filament,  $+37\% \pm 4.9$  for 8 g filament and  $46\% \pm 4.9$  for 15 g filament, compared to both baseline responses before treatment and responses of vehicle-treated rats (Fig. 1A–C).

Vincristine-induced hypersensitivity to von Frey filament of 4 g bending force corresponded probably to allodynia, because baseline response frequency was  $<5\%$ . Vincristine-induced hypersensitivity to 8 and 15 g Von Frey filament stimulation more probably reflected mechanical hyperalgesia.

Before starting the treatment with vincristine or saline, the baseline withdrawal thresholds, measured with

the paw pressure test, did not significantly differ between the two treatment groups. The threshold value then decreased significantly ( $p < 0.005$ ) from  $174.26 \pm 3.48$  g on day 0 (before the first injection) to  $141.96 \pm 3.55$  g ( $-19\%$ ) on day 8 and  $134.18 \pm 2.28$  g ( $-23\%$ ) on day 15 in rats treated with vincristine (Fig. 1D). By contrast, vehicle-treated rats did not show any significant variation of the mechanical threshold throughout the whole treatment protocol.

As illustrated in Fig. 1E, vehicle-injected control rats only rarely responded to acetone, their mean “cold score” never exceeding 1 (mean 0.5). On day 8, only 20% of vincristine-treated rats responded to acetone, whereas on day 15, 40% of vincristine-treated rats responded (not shown). Response to acetone was considered as positive when the score was  $>2$ , the maximal response obtained in vehicle-treated rats. On day 8, the mean “cold score” of vincristine-treated rats, including the non-responders, was 1.2, a value not significantly different from the score of control rats. On day 15, the mean “cold score” of vincristine-treated rats was significantly increased ( $p < 0.05$ ) up to a value of 3.4 (Fig. 1E). The mean “cold score” of responder rats

reached  $4.00 \pm 1.70$  on day 8 and  $6.25 \pm 1.72$  on day 15 of vincristine treatment.

The vincristine-treated rats failed to gain weight during the treatment period, whereas controls rats showed a 30% gain weight for the same period (Fig. 1F). Although the mortality was low (1 death/ 74 rats), all vincristine-treated rats presented several clinical abnormalities like spasmodic breathing, diarrhoea and alopecia. Furthermore, all rats seemed anaemic. In controls rats, no clinical alterations could be observed.

### 3.2. 5-HT<sub>2A</sub> immunolabelling in lumbar DRG

In lumbar DRG of both vehicle and vincristine-treated animals, 5-HT<sub>2A</sub> immunolabelling was mainly observed in small and medium diameter neurons (Fig. 2A and B). Occasionally, large cell bodies were also immunolabelled. Quantification of immunopositive neurons showed a 38% increase ( $p < 0.05$ ) in the number of total 5-HT<sub>2A</sub> immunolabelled cells in vincristine-treated rats (mean  $\pm$  SEM:  $234.00 \pm 19.80$  cells/mm<sup>2</sup>) compared to saline-treated rats ( $168.75 \pm 15.32$  cells/mm<sup>2</sup>). The distribution histogram of diameters of immunoreac-

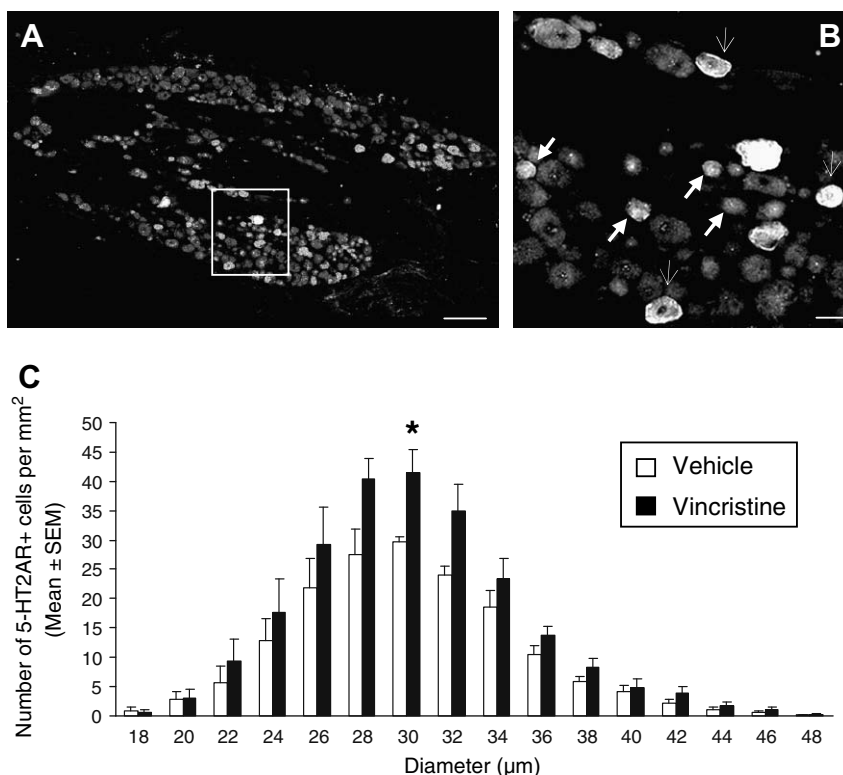


Fig. 2. 5-HT<sub>2A</sub> immunofluorescence labelling in L4 DRG after a 15 day-vincristine treatment (A and B); B corresponding to insert delimited in A, but at higher magnification; scale bars:  $A = 150$   $\mu$ m,  $B = 30$   $\mu$ m). The immunolabelling is mainly confined to small (large arrows) and medium-sized cell bodies (small arrows). Large cell bodies were occasionally labelled. (C): Size distribution histogram of 5-HT<sub>2A</sub> immunolabelled cell bodies in the L4 DRG of vehicle-treated (white bars) and vincristine-treated rats (black bars). The number of immunoreactive cell bodies was significantly increased in vincristine-treated rats compared to control animals, particularly in the diameter range of 30  $\mu$ m ( $*p < 0.05$ ). But vincristine treatment did not modify the size distribution of immunoreactive cell bodies. Each bar is the mean  $\pm$  SEM of independent cell counting in one of the fifth DRG section from 4 vincristine-treated rats and 4 vehicle-treated controls.

tive cell bodies was similar in both groups, with a peak at 30  $\mu\text{m}$  (Fig. 2), significantly higher (+36%,  $p < 0.05$ ) in vincristine-treated rats (Fig. 2C).

### 3.3. 5-HT<sub>2A</sub>R immunolabelling in spinal cord

In saline-treated rats, 5-HT<sub>2A</sub>R immunolabelling was widely distributed in the spinal cord (Fig. 3A). It was particularly dense in layer IX and in the ventral part of layer X around the central canal. The dorsal horn exhibited a relatively high staining in particular in a thin band corresponding to layer II, the lateral part of which being more labelled. Layer III was less labelled and the deeper layers, including the neck of the dorsal horn, displayed moderate to low labelling. After vincristine treatment, 5-HT<sub>2A</sub>R immunolabelling exhibited a clear-cut but relatively small increase in all layers of the dorsal horn while, in contrast, the intensity of the staining in

the ventral horn was unchanged (Fig. 3B). Quantification of 5-HT<sub>2A</sub>R immunolabelling in the superficial layers of the dorsal horn (Fig. 3C and D) demonstrated a significant increase ( $p < 0.001$ ) in mean grey level in layer I (+11%:  $1787.22 \pm 31.20$  in vincristine-treated animals compared to  $1605.40 \pm 31.18$  in control animals, means  $\pm$  SEM,  $n = 4$ ), layer II (+17%:  $2506.69 \pm 39.20$  compared to  $2140.95 \pm 43.37$ ) and layer III (+11%:  $2322.80 \pm 37.50$  and  $2083.90 \pm 46.57$ ). In layer IV, 5-HT<sub>2A</sub>R immunoreactivity exhibited a smaller increase (+4.5%:  $1905.43 \pm 27.57$  compared to  $1823.20 \pm 31.32$ ,  $p < 0.05$ ).

The intensity of intracellular staining was increased in neurons located in layers I and IV–V (Fig. 4), and in layer II (not shown). Moreover, long labelled dendrites were observed in the dorsal horn of vincristine-treated animals while they were shorter or unlabelled in the dorsal horn of control animals (Fig. 4A, B, E and F). At a

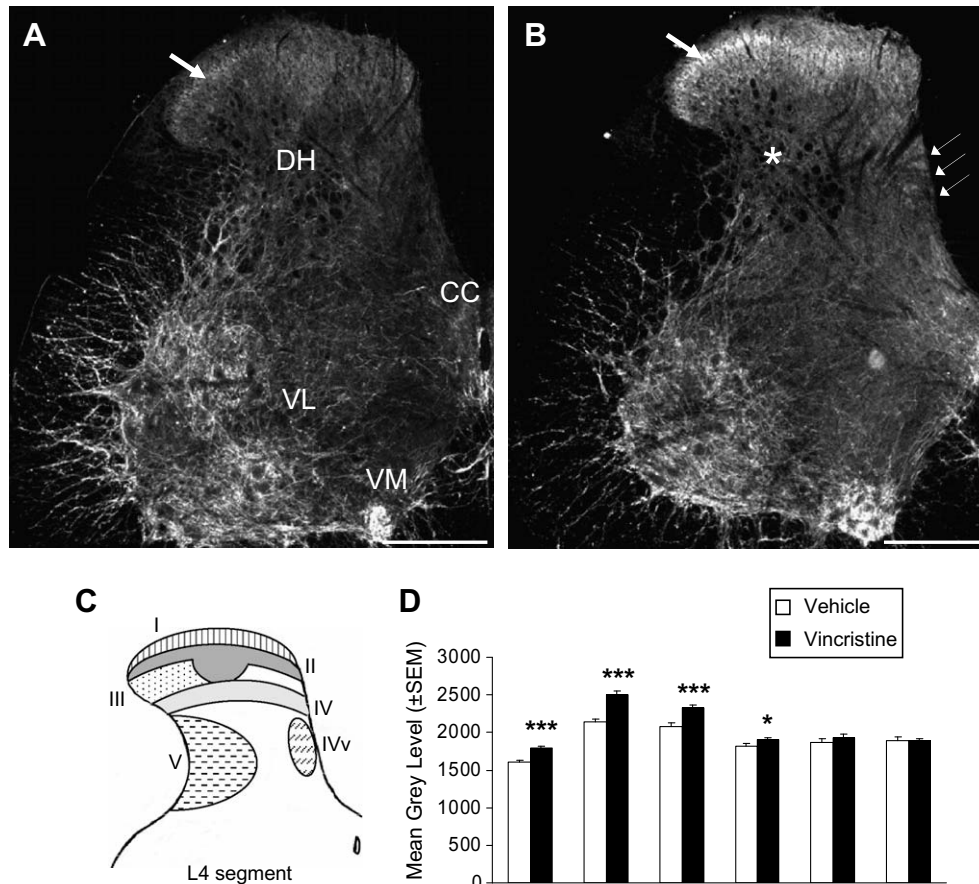


Fig. 3. 5-HT<sub>2A</sub>R immunolabelling in the lumbar spinal cord in control and vincristine-treated rats. (A): In a control (saline-treated) rat, 5-HT<sub>2A</sub>R immunolabelling was particularly intense in motoneurons of the ventro-lateral (VL) and the ventro-medial (VM) columns. A dense immunoreactivity was also observed around the central canal (CC), i.e. in layer X. In the dorsal horn (DH), the staining was moderate but slightly more intense in layer II. (B): in a vincristine-treated rat, layer II immunolabelling was increased (arrow). The labelling was also enhanced in layers V (asterisk) and VI (thin arrows). The immunostaining in the ventral horn was not modified. Scale bars: 500  $\mu\text{m}$ . (C): Schematic diagram showing the regions where 5-HT<sub>2A</sub>R immunolabelling was quantified (7 lumbar sections from each of 5 control and 5 vincristine-treated rats, see details in Section 2). (D): Grey level in the different regions analysed. Each bar is the mean  $\pm$  SEM of 35 independent determinations. The mean grey level was significantly higher in the four dorsal horn layers (I, II, III, IV) in vincristine-treated rats (black bars) compared to control rats. \* $p < 0.05$ , \*\*\* $p < 0.001$  ( $t$ -test).



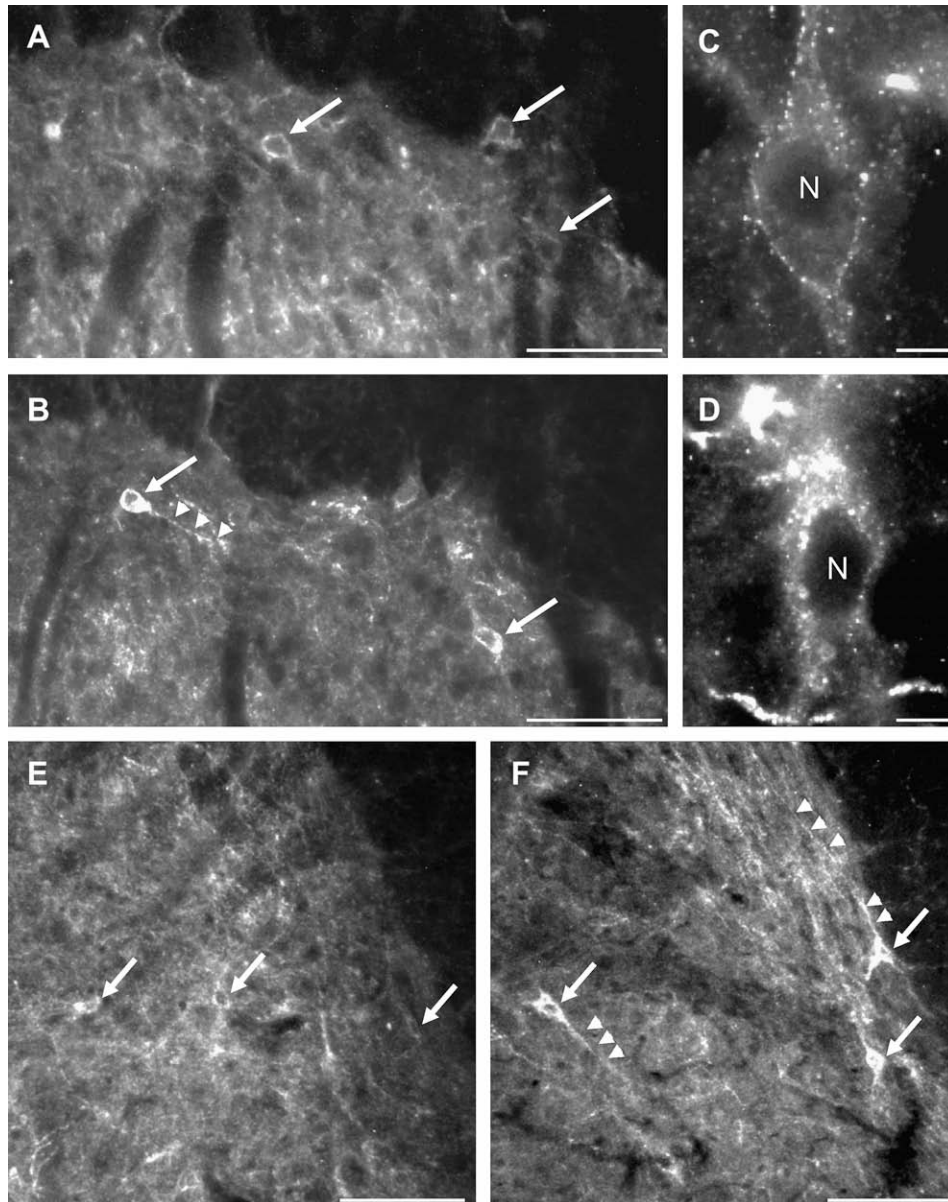


Fig. 4. Comparison of 5-HT<sub>2A</sub>R immunolabelling between saline-treated (A, C, and E) and vincristine-treated rats (B, D, and F) in layer I (A,B), layer V (C,D) and the ventral part of layer IV (E,F). The number of immunoreactive cell bodies (pointed by arrows) seemed unchanged while the intensity of immunolabelling was greatly enhanced in all layers after vincristine treatment (B versus A). In saline-treated rats, dendrites were generally not visible while they were clearly labelled in vincristine-treated rats (see arrowheads in B and F). Also notice the intense cytoplasmic labelling of a soma in layer V from a vincristine-treated rat (D) compared to the slight labelling of a comparable neuron from a control rat (C). N = nucleus. Scale bars: A, B, E, F: 100  $\mu$ m; C, D: 10  $\mu$ m.

cellular level, the staining was mainly localized along the plasma membrane of cell bodies and proximal dendrites in control animals, while in vincristine-treated rats, a strong labelling was also observed in the cytoplasm (Fig. 4C and D).

#### 3.4. Subcellular distribution of 5-HT<sub>2A</sub>R in dorsal spinal cord

To investigate whether the increased 5-HT<sub>2A</sub>R immunoreactivity in the dorsal horn of vincristine-

treated rats corresponded to an enhanced number of labelled axon terminals, as could be inferred from the increased number of immunolabelled cells in DRG (Fig. 2) or to a greater density of immunoreactive cell bodies in the dorsal horn, we quantified immunolabelled soma, dendrites and axons in the two superficial layers where nociceptive fibres project [61], in vincristine-treated compared to vehicle-treated rats. Results showed that the number of all immunoreactive elements was  $32.0 \pm 6.9\%$  higher ( $p < 0.001$ ) in vincristine-treated animals than in control rats.

Among these elements, the number of immunoreactive axon terminals was enhanced by  $76.30 \pm 23.90\%$  after vincristine treatment. By contrast, the number of immunoreactive cell bodies and dendrites were not significantly affected by vincristine treatment (Fig. 5A). In cell bodies, 5-HT<sub>2A</sub>R immunolabelling was localized on different organelles such as Golgi apparatus and rough endoplasmic reticulum and vesicles. Axon

terminals were generally more intensely labelled in vincristine-treated rats (Fig. 5B and C) than in vehicle-treated rats (Fig. 5E). In dendrites, a labelling outlining the plasma membrane was observed. It was localized on the external face of the plasma membrane (Fig. 5D and F) as previously described [15] and as expected from the extracellular localization of the epitope recognized by anti-5-HT<sub>2A</sub>R antibodies. In con-

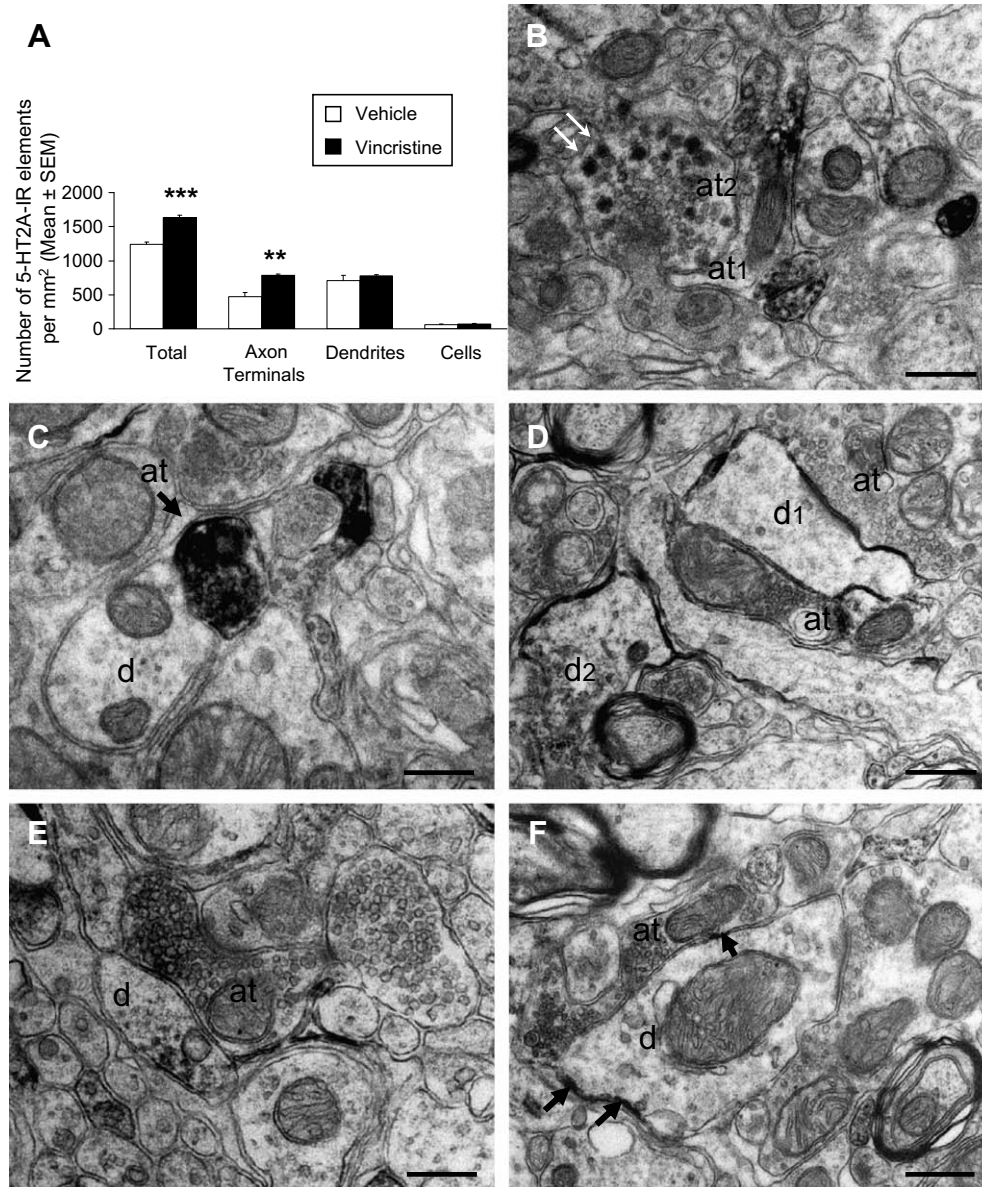


Fig. 5. Effect of vincristine treatment on the subcellular distribution of 5-HT<sub>2A</sub>R immunoreactivity in the dorsal horn layers I and II in rats. (A): After vincristine treatment, the density of total immunoreactive elements was significantly enhanced ( $***p < 0.001$ ) compared to vehicle-treated rats ( $n = 4$  sections per animal from 4 animals/group,  $t$ -test). The density of labelled axon terminals was increased ( $**p < 0.01$ ) whereas the densities of labelled dendrites and cell bodies were unchanged. (B): 5-HT<sub>2A</sub>R immunolabelling in two axon terminals (at1, at2) in a vincristine-treated rat. The peroxidase reaction product (in black) is localized around small clear vesicles (in at1) and in large granular vesicles (white arrows) in at2. (C): Dense immunolabelling filling out an axon terminal (at) in a vincristine-treated rat. Also notice in the neighbouring the dense labelling of a pre-terminal axon. (D): Dense immunolabelling (in black) outlining the plasma membrane of two dendrites (d1, d2) in a vincristine-treated rat. Notice the extracellular localisation of the labelling. (E): 5-HT<sub>2A</sub>R immunolabelling in a dendrite (d) and axon terminal (at) of vehicle-treated rat. Notice the less intense labelling in the axon terminal and the absence of immunoreaction at the plasma membrane of the dendrite. (F): Immunolabelled dendrite from a vehicle-treated rat exhibiting a lower plasma membrane labelling compared to the vincristine rat in D. Scale bars: 500 nm.

control animals, labelling was generally less intense over the plasma membrane (Fig. 5F), while in vincristine-treated animals some dendrites exhibited a labelling outlining the whole membrane (Fig. 5B). Furthermore, the intensity of immunolabelling appeared higher in

vincristine-treated rats than in control rats (compare Fig. 5B–E). In vincristine-treated rats, labelled axon terminals were medium-sized terminals containing densely-packed small synaptic vesicles and large granular vesicles (Fig. 5B).

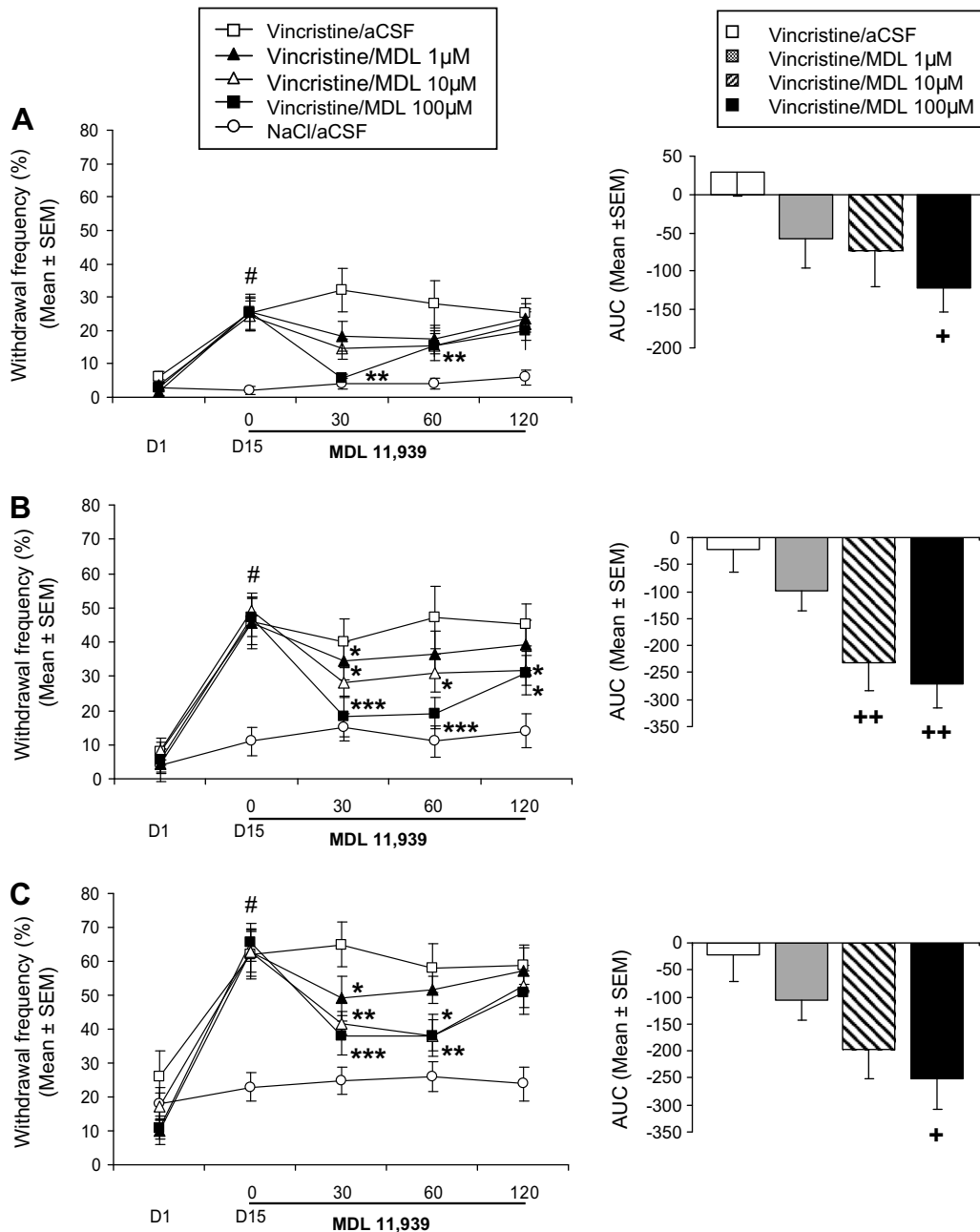


Fig. 6. Effect of acute administration of MDL11,939 on mechanical sensitization induced by vincristine treatment in rats. After vincristine or vehicle treatment (day 15), rats received an epidural injection of MDL 11,939 (1–100  $\mu$ M), or its vehicle (aCSF), then the frequency of paw withdrawal responses to 4 g (A), 8 g (B) or 15 g (C) von Frey filament stimulation was measured 30, 60 and 120 min later. Each point is the mean  $\pm$  SEM of 11: vincristine/aCSF, 11: vincristine/MDL at each concentration ( $3 \times 11$ ) or 10: vehicle/aCSF, independent determinations. The first point (D1 on abscissa) corresponds to measures made before starting vincristine or vehicle treatment, the second point (time 0, D15 on abscissa) corresponds to measures made just prior to MDL 11,939 or aCSF epidural injection. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$  compared to corresponding values before MDL11,939 injection (repeated measures one-way ANOVA with Bonferroni post hoc test). # $p < 0.001$  compared to corresponding values before vincristine treatment ( $t$ -test). The right hand panel depicts the areas under the curves (AUCs) calculated from curves shown in the left panel. + $p < 0.05$ , ++ $p < 0.01$  after 1–100  $\mu$ M MDL 11, 939 injection compared to aCSF injection (One-way ANOVA).

### 3.5. Effect of a 5-HT<sub>2A</sub>R antagonist on vincristine-induced mechanical hypersensitivity in rats

Epidural injection of the 5-HT<sub>2A</sub>R antagonist MDL 11,939 significantly lowered mechanical hypersensitivity induced by 15 days vincristine treatment (Fig. 6A–C). The maximal effect was observed 30 min after an epidural injection of 25  $\mu$ l of 100  $\mu$ M MDL 11,939 which significantly reduced paw withdrawal frequency to stimulation by von Frey filament of 4, 8 and 15 g in vincristine-treated rats (from  $32.0 \pm 6.5\%$  to  $5.5 \pm 1.6\%$ , from  $40.0 \pm 6.8\%$  to  $18.2 \pm 5.0\%$ , and from  $65.0 \pm 6.5\%$  to  $38.2 \pm 5.8\%$ , respectively,  $p < 0.001$  for 8 and 15 g filaments and  $p < 0.01$  for 4 g filament). At the dose of 10  $\mu$ M, MDL 11,939 also reduced paw withdrawal frequency of vincristine-treated rats to von Frey filament stimulation but to a lower extent: from  $40.0 \pm 6.8\%$  to  $28.2 \pm 4.4\%$  ( $p < 0.05$ ) 30 min after injection for the 8 g filament and from  $65.0 \pm 6.5\%$  to  $41.8 \pm 3.3\%$  ( $p < 0.01$ ) for the 15 g filament. As illustrated in Fig. 6A–C, the lower dose (1  $\mu$ M) of MDL 11,939 was also effective to significantly reduce ( $p < 0.05$ ) the paw withdrawal frequency to stimulation with von Frey filament: from  $40.0 \pm 6.8\%$  to  $34.5 \pm 5.6\%$  30 min after injection for the 8 g filament and from  $65.0 \pm 6.5\%$  to  $49.1 \pm 6.5\%$  for the 15 g filament). Comparison of areas under the curves (AUCs), calculated from 0 to 120 min after MDL 11,939 or aCSF injection for each group of animals, showed that the AUC for vincristine-treated rats injected with 100  $\mu$ M MDL 11,939 was significantly different from that of vincristine-treated animals injected with aCSF ( $p < 0.05$  for 4 g filament,  $p < 0.01$  for 8 and 15 g filaments) (Fig. 6, right panel). Furthermore, it appeared that the reduction of paw withdrawal frequency after MDL 11,939 epidural injection exhibited a dose-related effect (Fig. 6A–C). On its own, administration of MDL 11,939 did not modify mechanical responses to von Frey filament stimulation in vehicle-treated rats. Thus, in the later animals, 30 min (T30) and 60 min (T60) after epidural injection of 25  $\mu$ l of 100  $\mu$ M MDL 11,939 injection, the response frequencies to von Frey filaments stimulation were not statistically modified compared to values measured before injection.

### 3.6. Absence of mechanical hypersensitivity in 5-HT<sub>2A</sub>–/– mice treated by vincristine

Wild-type (5-HT<sub>2A</sub>R+/+) mice only poorly responded to von Frey filament of 0.04 g bending force (response frequency 0–1.25%) (Fig. 7A), but a withdrawal frequency of  $23.75 \pm 6.25\%$  could easily be quantified in response to 0.4 g von Frey filament stimulation (Fig. 7B). After 8 days of vincristine treatment, the response frequencies of 5-HT<sub>2A</sub>R+/+ mice to 0.04 and 0.4 g von Frey filaments were significantly enhanced

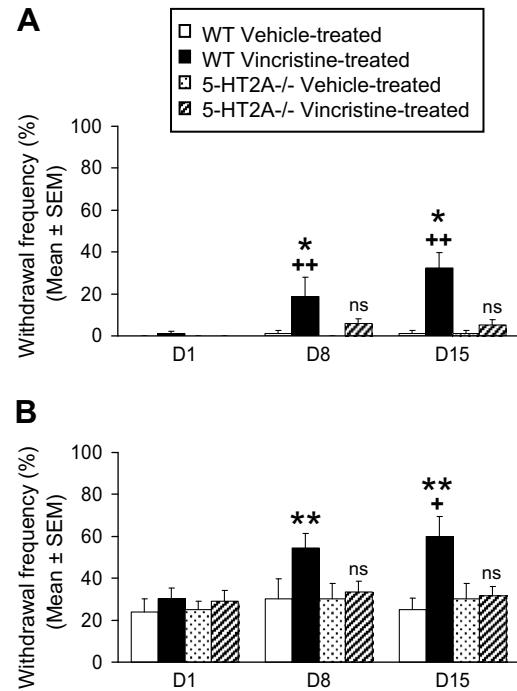


Fig. 7. Vincristine-induced mechanical sensitization in wild-type (WT, 5-HT<sub>2A</sub>+/+) and 5-HT<sub>2A</sub>-/- mice. Response frequencies to stimulations by von Frey filaments of 0.04 g (A) and 0.4 g (B) were measured before starting vincristine or vehicle treatment (D1 on abscissa), on days 8 (D8) and 15 (D15) of treatment. Each bar is the mean  $\pm$  SEM of independent determinations in 12 vincristine/5-HT<sub>2A</sub>-/-, 10 vincristine/WT, 8 vehicle/5-HT<sub>2A</sub>-/- and 8 vehicle/WT mice. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.05$ , comparison of withdrawal frequencies of vincristine/WT mice at D8 or D15 versus D1 (repeated measures one-way ANOVA with Bonferroni post-hoc test). + $p < 0.05$ , ++ $p < 0.01$ , comparison of withdrawal frequencies between the four groups at each time point (one-way ANOVA with Bonferroni post hoc test). ns: indicates that the withdrawal frequency of 5-HT<sub>2A</sub>-/- mice treated by vincristine was not significantly different from that of vehicle-treated 5-HT<sub>2A</sub>-/- and 5-HT<sub>2A</sub>+/+ mice.

( $18.88 \pm 9.13\%$  and  $54.44 \pm 6.89\%$ , respectively). At day 15, response frequencies to 0.04 g and 0.4 g von Frey filaments were further enhanced ( $32.22 \pm 7.41\%$  and  $60.00 \pm 9.43\%$ , respectively,  $p < 0.01$ ) demonstrating that mice treated by vincristine developed mechanical hyperalgesia and allodynia similar to those previously observed in vincristine-treated rats. These results are in accordance with previous data obtained in vincristine-treated mice showing that mechanical hypersensitivity appeared on day 6 after a daily 0.2 mg/kg i.p. vincristine treatment [22]. Our results further showed that vincristine-treated mice developed both mechanical hyperalgesia and mechanical allodynia.

Before vincristine injection, the baseline paw withdrawal frequency in response to mechanical stimulation with von Frey filaments was not significantly different in 5-HT<sub>2A</sub>R+/+ and 5-HT<sub>2A</sub>R-/- mice (Fig. 7). In contrast to that found in 5-HT<sub>2A</sub>R+/+ mice, vincristine

treatment did not significantly modify the paw withdrawal frequency to mechanical stimulation with von Frey filaments in 5-HT2AR<sup>-/-</sup> mice. Furthermore, mechanical withdrawal responses of vincristine-treated 5-HT2AR<sup>-/-</sup> mice were significantly lower than those of vincristine-treated 5-HT2AR<sup>+/+</sup> mice ( $5.0 \pm 2.61\%$  versus  $32.22 \pm 7.41\%$  and  $31.67 \pm 4.23\%$  versus  $60.00 \pm 9.43\%$ , respectively, for 0.04 g and 0.4 g filaments on day 15). These data indicated that the 5-HT2AR<sup>-/-</sup> mice did not develop mechanical hyperalgesia or allodynia after vincristine treatment.

### 3.7. Fos immunocytochemistry

In vincristine-treated rats, Fos- immunoreactive nuclei were particularly numerous in the intermediate (III–IV) and deep layers (V–VI) of the dorsal horn (Fig. 8B). Quantification was made as described in Section 2 according to the schematic diagram shown in Fig. 8C. In vincristine-treated compared to vehicle-treated rats, the number of Fos positive nuclei was significantly increased ( $p < 0.005$ ) on day 8 in the whole dorsal horn. The mean number of immunoreactive

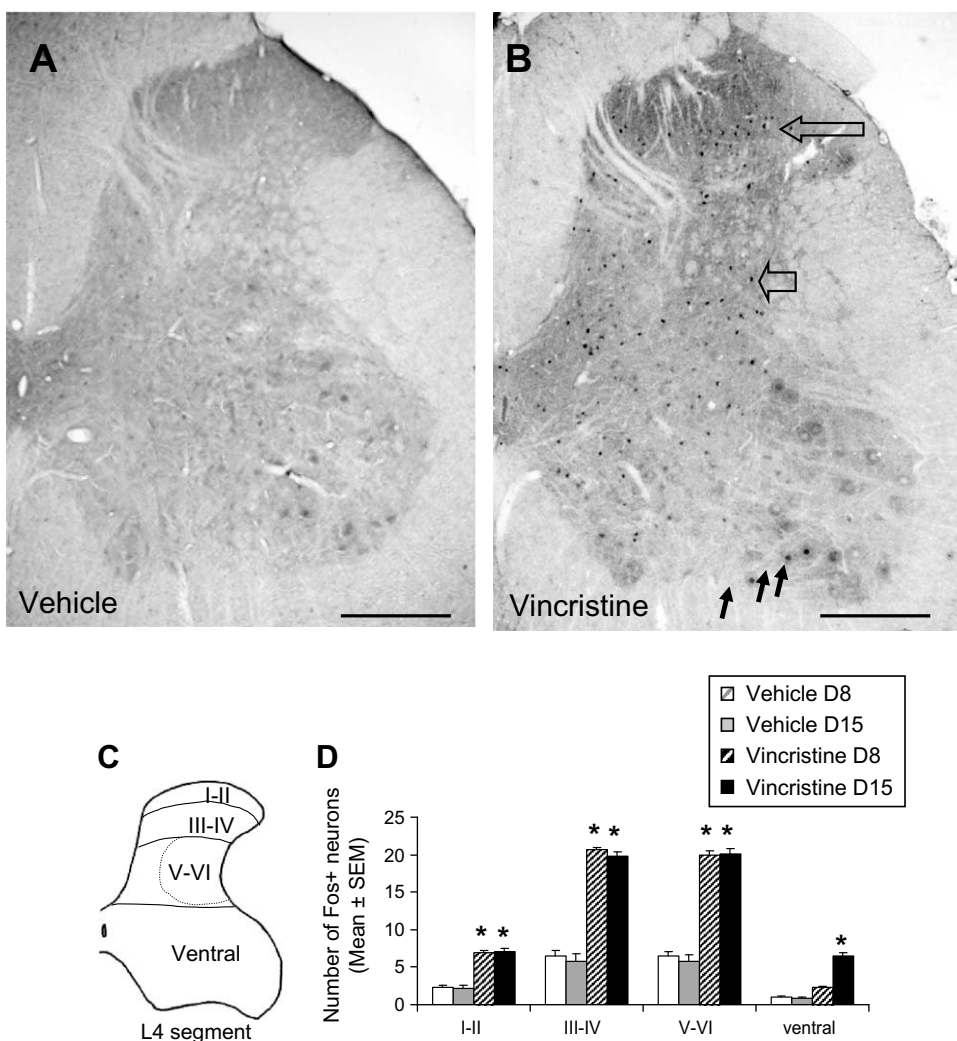


Fig. 8. Changes in the number of Fos positive cells in the spinal cord of vehicle-treated and vincristine-treated animals on days 8 (D8) and 15 (D15) of treatment. (A–B): Example of Fos labelling in the lumbar L4 spinal cord on D15 of a vincristine-treated (B) compared to a vehicle-treated animal (A). In the vincristine-treated rat, note the presence of Fos immunoreactive nuclei in the deep layers of the dorsal horn (short arrow), in the intermediate dorsal grey (long arrow) and in the ventral horn (presumably on motoneurons, small black arrows). No Fos labelling was observed at these levels in vehicle-treated rat (A). Scale bar: 500  $\mu$ m. (C): Schematic diagram (redrawn from Paxinos and Watson [42]) showing the laminar demarcation used for the quantification. (D): Quantification of the number of Fos nuclei in lumbar L4 spinal cord in control animals on day 8 (hatched grey bars) and on day 15 (grey bars) and in vincristine-treated animals on day 8 (hatched black bars) and on day 15 (black bars). On day 8, the number of Fos nuclei was significantly increased in all regions examined except the ventral horn in vincristine-treated compared to saline-treated rats. In the ventral horn, the number of labelled nuclei increased significantly in vincristine-treated rats on day 15. Data (obtained in 7 sections from 5 control and 5 vincristine-treated rats randomly chosen) are expressed as mean  $\pm$  SEM of 35 independent determinations in each group. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , comparison between vincristine-treated and vehicle-treated rats.

nuclei in layers I–II increased from  $2.29 \pm 0.26$  in control rats to  $6.07 \pm 0.39$  in vincristine-treated rats, in layers III–IV from  $6.52 \pm 0.62$  to  $17.86 \pm 0.91$  and in layers V–VI from  $8.47 \pm 0.66$  to  $18.25 \pm 0.92$  (Fig. 8D). This effect was maintained on day 15 with a number of labelled nuclei in layer I–II of  $2.2 \pm 0.27$  in control animals versus  $7.27 \pm 0.34$  labelled nuclei in vincristine-treated rats,  $5.8 \pm 0.34$  versus  $18.86 \pm 0.68$  in layers III–IV,  $5.77 \pm 0.48$  versus  $20.47 \pm 0.76$  in layers V–VI. In the ventral horn, where very few labelled nuclei were observed in control animals (Fig. 8A), the mean number of Fos nuclei was statistically unchanged on day 8 but significantly increased on day 15 ( $p < 0.001$ ). At this level, the staining was localized in large neurons, presumably motoneurons.

### 3.8. Double 5-HT2AR/Fos immunolabelling

Double 5-HT2AR/Fos immunolabelling was observed in the different layers of the dorsal horn where Fos labelling was restricted to nuclei, whereas 5-HT2AR labelling was localized in the cytoplasm and spared the nuclei. In particular, double-labelled cell bodies were clearly observed in layers I and III (Fig. 9A and B). In layer II, 5-HT2AR immunolabelling was too dense to observe double labelled cells under the light microscope.

In the deep dorsal horn, cell bodies exhibiting double labelling were observed in layer V (Fig. 9C).

## 4. Discussion

These results show that the 5-HT2AR is involved in vincristine-induced neuropathy. A 15-day treatment with vincristine induced mechanical hyperalgesia, and mechanical and thermal allodynia. The mechanical hypersensitivity (1) dose-dependently decreased after an epidural injection a 5-HT2AR antagonist, (2) was totally absent in 5-HT2AR<sup>-/-</sup> mice whereas their wild-type littermates developed a neuropathy comparable to that observed in rats. Moreover, we observed an increase in 5-HT2AR immunoreactivity in the superficial layers of the lumbar dorsal horn and the number of small- and medium-sized DRG cells expressing the 5-HT2AR, presumably nociceptive, was increased by 36% in vincristine-treated rats.

Despite the increase in total dorsal horn 5-HT2AR immunoreactivity, the number of immunoreactive neurons seemed unchanged whereas the intensity of immunoreactivity of individual neurons was markedly increased after vincristine treatment. This result was confirmed by quantification under the electron microscope that showed a 76.30% increase in the number of

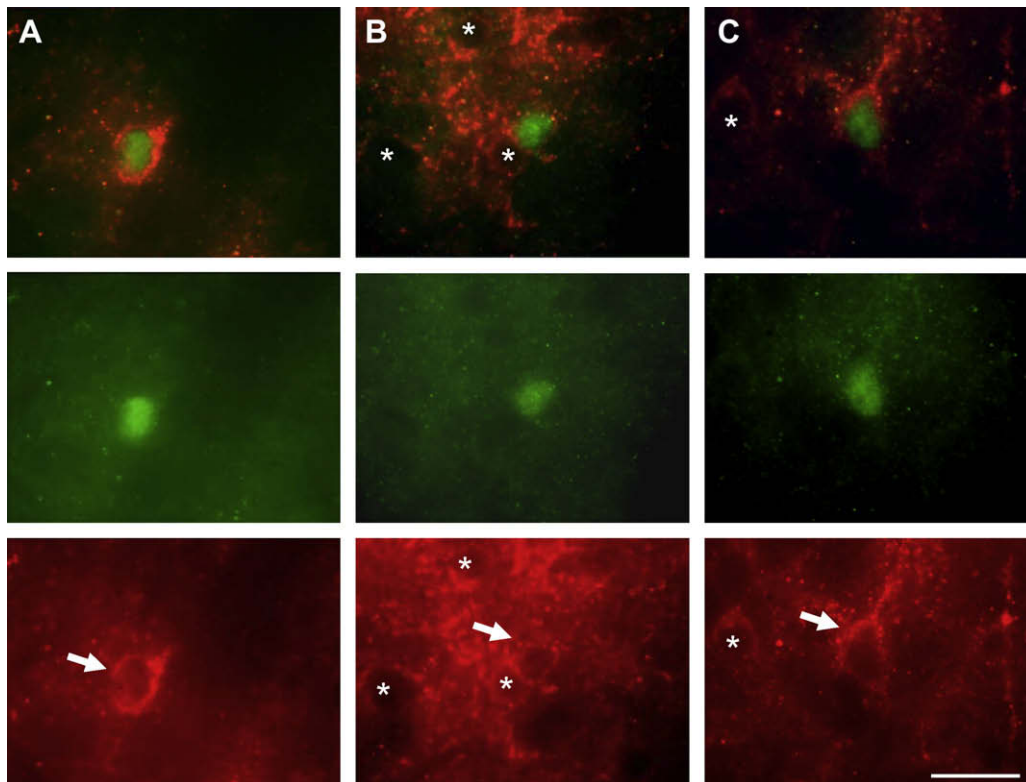


Fig. 9. Examples of double 5-HT2AR/Fos immunolabelling in layers I (A), III (B) and V (C) of the lumbar dorsal horn in a vincristine-treated rat on day 15 of treatment. Individual Fos labelling (in green) and 5-HT2AR labelling (in red) are shown in the columns below the merge. Fos labelling is restricted to nuclei, whereas 5-HT2AR labelling is localized in the cytoplasm and spares the nuclei. Stars indicate 5-HT2AR-positive cells unlabelled for Fos. Scale bar: 25  $\mu\text{m}$ .

immunoreactive axon terminals without any significant variation in the number of labelled somas. An up-regulation of 5-HT<sub>2A</sub>R expression in dorsal horn neurons was, however, probable since immunolabelling of individual neurons appeared enhanced at the electron microscope level. In addition, an extensive plasma membrane labelling, sometimes covering almost all the dendritic and somatic membrane, was observed under the electron microscope. This 5-HT<sub>2A</sub>R localization suggested that the receptor was functional, in accordance with our previous results [15], which led us to propose a paracrine mechanism of action for 5-HT through 5-HT<sub>2A</sub>R.

Since 5-HT<sub>2A</sub>R is internalized *in vivo* [62], we looked for 5-HT<sub>2A</sub>R internalisation in further support of the functional activity of the receptor in vincristine-treated rats. However, only a few immunoreactive multivesicular bodies were observed, and we did not detect any morphological evidence, i.e. immunoreactive endosomes of 5-HT<sub>2A</sub>R internalization in vincristine-treated rats. Indeed, the absence of immunolabelled endosomes might be explained by the N-terminal localisation of the epitope recognized by anti-5-HT<sub>2A</sub>R antibodies. After internalization, the accessibility of the N-terminal part of the receptor, localized within primary endosomes, would be very limited. In any case, it is also possible that a rapid internalization and recycling of the receptor occurs, making the detection of labelled endosomes difficult. Although we cannot conclude about possible 5-HT<sub>2A</sub>R internalisation, the wide expression of the receptor at the cell surface strongly suggests that it is functional in vincristine-treated rats. Accordingly, enhanced immunolabelling in intrinsic dorsal horn cells, in particular at their plasma membrane, supports the idea that an enhanced 5-HT<sub>2A</sub>R activity is associated with neuropathic pain in vincristine-treated rats.

To characterize the neuronal activation induced by vincristine in the spinal cord, we studied the expression of Fos protein. After 8 days of vincristine treatment, Fos labelling was markedly enhanced in the whole dorsal horn compared to control rats. The pattern of Fos labelling was unchanged after a longer treatment, suggesting that pathological modifications of peripheral and spinal nociceptive neurons were already present as soon as 8 days post-injection. However, after 15 days of vincristine treatment, Fos labelling appeared occasionally in ventral horn somas suggesting that some motoneuronal dysfunction may also occur. But, we did not observe any motor deficit, in agreement with previous data showing no motor alterations in rodents treated with vincristine [4], in contrast to that reported in humans [8].

Interestingly, Fos protein appeared more widely distributed in the dorsal horn of vincristine-induced neuropathic rats than in the models of direct nerve lesion [10]. This may be accounted for by the functional [6,52,53,65]

and morphological alterations [51,55] that affect both C- and A-fibres in vincristine-treated animals. We have observed that the number of Fos labelled nuclei increased not only in the superficial (I–II) and deeper layers (V–VI), where nociceptive fibres terminate, but also in layers III–IV, the site of myelinated A $\beta$ -fibres termination [61]. Recent data, contrary to the earlier studies [52,53,55], detected a clearly abnormal incidence of spontaneous discharge affecting 10% of A $\beta$ -fibres and up to 36% of C nociceptive fibres after vincristine treatment [65]. Since no loss of DRG cells or degeneration of proximal axons is observed in vincristine-treated animals, ectopic discharges were attributed to a loss of sensory terminal arborization [6,49]. We also observed that a 15 days vincristine treatment led to the alterations of mitochondria, characterized by a swelling and disappearance of cristae in lumbar DRG cell bodies (unpublished results), similar to those we previously described in ddC-induced neuropathy [56]. Such changes are in line with data obtained in a model of paclitaxel-induced neuropathy, in which abnormal mitochondria were seen in both C- and A-fibres [20,27]. In the latter model, a positive correlation could even be evidenced between pain and mitochondrial injury. In line with this hypothesis, administration of L-acetyl carnitine, known to reverse, at least partially, mitochondrial dysfunction [58,66], was reported to prevent and partly reverse chemotherapy-induced neuropathy [20,23,65]. Interestingly, Jin et al. [27] demonstrated that L-acetyl carnitine treatment that completely prevented the paclitaxel-induced neuropathic pain also prevented the incidence of swollen mitochondria in C- but not in A-fibres, suggesting different mechanisms of action in these two fibre types.

The spontaneous activity of both C- and A-fibres described by Xioa and Bennett [65] may give rise to spontaneous pain and abnormal sensations. Therefore, Fos labelling in the superficial and deep layers of the dorsal horn may correspond to spontaneous pain as already demonstrated in a model of neuropathic cancer pain, in which the duration of paw-lifting was correlated to Fos labelling in the dorsal horn [48]. In the case of vincristine-induced neuropathy, the Fos labelling of layers III–IV and the spontaneous activity of A $\beta$ -fibres correlate with the clinical data describing spontaneous abnormal sensations like paresthesia and numbness in 34–60% of the patients treated by vincristine [57].

The spontaneous activity of A $\beta$ - and C-fibres may also trigger central sensitization at the origin of abnormal stimulus-evoked pain sensations [12,35]. Spontaneous discharge of A $\beta$ -fibres [65] may participate in the central sensitization of layers III–IV neurons. Such a mechanism could be at the origin of mechanical allodynia observed in our model. A $\beta$  fibres, usually assumed to be low threshold mechanoreceptors (LTM), have been involved in tactile allodynia following tissue and nerve injury. However, the possibility that A $\beta$  fibres

could be nociceptive (about 20% of them) in the rat has been reported [13]. LTM A $\beta$  fibres terminate in intermediate layers (III–V), but some nociceptive A $\beta$ -fibres (with a conduction velocity >30 m/s) were shown to exhibit two central arborisation pattern afferents, one projecting to superficial layers (I–IIo) and the other showing diffuse projections through layers I–V [63]. Our results showing an increase of Fos labelling in superficial (I–IIo) and deep layers (III–V) are in good agreement with the hypothesis that both LTM A $\beta$ -fibres and A $\beta$ -nociceptive fibres may contribute to abnormal sensation observed in the vincristine-treated rats.

The important increase in Fos labelling in the deep layers of the dorsal horn, where wide dynamic range (WDR) neurons are localized, suggests that these neurons are chronically activated by vincristine. Indeed, a sensitisation of WDR neurons by vincristine has already been demonstrated by Weng et al. [60] who observed increased responses to acute activation of A $\delta$ - and C-fibres. In our study, numerous layer I neurons, receiving pure nociceptive input from C-fibres, displayed a marked Fos labelling suggesting that they are not only chronically activated (by spontaneous activity) but also sensitized. Such sensitization of nociceptive layer I neurons may play a critical role in the maintenance of neuropathy [34,37,64] through the activation of a facilitatory descending serotonergic pathway involving the 5-HT<sub>3</sub> receptor [50].

In this paper, our data on vincristine-treated rats show that the 5-HT<sub>2A</sub> also plays a pro-nociceptive role at the spinal and peripheral levels, as previously shown in ddC-induced neuropathy [56]. Double labelling experiments clearly indicate that the spinal cells of layers I, III and V, chronically activated by injuries due to vincristine, as confirmed by their Fos expression, also express the 5-HT<sub>2A</sub> suggesting that this receptor is involved in activation processes. Indeed, although the precise mechanisms of action of 5-HT on spinal neurons are still elusive, several data suggest that 5-HT<sub>2A</sub> stimulation may have an excitatory effect upon dorsal horn neurons [26,30,33]. Moreover, as shown in our study, the 5-HT<sub>2A</sub> expression, significantly up-regulated at the central terminal of nociceptive fibres, may contribute to the central sensitization of post-synaptic neurons [35,37,64], notably by enhancing the local release of SP and glutamate [31].

Finally, the role of peripheral 5-HT<sub>2A</sub> in inflammatory-induced hyperalgesia is largely documented [1,2,14,31,41,54,59], but its role in neuropathic pain is still a matter of debate. Convergent data have shown that sarpogrelate, a 5-HT<sub>2A</sub> antagonist with exclusive peripheral action is effective in alleviating neuropathic pain [25,28,39]. We confirm that peripheral 5-HT<sub>2A</sub> are involved in neuropathic pain induced by vincristine (this paper) and ddC [56]. Whether vincristine-induced neuropathy [7] as well as neurotoxic neuropathy induced

by paclitaxel [3,11,16] comprises an inflammatory component remains controversial.

In conclusion, in the model of vincristine-induced peripheral neuropathy, as well as in ddC-induced neuropathy [56], we demonstrate the critical role of spinal and peripheral 5-HT<sub>2A</sub> in the peripheral sensitization of nociceptors and a concomitant central sensitization of dorsal horn neurons.

## Acknowledgements

This work has been supported by CNRS UMR 7101, CNRS UMR 7637, INSERM U677, AFM (Association Française contre les Myopathies, No. 13,224), and Janssen Laboratories. J.V.S. was supported by AFM during performance of this work. We thank Dr. Jay Gingrich (Columbia University, NY, USA) for the generous gift of 5-HT<sub>2A</sub> receptor knock-out mice.

We certify that there were no conflicts of interest in this work.

## References

- [1] Abbott FV, Hong Y, Blier P. Activation of 5-HT<sub>2A</sub> receptors potentiates pain produced by inflammatory mediators. *Neuropharmacology* 1996;35:99–110.
- [2] Abbott FV, Hong Y, Blier P. Persisting sensitization of the behavioural response to formalin-induced injury in the rat through activation of serotonin<sub>2A</sub> receptors. *Neuroscience* 1997;77:575–84.
- [3] Alessandri-Haber N, Dina OA, Yeh JJ, Parada CA, Reichling DB, Levine JD. Transient receptor potential vanilloid 4 is essential in chemotherapy-induced neuropathic pain in the rat. *J Neurosci* 2004;24:4444–52. Erratum in: *J Neurosci* 2004;24:5457.
- [4] Aley KO, Reichling DB, Levine JD. Vincristine hyperalgesia in the rat: a model of painful vincristine neuropathy in humans. *Neuroscience* 1996;73:259–65.
- [5] Authier N, Coudore F, Eschalier A, Fialip J. Pain related behaviour during vincristine induced neuropathy in rats. *Neuroreport* 1999;10:965–8.
- [6] Authier N, Gillet JP, Fialip J, Eschalier A, Coudore F. A new animal model of vincristine induced nociceptive peripheral neuropathy. *Neurotoxicology* 2003;24:797–805.
- [7] Casey EB. Vincristine neuropathy. Clinical and electrophysiological observations. *Brain* 1973;96:69–86.
- [8] Cata JP, Weng HR, Dougherty PM. Cyclooxygenase inhibitors and thalidomide ameliorate vincristine-induced hyperalgesia in rats. *Cancer Chemother Pharmacol*. 2004;54:391–7.
- [9] Chen JJ, Vasko MR, Wu X, Staeva TP, Baez M, Zgombick JM, et al. Multiple subtypes of serotonin receptors are expressed in rat sensory neurons in culture. *J Pharmacol Exp Ther* 1998;287:1119–27.
- [10] Coggeshall RE. Fos, nociception and the dorsal horn. *Prog Neurobiol* 2005;77:299–352.
- [11] Dina OA, Chen X, Reichling D, Levine JD. Role of protein kinase C epsilon and protein kinase A in a model of paclitaxel-induced painful peripheral neuropathy in the rat. *Neuroscience* 2001;108:507–15.
- [12] Djouhri L, Koutsikou S, Fang X, McMullan S, Lawson SN. Spontaneous pain, both neuropathic and inflammatory, is related



- to frequency of spontaneous firing in intact C-fiber nociceptors. *J Neurosci* 2006;26:1281–92.
- [13] Djouhri L, Lawson SN. Abeta-fiber nociceptive primary afferent neurons: a review of incidence and properties in relation to other afferent A-fiber neurons in mammals. *Brain Res Brain Res Rev* 2004;46:131–45.
- [14] Doi-Saika M, Tokunaga A, Senba E. Intradermal 5-HT induces Fos expression in rat dorsal horn neurons not via 5-HT3 but via 5-HT2A receptors. *Neurosci Res* 1997;29:143–9. 28.
- [15] Doly S, Madeira A, Fischer J, Brisorgueil MJ, Daval G, Bernard R, et al. The 5-HT2A receptor is widely distributed in the rat spinal cord and mainly localized at the plasma membrane of postsynaptic neurons. *J Comp Neurol* 2004;472:496–511.
- [16] Dougherty PM, Cata JP, Cordella JV, Burton A, Weng HR. Taxol-induced sensory disturbance is characterized by preferential impairment of myelinated fiber function in cancer patients. *Pain* 2004;109:132–42.
- [17] Dudley MW, Wiech NL, Miller FP, Carr AA, Cheng HC, Roebel LE, et al. Pharmacological effects of MDL 11,939: a selective, centrally acting antagonist of 5-HT2 receptors. *Drug Dev Res* 1988;13:29–43.
- [18] Fiorica-Howells E, Hen R, Gingrich J, Li Z, Gershon MD. 5-HT(2A) receptors: location and functional analysis in intestines of wild-type and 5-HT(2A) knockout mice. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2002;282:G877–93.
- [19] Flatters SJL, Bennett GJ. Ethosuximide reverses paclitaxel- and vincristine-induced painful peripheral neuropathy. *Pain* 2004;109:150–61.
- [20] Flatters SJ, Xiao WH, Bennett GJ. Acetyl-L-carnitine prevents and reduces paclitaxel induced painful peripheral neuropathy. *Neurosci Lett* 2006;397:219–23.
- [21] Forman AD. Peripheral neuropathy and cancer. *Curr Oncol Rep* 2004;6:20–5.
- [22] Fukuisumi T, Ohkubo T, Kitamura K. Spinal sensitization mechanism in vincristine induced hyperalgesia in mice. *Neurosci Lett* 2003;343:89–92.
- [23] Ghirardi O, Vertechy M, Vesci L, Canta A, Nicolini G, Galbiati S, et al. Chemotherapy-induced allodynia: neuroprotective effect of acetyl-L-carnitine. *In Vivo* 2005;19:631–7.
- [24] Grubb BD, McQueen DS, Iggo A, Birrell GJ, Dutia MB. A study of 5-HT-receptors associated with afferent nerves located in normal and inflamed rat ankle joints. *Agents Actions* 1988;25:216–8.
- [25] Hashizume H, Kawakami M, Yoshida M, Okada M, Inomata Y. Sarpogrelate hydrochloride, a 5-HT2A receptor antagonist, attenuates neurogenic pain induced by nucleus pulposus in rats. *Spine* 2007;32:315–20.
- [26] Hori Y, Endo K, Takahashi T. Long-lasting synaptic facilitation induced by serotonin in superficial dorsal horn neurones of the rat spinal cord. *J Physiol* 1996;492:867–76.
- [27] Jin HW, Flatters SJ, Xiao WH, Mulhern HL, Bennett GJ. Prevention of paclitaxel-evoked painful peripheral neuropathy by acetyl-L-carnitine: effects on axonal mitochondria, sensory nerve fiber terminal arbors, and cutaneous Langerhans cells. *Exp Neurol* 2008;210:229–37.
- [28] Kanayama M, Hashimoto T, Shigenobu K, Yamane S. Efficacy of serotonin receptor blocker for symptomatic lumbar disc herniation. *Clin Orthop Relat Res* 2003;411:159–65.
- [29] Kayser V, Elfassi IE, Aubel B, Melfort M, Julius D, Gingrich JA, et al. Mechanical, thermal and formalin-induced nociception is differentially altered in 5-HT(1A)-/-, 5-HT(1B)-/-, 5-HT(2A)-/-, 5-HT(3A)-/- and 5-HTT-/- knock-out male mice. *Pain* 2007;130:235–48.
- [30] Kjorsvik A, Tjolsen A, Hole K. Activation of spinal serotonin 2A/2C receptors augments nociceptive responses in the rat. *Brain Res* 2001;910:179–81.
- [31] Kjorsvik-Bertelsen A, Warsame AA, Gustafsson H, Tjolsen A, Hole K, Stiller CO. Stimulation of spinal 5-HT (2A/2C) receptors potentiates the capsaicin-induced in vivo release of substance P-like immunoreactivity in the rat dorsal horn. *Brain Res* 2003;987:10–6.
- [32] LaMotte CC, Kapadia SE, Shapiro CM. Central projections of the sciatic, saphenous, median, and ulnar nerves of the rat demonstrated by transganglionic transport of cholera toxin B-subunit (B-HRP) and wheat germ agglutinin-HRP (WGA-HRP). *J Comp Neurol* 1991;311:546–62.
- [33] Li P, Kerchner GA, Sala C, Wei F, Huettner JE, Sheng M, et al. AMPA receptor-PDZ interactions in facilitation of spinal sensory synapses. *Nat Neurosci* 1999;2:972–7.
- [34] Mantyh PW, Rogers SD, Honoré P, Allen BJ, Ghilardi JR, Li J. Inhibition of hyperalgesia by ablation of lamina I spinal neurons expressing the substance P receptor. *Science* 1997;278:275–9.
- [35] Meyer RA, Ringkamp M, Campbell JN, Raja SN. Peripheral mechanism of cutaneous nociception. In: McMahon SB, Koltzenburg M, editors. *Melzack and Wall's textbook of pain*. London: Elsevier Churchill Livingstone; 2006. p. 3–34.
- [36] Molander C, Xu Q, Grant G. The cytoarchitectonic organization of the spinal cord in the rat. I. The lower thoracic and lumbosacral cord. *J Comp Neurol* 1984;230:133–41.
- [37] Nichols ML, Allen BJ, Rogers SD, Ghilardi JR, Honoré P, Luger NM, et al. Transmission of chronic nociception by spinal neurons expressing the substance P receptor. *Science* 1999;286:1558–61.
- [38] Nicholson R, Small J, Dixon AK, Spanswick D, Lee K. Serotonin receptor mRNA expression in rat dorsal root ganglion neurons. *Neurosci Lett* 2003;337:119–22.
- [39] Nitanda A, Yasunami N, Tokumo K, Fujii H, Hirai T, Nishio H. Contribution of the peripheral 5-HT2A receptor to mechanical hyperalgesia in a rat model of neuropathic pain. *Neurochem Int* 2005;47:394–400.
- [40] Nozaki-Taguchi N, Chaplan SR, Higuera ES, Ajakwe RD, Yaksh TL. Vincristine induced allodynia in the rat. *Pain* 2001;93:69–76.
- [41] Okamoto K, Imbe H, Morikawa Y, Itoh M, Sekimoto M, Nemoto K, et al. 5-HT2A receptor subtype in the peripheral branch of sensory fibers is involved in the potentiation of inflammatory pain in rats. *Pain* 2002;99:133–43.
- [42] Paxinos G, Watson C. *The rat brain in stereotaxic coordinates*. 4th ed. San Diego: Acad Press; 1998.
- [43] Pehek EA, Nocjar C, Roth BL, Byrd TA, Mabrouk OS. Evidence for the preferential involvement of 5-HT2A serotonin receptors in stress- and drug-induced dopamine release in the rat medial prefrontal cortex. *Neuropsychopharmacology* 2006;31:265–77.
- [44] Pierce PA, Xie GX, Levine JD, Peroutka SJ. 5-Hydroxytryptamine receptor subtype messenger RNAs in rat peripheral sensory and sympathetic ganglia: a polymerase chain reaction study. *Neuroscience* 1996;70:553–9.
- [45] Randall LO, Selitto JJ. A method for measurement of analgesic activity on inflamed tissue. *Arch Int Pharmacodyn Ther* 1957;111:409–19.
- [46] Rueff A, Dray A. 5-Hydroxytryptamine-induced sensitization and activation of peripheral fibres in the neonatal rat are mediated via different 5-hydroxytryptamine-receptors. *Neuroscience* 1992;50:899–905.
- [47] Sandler SG. Vincristine-induced neuropathy. A clinical study of fifty leukemic patients. *Neurology* 1969;19:367–74.
- [48] Shimoyama M, Tatsuoka H, Ohtori S, Tanaka K, Shimoyama N. Change of dorsal horn neurochemistry in a mouse model of neuropathic pain. *Pain* 2005;114:221–30.
- [49] Siau C, Xiao WH, Bennett GJ. Paclitaxel- and vincristine-evoked painful peripheral neuropathies: loss of epidermal innervation and activation of Langerhans cells. *Exp Neurol* 2006;201:507–14.
- [50] Suzuki R, Rahman W, Hunt SP, Dickenson AH. Descending facilitatory control of mechanically evoked responses is enhanced

- in deep dorsal horn neurons following peripheral nerve injury. *Brain Res* 2004;1019:68–76.
- [51] Tanner KD, Levine JD, Topp KS. Microtubule disorientation and axonal swelling in unmyelinated sensory axons during vincristine-induced painful neuropathy in rat. *J Comp Neurol* 1998;395:481–92.
- [52] Tanner KD, Reichling DB, Levine JD. Nociceptor hyper-responsiveness during vincristine-induced painful peripheral neuropathy in the rat. *J Neurosci* 1998;18:6480–91.
- [53] Tanner KD, Reichling DB, Gear RW, Paul SM, Levine JD. Altered temporal pattern of evoked afferent activity in a rat model of vincristine-induced painful peripheral neuropathy. *Neuroscience* 2003;118:809–17.
- [54] Tokunaga A, Saika M, Senba E. 5-HT<sub>2A</sub> receptor subtype is involved in the thermal hyperalgesic mechanism of serotonin in the periphery. *Pain* 1998;76:349–55.
- [55] Topp KS, Tanner KD, Levine JD. Damage to the cytoskeleton of large diameter sensory neurons and myelinated axons in vincristine-induced painful peripheral neuropathy in the rat. *J Comp Neurol* 2000;424:563–76.
- [56] Van Steenwinckel J, Brisorgueil M-J, Fischer J, Vergé D, Gingrich JA, Bourgoin S, et al. Role of spinal serotonin 5-HT<sub>2A</sub> receptor in 2',3'- dideoxycytidine-induced neuropathic pain in the rat and the mouse. *Pain* 2008;137:66–80.
- [57] Verstappen CC, Koeppen S, Heimans JJ, Huijgens PC, Scheulen ME, Strumberg D, et al. Dose-related vincristine-induced peripheral neuropathy with unexpected off-therapy worsening. *Neurology* 2005;64:1076–7.
- [58] Virmani A, Gaetani F, Binienda Z. Effects of metabolic modifiers such as carnitines, coenzyme Q10, and PUFAs against different forms of neurotoxic insults: metabolic inhibitors, MPTP, and methamphetamine. *Ann NY Acad Sci* 2005;1053:183–91.
- [59] Wei H, Chen Y, Hong Y. The contribution of peripheral 5-hydroxytryptamine<sub>2A</sub> receptor to carrageenan-evoked hyperalgesia, inflammation and spinal Fos protein expression in the rat. *Neuroscience* 2005;132:1073–82.
- [60] Weng HR, Cordella JV, Dougherty PM. Changes in sensory processing in the spinal dorsal horn accompany vincristine-induced hyperalgesia and allodynia. *Pain* 2003;103:131–8.
- [61] Willins DL, Berry S, Alsayegh L, Backstrom JR, Sanders-Bush E, Friedman L, et al. Clozapine and other 5-hydroxytryptamine-2A receptor antagonists alter the subcellular distribution of 5-hydroxytryptamine-2A receptors *in vitro* and *in vivo*. *Neuroscience* 1999;91:599–606.
- [62] Willis WD, Coggeshall RE. Structure of the dorsal horn. In: *Sensory mechanisms of the spinal cord*. New York: Plenum Press; 1991. p. 79–151.
- [63] Woodbury CJ, Koerber HR. Widespread projections from myelinated nociceptors throughout the substantia gelatinosa provide novel insights into neonatal hypersensitivity. *J Neurosci* 2003;23:601–10.
- [64] Woolf CJ, Salter MW. Neuronal plasticity: increasing the gain in pain. *Science* 2000;288:1765–9.
- [65] Xiao WH, Bennett GJ. Chemotherapy-evoked neuropathic pain: abnormal spontaneous discharge in A-fiber and C-fiber primary afferent neurons and its suppression by acetylcarnitine. *Pain* 2008;135:262–70.
- [66] Zanelli SA, Solenski NJ, Rosenthal RE, Fiskum G. Mechanisms of ischemic neuroprotection by L-acetyl-carnitine. *Ann NY Acad Sci* 2005;1053:153–61.

## 4. Les systèmes opioïdes endogènes

### 4.1. Le rôle du système opioïde endogène dans les douleurs chroniques.

Les enképhalines sont des peptides endogènes agonistes des récepteurs opioïdes. Ce terme est utilisé depuis 1974 pour désigner les protéines de faible poids moléculaire constituant avec les endorphines et les dynorphines le groupe des opioïdes endogènes : ils constituent une catégorie de neuropeptides neuromodulateurs libérés par des neurones spécialisés mis en jeu lors d'une stimulation douloureuse intense. Les deux enképhalines (Leucine-enképhaline et Méthionine-enképhaline), qui sont constituées par une courte chaîne de 5 acides aminés, possèdent une action antalgique de durée brève (quelques minutes) car elles sont très rapidement dégradées par l'intervention de deux enzymes : les enképhalinases (endopeptidase neutre et aminopeptidase N).

Nous avons vu que les molécules opioïdes, comme la morphine, sont encore très prescrits dans le traitement des douleurs par excès de nociception en clinique. Malheureusement, les effets secondaires de cette classe de médicaments sont nombreux et souvent handicapant pour les patients. Il est donc important de trouver de nouveaux composés ou de nouvelles stratégies susceptibles de soulager efficacement les douleurs chroniques inflammatoires. Par contre les opioïdes, et principalement la morphine, ne sont que rarement prescrits en première intention pour le traitement des douleurs chroniques neuropathiques, avec toutefois une tendance à prescrire maintenant l'Oxycodone pour soulager les douleurs neuropathiques diabétiques et post-zostériennes. La mise en évidence du fait que les enképhalines sont dégradées par deux metallopeptidases, l'endopeptidase neutre et l'aminopeptidase N, a permis de développer une nouvelle stratégie : ces deux enzymes peuvent être inactivées par un inhibiteur synthétique double, représentant une voie prometteuse pour développer des molécules à effet analgésique que l'on pourrait qualifier de "physiologique" en empêchant la dégradation des enképhalines libérées à la périphérie dans différents modèles de douleur chronique. Ces inhibiteurs

d'enképhalines sont dépourvus des effets secondaires de la morphine parce que à action exclusivement périphérique (ils ne passent pas la barrière hémato-encéphalique).

Il a ainsi été montré que l'administration de RB101, un inhibiteur mixte des enképhalines, entraîne une augmentation de la concentration extracellulaire d'enképhalines dans certaines structures nerveuses centrales (Dauge et al., 1996). De plus, l'administration de cet inhibiteur induit un effet analgésique dépendant de la dose chez la souris évalué à l'aide du test de la plaque chaude, après injection par voie intraveineuse, intrapéritonéale ou encore sous-cutanée (Noble et al., 1992). La spécificité d'action de cet inhibiteur sur le catabolisme des enképhalines a été validée par la perte de son efficacité analgésique sur des souris dont le gène codant la pré-proenképhaline a été invalidé (Noble et al., 2008).

Dans différents modèles de douleurs inflammatoires, des effets antinociceptifs ont été décrits chez les rats arthritiques après injection d'un inhibiteur mixte des enképhalines, le PC12, par voie intraveineuse (Perrot et al., 1993). Des effets antinociceptifs ont également été décrits dans un modèle d'inflammation provoquée par injection intraplantaire d'adjuvant complet de Freund (Maldonado et al., 1994) ou de carragénine (Le Guen et al., 1999) après injection de RB101 par voie intraveineuse. En ce qui concerne les douleurs neuropathiques, les inhibiteurs mixtes suppriment non seulement l'hyperalgésie mécanique induite par une constriction du nerf sciatique (Lee et al., 1994) mais également l'allodynie mécanique induit dans le modèle diabétique chez le rat (Coudore-Civiale et al., 2001).

Dans ce chapitre, nous rapportons des résultats de l'étude que nous avons effectuée sur les effets d'un inhibiteur mixte des enképhalines, le PL37 inhibiteur de dernière génération, à l'aide de notre modèle de douleur neuropathiques générées par la Vincristine.

4.2. Résultats

Antinociceptive and anti-allodynic effects of oral PL37, a complete inhibitor of enkephalin-catabolizing enzymes, in a rat model of peripheral neuropathic pain induced by vincristine

Karine Thibault, Elisabeth Bonnard, Sophie Dubacq, Marie Claude Fournié-Zaluski, Bernard Roques, Bernard Calvino

European Journal of Pharmacology 2008, 600 : 71–77

**RESUME DE L'ARTICLE**

Le but de cette étude était d'étudier les effets de PL37, un inhibiteur mixte des enképhalines dans les douleurs neuropathiques induites par un traitement anticancéreux : la Vincristine

**Méthodologie** : Les animaux ont été traités par la Vincristine par injection intrapéritonéale quotidienne pendant deux cycles de cinq jours.

Nous avons réalisé une étude comportementale chez les rats traités par la Vincristine avec ou sans traitement par le PL37. Le PL37 était injecté par voie intrapéritonéale ou par voie orale. Nous avons testé la sensibilité des rats à l'allodynie mécanique ainsi que l'allodynie thermique au froid.

**Résultats** : Nous avons validé pour la première fois un test mesurant la sensibilité mécanique dynamique des animaux. Pour cela, nous avons mis au point le « test du pinceau » qui consiste à appliquer un pinceau de manière dynamique sur la face plantaire de la patte postérieure des animaux. Deux pinceaux ont été utilisés : un pinceau à poils souples (poils de martre) ou un pinceau à poils durs (soies de porc). Le premier entraîne très peu ou pas de réponse chez les animaux contrôles (<10%) ; il nous a servi à mesurer une allodynie mécanique dynamique chez les rats. Le deuxième qui entraîne un taux de réponse entre 10 et 15% chez les animaux contrôles a été utilisé afin de mesurer une hyperesthésie mécanique dynamique.

Nous avons montré que l'hypersensibilité mécanique statique (évaluée à l'aide du test de Von Frey) et dynamique (évaluée à l'aide du « test du pinceau »), induite par le traitement par la Vincristine, est fortement réduite par l'administration du PL37 par voie intrapéritonéale et par voie orale de manière dépendante de la dose. En revanche, le PL37 n'a pas d'action sur l'allodynie thermique au froid (évaluée à l'aide du test à l'acétone). Ces effets sont inhibés par administration de naloxone-méthiodide, qui est un antagoniste périphérique des récepteurs opioïdes qui ne passe pas la barrière hémato encéphalique.

**Conclusion** : Ces résultats suggèrent que l'inhibition de la dégradation des enképhalines périphériques par le PL37 permet une diminution de la sensibilité mécanique induite par la Vincristine. Ce résultat permettrait d'impliquer une action analgésique de ces peptides opioïdes endogènes libérés en grande quantité à la périphérie sur leurs récepteurs périphériques exprimés alors sur les mécanorécepteurs A $\beta$  et/ou les mécanonocicepteurs C et A $\delta$ . Le fait que le PL37 présente une activité analgésique élevée dans ce modèle suggère l'hypothèse selon laquelle une quantité importante d'enképhalines serait libérée à la périphérie après traitement à la Vincristine, sans doute par les cellules du système immunitaire activées. Mais le fait que le PL37 soit actif sur les stimuli mécaniques de faible intensité suggère de plus une expression des récepteurs opioïdes sur les mécanorécepteurs A $\beta$  à bas seuil d'activation après traitement par la Vincristine.



## Neuropharmacology and Analgesia

# Antinociceptive and anti-allodynic effects of oral PL37, a complete inhibitor of enkephalin-catabolizing enzymes, in a rat model of peripheral neuropathic pain induced by vincristine

Karine Thibault<sup>a</sup>, Bonnard Elisabeth<sup>b</sup>, Dubacq Sophie<sup>a</sup>, Fournié-Zaluski Marie Claude<sup>b</sup>,  
Roques Bernard<sup>b,c</sup>, Calvino Bernard<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> ESPCI-CNRS UMR 7637, 10 rue Vauquelin, 75005 Paris, France

<sup>b</sup> Pharmaleads SAS, 11 rue Watt, 75013 Paris, France

<sup>c</sup> Université Paris Descartes, 4 avenue de l'Observatoire, 75006 Paris, France

## ARTICLE INFO

## Article history:

Received 15 April 2008

Received in revised form 16 September 2008

Accepted 5 October 2008

Available online 10 October 2008

## Keywords:

Oral PL37

Inhibition of enkephalin metabolism

Vincristine

Antiallodynia

Antinociception

Neuropathic pain

## ABSTRACT

Vincristine is a common anti-cancer therapy administered for the treatment of many types of tumors. Its dose-limiting side effect is the production of peripheral neuropathy, resulting in chronic neuropathic pain in many patients. An animal model of vincristine-induced sensory neuropathy was developed after repeated intraperitoneal injection in male rats and used in the present work to study the effects of PL37, an orally active complete dual inhibitor of enkephalin-catabolizing enzymes, on mechanical hypersensitivity and allodynia and on cold allodynia. We used the Electronic Von Frey filament (mechanical static allodynia), acetone test (cold allodynia), and a new behavioural test we first describe in this study, the “paint-brush test” which evaluates dynamic mechanical allodynia and dynamic mechanical hypersensitivity. We used a smooth paint brush leading to an innocuous stimulus, and a rough-one leading to an intense mechanical stimulus. Mechanical hypersensitivity and allodynia due to vincristine-induced neuropathy, but not cold allodynia, are strongly reduced by oral or i.p. injected PL37, the dose-dependent effects being reversed by naloxone-methiodide supporting the peripheral action of the dual inhibitor. These results show that enkephalins protected from degradation by PL37 could bind to peripheral opioid receptors expressed only on C- and A $\delta$ -mechanonociceptors but not on cold thermonociceptors. The fact that PL37 is also active on small intensity mechanical stimulus could reveal an expression of opioid receptors on low threshold mechanoreceptors in the vincristine-evoked pathological conditions. Thus the increase in endogenous enkephalin levels induced by PL37 offers a new way to reduced neuropathic pain without the possible side effects of opiates.

© 2008 Elsevier B.V. All rights reserved.

## 1. Introduction

Vincristine is one of the most common anti-cancer therapy administered for the treatment of many types of cancers such as leukaemias, lymphomas and sarcomas. However, its dose-limiting side effect is the production of peripheral neuropathy, which in many patients is accompanied by a chronic neuropathic pain syndrome (reviewed in Dougherty et al., 2004) that requires discontinuation of treatment and thus greatly impacts on the survival of cancer patients (Casey et al., 1970). The incidence and severity of vincristine-induced neuropathic pain is positively correlated with the period and doses used. The anti-tumor action of vincristine is due to its binding to  $\beta$ -tubulin, which leads to its antimetabolic property leading to aborted cell division and cell death (Wilson et al., 1975). Axonal microtubules also contain  $\beta$ -tubulin, and vincristine property to bind to  $\beta$ -tubulin is

thought to induce peripheral neuropathies leading to chronic pain through its neurotoxic action on peripheral sensory fibres.

Using doses close to those used clinically, an animal model of vincristine-induced nociceptive sensory neuropathy after repeated intraperitoneal injection in male rats has been developed (Authier et al., 2003; Weng et al., 2003). The sensory behavioural assessment revealed mechanical hyperalgesia and allodynia associated with cold thermal hyperalgesia and allodynia (Authier et al., 2003). We developed this model of vincristine-induced painful neuropathy to test new analgesic drugs.

From a pharmacological standpoint, opioids in general and morphine in particular constitute the mainstay of treatment for pain resulting from excessive nociception, whether severe acute pain (such as post-operative pain), chronic cancer-related pain, or certain pain syndromes not related to cancer, e.g. pain resulting from chronic inflammation. Controversy over the use of morphine due to its limited efficacy for the treatment of neuropathic forms of pain has been building up for over a decade (DelleMijn, 1999). However studies using some experimental models of chronic neuropathic pain in animals based on the lesion of

\* Corresponding author. Laboratoire de Neurobiologie – ESPCI, 10 rue Vauquelin, 75231 Paris Cedex 05, France. Tel.: +33 1 40 79 51 80; fax: +33 1 40 79 47 57.

E-mail address: [bernard.calvino@espci.fr](mailto:bernard.calvino@espci.fr) (C. Bernard).

peripheral nerves (Bennett and Xie, 1988; Seltzer et al., 1990; Kim and Chung, 1992) have tended to demonstrate the efficacy of opiates both in elevating the thresholds or latencies of response of these “neuropathic” animals to mechanical or thermal nociceptive (hyperalgesic) or non-nociceptive (allodynic) stimuli and in lowering the scores assessing the spontaneous behavioural reactions related to the pain experienced by these animals. These results are clearly in favour of the use of morphine or other selective opioid receptor agonists on the grounds of their efficacy in relieving chronic neuropathic pain (see, for example, Attal et al., 1991; Desmeules et al., 1993; and in particular, Martin et al., 1998).

Opioids, such as morphine, are widely used in the clinical management of pain, but unfortunately, limited by various side-effects (tolerance, dependence, respiratory depression, constipation ...). To reduce such side-effects liability there is still considerable interest in the strategy based on the protection of extracellularly released endogenous opioid peptides (enkephalins) from their inactivation by two ectopeptidases: neprilysin and aminopeptidase N (review in Roques et al., 1993). Thus it has been shown that such protection by peptidase inhibitors provide analgesia with reduced side effects comparatively to exogenous opioids (reviews in Jutkiewicz, 2007 and in Noble and Roques, 2007). As previously studied, a dual inhibitor, RB101, induces in inflammatory pain potent antinociceptive responses in normal and mononeuropathic rats after systemic administration (Noble et al., 1992; Maldonado et al., 1994), by elevating the extracellular levels of enkephalins (Dauge et al., 1996; Nieto et al., 2001). Furthermore, dual inhibitors have been previously shown to produce antinociception in rats with a constriction of the sciatic nerve (Lee et al., 1994) and in diabetic neuropathic rats (Coudore-Civiale et al., 2001). However inhibitors of the two enkephalin inactivating enzymes have never been studied in vincristine-induced neuropathic pain. Accordingly, the present work was carried out to study the effects of PL37, an orally active dual inhibitor of neprilysin and aminopeptidase N on mechanical static allodynia and on cold thermal allodynia in neuropathic rats. Moreover, with the aim of studying mechanical dynamic allodynia and hypersensitivity we have developed a new original test: “the paint-brush test” which is described for the first time in this paper and used to investigate the effect of PL37. These parameters are highly relevant in patients suffering from neuropathic pain, and clinically different from mechanical static allodynia and hypersensitivity. Furthermore, the involvement of peripheral opioid receptors has been assessed using naloxone-methiodide, an opioid receptor antagonist which does not cross the blood-brain barrier (Milne et al., 1990).

## 2. Materials and methods

### 2.1. Experimental animals

Three experiments were performed on 87 adult male Sprague-Dawley rats (Charles River, France), weighing 175–200 g at their arrival. The guidelines proposed by the Ethical Committee of the IASP (Committee for Research and Ethical issues of the IASP, 1980) for investigations of experimental pain in conscious animals have been followed and all experiments were carried out in accordance with the Declaration of Helsinki and the European Communities Council Directive of 24 November 1986 (86/609/EEC). Accordingly, the number of animals was kept to a minimum. Great care was taken, particularly with regard to housing conditions, to avoid or minimize discomfort of the animals: rats were housed four to a cage to minimize the possibility of painful interactions. The animals were kept on solid floor cages with a deep layer of sawdust to accommodate the excess of urination and cages were changed daily. They were kept at a constant temperature of 22 °C, with a 12 h alternative light/dark cycle. Food and water were available *ad libitum*. All animals were housed during two weeks before the beginning of the experiments, a period during which they were able to familiarize with the investigator and get used to the experimental room and to the various apparatus likely to be used for

pain or allodynia tests. At the beginning of the experiment (D1) their weight was  $312.3 \pm 3.9$  g.

### 2.2. Induction of peripheral neuropathic pain and drugs treatment

Rats were intraperitoneally injected with vincristine (or saline in control animals in the first experiment) according to the protocol proposed by Weng et al. (2003): they were treated with i.p. bolus injections of vincristine (Oncovin, EGLabo; 0.1 mg/kg/day diluted to 1 ml in saline, Lavoisier). The drug was again administered daily in two 5-day cycles (D1–D5 and D8–D12) with two days pause between cycles. Animals showed no acute reaction to the drug injection. Mortality level was 8% (7 rats upon 87), which occurred in the second cycle of vincristine injections (between D8 and D12). No noticeable motor disorder was observed during the all experimental period.

A preliminary experiment was first designed in order to evaluate neuropathic pain induced by the vincristine chemotherapeutic treatment with the various behavioural tests we used (vincristine-treated,  $n=7$  and saline-treated,  $n=6$ ).

Three experiments were then realized in order to evaluate the effects of PL37 1-2-[(1-ethoxy-carboxyloxy-ethoxycarbonylmethyl)-carbamoyl]-3-phenyl-propylidylsulfanylmethyl-3-methylsulfanyl-propyl-ammonium. On D15, PL37 was i.p. administrated to rats (70 mg/kg in saline solution) or *per os* (50 or 100 mg/kg in solvent: ethanol 10%, PEG 40% and water 50%). Naloxone-methiodide (2 mg/kg) or saline was i.p. administered immediately after PL37 administration. All drugs were freshly prepared daily.

### 2.3. Experimental design

Behavioural tests were performed on D15, and consisted of the “paint-brush” tests, the Electronic Von Frey test and finally the acetone test. All behavioural tests were realized at three time points: before the administration of PL37 or of its solvent, 20 min and 50 min after.

Three series of experiments were conducted according to the way of administration of PL37.

Drugs were injected as follows:

- Experiment 1:* we compared the effects of i.p. PL37 (70 mg/kg;  $n=7$ ) and of saline (i.p.;  $n=7$ ) in vincristine-pre treated animals.
- Experiment 2:* we tested the dose effects of PL37 administered *per os* in two doses (50 mg/kg,  $n=6$ , and 100 mg/kg,  $n=7$ ) and of its solvent (ethanol 10%, PEG 40% and water 50%;  $n=6$ ) in vincristine-pre treated animals.
- Experiment 3:* we tested the effects of naloxone-methiodide on PL37 administered *per os* (100 mg/kg,  $n=7$ ) in vincristine-pre treated animals, comparing four groups of animals in which PL37 and its solvent were administered *per os* and naloxone-methiodide and saline administered i.p.: PL37 (100 mg/kg)/naloxone-methiodide (2 mg/kg) ( $n=7$ ); PL37 (100 mg/kg)/saline ( $n=7$ ); solvent/naloxone-methiodide (2 mg/kg) ( $n=6$ ); solvent/saline ( $n=6$ ).

All drugs were administered in a volume of 1 ml/kg.

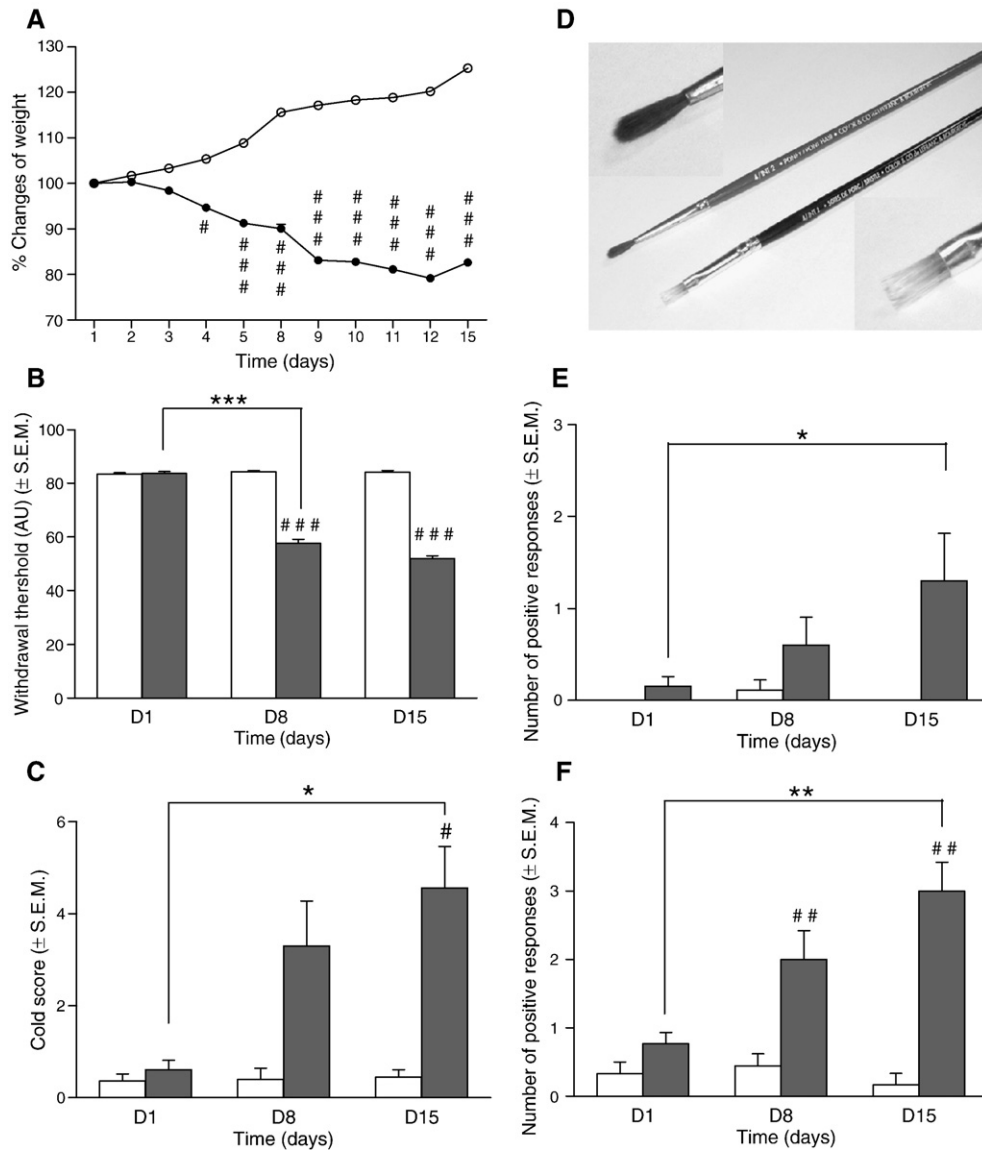
All the experiments included for each treatment were realized at the same time in the afternoon (between 1 and 4 P.M.); they were performed blind by the same person using a randomized block to avoid any chronobiological effects, and to assess the effects of the different treatments under the same environmental conditions.

### 2.4. Pain behaviour testing

#### 2.4.1. Assessment of mechanical static allodynia

Rats were individually placed on an elevated wire mesh floor in a clear plastic cylinder (22 cm diameter) and were adapted to the testing environment for 10 min. An Electronic Von Frey hair unit (EVF-3, Bioseb,





**Fig. 1.** Time-course of weight gain and pain-related behaviour, static and dynamic mechanical allodynia, dynamic mechanical hyperesthesia, and cold thermal allodynia, in control and vincristine-treated animals. **A:** Changes in the mean daily body weight in vincristine-treated (black dots) and saline-treated rats (empty dots). Vincristine-treated rats failed to gain weight as expected from the saline-treated group ( $\#P \leq 0.5$ ,  $\#\#\#P \leq 0.001$  vincristine-treated rats versus controls rats). **B:** Mean withdrawal threshold to an increasing pressure on the hind-paw with Electronic Von Frey test. The withdrawal threshold was significantly different in vincristine-treated rats (dark grey bars) compared to control rats (empty bars) as soon as D 8 and maintained at D15 ( $***P \leq 0.001$  vincristine-treated rats between D1 and D8,  $\#\#\#P \leq 0.001$  vincristine-treated rats versus controls rats). **C:** Mean cold scores obtained with the acetone test were slightly significantly increased at day 8, but significantly higher at day 15 compared to control animals. Data are expressed in mean  $\pm$  S.E.M. ( $*P \leq 0.05$  vincristine-treated rats between D8 and D15,  $\#P \leq 0.05$  vincristine-treated rats versus controls rats). **D:** Photos of paint-brushes used to stimulate plantar area of the hind paw of the rats. In the upper left corner, magnification of the smooth paint-brush, and in the lower right corner, magnification of the rough paint-brush. **E:** Mean numbers of positive responses to the smooth paint-brush test. At D8 and D15, the mean number of positive response was significantly increased in vincristine-treated rats (dark grey bars) compared to control rats ( $\#P \leq 0.05$ ). **F:** Mean numbers of positive responses to the rough paint-brush test. The mean numbers of positive responses was significantly different in vincristine-treated rats (dark grey bars) compared to control rats (empty bars) as soon as D8 and was significantly increased in D15. Data are expressed in mean  $\pm$  S.E.M. ( $**P \leq 0.01$  vincristine-treated rats between D1 and D15;  $\#\#\#P \leq 0.001$  vincristine-treated rats versus controls rats).

Chaville, France) was used: the sensitivity threshold is measured in one test, measurement ranging from 0.1 to 100 g with a 0.2 g accuracy. Punctuate stimulus is delivered to the mid-plantar area of each hind paw from below the mesh floor through a plastic spring tip and sensibility threshold result is displayed on a screen. Paw sensitivity threshold was defined as the minimum pressure required eliciting a robust and immediate withdrawal reflex of the paw. Voluntary movement associated with locomotion was not taken as a withdrawal response. The stimulus was applied on each hind paw five times with a five seconds interval and the value adopted as a threshold for a rat was the average of the ten values measured. Mechanical allodynia was defined as a significant decrease in withdrawal thresholds to EVF-3 application. For pharmacological studies, the results were expressed for each group as

follow:  $\Delta$ -paw withdrawal threshold (mean  $\pm$  S.E.M.) in arbitrary unit (AU), calculated from individual paw withdrawal thresholds at each time, as followed:

$$\Delta\text{-paw withdrawal} = t_{20} \text{ (or } t_{50}) \text{ paw withdrawal value} - \text{baseline value}$$

Analgesia effect on mechanical allodynia was defined as a significant increase in  $\Delta$ -paw withdrawal threshold to EVF-3 application.

#### 2.4.2. Assessment of mechanical dynamic allodynia and mechanical dynamic hypersensitivity: the "paint-brush test"

This behavioural test, the "paint-brush" test allowed to explore dynamic responses to a mechanical stimulus. Animals were placed in

the plastic cylinder on the wire mesh floor and a paint-brush was used to rub the plantar area of each hind paw from the heel to the toes as a stimulus. Two paint-brushes were used, one very smooth made of marten hairs and the other rough made of bristles pig (Fig. 1D). The smooth paint-brush was firstly used then followed by the rough paint-brush. The stimulus was applied on each hind paw five times with a five seconds interval and the value adopted using each paint-brush for a rat was the average score of withdrawals (for each paw between 0 and 5) got from each hind paw. Vincristine-induced responses to smooth paint-brush are best described as allodynia because normal rats never withdraw from this stimulus and responses to rough paint-brush are described as mechanical hypersensitivity because normal rats withdraw from this stimulus 5–10% of the time.

#### 2.4.3. Assessment of cold thermal allodynia

Animals were placed in the plastic cylinder on the wire mesh floor and a drop (0.05 ml) of acetone was placed against the centre of the ventral side of the hind paw. In the following 40 s after acetone application, the rat's response was monitored. Responses of the rat to acetone were graded to a 4-point scale as defined by Flatters and Bennett (2004): 0, no response; 1, quick withdrawal, flick or stamp of the paw; 2, prolonged withdrawal or repeated flicking; 3, repeated flicking of the paw with licking directed at the ventral side of the paw. Acetone was applied alternately three times to each paw and the responses scored categorically. Cumulative scores were then generated by adding the six scores for each rat together, the minimum score being 0 and the maximum possible score being 18.

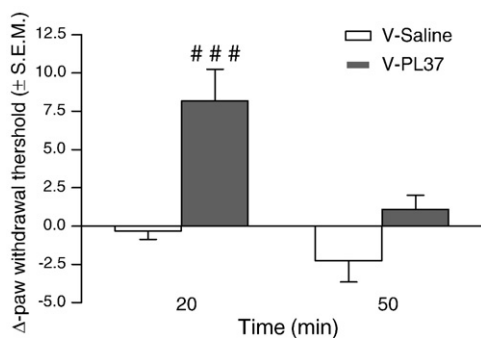
#### 2.5. Statistical analysis

The behavioural data are presented as mean±S.E.M. at different time point after the beginning of the vincristine treatment or drug administrations. Statistical analysis of changes in mechanical and cold thresholds were carried out using a two-way ANOVA (electrical von Frey) or a Kruskal–Wallis test (paint-brush test, acetone test), following by Student Newman–Keuls test (electrical von Frey test) or Wilcoxon matches pairs test and Mann–Whitney *U* test (paint-brush test, acetone test), to compared specific data points.  $P < 0.05$  was considered statistically significant in all tests.

### 3. Results

#### 3.1. Vincristine chemotherapeutic treatment induced neuropathic pain

The vincristine-injected rats (V-rats) lost a mean of 17.36% of their body weight during treatment ( $82.64 \pm 2.18\%$ ) whereas, in the first



**Fig. 2.** Effects of PL37 (70 mg/kg i.p.) in vincristine-treated versus control rats: mean withdrawal threshold to an increasing pressure on the hind-paw with Electronic Von Frey procedure. Twenty minutes after i.p. injection of PL37, the  $\Delta$ -paw withdrawal threshold was significantly increased in vincristine-pretreated rats and this effect was abolished 50 min after injection (dark grey bars). The  $\Delta$ -paw withdrawal was not significantly different in saline-injected vincristine-treated rats (empty bars). Data are expressed in mean±S.E.M. (### $P < 0.001$ ).

experiment, saline-injected control animals (C-rats) increased of their body weight 25% ( $125 \pm 1.2\%$ ) during the same period (Fig. 1A).

As measured with the EVF-3, the mean withdrawal reflex of the paw was significantly reduced in vincristine-treated rats ( $57.74 \pm 0.83$  in arbitrary units (AU) at D8 versus  $83.28 \pm 0.63$  at D1) ( $P < 0.001$ ) (dark grey bar) when compared with control rats (empty bar), a decrease which persisted at D15 ( $51.93 \pm 0.99$ ) ( $P < 0.001$ ) (Fig. 1B). This result is interpreted as a mechanical static allodynia.

Control rats only rarely responded to acetone, their mean “cold score” was between  $0.36 \pm 0.15$  and  $0.45 \pm 0.16$ . At day 15, vincristine-treated rats responded to acetone, with a “cold score” of  $4.55 \pm 0.98$ , which was statistically different from the score of control rats ( $P < 0.05$ ) (Fig. 1C). This result is interpreted as a cold thermal allodynia.

Rats treated with vincristine, but not those treated with saline, showed significant increased responses to smooth and rough paint-brush stimulation at D8 and D15 of vincristine treatment respectively. This increased response persisted throughout the treatment. Vincristine-treated rats exhibited a number of positive responses of  $1.3 \pm 0.5$  at D15, significantly different to the beginning of the treatment ( $0.15 \pm 0.1$ ) at D1, to smooth paint-brush ( $P < 0.05$ ) (Fig. 1E). This result is interpreted as a mechanical dynamic allodynia. In the same way, vincristine-treated rats presented a significant increased number of positive responses to rough paint-brush stimulation at D8 and D15 of the treatment significantly different from the saline injected group ( $P < 0.01$ ). In fact, vincristine-treated rats exhibited a number of positive response of  $2 \pm 0.4$  at D8 and  $3 \pm 0.16$  at D15, significantly different to the beginning of the treatment at D1, to rough paint-brush stimulation ( $P < 0.01$ ) (Fig. 1F). This result is interpreted as a dynamic mechanical hypersensitivity.

#### 3.2. Experiment 1: Effects of PL37 (70 mg/kg i.p.) or saline alone in vincristine-treated rats

As evaluated with the EVF-3, before drug injection ( $T_0$ ), the mean withdrawal reflex threshold of the paw was not significantly different in both V-rats groups (PL37 and saline). PL37 i.p. injected significantly increased this threshold in V-rats 20 min after, whereas saline was without effect ( $P < 0.001$ ). In fact, in PL37-treated V-rats, we observed an increased of  $\Delta$ -paw withdrawal threshold of  $8.14 \pm 2.07$  at 20 min when compared with  $T_0$  value; the  $\Delta$ -paw withdrawal change in saline V-rats between  $T_0$  and  $T_{20}$  min was of  $-0.31 \pm 0.55$ .  $\Delta$ -paw withdrawal value between  $T_0$  and  $T_{50}$  min was not significantly different in both V-groups (PL37 and saline) ( $1.08 \pm 0.92$  versus  $-2.26 \pm 1.38$  respectively) (Fig. 2).

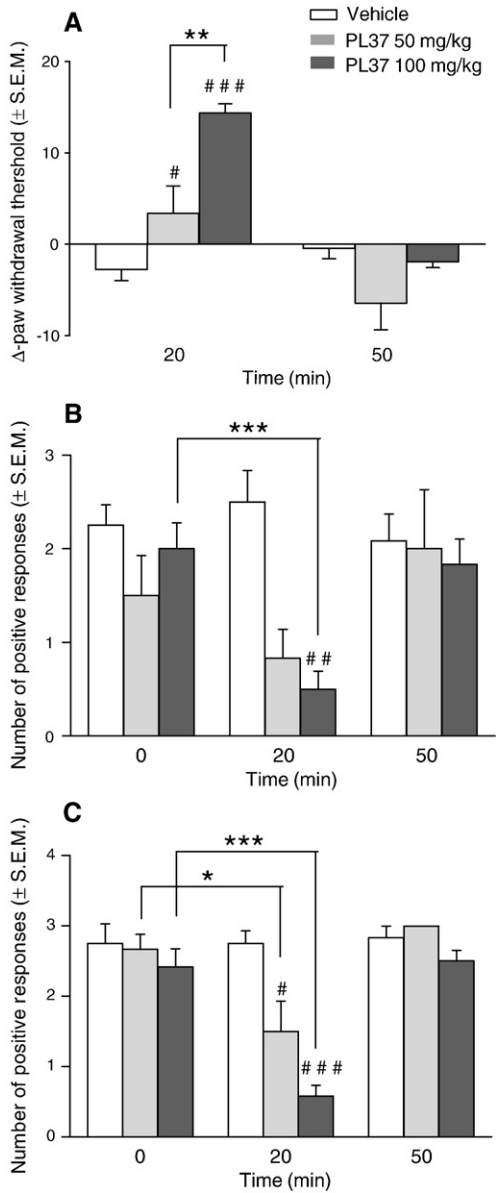
PL37 was without effect on the cold scores in both groups of rats (data not presented).

#### 3.3. Experiment 2: Effects of two doses of PL37 administered per os in V-rats

Two doses of PL37 were tested in this experiment (PL37 50 mg/kg and 100 mg/kg per os/solvent) in V-rats. The baseline values were determined before oral administration of compounds and no statistical differences were observed between the three tested groups.

In the electrical von Frey test, both PL37 orally-administered doses (50 mg/kg and 100 mg/kg) induced an antiallostatic dose-dependant effect at  $T_{20}$  min. We observed an increased of  $\Delta$ -paw withdrawal thresholds at  $T_{20}$  min in V-rats who received oral administration of PL37 at 50 mg/kg and 100 mg/kg ( $3.4 \pm 2.99$  and  $14.36 \pm 1.02$  respectively versus  $-2.77 \pm 1.17$  for saline group) ( $P < 0.05$ ;  $P < 0.001$ ).  $\Delta$ -paw withdrawal thresholds at  $T_{50}$  min was not significantly different in both PL37 groups when compared with saline group ( $-6.43 \pm 2.9$  and  $-1.9 \pm 0.65$  respectively for the two doses versus  $-0.43 \pm 1.17$ ) (Fig. 3A).

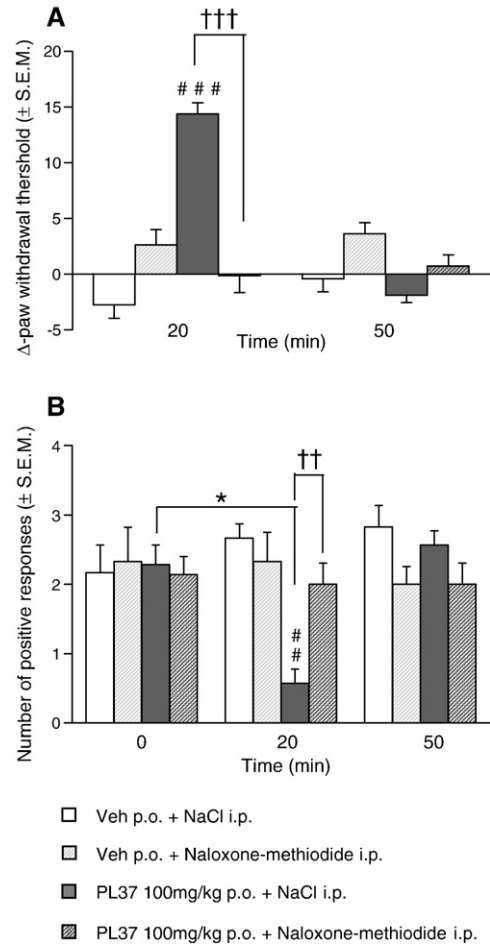
With the smooth paint-brush test, before drug injection the average score was not significantly different between the three groups of rats (Fig. 3B). PL37 100 mg/kg significantly decreased the score



**Fig. 3.** Dose dependent effects of PL37 administered *per os* in vincristine-treated rats. A: Mean withdrawal threshold to an increasing pressure on the hind-paw with Electronic Von Frey procedure. Twenty minutes after injection of PL37 the  $\Delta$ -paw withdrawal was significantly increased in vincristine-treated rats receiving the two doses of PL37 (50 and 100 m/kg) ( $\#P \leq 0.05$ ;  $\#\#\#P \leq 0.001$ ); this effect was dose-dependent ( $**P \leq 0.01$  vincristine-treated rats between 50 mg/kg and 100 mg/kg) and abolished 50 min after injection (light grey bars and dark grey bars). The  $\Delta$ -paw withdrawal did not significantly differ at T20 and T50 in vincristine-treated rats who received saline injection (empty bars). Fifty minutes after administration of PL37, thresholds values return to their baseline values. B: Positive mean number responses to the smooth paint-brush. Before administration of PL37 (T0) this mean number was not significantly different in the three groups of rats. Twenty minutes after administration of PL37, the mean number of positive responses was significantly decreased in PL37 100 mg/kg ( $\#\#\#P \leq 0.01$ ) treated (V-rats dark grey bars) compared with control V-rats (empty bars). There is a clear tendency to a reduction in the mean number of positive responses in PL37-injected 50 mg/kg vincristine-treated rats (light grey bars) but the decrease was not statistically significant. Fifty minutes after administration of PL37, thresholds values return to their baseline. C: Positive mean number responses to the rough paint-brush tests. Before administration of PL37 (T0) this mean number was not significantly different in the three groups of rats. Twenty minutes after administration of PL37, the mean number of positive responses was dose-dependently significantly decreased in V-rats receiving one of the two doses of PL37 (50 and 100 m/kg) (light grey bars and dark grey bars) ( $*P \leq 0.05$ ;  $\#\#\#P \leq 0.001$ ) and significantly different in comparison with control V-rats ( $\#P \leq 0.05$ ;  $\#\#\#P \leq 0.001$ ). Fifty minutes after administration of PL37, thresholds values return to their baseline. Data was expressed in mean  $\pm$  S.E.M.

20 min after injection (75% decrease;  $P \leq 0.001$ ) and a clear reduction in the number of positive responses was also observed 20 min after PL37 50 mg/kg injection (Fig. 3B) but the result was not statically significant. Fifty min later, threshold values return to their baseline in both groups of rats.

With the rough paint-brush, before drug injection the average score was not significantly different in the three groups of rats (Fig. 3C). PL37 significantly decreased dose-dependently the score 20 min after at both doses (100 mg/kg *per os*, 75.86% decrease,  $P \leq 0.001$ , and 50 mg/kg *per os*, 37.9% decrease,  $P \leq 0.05$ ). Fifty min later, threshold values return to their baseline in both groups of rats.



**Fig. 4.** Antagonizing effects of naloxone-methiodide i.p. injected on the antinociceptive effect of PL37 administered *per os* in vincristine-treated rats. A: Mean withdrawal threshold to an increasing pressure on the hind-paw as evaluated with Electronic Von Frey test. Twenty minutes after PL37 administration (T20), the  $\Delta$ -paw withdrawal significantly increased in PL37 (100 m/kg)-saline vincristine-treated rats (dark grey bars) ( $\#\#\#P \leq 0.001$ ), when compared with the three other groups [solvent-saline (empty bars); solvent-naloxone-methiodide (hatched light grey bars); PL37-naloxone-methiodide treated rats (hatched black bars)]. The  $\Delta$ -paw withdrawal significantly differ in PL37 (100 m/kg) vincristine-treated rats and PL37-naloxone-methiodide treated rats ( $\#\#\#P \leq 0.001$ ). Fifty minutes after PL37 administration (T50), thresholds values return to their baseline values. Data are expressed in mean  $\pm$  S.E.M. B: Mean positive number responses to the rough paint-brush. Before administration of PL37 (T0), the withdrawal threshold was not significantly different in the four groups of rats. Twenty minutes after PL37 administration (T20), the mean number of positive responses significantly decreased in PL37 (100 mg/kg)-saline vincristine-treated rats (dark grey bars) ( $\#\#\#P \leq 0.001$ ) and was significantly different when compared with the three other groups [solvent-saline (empty bars); solvent-naloxone-methiodide (hatched light grey bars); PL37-naloxone-methiodide treated rats (hatched black bars)]. The mean number of positive responses significantly differ in PL37 (100 m/kg) vincristine-treated rats and PL37-naloxone-methiodide treated rats ( $\#\#\#P \leq 0.001$ ). Fifty minutes after PL37 administration (T50), thresholds values return to their baseline values. Data are expressed in mean  $\pm$  S.E.M.

PL37 was without effect on the cold scores in both groups of rats (data not presented).

#### 3.4. Experiment 3: Effects of naloxone-methiodide i.p. injected on the antinociceptive effect of PL37 administered per os in V-rats

For testing the possible peripheral effects of PL37, naloxone-methiodide (2 mg/kg) was administered *per os* (100 mg/kg,  $n=7$ ), and investigated with two behavioural tests in vincristine-pretreated animals: the Electronic Von Frey test and the rough paint-brush test.

As measured with the EVF-3, before drug injection (T0), the mean withdrawal reflex threshold of the paw was not significantly different in the four groups of rats. PL37 (100 mg/kg *per os*) significantly increased this threshold 20 min after ( $P\leq 0.001$ ). Fifty min later, threshold values return to their baseline. Naloxone-methiodide i.p. injected antagonized the PL37 antiallodynic effects, measured at 100 mg/kg but *per se* had no effect on the threshold (Fig. 4A).

With the rough paint-brush, before drug injection (T0) the average score was not significantly different in the four groups of rats (Fig. 4B). As previously observed, PL37 significantly decreased the score 20 min later (T20) ( $P\leq 0.01$ ), whereas these threshold values return to their baseline fifty min later. Naloxone-methiodide injected i.p. antagonized PL37 effects, but *per se* had no effect on the threshold (Fig. 4B).

As PL37 was without effect on the cold scores in experiments 1 and 2, we did not perform this test in experiment 3.

#### 4. Discussion

In the present study, we investigated the anti-allodynic effects of a new mixed inhibitor of enkephalin degrading enzymes, PL37, systemically administered to neuropathic rats (intraperitoneal and oral route). With this aim, we used a classical test, the Electronic Von Frey filament (static allodynia) and a new behavioural test we first describe in this study, the “paint-brush test”. This test evaluates dynamic mechanical allodynia and dynamic mechanical hypersensitivity by two different paint brushes, one smooth leading to an innocuous stimulus, the other rough triggering an intense mechanical stimulus. Furthermore, PL37 effect is dose-dependent and naloxone-methiodide reversible. Contrarily, PL37 was without any effect on cold allodynia. These results are in good agreement with those obtained with various dual inhibitors previously studied in other chronic neuropathic pain models such as in mononeuropathic (Attal et al., 1991; Lee et al., 1994) and neuropathic diabetic (Coudore-Civiale et al., 2001) models.

The analgesic potency of the peptidase inhibitors may directly depend on the importance of the extracellular release of endogenous opioid peptides caused by nociceptive stimuli (Bourgoin et al., 1986). The effects of endogenous enkephalins protected from degradation by PL37 on mechanical stimuli could result from their direct action on opioid receptors overexpressed at terminals of peripheral fibres. This is consistent with the complete reversion of responses induced by mechanical stimuli by naloxone-methiodide, a quaternary analogue of naloxone when it is used at a dose (2 mg/kg) unable to cross the blood brain barrier (Milne et al., 1990). Nevertheless one cannot completely exclude a weak participation of pre- or post-synaptic opioid receptors located at the lumbar spinal cord (Duggan and North, 1983; Dickenson et al., 1986; Lombard and Besson, 1989). Thus, these results show that by blocking enkephalin catabolism, mechanical hypersensitivity and allodynia due to vincristine-induced neuropathy are strongly reduced suggesting an increased tonic release of enkephalins in conditions of vincristine-induced neuropathy, the synaptic levels of which is still enhanced by inhibition of their catabolism.

In our study PL37 has a short-duration of action since at all the doses studied and with the two modes of administration used (*i.p* and *per os*), the effect was maximum at 20 min post-injection with a return to baseline levels at 50 min. This duration of action, can be compared

with the one of RB101, since a dose of 10 mg/kg (*i.v.*) lasted less than 30 min (Le Guen et al., 2003).

PL37 was also highly effective against static and dynamic mechanical allodynia, but failed to alleviate cold allodynia. This difference of activity may be due to the characteristics of the applied stimulus, the fibres involved in nociception or allodynia being not the same according to the intensity (innocuous with the smooth paint brush, or intense with the rough paint-brush) and to the nature (mechanical or thermal) of the stimulus. It is generally admitted that small diameter C- and A $\delta$ -fibres are mainly involved in the response to cold stimuli, and in the response to intense mechanical stimuli whereas large A $\beta$ -fibres (low threshold fibres) respond to tactile stimuli. Vincristine treatment-induced neuropathy involved degeneration of myelinated fibres (Authier et al., 2003); but unmyelinated fibres also degenerate since occasionally swollen non-myelinated fibres (Authier et al., 2003), and a significant decrease in microtubule density suggesting swelling unmyelinated axons (Tanner et al., 1998) have been described. The present results showed that enkephalins protected from degradation by PL37 could bind to opioid receptors expressed only on C- and A $\delta$ -mechanonociceptors but not on cold thermonociceptors. The fact that PL37 is also active on small intensity mechanical stimulus (smooth paint brush) could reveal an expression of opioid receptors on large A $\beta$ -fibres (low threshold mechanoreceptors) in the pathological conditions resulting from vincristine treatment. In fact it has been shown that opioid analgesics can act outside the central nervous system, targeting opioid receptors expressed at sites of peripheral damaged tissue (Stein et al., 2003). Thus the preproenkephalin gene was shown to be expressed in dorsal root ganglia and then enkephalins transported to the nociceptor terminals (Antunes-Bras et al., 2001). Besides enkephalins were reported to be released from leukocytes recruited in injured tissue (Rittner et al., 2006) and able to express neprilysin and aminopeptidase N at their membrane level. In neuroinflammatory and neuropathic conditions the phasic increase of locally secreted enkephalins could interact with opioid receptors located on sensory endings (Machelska et al., 2003). As in the central nervous system, the dual inhibitors could enhance the amounts of enkephalins at the peripheral receptor level thus potentiating the antinociceptive response.

From a clinical point of view, the management of chronic neuropathic pain is one of the major concerns of clinicians. Nevertheless, observations in the clinical context tend to indicate that neuropathic pain is not a homogeneous concept: the numerous studies performed in recent years have demonstrated that the chronic pain associated with neuropathic syndromes results from a wide variety of underlying pathophysiological mechanisms, the large number of mechanisms involved constituting a major therapeutic issue. From a clinical standpoint, this finding makes it even more vital to thoroughly explore the origin of the neuropathic symptoms experienced by individual patients in order to assign them to homogeneous groups sharing the same aetiology and the same pathophysiological mechanisms. And from an experimental standpoint, this is why we developed and describe in this paper the “paint-brush” test, due to the reported multiplicity of clinical factors involved in human neuropathic pain syndromes, such as differences between the syndromes involved, more precisely differences between static and dynamic hyperalgesia and allodynia.

In this context, even within the pharmacological family of opioids, the results obtained are highly contradictory. A review by DelleMijn (1999) resumed the current status of this controversy, emphasizing that the disparities in the results described are largely due to the multiplicity of factors involved: definitions of neuropathic pain, differences between the mechanisms involved in human neuropathic syndromes and in experimental animal models, differences in response according to the nature of the pain studied: spontaneous or evoked; inter-individual variability in analgesic response according to the nature of the opiate used and the doses administered, etc. The disparity of the results presented in our study could emphasize the

importance of the origin of the peripheral events related with the pathophysiological conditions resulting from vincristine treatment.

To conclude, our results offer new insights into the controversies surrounding the utility of opioid analgesics in the treatment of neuropathic pain syndromes and suggest new pharmacological tools for neuropathic pain therapy. The present results confirm that the antinociceptive and antiallodynic responses induced by an inhibitor of enkephalin metabolism are important in chronic painful conditions, probably as a consequence of the different adaptive changes occurring during chronic pain, since previous studies have shown that their effects are different in acute and chronic painful situations (see ref in Noble and Roques, 2007). It can be underlined that inhibition of the enzymes implicated in the inactivation of the endogenous enkephalins is a useful tool to assess the physiological role of the endogenous opioid system in neuropathic conditions. In addition, the oral use of PL37 is expected to allow a critical evaluation in clinic of the analgesic effects caused by potentiation of the endogenous opioids without the side effects of morphine.

## References

- Antunes-Bras, J., Becker, C., Bourgoin, S., Lombard, M.C., Cesselin, F., Hamon, M., Pohl, M., 2001. Met-enkephalin is preferentially transported into the peripheral processes of primary afferent fibres in both control and HSV1-driven proenkephalin A overexpressing rats. *Neuroscience* 103, 1073–1083.
- Attal, N., Chen, Y.L., Kayser, V., Guilbaud, G., 1991. Behavioural evidence that systemic morphine may modulate a phasic pain-related behaviour in a rat model of peripheral mononeuropathy. *Pain* 47, 65–70.
- Authier, N., Gillet, J.P., Fialip, J., Eschalier, A., Coudore, F., 2003. A new animal model of vincristine-induced nociceptive peripheral neuropathy. *Neurotoxicology* 24, 797–805.
- Bennett, G.J., Xie, Y.K., 1988. A peripheral mononeuropathy in rat that produces disorders of pain sensation like those seen in man. *Pain* 33, 87–107.
- Bourgoin, S., Le Bars, D., Artaud, F., Clot, A.M., Bouboutou, R., Fournié-Zaluski, M.C., Roques, B.P., Hamon, M., Cesselin, F., 1986. Effect of ketorphan and other peptidase inhibitors on the in vitro and in vivo release of methionine-enkephalin-like material from the rat spinal cord. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 238 (1), 360–366.
- Casey, E.B., Fullerton, P.M., Jelliffe, A.W., 1970. Vincristine neurotoxicity: a clinical and electrophysiological study of eighteen patients. *Clin. Sci.* 38, 23P–24P.
- Committee for Research and Ethical issues of the IASP, 1980. Ethical standards for investigations of experimental pain in animals. *Pain* 9, 141–143.
- Coudore-Civiale, M.A., Meen, M., Fournié-Zaluski, M.C., Boucher, M., Roques, B.P., Eschalier, A., 2001. Enhancement of the effects of a complete inhibitor of enkephalin-catabolizing enzymes, RB 101, by a cholecystokinin-B receptor antagonist in diabetic rats. *Br. J. Pharmacol.* 133, 179–185.
- Dauge, V., Mauborgne, A., Cesselin, F., Fournié-Zaluski, M.C., Roques, B.P., 1996. The dual peptidase inhibitor RB101 induces a long-lasting increase in the extracellular level of Met-enkephalin-like material in the nucleus accumbens of freely moving rats. *J. Neurochem.* 67, 1301–1308.
- Dellemijn, P., 1999. Are opioids effective in relieving neuropathic pain? *Pain* 80, 453–462.
- Desmeules, J.A., Kayser, V., Guilbaud, G., 1993. Selective opioid receptor agonists modulate mechanical allodynia in an animal model of neuropathic pain. *Pain* 53, 277–285.
- Dickenson, A.H., Sullivan, A., Feeney, C., Fournié-Zaluski, M.C., Roques, B.P., 1986. Evidence that endogenous enkephalins produce delta-opiate receptor mediated neuronal inhibitions in rat dorsal horn. *Neurosci. Lett.* 72, 179–182.
- Dougherty, P.M., Cata, J.P., Cordella, J.V., Burton, A., Weng, H.R., 2004. Taxol-induced sensory disturbance is characterized by preferential impairment of myelinated fiber function in cancer patients. *Pain* 109, 132–142.
- Duggan, A.W., North, R.A., 1983. Electrophysiology of opioids. *Pharmacol. Rev.* 35, 219–281.
- Flatters, S.J., Bennett, G.J., 2004. Ethosuximide reverses paclitaxel- and vincristine-induced painful peripheral neuropathy. *Pain* 109, 150–161.
- Jutkiewicz, E.M., 2007. RB101-mediated protection of endogenous opioids: potential therapeutic utility? *CNS Drug Rev.* 13, 192–205.
- Kim, S.H., Chung, J.M., 1992. An experimental model for peripheral neuropathy produced by segmental spinal nerve ligation in the rat. *Pain* 50, 355–363.
- Le Guen, S., Catheline, G., Fournié-Zaluski, M.C., Roques, B.P., Besson, J.M., Buritova, J., 2003. Further evidence for the interaction of mu- and delta-opioid receptors in the antinociceptive effects of the dual inhibitor of enkephalin catabolism, RB101(S). A spinal c-Fos protein study in the rat under carrageenin inflammation. *Brain Res.* 967, 106–112.
- Lee, S.H., Kayser, V., Guilbaud, G., 1994. Antinociceptive effect of systemic ketorphan, in mononeuropathic rats, involves different opioid receptor types. *Eur. J. Pharmacol.* 264, 61–67.
- Lombard, M.C., Besson, J.M., 1989. Electrophysiological evidence for a tonic activity of the spinal cord intrinsic opioid systems in a chronic pain model. *Brain Res.* 477, 48–56.
- Machelska, H., Schopohl, J.K., Mousa, S.A., Labuz, D., Schäfer, M., Stein, C., 2003. Different mechanisms of intrinsic pain inhibition in early and late inflammation. *J. Neuroimmunol.* 141, 30–39.
- Maldonado, R., Valverde, O., Turcaud, S., Fournié-Zaluski, M.C., Roques, B.P., 1994. Antinociceptive response induced by mixed inhibitors of enkephalin catabolism in peripheral inflammation. *Pain* 58, 77–83.
- Martin, T.J., Hairston, C.T., Lutz, P.O., Harris, L.S., Porreca, F., 1998. Anti-allodynic actions of intravenous opioids in the nerve injured rat: potential utility of heroin and dihydroetorphine against neuropathic pain. *Eur. J. Pharmacol.* 357, 25–32.
- Milne, R.J., Coddington, J.M., Gamble, G.D., 1990. Quaternary naloxone blocks morphine analgesia in spinal but not intact rats. *Neurosci. Lett.* 114, 259–264.
- Nieto, M.M., Wilson, J., Walker, J., Benadives, J., Fournié-Zaluski, M.C., Roques, B.P., Noble, F., 2001. Facilitation of enkephalins catabolism inhibitor-induced antinociception by drugs classically used in pain management. *Neuropharmacology* 41 (4), 496–506.
- Noble, F., Roques, B.P., 2007. Protection of endogenous enkephalin catabolism as physiological approach to novel analgesic and anti-depressant drugs. *Expert Opin. Ther. Targets* 11 (2), 145–159.
- Noble, F., Soleilhac, J.M., Soroca-Lucas, E., Turcaud, S., Fournié-Zaluski, M.C., Roques, B.P., 1992. Inhibition of the enkephalin-metabolizing enzymes by the first systemically active mixed inhibitor prodrug RB 101 induces potent analgesic responses in mice and rats. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 261, 181–190.
- Rittner, H.L., Labuz, D., Schaefer, M., Mousa, S.A., Schulz, S., Schäfer, M., Stein, C., Brack, A., 2006. Pain control by CXCR2 ligands through Ca<sup>2+</sup>-regulated release of opioid polymorphonuclear cells. *FASEB J.* 20, 2627–2629.
- Roques, B.P., Noble, F., Dauge, V., Fournié-Zaluski, M.C., Beaumont, A., 1993. Neutral endopeptidase 24.11. Structure, inhibition, and experimental and clinical pharmacology. *Pharmacol. Rev.* 45 (1), 87–146.
- Seltzer, Z., Dubner, R., Shir, Y., 1990. A novel behavioral model of neuropathic pain disorders produced in rats by partial sciatic nerve injury. *Pain* 43, 205–218.
- Stein, C., Schafer, M., Machelska, H., 2003. Attacking pain at its source: new perspectives on opioids. *Nat. Med.* 9, 1003–1008.
- Tanner, K.D., Levine, J.D., Topp, K.S., 1998. Microtubule disorientation and axonal swelling in unmyelinated sensory axons during vincristine-induced painful neuropathy in rat. *J. Comp. Neurol.* 395, 481–492.
- Weng, H.R., Cordella, J.V., Dougherty, P.M., 2003. Changes in sensory processing in the spinal dorsal horn accompany vincristine-induced hyperalgesia and allodynia. *Pain* 103, 131–138.
- Wilson, L., Creswell, K.M., Chin, D., 1975. The mechanism of action of vinblastine. Binding of [acetyl-<sup>3</sup>H]vinblastine to embryonic chick brain tubulin and tubulin from sea urchin sperm tail outer doublet microtubules. *Biochemistry* 14, 5586–5592.

## **Chapitre II**

## Chapitre II : L'Oxaliplatine

### 1. L'Oxaliplatine

#### 1.1. L'Oxaliplatine

L'Oxaliplatine est un agent anti-tumoral dérivé des sels de platine (Figure 21) efficace pour le traitement des cancers colo-rectaux, et présente un avantage sur les autres sels de platine (cisplatine et carboplatine) du fait de son absence de néphrotoxicité et d'un effet ototoxique réduit.

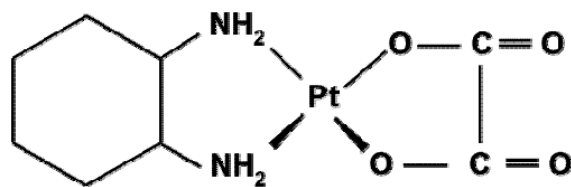


Figure 21 : Structure de l'Oxaliplatine

Comme les alkylants, les sels de platine agissent en créant des ponts intra ou interbrins avec des segments de l'ADN déroulés en simple brin, ponts à l'origine de la mort cellulaire. On peut ainsi observer la formation de ponts intra-brins entre deux guanines, de ponts intra-brins entre une adénine et une guanine ou de ponts inter-brins entre deux guanines proches (Figure 22). La création de ces ponts va inhiber la réplication et la transcription de l'ADN, induire la

libération de radicaux libres qui vont provoquer des cassures des brins d'ADN et entraîner la mort de la cellule. Ils agissent pendant la division cellulaire quelle que soit la phase.

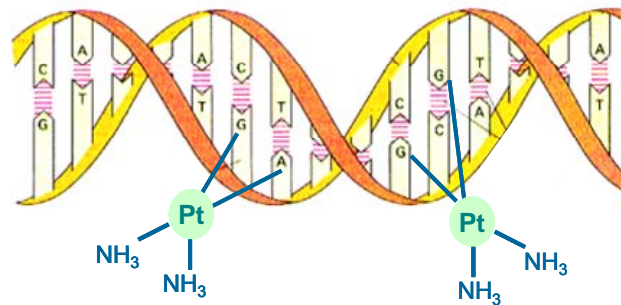


Figure 22 : Schématisation du mode d'action de l'Oxaliplatine sur les brins de l'ADN

## 1.2. Oxaliplatine et douleurs neuropathiques

Malheureusement cette molécule induit des effets secondaires neurologiques importants rapportés sous deux formes : d'une part, immédiatement après ou même pendant la perfusion, sous forme de neuropathie périphérique sensorielle transitoire, se manifestant par des paresthésies ou des dysesthésies dans les extrémités des membres, souvent accompagnées de contractions musculaires des extrémités ou de la mâchoire ; d'autre part après un délai plus long, et corrélée avec une accumulation des doses, se manifestant sous forme de perte sensorielle associée à des neuropathies périphériques qui peuvent entraîner pour les patients des douleurs insupportables (Gamelin et al., 2002;Grothey, 2003;Wilson et al., 2002;Lehky et al., 2004). L'un des symptômes le plus fréquemment rencontré est une sensibilité accrue au froid, avec l'apparition d'allodynie et d'hyperalgésie au froid. Ainsi une étude clinique récente a montré que l'hyperalgésie thermique au froid mais également au chaud était un bon marqueur de neurotoxicité de l'Oxaliplatine pouvant prédire une neuropathie sévère chez les patients (Attal et al., 2009).

La physiopathologie des neuropathies transitoires observées chez les patients seraient principalement dues à des canalopathies, résultants d'un dysfonctionnement transitoire des canaux ioniques exprimés à la membrane des nerfs (Wilson et al., 2002;Lehky et al., 2004).



En revanche, les neuropathies sensorielles chroniques observées résulteraient des effets neurotoxiques de l'accumulation du platine dans les ganglions des racines dorsales (Cavaletti et al., 2001).

Ces neuropathies périphériques partiellement réversibles ont été bien décrites chez l'homme mais encore très peu étudiées chez l'animal. Un modèle a néanmoins été mis au point chez le rat par deux équipes différentes (Holmes et al., 1998;Cavaletti et al., 2001). Les résultats obtenus par ces équipes montrent qu'une des cibles privilégiées de l'Oxaliplatine est le GRD où son accumulation entraîne des modifications morphologiques des cellules et une diminution de la vitesse de conduction des axones périphériques. En effet, Holmes et al ont montré une diminution des aires cellulaires et nucléaires ainsi qu'une augmentation du pourcentage de cellules présentant des nucléoles excentrés ou dédoublés dans les ganglions des racines dorsales (Holmes et al., 1998). Cavaletti et al ont montré une diminution de la vitesse de conduction des nerfs sensoriels chez le rat après traitement par l'Oxaliplatine (Cavaletti et al., 2001).

Peu d'études comportementales complètes chez le rat ont été réalisées afin de mieux définir les douleurs neuropathiques engendrées par un traitement chronique d'Oxaliplatine. Ainsi, Ling et collaborateurs ont développé un modèle de neuropathie induite par des injections chroniques d'Oxaliplatine par voie intraveineuse chez le rat. Ils ont observé l'apparition d'une allodynie thermique au froid (10°C), d'une hyperalgésie thermique au froid (4°C) mesurées par immersion de la queue dans l'eau dans un bain d'eau thermostatée, ainsi qu'une allodynie mécanique (Ling et al., 2007).

## 2. Etude comportementale, analyse de l'expression différentielle de gènes et activation de p-ERK dans le cortex somatosensoriel, dans un modèle de douleur neuropathique induit par un traitement à l'Oxaliplatine.

### 2.1. Implication de la MAPkinase ERK dans la transduction du message douloureux.

Les protéines kinases « *mitogen-activated protein kinase* » (MAPK) sont des protéines de la famille des sérine/thréonine kinases qui ont pour rôle d'ajouter des groupements phosphate à d'autres protéines afin de les activer. Les protéines ERK-1 et ERK-2, « *Extracellular signal-regulated kinases* », font partie de la famille des MAP kinases. Elles sont activées par des kinases, les MAPK/ERK kinase (MEK), elles mêmes activées par une dépolarisation membranaire et une augmentation du flux calcique dans la cellule (Rosen et al., 1994). Les kinases ERK sont connues pour être une des voies de signalisation intracellulaire impliquée dans la plasticité neuronale, comme dans la potentialisation à long terme, l'apprentissage ou la mémoire (Martin et al., 1997) (pour review voir (Impey et al., 1999; Sweatt, 2001)).

De nombreuses études ont également montré un rôle de la phosphorylation de ERK dans la transduction du message douloureux. Ainsi une stimulation nociceptive aiguë, comme par exemple l'injection de capsaïcine ou de formaline dans la patte postérieure de l'animal, induit une phosphorylation de ERK dans les neurones de la corne dorsale de la moelle épinière (Figure 23) (Ji et al., 1999; Karim et al., 2001; Pezet et al., 2002b; Pezet et al., 2002a). L'utilisation d'un inhibiteur spécifique de MEK réduit le comportement douloureux aigu des animaux après injection sous-cutanée de formaline, confirmant un rôle de l'activation de ERK dans les processus douloureux par excès de nociception (Ji et al., 1999; Karim et al., 2001).

Dans les structures supraspinales, il a été démontré que l'activation de ERK dans l'amygdale est nécessaire et suffisante pour induire une hypersensibilité périphérique à une stimulation tactile dans le modèle d'inflammation induit par la formaline chez la souris (Carrasquillo and Gereau, 2007).

D'autres études ont également rapporté un rôle de la phosphorylation de ERK dans le cortex cingulaire dans l'induction et/ou le maintien de la douleur chronique induite dans le modèle inflammatoire mettant en jeu une injection de formaline (Wei and Zhuo, 2008; Cao et al., 2009).

Enfin, une étude récente a montré l'implication de ERK dans le cortex insulaire après ligature du nerf infraorbitaire chez le rat (Alvarez et al., 2009). En effet, une stimulation mécanique dynamique non-nociceptive entraîne une augmentation de la forme phosphorylée de ERK dans le cortex insulaire après une telle lésion.

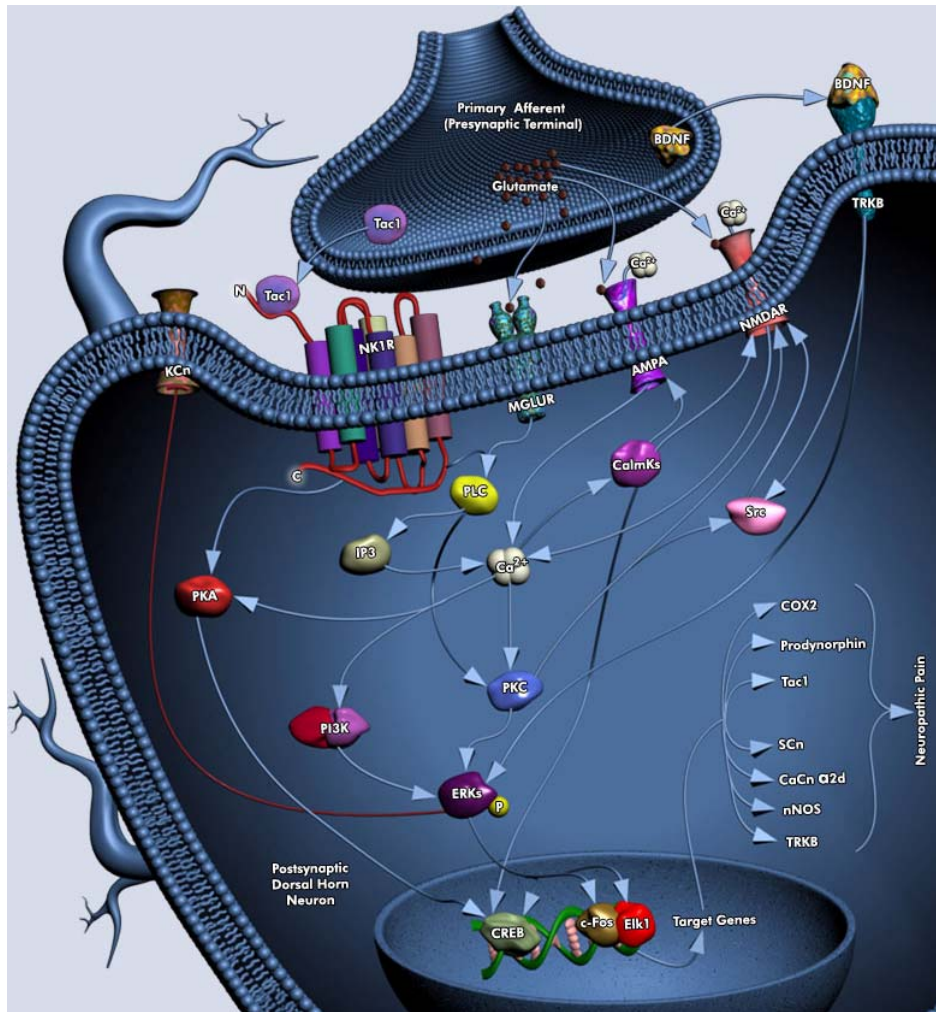


Figure 23 : Exemple d'implication de la protéine kinase ERK dans la signalisation intracellulaire du message douloureux dans la corne dorsale de la moelle épinière. Les protéines ERK peuvent être activées par différentes voies intracellulaires (PI3K, PKC, TrkB) et entraîneraient la transcription de gènes cibles (CREB, c-Fos...). Qiagen®.

2.2. Résultats

Behavioural study , differential gene expression analysis and p-Erk activation at the cortical level in Oxaliplatin-induced chronic neuropathic pain in the rat.

Karine Thibault, Sophie Pezet, Sophie Dubacq, Marie Roualle-de-Rouville, Isabelle Rivals, Bernard Calvino

Manuscrit en préparation

**RESUME DE L'ARTICLE**

Le but de cette étude était d'étudier les modifications d'expression différentielle de gènes dans trois structures du système nerveux périphérique et central impliquées dans la transduction du message douloureux (les ganglions des racines dorsales, la corne dorsale de la moelle épinière et le cortex somatosensoriel) pouvant être à l'origine de l'apparition des douleurs neuropathiques induites par l'Oxaliplatine.

**Méthodologie** : Les animaux ont été traités par l'Oxaliplatine (4 mg/kg i.p.) deux fois par semaine pendant 4,5 semaines.

Dans un premier temps, nous avons réalisé une étude comportementale complète chez le rat afin de caractériser de manière très précise les douleurs neuropathiques induites par un traitement par l'Oxaliplatine.

Dans un deuxième temps, par la technique des puces à ADN, nous avons recherché les gènes différenciellement exprimés dans les ganglions des racines dorsales, la corne dorsale de la

moelle épinière et le cortex somatosensoriel chez les animaux traités par la molécule anticancéreuse en comparaison avec les animaux contrôle.

Enfin, nous avons réalisé une étude immunohistochimique complète de la MAPkinase Erk dans certaines aires corticales impliquées dans l'intégration du message douloureux après traitement par l'Oxaliplatine à l'état basal ou à la suite d'un stimulus mécanique non nociceptif.

**Résultats** : D'un point de vue comportemental, les rats traités par l'Oxaliplatine développent une allodynie et une hyperesthésie mécanique dynamique mesurées dès la première injection d'Oxaliplatine. Nous avons également observé une allodynie et une hyperalgésie mécanique statique chez les rats traités par la Vincristine à la suite de la première et de la deuxième injection. Cette sensibilisation mécanique est associée à une allodynie et une hyperalgésie thermique au froid qui n'apparaissent que tardivement au cours du traitement.

Chez les rats traités par l'Oxaliplatine, nous avons observé un grand nombre de gènes différentiellement exprimés dans le cortex somatosensoriel par la technique des puces à ADN. En revanche, très peu de gènes semblent différentiellement exprimés dans les ganglions des racines dorsales et dans la corne dorsale de la moelle épinière (4 et 8 gènes respectivement). L'ensemble de tous les gènes différentiellement exprimés dans le cortex somatosensoriel présente une expression diminuée par rapport aux contrôles. Parmi les gènes dont l'expression est réduite, nous avons repéré un ensemble de 5 gènes codant des canaux potassiques.

Enfin, nous avons montré une augmentation du nombre de neurones p-Erk positifs dans les couches superficielles de différentes aires corticales impliquées dans l'intégration du message douloureux. En effet, nous avons observé une augmentation du nombre de neurones p-Erk positifs dans les cortex somatosensoriels primaires des régions des pattes postérieures, antérieures et du tronc, le cortex somatosensoriel secondaire, le cortex cingulaire, le cortex insulaire et le cortex moteur. Après une stimulation mécanique non-nociceptive, nous avons observé une diminution du nombre de neurones p-Erk positifs entre les animaux traités par l'Oxaliplatine stimulés et non-stimulés, dans l'ensemble des cortex somatosensoriels primaires d'intérêt.

**Conclusion** : L'ensemble de ces résultats suggère que l'Oxaliplatine entraîne une atteinte préférentiellement centrée sur des structures supraspinales, ce qui pourrait contribuer à l'apparition et/ou au maintien des douleurs neuropathiques observées dans ce modèle. L'Oxaliplatine semble augmenter l'excitabilité de certains neurones corticaux mesurée par la

phosphorylation de la MAPkinase Erk. Le fait qu'une stimulation non-nociceptive périphérique entraîne une diminution du nombre de cellules p-Erk positive suggère un renforcement des contrôles inhibiteurs descendants dans ce modèle.

**Behavioural study , differential gene expression analysis and ERK activation at the cortical level in Oxaliplatin-induced chronic neuropathic pain in the rat.**

Karine Thibault<sup>1</sup>, Sophie Pezet<sup>1</sup>, Sophie Dubacq<sup>1</sup>, Marie Roualle-de-Rouville<sup>1</sup>, Isabelle Rivals<sup>2</sup>, Bernard Calvino<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> Laboratoire de Neurobiologie, CNRS UMR 7637, Ecole Supérieure de Physique et de Chimie Industrielles, 10 rue Vauquelin, 75005 Paris, France

<sup>2</sup> Equipe de Statistique Appliquée, Ecole Supérieure de Physique et de Chimie Industrielles, 10 rue Vauquelin, 75005 Paris, France

Key words: Oxaliplatin; neuropathic pain; large diameter A $\beta$  fibres; DNA microarray; cortex; p-ERK

Number of text pages: 26

Number of figures: 7

Number of tables: 5

\* Correspondence should be sent to:

Pr Bernard Calvino, UMR CNRS 7637, Ecole Supérieure de Physique et Chimie Industrielles, 10 rue Vauquelin, 75005 Paris, France.

Tel: (33) 1 40 79 51 80; Fax: (33) 1 40 79 47 57; e-mail: [bernard.calvino@espci.fr](mailto:bernard.calvino@espci.fr)

## ABSTRACT

Oxaliplatin is a third-generation platinum-based chemotherapy drug that has gained importance in the treatment of advanced metastatic colorectal cancer. Its dose-limiting side effect is the production of peripheral neuropathy, resulting in chronic neuropathic pain in many patients. An animal model of Oxaliplatin-induced sensory neuropathy was developed after repeated intraperitoneal injections in male rats and used in the present work to evaluate the mechanisms of neurotoxicity at the origin of this neuropathic pain. Oxaliplatin-treated rats displayed static mechanical allodynia and hyperalgesia associated with dynamic mechanical allodynia and hyperaesthesia. The behavioral assessment revealed also cold allodynia and hyperalgesia. To identify the molecular changes that may lead to neuropathic pain, we used DNA microarray technology. Our results revealed approximately nine hundred genes down-regulated in the somatosensory cortex, but a very few in the dorsal root ganglions (DRG) and spinal dorsal horn after Oxaliplatin treatment. In order to know if this general down-regulation of genes may be involved in a central sensitization process of spinal neurons and at the origin of hyperexcitability of somatosensory cortex, we quantified extracellular signal-regulated kinase (ERK) phosphorylation, as a marker of nociceptive processing in various supraspinal structures. Our results showed a ten times fold increase in the number of p-ERK neurons labelled after Oxaliplatin treatment compared to controls. Surprisingly, a non-noxious stimulation induced a decreased number of p-ERK neurons immunoreactive(IR). Our results put forward the hypothesis according which Oxaliplatin could have a preferential targeting activity on cortical neurons at the origin of neuropathic symptoms described in treated rats.



## INTRODUCTION

Oxaliplatin is a third-generation platinum-based chemotherapy drug that has gained importance in the treatment of advanced metastatic colorectal cancer. In phase I trials, the dose-limiting toxicity of oxaliplatin was characterized by transient acute dysesthesia and cumulative distal neurotoxicity (Raymond et al., 1998b). In fact, Oxaliplatin-induced neurotoxicity develops progressively in about 10–15% of patients after a cumulative dose of 780–850 mg/m<sup>2</sup> (Gamelin et al., 2002; Wilson et al., 2002). The acute symptoms disappear in one week (Gamelin et al., 2002; Lehky et al., 2004), whereas chronic painful signs resulting from cumulative Oxaliplatin doses were reversible only within a few months after treatment discontinuation (Raymond et al., 1998a; Gamelin et al., 2002).

A model of Oxaliplatin-induced neuropathic pain was recently developed in rats using intravenous injection of Oxaliplatin (Ling et al., 2007). This model is characterized by initiation of cold allodynia and hyperalgesia symptoms associated with a mechanical allodynia. Oxaliplatin neurotoxicity is at the origin of damages to dorsal root ganglia which seem to result in peripheral nerves axonopathy, especially damaging large myelinated fibres associated with sensory nerve conduction (Holmes et al., 1998). Jamieson and collaborators showed that Oxaliplatin repeated administration for 8 weeks causes a selective atrophy of a subpopulation of DRG neurons with predominantly large parvalbumin-expressing cells without inducing neuronal loss. However, it is essential to identify which molecular changes may lead to neuropathic pain, both for understanding underlying mechanisms and developing new therapies.

While *in situ* hybridisation, western blots and other methods have been extensively used to study expressional changes of individual genes after chemotherapeutic treatment, a limiting factor with these methods comes from the fact that there is a lack of comprehensive overview of large-scale changes of multiple genes in a single study. The recent advancement of microarray technology represents a potentially approach for such a task. The fact that this technique gives the ability to examine the expression profile of potentially the all genome in a single experiment gives the possibility to identify the cellular consequences of Oxaliplatin treatment and thus to identify target specific drug affects. In the present study, we used DNA microarray technology to differentiate expressional changes of multiple genes in dorsal roots ganglions, spinal cord dorsal horn and somatosensory cortex in Oxaliplatin treated rats as compared with those in control rats.

DNA microarray data analysis revealed an important differential expression of genes in cortex but a very few in DRGs and spinal cord dorsal horn, approximately nine hundred down-regulated cortical genes, including genes coding transcriptional enzymes. In order to know whether this general down-regulation may be involved in a central sensitization process of spinal neurons and at the origin of hyperexcitability of somatosensory cortex, we quantified extracellular signal-regulated kinase (ERK) phosphorylation, as a marker of nociceptive processing (Ji et al., 1999) in a various central nervous system structures. Our results put forward the hypothesis according which Oxaliplatin could have a preferential targeting activity on cortical neurons at the origin of neuropathic symptoms described in treated rats.

## MATERIELS AND METHODS

### **Animals**

Male Sprague Dawley rats weighing 150-175 g at the beginning of the experiments (Janvier, Le Genest St Isle, France). Experiments were performed according to the European Community Council Directive of 24 November 1986 (86/609/EEC) and to guidelines published in a Guest Editorial in Pain on ethical standards for the investigation of experimental pain in animals (Committee for Research and Ethical issues of the I.A.S.P., 1980) and were in accordance with the French “Ministère de l’Agriculture et de la Pêche” rules. Great care was taken, particularly with regard to housing conditions, to avoid or minimize discomfort of the animals: rats were housed four to a cage to minimize the possibility of painful interactions. The animals were kept on solid floor cages with a deep layer of sawdust to accommodate the excess of urination and cages were changed daily. They were kept at a constant temperature of 22°C, with a 12h alternative light/dark cycle. Food and water were available *ad libitum*. All animals were housed during two weeks before the beginning of the experiments, a period during which they were able to familiarize with the investigator and get used to the experimental room and to the various apparatus likely to be used for pain or allodynia tests.

Nociceptive behaviour (see below) was tested in two groups of rats, one control and one treated by Oxaliplatin. Animals were randomly chosen and tested by an experimenter blinded to the treatment. Rats received intraperitoneal (i.p.) injections of Oxaliplatin (Sanofi-synthelabo) at 4 mg/kg/day, twice-weekly for four-and-a-half consecutive weeks. Volumes of a 5% glucose solution were adjusted to the weight of each rat and injected by the same route in the control group.

### **Behavioural tests**

#### ***Assessment of mechanical static allodynia***

Rats were individually placed on an elevated wire mesh floor in a clear plastic cylinder (22cm diameter) and were adapted to the testing environment for 10min. An Electronic Von Frey hair unit (EVF-3, Bioseb, Chaville, France) was used: the sensitivity threshold is measured in one test, measurement ranging from 0 to 500 grams with a 0.2 gram accuracy. Punctuate stimulus is delivered to the mid-plantar area of each hind paw from below the mesh floor

through a plastic spring tip and sensibility threshold result is displayed on a screen. Paw sensitivity threshold was defined as the minimum pressure required eliciting a robust and immediate withdrawal reflex of the paw. Voluntary movement associated with locomotion was not taken as a withdrawal response. The stimulus was applied on each hind paw five times with a five seconds interval and the value adopted as a threshold for a rat was the average of the ten values measured. Mechanical allodynia was defined as a significant decrease in withdrawal thresholds to EVF-3 application.

#### ***Assessment of mechanical static hyperalgesia***

Rats were individually taken by experimenter and were kept free movement of all on him for 5 min. A Pincher (Bioseb, Chaville, France) was used: the sensitivity threshold is measured in one test, measurement ranging from 0 to 800 grams. Punctuate stimulus is delivered to the mid-plantar area of each hind paw. Paw sensitivity threshold was defined as the minimum pressure required eliciting a robust and immediate withdrawal reflex of the paw. Voluntary movement associated with locomotion was not taken as a withdrawal response. The stimulus was applied on each hind paw tree times with a minute interval and the value adopted as a threshold for a rat was the average of the six values measured. Mechanical hyperalgesia was defined as a significant decrease in withdrawal thresholds to pincher application.

#### ***Assessment of mechanical dynamic allodynia and hyperaesthesia: the “Paint-brush test”***

This behavioural test, the “Paint-brush” test allowed to explore dynamic responses to a mechanical stimulus. Animals were placed in the plastic cylinder on the wire mesh floor and a paint-brush was used to rub the plantar area of each hind paw from the heel to the toes as a stimulus. Two paint-brushes were used, one very smooth made of marten hairs and the other rough made of bristles pig, as previously described in Thibault et al. 2008. The smooth paint-brush was firstly used then followed by the rough paint-brush. The stimulus was applied on each hind paw five times with a five seconds interval and the value adopted using each paint-brush for a rat was the average score of withdrawals (for each paw between 0 and 5) got from each hind paw. Oxaliplatin-induced responses to smooth paint-brush are best described as allodynia because normal rats never or shortly (less than 5%) withdraw from this stimulus and responses to rough paint-brush are probably described as hyperaesthesia because normal rats withdraw from this stimulus 5-10% of the time.

### ***Assessment of cold thermal allodynia***

Animals were placed in a plastic cylinder on the wire mesh floor and a drop (0.05 ml) of acetone was put down in the centre of the ventral side of the hind paw. During the following 40s after acetone application, the rat's response was monitored. Responses of the rat to acetone were graded to a 4-point scale as defined by Flatters and Bennett (2004): 0, no response; 1, quick withdrawal, flick or stamp of the paw; 2, prolonged withdrawal or repeated flicking; 3, repeated flicking of the paw with licking directed at the ventral side of the paw. Acetone was applied alternately three times to each paw and the responses scored categorically. Cumulative scores were then generated by adding the six scores together for each rat, the minimum score being 0 and the maximum possible score being 18.

### ***Assessment of cold thermal sensibility***

For the assessment of allodynia and hyperalgesia to a cold stimulus, the Cold Plate Analgesia Meter (Bioseb) was used. Rats were placed on a wire plate at room temperature (22°C) kept at the beginning of the experiment and covered with a transparent plastic cylinder (22cm diameter, 28cm high). Five minutes later, temperature of the plate was decreased, driven by a computer, from 22°C to 0°C at a rate of 5°C/min. This slope was determined in preliminary experiments in order to have the opportunity to record easily with as small variations as possible the real thresholds at which an animal manifests particular behaviour. Two thresholds were recorded: the first one, the attention threshold, occurring between 10°C and 13°C in control rats when the animal clearly orientated his head towards its hind paws, a behaviour interpreted as an intentional manifestation of cold detection: as this behaviour occurred at temperatures significantly higher in Oxaliplatin-treated than in control animals, it could be interpreted as a cold allodynia. The second one, the withdrawal threshold, when the animal very briskly lifted its hind paw, a behaviour counted as a nociceptive response, occurring at temperatures lower than 4°C in control rats. These behaviours were assessed at room temperature (22 ± 1°C) and scored by an observer who was unaware of the treatment condition.

### ***Statistical analysis***

Treatments were randomized within each cage. Behavioural data, Von Frey electronic, Pinch test, and cold plate were examined using two-way analysis of variance (ANOVA) followed by Student Newman–Keuls test to detect differences between treatment and control group at each time point. For paint-brush test and acetone test, behavioural data were examined using

Kruskal–Wallis test followed by Wilcoxon matches pairs test and Mann–Whitney U test to compared specific data points. Data were expressed as means  $\pm$  standard error of the mean (SEM), and the levels of significance were set at: \*  $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.01$ ; \*\*\*  $p < 0.001$ .

### **Tissues RNA preparation for microarray analysis and microarray hybridization**

Rats were decapitated at the end of treatment (D32). The brain and the rachis were extracted most quickly as possible and placed on ice. The dorsal horn of lumbar spinal cord and DRGs L2 to L5 were collected in RNase free eppendorf tubes and were immediately frozen in dry ice then stocked at  $-80^{\circ}\text{C}$ . A slice of brain was realised from Bregma 0 mm to Bregma 2 mm and the somatosensory cortex left and right were dissected and pooled in eppendorf, immediately frozen in dry ice then stocked at  $-80^{\circ}\text{C}$ . Total RNA from frozen individually dissected somatosensory cortex, dorsal horn of spinal cord and DRGs was extracted and treated with DNase using RNeasy® Lipid Tissue Midi kit for somatosensory cortex and dorsal horn of spinal cord or Mini kit (Qiagen) for DRGs in accordance to the manufacturer's protocol. The quality and quantity of each RNA sample was checked using the Agilent 2100 Bioanalyzer with RNA 6000 NanoChips (Agilent Technologies). Five hundred ng of RNA were converted to cDNA then to biotinylated cRNA, labelled with Cy3 and hybridized to RatRef-12 Expression BeadChips (Illumina) on the Integragen Illumina microarray platform (Evry, France), according to the Illumina procedures. Scans were performed on the BeadStation 500 scanner (Illumina) with a  $0.8\mu\text{m}$  resolution at a wavelength of 532nm and data were extracted with the Beadstudio software (Illumina). This experiment included 4 rats treated Oxaliplatin and 4 control rats.

### ***Statistical analysis***

All manipulations and statistical analysis were implemented with the R freeware. For Illumina beadchip data, all the spots with a detection p-value higher than 0.05% were excluded. To find differentially expressed genes between Vincristine treated rats and controls, we performed Student's t -tests. P-values were deduced from comparison with  $\alpha$  under the null hypothesis. Significant enrichments of GO categories among genes of interest were obtained using the web-based tool eGOn (explore GeneOntology, [www.genetools.no](http://www.genetools.no)) with a p-value of 5%. Only GO categories with at least 3 genes were considered.

### **p-ERK labeling**

Four experimental groups were determined: two control groups and two experimental groups receiving i.p. injections of Oxaliplatin.

- **Basal p-ERK-labeling**

Basal p-ERK-labeling was considered in absence of any intentional stimulation. This protocol was assessed in 4 control rats and 4 Oxaliplatin treated rats. Rats were deeply anaesthetized with isoflurane and perfused.

- **Non-noxious mechanical stimulation**

A non-noxious mechanical stimulation was performed under anaesthesia with 4% Isoflurane in oxygen. A gentle touch stimulus was applied manually with the flat surface of the experimenter's thumb to the palm surface of hind paw as previously described by Ma and Woolf. Each touch lasted 2 s, moving from the middle position of the palm surface to the distal foot pad. This stimulus was applied every 4 s for 5 min. This stimulus was applied on right hind paw in control (n=4) and Oxaliplatin treated (n=5) rats. Rats were replaced in the cage and protocol was realized 1 hour later. At the end of the second stimulation, rats were perfused 2 minutes later.

### ***Tissue preparation for immunohistochemistry***

Rats were perfused transcardially with 200 ml of 0.9% NaCl followed with 4% paraformaldehyde (PFA) plus 15% of saturated solution of picric acid in 0.2 M phosphate buffer (PB), pH 7.4. The brain was dissected out and postfixed overnight in 4% PFA plus 15% of picric acid at 4°C. Brain was cryoprotected in 30% sucrose in 0.2 M PB, pH 7.4, overnight à 4°C. Twenty µm-thick coronal brain sections were serially cut using a cryostat (HM550, Microm Microtech). Every ten section was mounted onto a Superfrost slide in order to obtain four series of ten slides corresponding to whole structures of interest including primary and secondary somatosensoriel cortex.

### ***Immunohistochemical detection of p-ERK protein***

Serial sections from the brain were immunostained for p-ERK immunoreactivity (p-ERK IR) according to the avidin-biotin-peroxidase method. Tissue sections were incubated overnight at room temperature in primary antiserum directed against the p-ERK protein (Cell Signaling, Phospho p44/42 Rabbit, Reference4370L, diluted at 1:1000) in PBS (0.02M) containing 0.3% Triton and 0.02% sodium azide. Incubated sections were washed in three successive PBS baths and incubated in 1:300 biotinylated goat anti-rabbit IgG (Vector, Burlingame, USA) in PBST for 1 h at room temperature. They were then washed three times in PBS and incubated for 1 h in avidin-biotin-peroxidase complex (Vectastain, Vector Laboratories) diluted (1/500) in PBS. Finally, sections were washed three times in PBS and revealed with peroxidase substrate kit (Vector Laboratories, SK-4100) according to the protocol proposed by supplier. The reaction proceeded at 20 °C under the control of a light microscope and was stopped 5 min after by washing in distilled water. Sections were sequentially differentiated in 70%, 90%, 95% and absolute alcohol, and finally air dried, xylene treated, and cover-slipped with DPX Mountant for histology (Sigma).

Due to the fact that immunocytochemistry might vary from one experiment to the other, brain sections of rats of the same experimental groups were immunoreacted at the same time in order to perform statistical analysis.

### ***Counting of p-ERK IR labeling neurons***

Tissue sections were first examined using dark-field microscopy to determine structures of interest. Cells with labelled nuclei were counted using a camera lucida attachment. The numbers of p-ERK-IR neurons per specific cortical areas were counted.

For this purpose, eight regions were defined: primary somatosensory cortex of the forelimb region, primary somatosensory cortex of the hindlimb region, primary somatosensory cortex of the trunk region, secondary somatosensory cortex, cingulate cortex, insular cortex, motor cortex including primary and secondary motor cortex, and piriform cortex. All p-ERK-IR neurons were counted without consideration of staining intensity. The investigator counting p-ERK-IR neurons was blind to the experimental situation of each animal.

### **Kv2.2 labeling**



Double label immunohistochemistry was performed using kv2.2 (rabbit anti-kv2.2, 1:800, Abcam) and p-EERK. The first primary antibody (kv2.2) was applied overnight at room temperature in PBS (0.02M) containing 0.3% Triton and 0.02% sodium azide, at a dilution that was undetectable by secondary antibody Alexa and was detected by TSA amplification. After washing in PBS, tissues were incubated for 1 h at room temperature in 1:300 biotinylated anti-rabbit (Vector, Burlingame, USA). A second wash was performed in PBS and tissue were incubated for 1 h in the avidin-biotin-peroxidase complex (Vector, Burlingame, USA) diluted (1/500) in PBS. Tissues were successively washed three times in PBS followed by a 10 min application of fluorescein-tyramide (Perkin Elmer) diluted in 1:400 in PBS. After an additional washing, the second primary antibody (anti-p-ERK p44/42 Rabbit Cell Signaling, Reference4370L, diluted 1:1000) was applied overnight at room temperature. Once more after washing, tissues were incubated for 2 h at room temperature in 1:1000 Alexa488 anti-rabbit IgG (Invitrogen). Tissues were finally washed in PBS, and mounted in Vectashield medium (Vector, Burlingame, USA).

## RESULTS

### Neuropathic pain in oxaliplatin-treated rats

No difference in the percentage of body weight variation could be detected between Oxaliplatin-treated and control rats during the course of the experiment (Figure 1). At the end of treatment, Oxaliplatin treated and control rats displayed an increase of  $47.87 \pm 3.2 \%$  and  $50.82 \pm 1.3 \%$  respectively, compared to D1.

#### - *Dynamic mechanical allodynia and hyperaesthesia*

Oxaliplatin treated rats, but not saline treated rats, displayed significant increased responses to smooth (A) and rough (B) paintbrush stimulations. Using the smooth paint-brush, Oxaliplatin-treated rats displayed a rapidly significantly different number of positive responses from  $0.71 \pm 0.29$  on D1 at the beginning of the treatment to  $1.57 \pm 0.2$  as soon as on D4 ( $p < 0.05$ ) (Figure 2A). At the end of the treatment, Oxaliplatin-treated rats displayed a significantly different number of positive responses from  $4.43 \pm 0.2$  compared to  $1.5 \pm 0.29$  ( $p < 0.001$ ) for control rats.

Using the rough paint-brush Oxaliplatin treated rats displayed roughly the same time-course as with the smooth paint-brush, i.e. an increased number of positive responses from  $1.86 \pm 0.14$  on D1 to  $2.71 \pm 0.18$  on D4 ( $p < 0.05$ ) (Figure 2B). More importantly, this score increased from  $1.75 \pm 0.25$  to  $5 \pm 0.31$  on D32 ( $p < 0.001$ ) at the end of the treatment for control and oxaliplatin-treated rats respectively.

#### - *Static mechanical allodynia*

Oxaliplatin treated rats, but not saline treated rats, displayed significant decreased responses to electronic Von Frey stimulation as soon on D4 of Oxaliplatin treatment (Figure 2C) ( $p < 0.05$ ). This decreased response persisted and intensified throughout the treatment. Before the first injection, the mean withdrawal thresholds (baseline values) were not significantly different between saline and Oxaliplatin-treated groups, but they decreased in Oxaliplatin-treated group from  $92.28 \pm 1.52$  A.U. (pressure, arbitrary unit) on day 1 before the first injection to  $87.03 \pm 1.84$  on day 8 and  $69.2 \pm 1.67$  on day 32 (Figure 2C). At the same time, control rats did not show any significant variation of their mechanical threshold during all the time course of the experiment.

### ***- Static mechanical hyperalgesia***

Before the beginning of Oxaliplatin or saline treatment, baseline withdrawal thresholds measured in the two groups with the “pincher” test did not significantly differ. Threshold values then significantly decreased ( $p < 0.001$ ) from  $739.39 \pm 13.57$  A.U. (on day 0 before the first injection) to  $654.41 \pm 14.67$  A.U. on day 11 and  $560.96 \pm 21.63$  A.U. on day 32 in Oxaliplatin treated rats (Figure 2D). By contrast, vehicle-treated rats did not display any significant variation of the mechanical threshold during the whole treatment period.

### ***- Cold thermal allodynia***

Control rats rarely displayed any behavioural reaction to acetone drop (mean “cold score” between  $0.5 \pm 0.29$  and  $1 \pm 0.41$  at the end of the treatment). On day 32 only, Oxaliplatin-treated rats displayed a significant increase in their cold score ( $8.28 \pm 1.69$ ) compared to D1 ( $0.71 \pm 0.39$ ) ( $p < 0.05$ ), significantly different from control rats ( $p < 0.01$ ) (Figure 3A).

### ***- Cold thermal allodynia and hyperalgesia***

Using the Cold Plate test, Oxaliplatin treated rats displayed a significant increased “attention” threshold ( $16.42 \text{ }^\circ\text{C} \pm 0.26$ ) only on day 32 when compared to control rats ( $13.25 \text{ }^\circ\text{C} \pm 0.21$ ) ( $p < 0.001$ ) (Figure 3B). In the same way, a significant increased of withdrawal threshold was observed in Oxaliplatin treated rats on D15 ( $5.89 \text{ }^\circ\text{C} \pm 0.67$ ) as compared to control rats ( $4.37 \text{ }^\circ\text{C} \pm 0.21$ ) ( $p < 0.05$ ) (Figure 3C). On day 32, Oxaliplatin-treated rats displayed a greater increase in their withdrawal threshold ( $7.17 \pm 0.56$ ), compared to D15 ( $p < 0.001$ ) and control rats ( $p < 0.001$ ).

## **Identification of differentially expressed genes induced by Oxaliplatin treatment.**

In order to identify genes differentially expressed by Oxaliplatin treatment, L2-L5 DRGs, lumbar spinal cord dorsal horn and somatosensory cortex of 4 treated rats and 4 control rats were dissected and analyzed individually on microarrays. Illumina pangenomic rat microarrays were used including 22 517 probes. In this study, we used t-test analysis and comparative results between control and Oxaliplatin treated rats were considered to be significantly differentially expressed as a out of line when p value was less than 0.05.

Of the 22 517 probes included in Illumina microarrays, 9 760, 10 397 and 10 107 were expressed in DRGs, dorsal horn of spinal cord and somatosensory cortex respectively. Among

them, only 0.06% (6 probes corresponding to 4 genes) were found to be significantly differentially expressed in DRGs, and only 0.4% (46 probes corresponding to 8 genes) were found to be significantly differentially expressed in dorsal horn of spinal cord. However, 9.85% (996 probes corresponding to 322 genes) were found to be significantly differentially expressed in the somatosensory cortex.

Considering the 4 genes that displayed significant differential expression in DRGs, all of them were down-regulated, among which synaptotagmin 12 and purinergic receptor P2X2 expression (Table 1). Considering the 8 genes that showed significant differential expression in spinal cord dorsal horn, 3 were up-regulated and 5 were down-regulated, among which two transporters (slc6a13 and slc5a5), one enzyme (Timp3 and Arg2) and one lectin (Lgals5) (Table 2).

Among the 322 genes that showed significant differential expression in somatosensory cortex, all of them were down-regulated. We distinguished adown-regulation of 3 different subunits of the polymerase, pold1 (Polymerase, delta1, catalytic subunit), polr2f (Polymerase II, polypeptide F) and rpo1-4 (RNA polymerase 1-4) (Table 3). The first one has DNA polymerase and 3'exonuclease activities and plays roles in DNA replication, base excision repair, and other types of DNA repair. The second one is required subunit of all eukaryotic RNA polymerases and the third one is a subunit of RNA polymerase I (polymerase (RNA) I polypeptide A).

Genes of interest were classified below according to GO categories (Gene Ontology enrichment analysis). We observed changes in ion channels and receptors gene expression in Oxaliplatin treated animals. Genes regulating ion channels activity are listed in Table 4. Twelve genes were classified in this GO category (GO: 0005216). Among these 12 genes, we observed five genes encoding potassium channels, one chloride channel and one sodium channel.

### **p-ERK-labeling**

#### ***- Basal p-ERK labeling***

A quantitative analysis of p-ERK-IR cells was performed in various areas of interest, i.e. primary somatosensory cortex of the forelimb region, primary somatosensory cortex of the

hindlimb region, primary somatosensory cortex of the trunk region, secondary somatosensory cortex, cingulate cortex, insular cortex, motor cortex including primary and secondary motor cortex, and piriform cortex.

We observed that, in absence of any stimulation, the number of p-ERK-IR neurons in Oxaliplatin treated animals was significantly increased in three primary somatosensory cortex (forelimb, hindlimb and trunk region) when compared with control rats values (Table 5 and Figure 4A, B and C). The number of p-ERK-IR neurons in Oxaliplatin treated animals was also significantly increased in the cingulate motor cortex, compared with control rats values (Table 5 and Figure 4D and E). However, in the insular cortex and secondary somatosensory cortex, we showed an up-regulation in number of p-ERK-IR neurons in Oxaliplatin treated animals but this increase was not statistically significant as compared with control rats values (Table 5 and Figure 4F and G). In a last cortex (piriform cortex not involved in pain message transduction), there was no statistical difference between Oxaliplatin treated and control rats (Figure 4H).

All p-ERK-IR neurons were localized in superficial layer of cortical areas (Figure 5), mostly within layers I-II.

#### ***- Non noxious mechanical stimulation***

First, there was no statistical difference between non noxiously stimulated Oxaliplatin treated and control rats (Table 5). However, after non noxious mechanical stimulation, the number of p-ERK-IR neurons in Oxaliplatin treated animals was significantly decreased within the three primary somatosensory cortex (forelimb, hindlimb and trunk region), in the secondary sensory cortex and the insular cortex when compared with non stimulated Oxaliplatin treated rats values (Table 5 and Figure 6). We did not observe any differences between the ipsilateral and contralateral sides in stimulated Oxaliplatin treated rats.

#### **p-ERK/kv2.2-labeling**

Kv2.2 proteins were not identified in the cell bodies of expressing cells, but rather mostly confined to distal extensions, probably dendrites (Figure 7B). In a few cases, Kv2.2-positive dendrites were colocalized with p-ERK-positive dendrites (Figure 7C). However, we did not observe any double labeling (p-ERK-Kv2.2) of in cell bodies (Figure 7D). Negative control, without primary antibody anti-p-ERK, showed no labeling (Figure 7E).

## DISCUSSION

In this study, rats chronically treated with Oxaliplatin showed significant behavioral nociceptive signs which are consistent with clinical symptoms of neuropathic pain. In fact, this model displayed all the characteristics of a peripheral sensory neuropathy in the rat, i.e. behavioural signs such as static mechanical allodynia and hyperalgesia, cold thermal allodynia and hyperalgesia. Our study reports major behavioral effects of Oxaliplatin administration on nociceptive thresholds induced by both noxious and non-noxious stimuli. As previously described by Ling et al., we observed that a systemic administration of Oxaliplatin induced cold thermal allodynia and hyperalgesia (Ling et al., 2007).

We also observed a dynamic and static mechanical allodynia and hyperaesthesia, these three behavioural changes were observed as soon as D4, i.e. after the first Oxaliplatin injection (Figure 1A, B and C). It is generally admitted that large A $\beta$ -fibres (low threshold fibres) are involved in response to tactile stimuli. Our results involving mechanical allodynia would suggest that these fibres would prematurely be affected after Oxaliplatin treatment. The comparison of the present results with those obtained in the Vincristine model, suggests that lesion of the large diameter fibers is taking place at a later time-point in the Vincristine model. A previous study showed that Oxaliplatin induced, in L5 DRG, a significant reduction in neuronal size distribution, ganglion volume, average cell size and relative frequency of large cells, but the total number of large and small size neurons was unchanged (Jamieson et al., 2005a). This result could explain the precocious occurrence of dynamic mechanical allodynia and hyperaesthesia described in our study.

However, cold thermal allodynia as measured either with acetone test and cold plate test ('attention' threshold) appear very late in our study after Oxaliplatin treatment. Indeed, we observed this cold thermal allodynia only on D32, i.e. after 9 Oxaliplatin injections. Furthermore, cold thermal hyperalgesia appeared only on D15, i.e. after 4 Oxaliplatin injections. In Ling et al. study, cold thermal hyperalgesia occur effectively after 4 Oxaliplatin injections, whereas they observed cold thermal allodynia after 6 Oxaliplatin injections. A recent clinical study showed that 96% of patients treated with Oxaliplatin complained of cold-evoked symptoms in the hands (paresthesia, dysesthesia or pain) during chemotherapy and that these symptoms generally started at the end of the third cycle of chemotherapy, i.e.

previously in treatment administration (Attal et al., 2009). Authors concluded that thermal hyperalgesia is a relevant clinical marker of early Oxaliplatin neurotoxicity and may predict severe neuropathy. In the case of animal model, our results suggest that dynamic mechanical allodynia would be a better marker of early neurotoxicity induced by Oxaliplatin.

Our DNA microarray results showed that systemic administration of Oxaliplatin induced the dysregulation of genes in DRGs and spinal dorsal horn. It is surprising to have only 4 genes differentially expressed in DRGs and 8 genes in spinal cord dorsal horn. In fact, most of previous studies described a damage of the peripheral nervous system in particular in primary sensory neurons by retention of platinum in the DRG (Holmes et al., 1998) (Jamieson et al., 2005b). In a recent study, Gauchan et al. showed increased expression of transient receptor potential melastatin 8 (TRPM8) in Oxaliplatin treated mice (Gauchan et al., 2009). This receptor, a cold receptor of TRP family in which all thermal hot and cold receptors and nociceptors are found, was not detected in our DNA microarray experiment. This negative result underlines limits of efficiency of the DNA microarray analysis: DNA microarray allowed examining the expression profile of potentially the entire genome at once but it is necessary to be careful with the interpretation of the results obtained with this technique (Griffin et al., 2003). These authors described a number of complications in DNA microarray experiments coming from complexity of tissues and diversity of cell populations. Indeed, averaging expression levels of an entire region of tissue, such as DRGs, spinal cord dorsal horn and cortex, will clearly minimize or even conceal large expression changes that occur in small subpopulations of cells. Large differences we observed in this study using p-ERK activity between various cortical areas underline the weakness of interpretation of DNA microarray results.

However, DNA microarray results showed a very important number of genes differentially expressed in the somatosensory cortex of Oxaliplatin treated rats. All of these genes were down-regulated. This result may be explained by the fact that Oxaliplatin could cross the blood-brain barrier. Indeed, it has generally been assumed that most chemotherapeutic agents do not cross this blood–brain barrier (with exceptions including methotrexate and 5-fluorouracil). However, recent reviews have suggested that nearly all frequently used chemotherapeutic agents can cause disorders in the central nervous system (CNS), including encephalopathy, leukoencephalopathy, ototoxicity and cerebellar symptoms, although these are fairly uncommon (Verstappen et al., 2003; Troy et al., 2000). In addition, studies using

positron emission tomography (PET) have shown that detectable levels of radiolabelled cisplatin was found in the brain after intravenous administration (Ginos et al., 1987). Dietrich et al. administered the commonly used chemotherapeutic agents BCNU, cisplatin and cytosine arabinoside (cytarabine) systemically to mice. These chemotherapy agents were associated with increased cell death and decreased cell division in the subventricular zone, the dentate gyrus of the hippocampus and the corpus callosum in animals that received this treatment (Dietrich et al., 2006). We can thus hypothesize that Oxaliplatin produces the same effect as cisplatin by passing effectively the blood-brain barrier. This effect could explain decrease of gene expression observed in Oxaliplatin treated animals.

Among genes that displayed a down-regulated expression in the somatosensory cortex, we found 5 genes coding for potassium channels. As a reference among these five potassium channels, we showed a down-regulation of  $K_v2.2$  gene expression (a voltage-gated potassium). A decreased expression of  $K_v2.2$  gene could suggest that Oxaliplatin-induced decrease of  $K_v2.2$  mRNAs may lead to a reduction in  $K^+$  currents and contribute to the neuronal hyperexcitability associated with ectopic spontaneous discharges generated in damaged nerves. Indeed, down-regulation of some voltage-gated potassium channels gene expression are observed in dorsal root ganglia following chronic constriction injury of the rat sciatic nerve, a model of peripheral neuropathic pain (Kim et al., 2002), among which authors found a down-regulation of  $K_v2.2$ .

The present study demonstrates an increase in ERK phosphorylation in many cortical areas involved in pain integration after Oxaliplatin treatment. It also suggests that ERK phosphorylation in these cortical neurons may contribute to the mechanisms underlying abnormal pain perception in this condition. Bilateral ERK phosphorylation was selectively distributed in cortical neuronal cell bodies with predominance within layers I–II accompanied with intense pERK also extending into distal dendrites. ERK is activated after noxious stimulation in the spinal dorsal horn and is activated in an activity-dependent manner in spinal neurons following activation of primary sensory neurons (Ji et al., 1999; Karim et al., 2001; Pezet et al., 2002). Previous studies showed an increased of ERK phosphorylation in cingulate cortex using the formalin model (Wei and Zhuo, 2008; Cao et al., 2009) and in insular cortex in a trigeminal neuropathic pain model in rats (Alvarez et al., 2009). In our study, double labeling indicated that some p-ERK labeled neurons also express  $K_v2.2$ . We can thus hypothesize that down-regulation of  $K_v2.2$  potassium channel, perhaps associated with



the four other K<sup>+</sup> channels we describe in Table 4, could induce cell excitability revealed by ERK phosphorylation. Thus Oxaliplatin treatment could lead to hyperexcitability of neurons in cortical areas involved in the integration of the pain message.

Finally, we showed that non-noxious stimulation induced a decrease in ERK phosphorylation in the same cortical areas. Previous study showed that light, dynamic, mechanical facial stimuli induce pERK in the insular cortex after infraorbital ligation (Alvarez et al., 2009). In our study, light, dynamic mechanical stimuli exerted on a hind paw in oxaliplatin-treated animals induce a decrease in the number of p-ERK-IR neurons. We can thus hypothesize that Oxaliplatin treatment would lead to an intensification of descending inhibitory controls. Indeed, some neurons in the dorsal horn of the spinal cord are strongly inhibited when a nociceptive stimulus is applied to any part of the body, distinct from their excitatory receptive fields. This phenomenon was termed "Diffuse Noxious Inhibitory Controls" (DNIC) (Le Bars et al., 1979). Neurons within the medullary subnucleus reticularis dorsalis (SRD) of the rat converge selectively nociceptive information from all parts of the body (Villanueva et al., 1988) (Villanueva et al., 1996). It is thus possible that Oxaliplatin treatment could increase these inhibitory controls. Since non-noxious stimulations can be integrated as noxious stimuli in Oxaliplatin treated rats, they could induce activation of SRD neurons triggering DNIC. Activation of SRD neurons could explain a decrease in cortical neuronal activity we described in the present study.

In conclusion, DNA microarray analysis and p-ERK expression study suggest that supraspinal structures were particularly affected at the end of oxaliplatin treatment. Indeed, our results suggest that cortical neurons sensitization in primary and secondary somatosensory cortex could be the result of the modification of expression of potassium channels, including kv2.2 in the somatosensory cortex. Our results suggest that this factor may be an important factor in pathogenesis of neuropathic pain induced by oxaliplatin treatment and could be a new pharmacological target for neuropathic pain therapy.

## FIGURE LEGENDS

**Figure 1:** Time-course of weight variation (expressed in percentage) in oxaliplatin treated and control rats. We observed no changes between the two groups of animals.

**Figure 2:** Time-course of dynamic and static mechanical allodynia and hyperalgesia. A: Mean number of positive responses to the smooth paint-brush test. At D4, the mean number of positive response was significantly increased in oxaliplatin-treated rats (black bars) compared to control rats (+  $P < 0.05$ ; \*  $p < 0.05$  oxaliplatin-treated rats between D1 and D4). B: Mean numbers of positive responses to the rough paint-brush test. The mean numbers of positive responses was significantly different in Vincristine-treated rats (black bars) compared to control rats (empty bars) as soon as D4. (+  $p < 0.05$  oxaliplatin-treated rats vs. controls rats; \*  $p < 0.05$  oxaliplatin-treated rats between D1 and D4). C: Threshold of mechanical allodynia measured using electronic Von Frey. The withdrawal threshold was significantly different in oxaliplatin-treated rats (black bars) compared to control rats (empty bars) as soon as D4 and maintained until D32 (\*  $p < 0.05$  oxaliplatin-treated rats between D1 and D4, +  $p < 0.05$ , +++  $p < 0.001$  oxaliplatin-treated rats vs. controls rats) D: Changes in mechanical hyperalgesia measured by the “Pinch Test”. The withdrawal threshold was significantly different in oxaliplatin-treated rats (black bars) compared to control rats (empty bars) at D11 and maintained until D32 (\*\*  $p < 0.001$  oxaliplatin-treated rats between D8 and D11, +++  $p < 0.001$  oxaliplatin-treated rats vs. controls rats). All data are expressed in mean  $\pm$  SEM.

**Figure 3:** Time-course of cold sensitivity. A: Cold score obtained with the acetone test. Mean cold scores were significantly increased in oxaliplatin-treated rats (black bars) compared to control rats (empty bars) at D32 (\*  $p < 0.05$  oxaliplatin-treated rats between D1 and D32; ++  $p < 0.01$  oxaliplatin-treated rats vs. controls rats). B: ‘Attention’: the animal stopped exploring or grooming and turned his head towards his hindpaws, examining the floor of the chamber. At D32, the ‘attention’ threshold was significantly increased in oxaliplatin-treated rats (black bars) compared to control rats (+++  $P < 0.001$ ). D: Threshold of nociceptive response: the animal exhibits one of the following behaviour: licking or shaking one of his hindpaws or jumping. Withdrawal threshold were significantly increased in oxaliplatin-treated rats (black bars) compared to control rats (empty bars) at D15 and continued to increase at D32 (\*\*\*)

$p < 0.001$  oxaliplatin-treated rats between D15 and D32; +++  $p < 0.05$  oxaliplatin-treated rats vs. controls rats). All data are expressed in mean  $\pm$  SEM.

**Figure 4:** Histograms presenting the distribution of p-ERK-IR neurons in different cortical areas after oxaliplatin treatment. A: p-ERK- immunoreactive (IR) IR neurons counted in the primary somatosensory cortex, forelimb region. The mean p-ERK-IR neurons were significantly increased in oxaliplatin-treated rats (black bars) compared to control rats (empty bars) (\*  $p < 0.05$ ). B: p-ERK-IR neurons counted in primary somatosensory cortex, hindlimb region. Mean p-ERK-IR neurons were significantly increased in oxaliplatin-treated rats (black bars) compared to control rats (empty bars) (\*  $p < 0.05$ ). C: p-ERK-IR neurons counted in primary somatosensory cortex, trunk region. Mean p-ERK-IR neurons were significantly increased in oxaliplatin-treated rats (black bars) compared to control rats (empty bars) (\*\*  $p < 0.01$ ). D: p-ERK-IR neurons counted in cingulate cortex. Mean p-ERK-IR neurons were significantly increased in oxaliplatin-treated rats (black bars) compared to control rats (empty bars) (\*  $p < 0.05$ ). E: p-ERK-IR neurons counted in motor cortex (primary and secondary). Mean p-ERK-IR neurons were significantly increased in oxaliplatin-treated rats (black bars) compared to control rats (empty bars) (\*\*  $p < 0.01$ ). F: p-ERK-IR neurons counted in the secondary somatosensory cortex. Mean p-ERK-IR neurons were increased in oxaliplatin-treated rats (black bars) compared to control rats (empty bars) but it is not significantly. G: p-ERK-IR neurons counted in the insular cortex. Mean p-ERK-IR neurons were increased in oxaliplatin-treated rats (black bars) compared to control rats (empty bars) but it is not significantly. H: p-ERK-IR neurons counted in piriform cortex. No changes was observed between oxaliplatin-treated rats (black bars) compared to control rats (empty bars). Data are expressed in mean  $\pm$  SEM.

**Figure 5:** Oxaliplatin treatment increases the number of phospho-ERK (p-ERK)-immunoreactive neuronal profiles in the somatosensory cortex. A: p-ERK-IR is present in superficial laminae (I, II) of cortex (arrows). B: Cell body and dendrites are immunoreactive for p-ERK.

**Figure 6:** Histograms presenting the distribution of p-ERK-IR neurons in different cortical areas (Primary somatossensory cortex, forelimb region (A), hindlimb region (B), trunk region (C), secondary somatosensory cortex (D), insular cortex (E)) in oxaliplatin treated and control rats after non-noxious stimulation applied to the right forepaw. The mean number of p-ERK-

IR neurons was significantly decreased in oxaliplatin-treated rats (black bars) compared to control rats (empty bars) in all these brain areas (\*  $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.01$ ). Data are expressed in mean  $\pm$  SEM.

**Figure 7:** Double immunofluorescent staining of p-ERK (A) and kv2.2 (B) in the somatosensory cortex of a representative Oxaliplatin treated animal. p-ERK labeling (A) colocalized with kv2.2 labeling (B) only in projections of cells, probably dendrites (C). However, we did not observed any doubly labeled (p-ERK-Kv2.2) cell body (D). Negative control, without primary antibody anti-p-ERK (E), showed no staining A and B are single staining for p-ERK and kv2.2 respectively shown in black and white. C and D are double stainings showing p-ERK in green and kv2.2 in red.

**Table1:** Genes differentially expressed in DRGs after oxaliplatin treatment. Of the 22 517 probes included in Illumina microarrays, 9 760 were expressed in DRGs. Among them, only 0.06% (6 probes corresponding to 4 genes) were found to be significantly differentially expressed.

**Table2:** Genes differentially expressed in DRGs after oxaliplatin treatment. Of the 22 517 probes included in Illumina microarrays, 10 397 were expressed in dorsal horn of spinal cord. Only 0.4% (46 probes corresponding to 8 genes) were found to be significantly differentially expressed in dorsal horn of spinal cord. Among them, 5 were down-regulated and 3 were up-regulated.

**Table3:** Down-regulation of polymerase subunit after oxaliplatin treatment. Among the 322 genes differentially expressed in the somatosensory cortex, we observed a down-regulation of pold1 (Polymerase, delta1, catalytic subunit), polr2f (Polymerase II, polypeptide F) and rpo1-4 (RNA polymerase 1-4).

**Table4:** Genes classified in GO category 'Ion channel activity'. Twelve genes were classified in this GO category (GO: 0005216). Along them, we observed five genes coding for potassium channels.

**Table5:** Numbers of p-ERK labeling neurons in different cortical areas: cingulate cortex, insular cortex, primary sensory cortex hindlimb region, primary sensory cortex forelimb region, motor cortex, primary sensory cortex trunk region and secondary somatosensory cortex. Two conditions were analyzed: basal p-ERK labeling (i.e. without any stimulation), and non-noxious mechanical stimulation applied to right forepaw of animal. +  $p < 0.05$ ; ++  $p < 0.01$  vs. non stimulated control rats; \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$  vs. non stimulated treated rats.

## Reference List

- Alvarez P, Dieb W, Hafidi A, Voisin DL, Dallel R (2009) Insular cortex representation of dynamic mechanical allodynia in trigeminal neuropathic rats. *Neurobiol Dis* 33:89-95.
- Attal N, Bouhassira D, Gautron M, Vaillant JN, Mitry E, Lepere C, Rougier P, Guirimand F (2009) Thermal hyperalgesia as a marker of oxaliplatin neurotoxicity: a prospective quantified sensory assessment study. *Pain* 144:245-252.
- Cao H, Gao YJ, Ren WH, Li TT, Duan KZ, Cui YH, Cao XH, Zhao ZQ, Ji RR, Zhang YQ (2009) Activation of extracellular signal-regulated kinase in the anterior cingulate cortex contributes to the induction and expression of affective pain. *J Neurosci* 29:3307-3321.
- Dietrich J, Han R, Yang Y, Mayer-Proschel M, Noble M (2006) CNS progenitor cells and oligodendrocytes are targets of chemotherapeutic agents in vitro and in vivo. *J Biol* 5:22.
- Gamelin E, Gamelin L, Bossi L, Quasthoff S (2002) Clinical aspects and molecular basis of oxaliplatin neurotoxicity: current management and development of preventive measures. *Semin Oncol* 29:21-33.
- Gauchan P, Andoh T, Kato A, Kuraishi Y (2009) Involvement of increased expression of transient receptor potential melastatin 8 in oxaliplatin-induced cold allodynia in mice. *Neurosci Lett* 458:93-95.
- Ginos JZ, Cooper AJ, Dhawan V, Lai JC, Strother SC, Alcock N, Rottenberg DA (1987) [<sup>13</sup>N]cisplatin PET to assess pharmacokinetics of intra-arterial versus intravenous chemotherapy for malignant brain tumors. *J Nucl Med* 28:1844-1852.
- Griffin RS, Mills CD, Costigan M, Woolf CJ (2003) Exploiting microarrays to reveal differential gene expression in the nervous system. *Genome Biol* 4:105.
- Holmes J, Stanko J, Varchenko M, Ding H, Madden VJ, Bagnell CR, Wyrick SD, Chaney SG (1998) Comparative neurotoxicity of oxaliplatin, cisplatin, and ormaplatin in a Wistar rat model. *Toxicol Sci* 46:342-351.
- Jamieson SM, Liu J, Connor B, McKeage MJ (2005a) Oxaliplatin causes selective atrophy of a subpopulation of dorsal root ganglion neurons without inducing cell loss. *Cancer Chemother Pharmacol* 56:391-399.
- Jamieson SM, Liu J, Connor B, McKeage MJ (2005b) Oxaliplatin causes selective atrophy of a subpopulation of dorsal root ganglion neurons without inducing cell loss. *Cancer Chemother Pharmacol* 56:391-399.
- Ji RR, Baba H, Brenner GJ, Woolf CJ (1999) Nociceptive-specific activation of ERK in spinal neurons contributes to pain hypersensitivity. *Nat Neurosci* 2:1114-1119.
- Karim F, Wang CC, Gereau RW (2001) Metabotropic glutamate receptor subtypes 1 and 5 are activators of extracellular signal-regulated kinase signaling required for inflammatory pain in mice. *J Neurosci* 21:3771-3779.

- Kim DS, Choi JO, Rim HD, Cho HJ (2002) Downregulation of voltage-gated potassium channel alpha gene expression in dorsal root ganglia following chronic constriction injury of the rat sciatic nerve. *Brain Res Mol Brain Res* 105:146-152.
- Le Bars D, Dickenson AH, Besson JM (1979) Diffuse noxious inhibitory controls (DNIC). I. Effects on dorsal horn convergent neurones in the rat. *Pain* 6:283-304.
- Lehky TJ, Leonard GD, Wilson RH, Grem JL, Floeter MK (2004) Oxaliplatin-induced neurotoxicity: acute hyperexcitability and chronic neuropathy. *Muscle Nerve* 29:387-392.
- Ling B, Authier N, Balayssac D, Eschalier A, Coudore F (2007) Behavioral and pharmacological description of oxaliplatin-induced painful neuropathy in rat. *Pain* 128:225-234.
- Pezet S, Malcangio M, Lever IJ, Perkinson MS, Thompson SW, Williams RJ, McMahon SB (2002) Noxious stimulation induces Trk receptor and downstream ERK phosphorylation in spinal dorsal horn. *Mol Cell Neurosci* 21:684-695.
- Raymond E, Chaney SG, Taamma A, Cvitkovic E (1998b) Oxaliplatin: a review of preclinical and clinical studies. *Ann Oncol* 9:1053-1071.
- Raymond E, Chaney SG, Taamma A, Cvitkovic E (1998a) Oxaliplatin: a review of preclinical and clinical studies. *Ann Oncol* 9:1053-1071.
- Troy L, McFarland K, Littman-Power S, Kelly BJ, Walpole ET, Wyld D, Thomson D (2000) Cisplatin-based therapy: a neurological and neuropsychological review. *Psychooncology* 9:29-39.
- Verstappen CC, Heimans JJ, Hoekman K, Postma TJ (2003) Neurotoxic complications of chemotherapy in patients with cancer: clinical signs and optimal management. *Drugs* 63:1549-1563.
- Villanueva L, Bouhassira D, Bing Z, Le BD (1988) Convergence of heterotopic nociceptive information onto subnucleus reticularis dorsalis neurons in the rat medulla. *J Neurophysiol* 60:980-1009.
- Villanueva L, Bouhassira D, Le Bars D (1996) The medullary subnucleus reticularis dorsalis (SRD) as a key link in both the transmission and modulation of pain signals. *Pain* 67:231-240.
- Wei F, Zhuo M (2008) Activation of ERK in the anterior cingulate cortex during the induction and expression of chronic pain. *Mol Pain* 4:28.
- Wilson RH, Lehky T, Thomas RR, Quinn MG, Floeter MK, Grem JL (2002) Acute oxaliplatin-induced peripheral nerve hyperexcitability. *J Clin Oncol* 20:1767-1774.

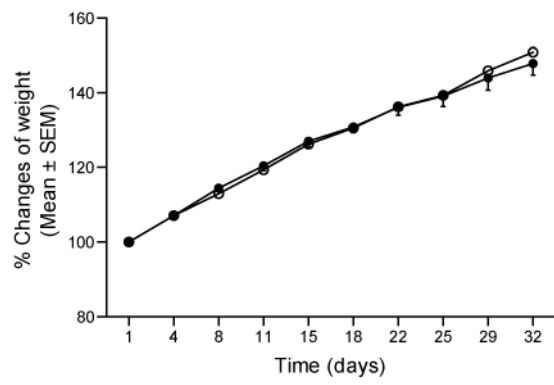


Figure 1



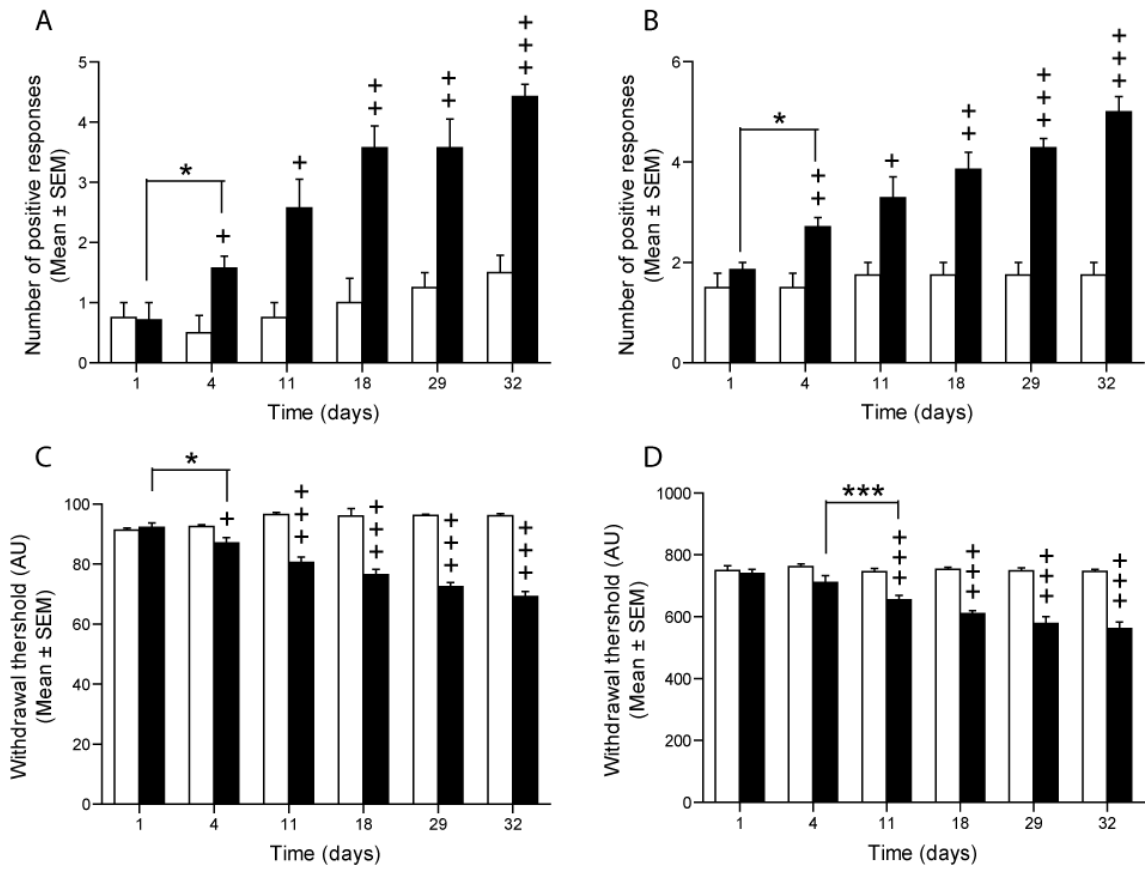


Figure 2

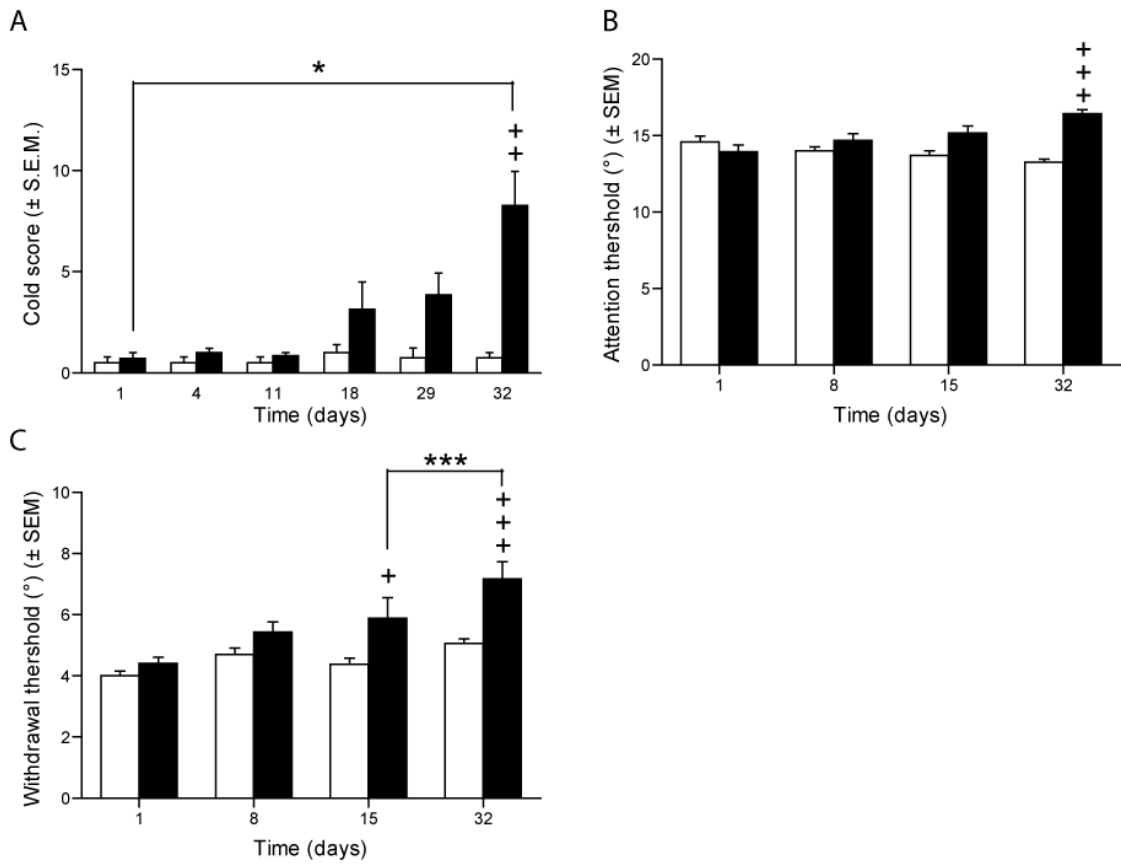


Figure 3

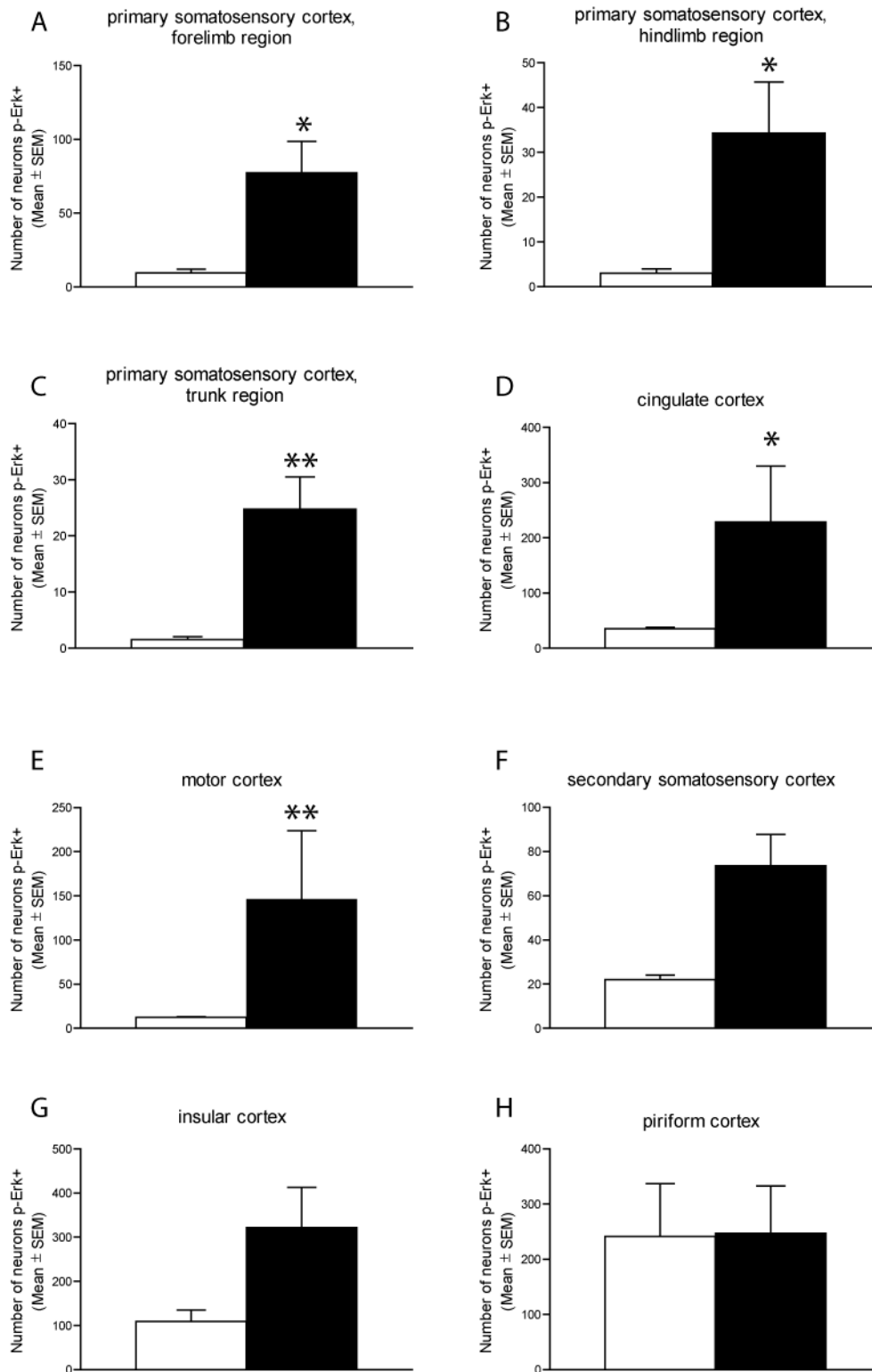


Figure 4

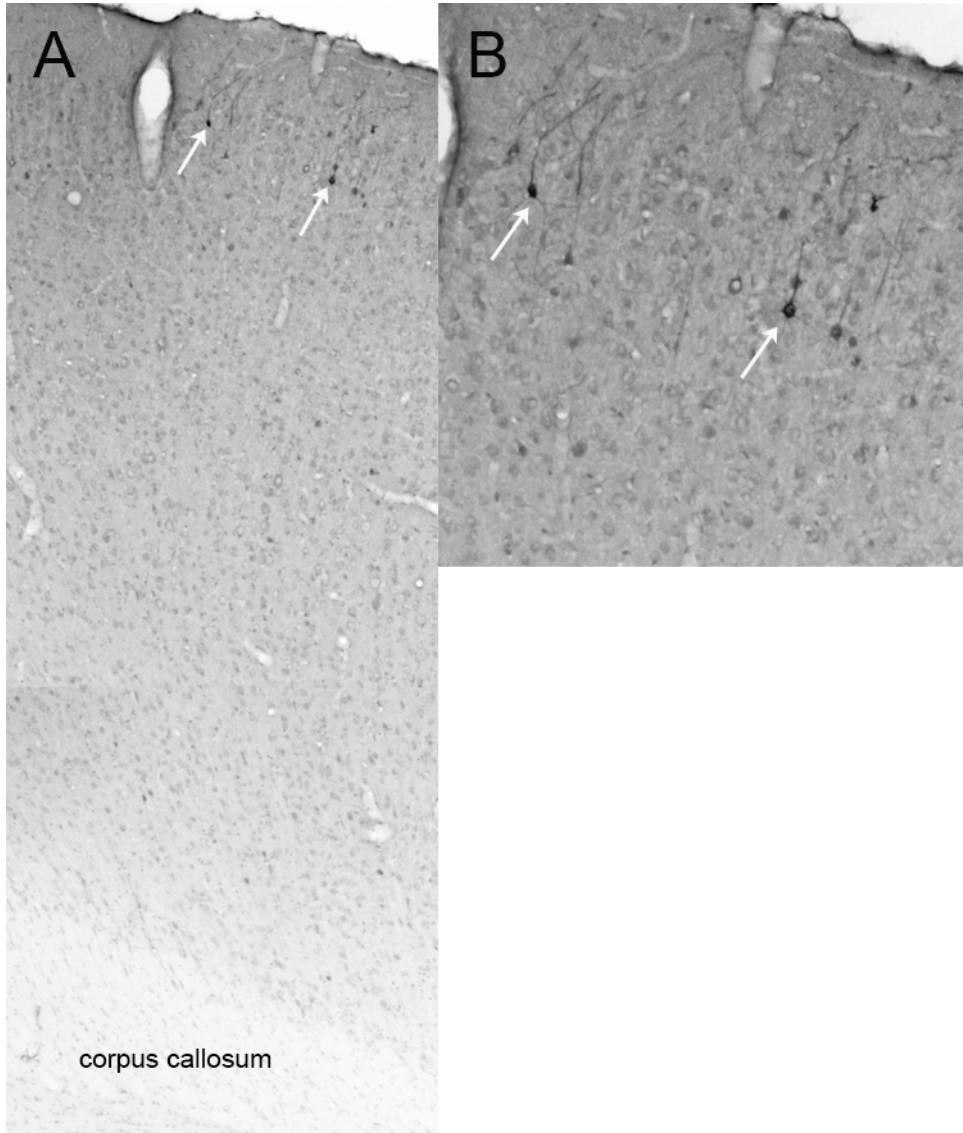


Figure 5

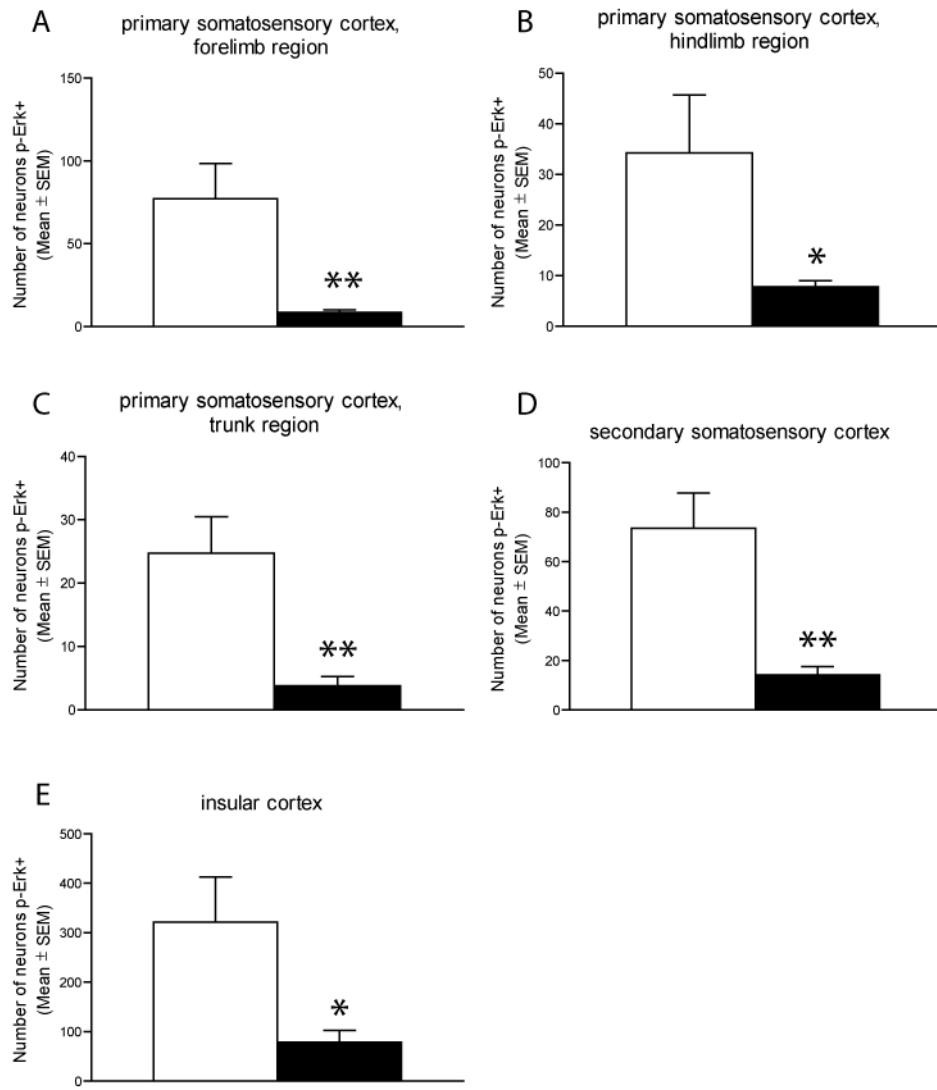


Figure 6

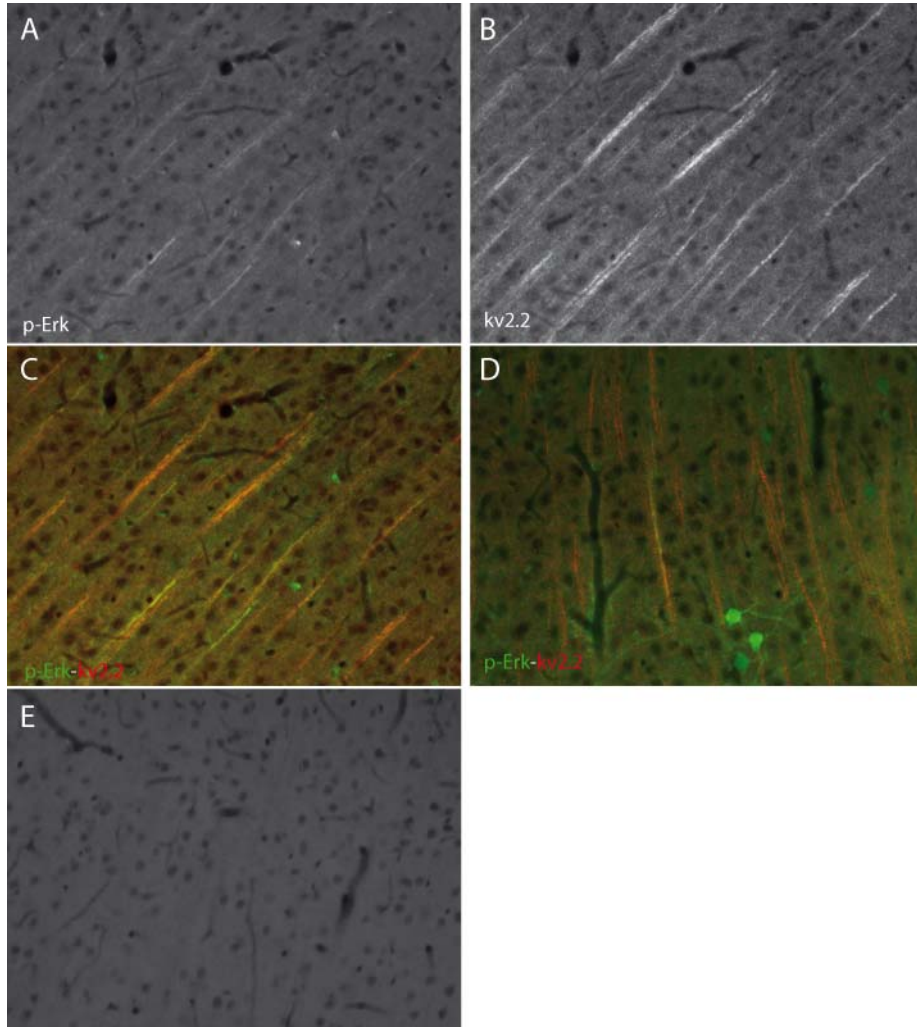


Figure 7

Identifier	Symbol	Name	Rapport	SD	p value
XM_234385	Pcnx	Pecanex homolog (Drosophila)	0,823832	0,10731	0,019019
NM_172077	Reg3a	Regenerating islet-derived 3 alpha	0,785399	0,160777	0,036329
NM_138835	Syt12	Synaptotagmin XII	0,812456	0,142679	0,040327
NM_053656	P2rx2	Purinergic receptor P2X, ligand-gated ion channel, 2	0,906556	0,067732	0,040991

Table 1

Identifiant	Symbol	Nom	Rapport	SD	p value
XM_341326	Adprt1	ADP-ribosyltransferase (NAD <sup>+</sup> ; poly (ADP-ribose) polymerase)-like 1	0,839151	0,071815	0,002496
NM_012976	Lgals5	Lectin, galactose binding, soluble 5	0,928624	0,029872	0,011874
NM_012886	Timp3	Tissue inhibitor of metalloproteinase 3 (Sorsby fundus dystrophy, pseudo-inflammatory)	0,94333	0,034034	0,023002
NM_052983	Slc5a5	Solute carrier family 5 (sodium iodide symporter), member 5	0,89238	0,0882	0,038855
NM_133623	Slc6a13	Solute carrier family 6 (neurotransmitter transporter, GABA), member 13	0,801325	0,17689	0,043217
XM_342826	Spag8	Sperm associated antigen 8	1,108887	0,079328	0,037609
NM_145673	Mafk	V-maf musculoaponeurotic fibrosarcoma oncogene family, protein K (avian)	1,210679	0,152264	0,042808
NM_019168	Arg2	Arginase 2	1,062627	0,049118	0,045092

Table 2



Identifier	Symbol	Name	Rapport	SD	p value
NM_021662	Pold1	Polymerase (DNA directed), delta 1, catalytic subunit	0.889491	0.056195	0.005370
NM_031335	Polr2f	Polymerase (RNA) II (DNA directed) polypeptide F	0.849202	0.092089	0.011077
NM_031772	Rpo1-4	RNA polymerase 1-4	0.847541	0.098091	0.013790

Table 3

---

GO: GO:0005216

Term: ion channel activity

Identifier	Symbol	Name	Rapport	SD	p value
NM_173103	Clcnkb	Chloride channel Kb	0.834671	0.092359	0.007183
NM_017288	Scn1b	Sodium channel, voltage-gated, type I, beta	0.851740	0.082354	0.007320
NM_017099	Kcnj8	Potassium inwardly-rectifying channel, subfamily J, member 8	0.842675	0.099078	0.012444
NM_052805	Chrna3	Cholinergic receptor, nicotinic, alpha polypeptide 3	0.884250	0.075653	0.016053
NM_023096	Kcnk10	Potassium channel, subfamily K, member 10	0.896325	0.070513	0.019393
NM_198762	Slick	Potassium channel, subfamily T, member 2	0.850293	0.114488	0.027690
NM_017065	Gabrb3	Gamma-aminobutyric acid (GABA-A) receptor, subunit beta 3	0.876387	0.095307	0.030169
NM_080586	Gabrg1	Gamma-aminobutyric acid A receptor, gamma 1	0.891590	0.083097	0.030457
NM_031982	Trpv1	Transient receptor potential cation channel, subfamily V, member 1	0.837665	0.130555	0.032498
NM_053937	Kcnh6	Potassium voltage-gated channel, subfamily H (eag-related), member 6	0.926494	0.056842	0.033717
NM_054000	Kcnb2	Potassium voltage gated channel, Shab-related subfamily, member 2	0.886395	0.091936	0.036720
NM_022683	Cul5	Cullin 5	0.898676	0.072492	0.038730

---

Table 4

	Control rats non-stimulated	Treated rats non- stimulated	Control rats stimulated	Treated rats stimulated
cingulate cortex	35 ± 3	228,8 ± 101 +	86,5 ± 29,41	30,8 ± 10,23
insular cortex	109,5 ± 25,5	321,5 ± 91,12	111,8 ± 42,59	78,4 ± 23,89 *
primary somatosensory cortex, hindlimb region	3 ± 1	34,25 ± 11,45 +	5,25 ± 2,66	7,8 ± 1,24 *
primary somatosensory cortex, forelimb region	9,5 ± 2,5	77,25 ± 21,36 +	10,5 ± 6,06	8,6 ± 1,43 **
motor cortex	12,5 ± 0,5	146,3 ± 77,69 ++	11,5 ± 7,44	16,4 ± 4,48
primary somatosensory cortex, trunk region	1,5 ± 0,5	24,75 ± 5,76 ++	2,5 ± 0,86	3,80 ± 1,46 **
secondary somatosensory cortex	22 ± 2	73,5 ± 14,31	7,25 ± 3,15	14,2 ± 3,31 **

Table 5

## **Chapitre III**

## Chapitre III : La sclérose en plaque

### 1. La sclérose en plaque

#### 1.1. Définition de la sclérose en plaque

La sclérose en plaque (SEP) est une maladie de type inflammatoire du système nerveux central. La définition nosologique de la SEP reste anatomique. En effet c'est à partir de la description des lésions de cette maladie que Charcot lui a donné son nom en 1868.

La SEP est le résultat d'une démyélinisation, c'est-à-dire une destruction de la myéline dans la substance blanche de l'encéphale et de la moelle épinière. Cette démyélinisation est de type inflammatoire comme en témoignent les jeunes lésions où l'œdème et l'infiltrat inflammatoire accompagnent la dégénérescence active des gaines de myéline. Dans les lésions moins jeunes, c'est à la périphérie des lésions, dans leur zone de progression que l'on trouve les signes de l'inflammation : une augmentation de la présence de lymphocytes T, puis de macrophages et de lymphocytes B ainsi qu'une sécrétion d'immuno-globulines. C'est le stade cicatriciel des lésions que Charcot a décrit en premier ; en effet les lésions anciennes sont le siège d'une prolifération astrocytaire qui caractérise la sclérose du tissu nerveux. Ces lésions démyélinisantes ont une répartition et une topographie singulières, non pas diffuses mais en plaques. Les zones de démyélinisation sont bien circonscrites, avec une frontière nette par rapport à la myéline saine. Ces plaques sont multiples et peuvent être disséminées dans le système nerveux central et périphérique (encéphale, nerf optique, moelle épinière), pouvant affecter n'importe quel secteur de la substance blanche, mais avec des sites de prédilection : tronc cérébral, zones périventriculaires.

Dans le cadre de la pathologie de type inflammatoire, la SEP occupe une place particulière, du fait de sa fréquence (c'est la principale maladie non tumorale du système nerveux chez l'adulte jeune), de son évolution prolongée sur des dizaines d'années, entraînant au fil du temps des déficits de plus en plus invalidants.

## 1.2. Epidémiologie

On observe une répartition géographique inégale de la maladie, avec des zones de haute prévalence (100 pour 100 000 habitants) en Scandinavie, Ecosse, Europe du Nord, au Canada et au Nord des Etats Unis, des zones de prévalence moyenne (50 pour 100 000 habitants), en Europe centrale et de l'Ouest, au Sud des Etats Unis, et des zones de basse prévalence (inférieure à 20 pour 100 000 habitants), autour de la Méditerranée et au Mexique. La maladie est exceptionnelle en Afrique dans la population noire. Une première analyse fait donc apparaître un gradient Nord-Sud, des climats froids ou tempérés humides aux pays chauds, mais ce principe de latitude n'est pas d'application générale : le Japon, dont l'extension Nord-Sud équivaut à celle des U.S.A. est uniformément atteint en basse prévalence ; la répartition de la SEP dans l'hémisphère Sud ne présente pas un gradient aussi schématique. L'analyse de ces données conduit à supposer l'interférence de deux facteurs au moins : un facteur environnemental et un facteur génétique. Parmi les arguments en faveur d'un facteur génétique, outre la faible prévalence de la SEP chez les Japonais, on relève la rareté chez les Noirs américains au Nord comme au Sud des USA. Le rôle présumé du patrimoine génétique est confirmé par le dénombrement des familles multi-cas chez lesquelles la fréquence des personnes atteintes est plus élevée que ne le donnerait le hasard : on estime le risque à 2 % pour les frères et sœurs d'un patient, soit un facteur 50 par rapport aux sujets non apparentés. Il existe une susceptibilité d'origine génétique, qui ne suffit pas pour expliquer le déclenchement de la maladie.

## 1.3. Les différentes formes de la SEP et ses symptômes

On distingue quatre formes évolutives de sclérose en plaques : la forme cyclique rémittente, les formes chroniques progressives primaire et secondaire, et la forme progressive rémittente (Figure 24).

- La forme cyclique rémittente : Dans 70 à 80 % des cas, le patient sera d'abord atteint de la forme cyclique rémittente. Cette forme se manifeste par des poussées suivies de rémissions. Une poussée est définie comme une période de survenue ou d'aggravation des signes neurologiques durant au moins 24 heures, séparée de la période précédente d'au moins un mois. Ces poussées sont provoquées par l'inflammation et la démyélinisation des fibres nerveuses. Durant les rémissions, la myéline se reforme en partie autour des fibres, ce qui entraîne une régression complète ou partielle des symptômes.

- Les deux formes chroniques progressives : Les formes progressives connaissent quant à elles une évolution lente, mais continue. Quatre-vingt pour cent des personnes souffrant de la forme cyclique rémittente souffriront d'une forme progressive dans les 15 ans qui suivent le diagnostic de la maladie. On l'appelle alors « forme progressive secondaire ». La progression est dite primaire lorsque, dès le départ, la maladie évolue lentement sans périodes de rémission.

- La forme progressive rémittente : Cette forme se caractérise par une évolution lente et constante de la maladie (une forme progressive primaire) marquée par des poussées plus importantes de symptômes.

Les symptômes varient d'une personne à l'autre. Ils dépendent de la localisation des plaques dans le cerveau et la moelle épinière. Les symptômes observés sont des engourdissements avec des faiblesses dans un ou plusieurs membres, une fatigue anormale, des tremblements et une difficulté à contrôler ses mouvements, des troubles de la vue et dans certains cas des pertes d'équilibre. Avec la progression de la maladie, surviennent parfois des spasmes musculaires (spasticité), des difficultés d'élocution, de l'incontinence (vésicale ou intestinale), une paralysie partielle ou totale des membres et des troubles de la mémoire.

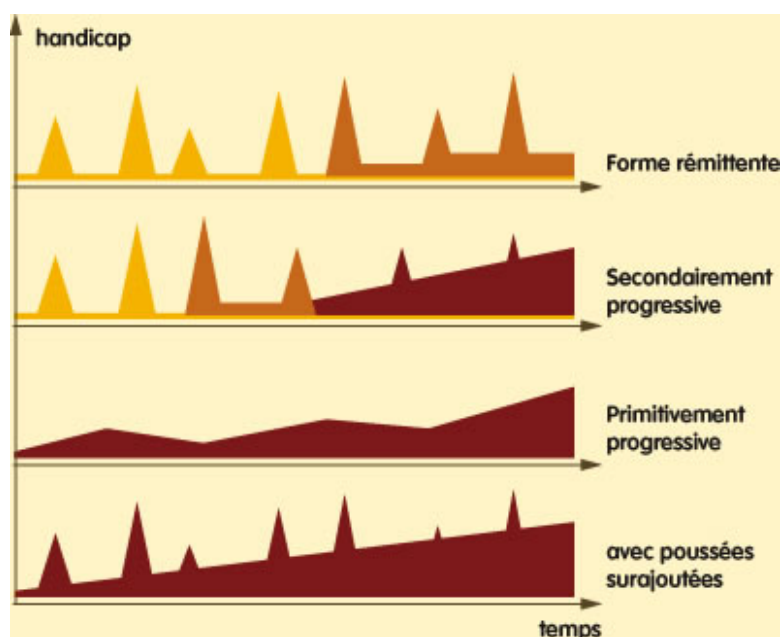


Figure 24 : Représentation schématique des différentes formes de SEP rencontrées chez l'homme, avec la forme cyclique rémittente (Forme rémittente), les deux formes chroniques progressives : la forme secondaire, c'est-à-dire une forme cyclique suivie d'une évolution lente mais continue (Secondairement progressive) ; et la forme primaire, c'est-à-dire une forme évolutive lente sans période de rémission (Primitivement progressive) et la forme progressive rémittente (avec poussées surajoutées) caractérisée par une évolution lente et constante de la maladie marquée par des poussées plus importantes de symptômes.

La SEP s'accompagne fréquemment de douleurs chroniques (Archibald et al., 1994; Clifford and Trotter, 1984; Moulin et al., 1988; Svendsen et al., 2003). Il a été estimé que 50 à 80 % des patients atteints de sclérose en plaque présentaient des épisodes douloureux à différents temps de l'évolution de leur maladie (Osterberg et al., 2005). Les douleurs associées à cette maladie peuvent être multiple : certaines sont liées directement au processus lésionnel et sont de type neuropathique, avec une atteinte du système nerveux ; d'autres sont les conséquences indirectes de la maladie. La prise en charge des douleurs de la SEP nécessite dans un premier temps de déterminer le(s) mécanisme(s) à l'origine de la douleur: neuropathiques paroxystiques et continues ; crises toniques; douleurs des poussées ; spasticité (contractures) ou douleurs secondaires (lombalgies, douleurs coliques, etc.) et enfin les douleurs iatrogènes. Les douleurs neuropathiques sont les douleurs les plus fréquentes et les plus difficiles à prendre en charge dans le syndrome des patients atteints de SEP (Svendsen et al., 2005). Toutefois, peu d'études ont été menées sur l'identification des mécanismes sous-jacents à la douleur neuropathique associée à la SEP.



## 2. Caractérisation des modifications comportementales sensorielles observées dans un modèle de sclérose en plaque chez le rat : étude comportementale et pharmacologique.

### 2.1. Le modèle animal

Le modèle de sclérose en plaque chez l'animal décrit dans la littérature est appelé : « *Experimental autoimmune encephalomyelitis* » (EAE). Ce modèle partage de nombreuses caractéristiques de la pathologie avec celles décrites chez les patients atteints de SEP, notamment des inflammations du système nerveux central, une démyélinisation et des déficiences motrices (Baxter, 2007;Owens and Sriram, 1995;Steinman and Zamvil, 2006). Les premières études ont utilisés des extraits de moelle épinière ou de cerveau afin d'induire l'EAE chez des singes (KABAT et al., 1946). Plus tard, des protéines purifiées du système nerveux central, comme la protéine basique de la myéline (MBP) (EINSTEIN et al., 1962), la protéine protéolipide (PLP) (Yamamura et al., 1986), la glycoprotéine oligodendrocytaire de la myéline (MOG) (Adelmann et al., 1995) ou la protéine S100 $\beta$  (Kojima et al., 1994) ont été utilisées afin d'induire le modèle EAE chez des rats (Bradl and Hohlfeld, 2003).

Suivant la souche de rats ou de souris utilisée, le fragment de myéline injecté et les traitements prescrits aux animaux, différentes évolutions de la maladie peuvent être modélisées, ce qui reflèterait les différences dans la progression des symptômes observés chez les patients atteints de SEP. Ainsi des rats Lewis immunisés par la MBP développent une EAE caractérisée par un épisode unique de paralysie à partir duquel ils guérissent spontanément et deviennent réfractaires à l'induction de la maladie (Duplan et al., 2006). En revanche, une immunisation par la MBP suivie d'injections chroniques de cyclosporine entraîne chez les rats Lewis un modèle bi-phasique d'EAE (Tanuma et al., 1999). Ce modèle est caractérisé par l'apparition de deux épisodes de troubles moteurs chez les rats. Ces deux phases peuvent également être quantifiées par une évaluation clinique en utilisant une échelle de score (Tanuma et al., 1999). Cette échelle comporte six niveaux de score ; 0 : aucun signe clinique ; 1 : queue atonique ; 2 : paralysie partielle des pattes arrières ; 3 : paralysie complète des pattes arrières ; 4 : tétraplégie ; 5 : mort résultant de l'EAE.

Peu d'études ont été réalisées sur les modifications du comportement douloureux chez les animaux après induction d'EAE. Un premier travail réalisé sur des rats Lewis (Pender, 1986) a étudié la sensibilité de la queue à une stimulation mécanique lors de la phase aiguë du modèle EAE. Cette étude a permis de mettre en évidence une hyposensibilité des animaux aux stimuli mécanique nociceptifs. Cette altération de la sensibilité intervient simultanément avec le développement de l'atonie de la queue mais disparaît plus rapidement que celle-ci (Pender, 1986). Une étude (Aicher et al., 2004) sur des souris de souche SJL immunisées grâce à un fragment de PLP (PLP<sub>139-151</sub>) a permis de valider une altération de la sensibilité de la queue : ces souris présentent une augmentation du temps de latence du retrait de la queue à un stimulus nociceptif au chaud en phase aiguë du modèle (hypoalgésie thermique au chaud). En revanche, durant la phase chronique de la maladie les souris présentent une diminution du temps de retrait de la queue indiquant l'apparition d'une hyperalgésie thermique au chaud. Ce comportement se développe au pic des déficits neurologiques et persiste au cours du temps. Olechowski et collaborateurs ont réalisé récemment une étude comportementale plus complète sur le modèle d'EAE. En effet, en utilisant des souris femelles C57BL/6, cette équipe a montré que les souris immunisées avec un fragment de la MOG (MOG<sub>35-55</sub>) présentaient une augmentation du temps de réponse à une application d'acétone sur la surface plantaire de la patte postérieure ainsi qu'une diminution du seuil de retrait de la patte au test des filaments de Von Frey, pouvant caractériser l'apparition d'une allodynie thermique au froid et d'une allodynie mécanique statique (Olechowski et al., 2009). Ils observent également que ces signes cliniques apparaissent avant le pic de déficits neurologiques de la maladie mesuré grâce à une échelle clinique de score ainsi que par le test du rotarod.

2.2. Résultats

Characterisation of the sensory abnormalities observed in an animal model of multiple sclerosis: a behavioural and pharmacological study.

Karine Thibault, Bernard Calvino, Sophie Pezet

Manuscrit en préparation

**RESUME DE L'ARTICLE**

Le but de cette étude était de réaliser une étude comportementale aussi complète que possible afin de caractériser de manière très précise les anomalies sensorielles se développant au cours de l'évolution d'un modèle de sclérose en plaque chez le rat (EAE). Cette étude comportementale a été prolongée par une étude pharmacologique pour tester sur ce modèle les molécules antalgiques utilisées classiquement pour le soulagement des douleurs aiguës et chroniques.

**Méthodologie :** Nous avons réalisé une étude comportementale sur deux modèles d'*Experimental autoimmune encephalomyelitis* (EAE) chez le rat : le premier caractérisé par un seul épisode de paralysie par immunisation des animaux par la MBP (EAE 'classique') et le deuxième caractérisé par deux épisodes par immunisation des animaux par la MBP suivie d'un traitement chronique de cyclosporine (EAE + cyclosporine).

Nous avons ensuite réalisé une étude pharmacologique sur le deuxième modèle qui mimerait la forme cyclique rémittente de la sclérose en plaque chez l'homme. Nous avons étudié les effets d'antalgiques classiques donnés en première intention pour le soulagement des patients

douloureux chronique. En faisant référence à l'échelle antalgique de l'OMS, nous avons testé :

- un antalgique de palier I : le Paracétamol (cf. p.16) ;
- un antalgique de palier II : le Tramadol (qui est un agoniste faible du récepteur  $\mu$  opioïde et un inhibiteur de la recapture de la sérotonine et de la noradrénaline, selon les doses utilisées) (cf. p.17).

Nous avons également testé des molécules hors échelle de l'OMS, classiquement utilisées en clinique pour le traitement des douleurs neuropathiques :

- un antidépresseur : le Duloxetine (qui est un inhibiteur mixte de la recapture sérotonine / noradrénaline, cf. p.25);
- et un antiépileptique : la Gabapentine (qui a un rôle modulateur inhibiteur sur l'activité des canaux ioniques activateurs calciques, cf. p.25 et 41-42).

**Résultats** : Nos résultats montrent une augmentation du score clinique des rats traités dans les deux modèles d'induction utilisés : EAE 'classique' et EAE + cyclosporine. En revanche, les rats ayant subi le modèle EAE + cyclosporine présentent des altérations motrices plus importantes que dans le modèle classique. Dans les deux modèles, les animaux présentent une allodynie et une hyperalgésie mécanique statique ainsi qu'une allodynie et une hyperalgésie thermique au froid au niveau des pattes postérieures et de la queue. Nous avons observé que ces symptômes apparaissent à des temps différents suivant l'évolution clinique des animaux. Ainsi l'hyperalgésie mécanique et thermique au chaud et au froid sur la queue ainsi que l'allodynie thermique au froid au niveau des pattes apparaissent avant les signes cliniques de l'EAE chez les rats. A l'opposé, l'allodynie mécanique et l'hyperalgésie thermique au froid au niveau des pattes n'apparaissent qu'après la disparition des signes cliniques.

Dans l'étude pharmacologique, nous avons observé que la Gabapentine et le Tramadol avaient un effet bénéfique sur l'hyperalgésie mécanique, tandis que le Duloxetine et le Tramadol avaient un effet bénéfique sur le développement de l'allodynie thermique au froid au niveau des pattes postérieures et sur l'hyperalgésie thermique au froid au niveau de la queue.

**Conclusion** : Nos résultats suggèrent que le modèle EAE + cyclosporine est un modèle bien adapté à l'étude chez le rat des douleurs neuropathiques chroniques induites dans la sclérose

en plaque. L'étude pharmacologique complète réalisée sur ce modèle a permis de mettre en évidence que chaque symptôme (allodynie, hyperalgésie mécanique ou thermique) rend compte de mécanismes distincts puisque l'efficacité des molécules testées diffère suivant le symptôme observé.

# **Characterisation of the sensory abnormalities observed in an animal model of multiple sclerosis: a behavioural and pharmacological study**

Karine Thibault, Bernard Calvino and Sophie Pezet

Laboratoire de Neurobiologie, CNRS UMR 7637, Ecole Supérieure de Physique et de Chimie Industrielles, 10 rue Vauquelin, 75005 Paris, France

Abbreviated title: chronic pain in multiple sclerosis

Key words: chronic pain, allodynia, hyperalgesia, sensory loss, demyelination

Number of text pages:

Number of figures: 9

Number of tables: 3

Number of supplementary figures:

Correspondence should be sent to:

Dr Sophie Pezet, UMR CNRS 7637, Ecole Supérieure de Physique et Chimie Industrielles, 10 rue Vauquelin, 75005 Paris, France.

Tel: (33) 1 40 79 51 83; Fax: (33) 1 40 79 47 57; e-mail: [sophie.pezet@espci.fr](mailto:sophie.pezet@espci.fr)

Acknowledgements: This work was supported by the 'Association pour la Recherche sur la Sclérose en plaque', ARSEP and the 'Centre National pour la Recherche Scientifique', CNRS. SP received a one-year postdoctoral fellowship from the ARSEP. Authors want to thank Grünenthal for kindly providing Tramadol for this study.

Authors want to thank Dr A. Saoudi (INSERM U563, Toulouse, France) for his helpful advice on EAE induction.

## **ABSTRACT**

Multiple sclerosis (MS) is a progressive neurodegenerative disease, affecting 2 millions persons worldwide. Among the symptoms associated with this disease, 50-90% of patients report persistent pain. While the type of pain that affects these patients is being more documented, the mechanisms underlying this pathology are still poorly understood and animal models of such chronic pain associated with MS is required. The aim of our study was to characterize the sensory abnormalities and in particular the symptoms linked to chronic pain in two models of Experimental Autoimmune Encephalomyelitis (EAE) in the rat. This behavioural characterization tested several sensory modalities such as mechanical and thermal (heat/cold) hyperalgesia or allodynia and explored some of these modalities on two different extremities: the hindpaws and the tail, where a previous study showed increased sensitivity in the mouse tail. Our study showed that while one of the model produced more robust motor impairment, animals of both models suffer from mechanical hyperalgesia and thermal allodynia to cold, both at the level of the tail and the hindpaws. While the time-course changes of some of these modalities are shifted in the time between the two models, they represent good models of the sensory abnormalities experienced by MS patients. The second part of our study aimed at characterizing from a pharmacological point of view the most robust model (“EAE + Cyclosporine”). This approach tested the curative effect of certain drugs given to MS patients to reduce some of these sensory abnormalities. We observed that Gabapentin and Tramadol had a beneficial effect on mechanical hyperalgesia, while Tramadol and Duloxetine had beneficial effects on the development of both Cold allodynia (hindpaws) and hyperalgesia (Tail). These results suggest that the model “EAE + Cyclosporine” in the rat is a good model of chronic sensory abnormalities observed in MS patients both from a behavioural and pharmacological point of view.

### **Abbreviations**

PI: post-inoculation

EAE: Experimental Autoimmune Encephalomyelitis

MS: Multiple sclerosis



## INTRODUCTION

Multiple sclerosis (MS) is a chronic inflammatory demyelinating disease of the human central nervous system. It is the most common invalidating disease in young adults and its progression can take several forms such as relapsing-remitting, primary progressive, secondary progressive or progressive-relapsing. In the relapsing-remitting form, each attack is characterized by a phase of demyelination and motor and sensory impairments. As the attack resumes, motor function is totally or partially restored, partially through mechanisms of remyelination. Among the symptoms affecting most MS patients, chronic pain is reported by 50 to 80 percent of patients, depending on the studies (see for review (O'Connor et al., 2008)). The types of chronic pain from MS sufferers have been described as central neuropathic pain (which includes dysesthetic extremity pain, Lhermitte's sign and trigeminal neuralgia), back pain, painful tonic spasms and headache. Depending on the type of persistent pain, these symptoms are treated using either acetaminophen, baclofen, diazepam to reduce spasticity, delta-9-tetrahydrocannabinol (THC) and see for review (O'Connor et al., 2008). Antidepressants and anticonvulsants (Attal et al., 2006; Dworkin et al., 2003; Finnerup et al., 2002; Finnerup et al., 2005) have been prescribed with some success for central neuropathic pain, as well as opioids analgesic, tramadol and serotonin and norepinephrine reuptake inhibitors (Dworkin et al., 2003; Finnerup et al., 2005).

In order to propose new therapeutical approaches in the treatment of pain associated with MS, models of pain associated with MS are required, as well as extended fundamental research on the mechanisms underlying this sustained pain. Several animal models of MS have been developed, both in rats and mice. These models share many of the pathological hallmarks of MS including motor deficits, demyelination and axonal damage of central nervous system (CNS) tissue. Yet, similar to MS, EAE models are heterogenous and influenced by the selective antigen used to develop them and while they are relevant for the study of T-cells mediated immune damage, it does not take into account the CD8 T cells damage observed in the human pathology (Friese et al., 2006).

Over the last three years, several studies examined changes in thermal heat hyperalgesia or mechanical hyperalgesia and showed that MS induced in mouse by the Theiler's mouse encephalomyelitis virus (Lynch et al., 2008) or experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) induced by myelin oligodendrocyte glycoprotein, or SJL mice induced by PLP 139-151. Despite some differences in the tests used, these studies showed that these models in mouse show sustained hyperalgesia before or after the onset of EAE, which was also observed in MS patients. Unfortunately these studies followed only few sensory abnormalities and not

always for a sustained period of time. In addition, none of them performed any pharmacological study on these sensory abnormalities. Our study aimed at studying changes in thermal and mechanical sensitivity in two animal models of EAE in the rat. One of these models was reported to have two onsets of motor impairment and may therefore be more clinically relevant to the human condition (Tanuma et al., 1999c). We chose to perform this study in rat rather than in mouse because richer behavioural studies can be performed in this species. Thermal sensitivity was tested for both cold and heat hyperalgesia and allodynia. In addition, following Aichers's study showing an increased sensitivity at the level of the tail (Aicher et al., 2004), compared to the hindpaws, sensitivity of both extremities were compared when possible. At last, the second part of our study examined from a pharmacological point of view the potential curative effect of some treatments prescribed to MS patients in the treatment of these neuropathic pain symptoms in the most aggressive model of EAE.

## **MATERIALS AND METHODS**

All experiments were carried out in accordance with the European Communities Council Directive of November 24 1986 (86/609/EEC), the guidelines on ethical standards for investigations of experimental pain in animals were followed (IASP, 1980) and were in accordance with the French “Ministère de l’Agriculture et de la Pêche” rules. Accordingly, the number of animals was kept to the minimum possible. Experiments were performed on 78 female Lewis rats (Janvier, Le Genest St Isle, France), weighing 150-175g at the beginning of the experiment. They were housed 3 to a large cage, to minimize the possibility of painful interactions. They were kept on solid floor cages with a deep layer of sawdust to allow the animals to hide and play in the sawdust. Cages were changed 3 times a week, after the behavioural testing. Animals were kept at a constant temperature of 22°C, with a 12h alternating light-dark cycle. Food and water were available *ad libitum*. When the animals showed reduced mobility, humidified food was made available on the floor of the cages. Animals were randomly chosen and tested by an experimenter blinded to the treatment.

### **Induction of EAE**

Two animal models of EAE in rats have been used in this study:

#### 1 – “Classical EAE model”

Animals were anaesthetized with 4% Isoflurane in oxygen. EAE was induced by a single injection in the flank of 100µl of a suspension made of : 1ml Complete Freund’s adjuvant (CFA, Sigma F5881), containing 4 mg of Mycobacterium butyricum (Difco Laboratory, USA) and 500 µg of MBP (Sigma M2295) dissolved in 0.1ml of saline. The suspension was performed by mixing the three compounds in a 5 ml glass syringe. The white suspension was then transferred in a plastic 1 ml syringe and kept for 1 hour at 4C, as previously described (Duplan et al., 2006).

#### 2 – The “EAE-Cyclosporine model”

In an attempt to compare the classical chronic-relapsing model of EAE characterized with one onset of motor disturbances with a more severe model of EAE characterized by two onsets of motor disturbances (Tanuma et al., 1999b), in the ‘EAE-cyclosporine’ model, animals were subjected to the same injections of CFA and MBP described above, but in addition, from the day of EAE induction, until the day 21 post induction, the animals received a subcutaneous injection of cyclosporine (4mg/kg), 3 times a week.

### **Clinical and behavioral studies**

### ***Habituation***

The animals were subjected to a two weeks habituation before induction of the EAE (experimental autoimmune encephalomyelitis). During this habituation, animals were habituated to the room, the experimenter, and increasingly to the different tests (rotarod, box for the measure of the locomotor activity or box for the Von Frey testing). In addition, they were habituated to be handled and kept without being restrained, but simply gently hold without stress on the lap of the experimenter (for the “Pinch test”) or on the chest of the experimenter (for the testing of hot/cold sensitivity at the level of the tail). After this habituation, animals were tested twice a week for the first part of the study (behavioural study on two different models of EAE) for 7 weeks post-inoculation, or once a week for 7 weeks for the second part of the study (the pharmacological study).

### ***Design of the behavioural study***

In the first part of our study, we studied the changes in many different sensory modalities in two different models of multiple sclerosis in rat. This study included the following number of animals in the different groups: n=6 saline, n=9 “EAE”, n=9 “EAE + Cyclo”,. These tests were performed 3 times a week in a particular sequence scored by an observer who was unaware of the treatment condition: 1- body weight, 2- actimetry, 3-rotarod, 4-cold hyperalgesia at the level of the tail, the animals were then placed for 30 min in the boxes for 4- electronic Von Frey on the hindpaws, 5- mechanical allodynia using the “brush test “, 6- mechanical hyperalgesia using the `Pinch test and 7- hot allodynia at the level of the tail.

In addition, once a week, the thermal allodynia and hyperalgesia to cold were determined at the level of the hindpaws, using the “Hot-Cold plate” from Bioseb, followed by the pinch test.

In the second part of the study (performed on 60 animals, i.e. 10 animals per group) the following tests were performed once a week in this sequence:

1- body weight, 2- actimetry, 3-rotarod, 4-cold hyperalgesia at the level of the tail, 5- hot allodynia at the level of the tail, 6- thermal allodynia to cold at the level of the hindpaws. The hot allodynia/hyperalgesia tests on the hindpaws and the “Pinch test” were performed once a week, on different day than the other tests.

Due to ethic considerations and the fact that motor disturbances are biasing the interpretation of the tests of mechanical and thermal sensitivities used in this study, animals that showed signs of motor disturbances (i.e. a EAE score superior or equal to 1), were tested for motor and exploratory behaviour, in addition to the clinical observation, but, were not subjected to all the other tests. Therefore, results presented in figures 1 to 4 show the results of animals

non paralyzed at the day of testing. For the pharmacological study, none of the animals were tested at day 15 PI for the same reasons.

NB: In order to provide a reproducible tail immersion (in hot allodynia and cold hyperalgesia testings), at the beginning of the experiment a mark was made using a permanent marker on the tail of all animals, at of 6cm of the tail, which constitute the line of tail immersion.

### ***Clinical assessment***

A clinical assessment was performed using a scale as previously described (Tanuma et al., 1999a), where 0 : no clinical signs, 1 : floppy tail, 2 : incomplete paralysis of hind legs, 3 : complete paralysis of hind legs, 4 : tetra paralysis, 5 : death resulting from EAE.

### ***Actimetry***

The actimetry (which reflects both the locomotor activity and the willingness of the animal to explore his environment) was determined using the 'Opto-Varimex' from Columbus Instruments (Columbus, Ohio, USA). The animal was placed for 10 minutes in a 45 cm X 22 cm box containing clean sawdust. The detectors around the box counted the number of times the animal crossed the laser beam. The result given by the apparatus is the number of laser interruption for 10 minutes.

### ***Rotarod***

The locomotor activity of the animals was evaluated using a rat Rotarod (Bioseb, France). The animal was placed on cylinders rotating at a low speed (4 rotations/min). Once the animal was with his four paws on the cylinder, the time spent by the animal on the cylinder, submitted to an acceleration of 4 rpm to 40 rpm in 5 minutes was evaluated.

### ***Cold hyperalgesia (Tail)***

Between the end of the previous test and this one, the animal was comforted for few minutes in the arms of the experimenter and while the animal did not notice, 6cm of the tail was immersed in ice cooled 2°C water. The time of tail redraw was measured once. A cut-off time of 1 minute was applied.

### ***Electronic Von Frey (hind paws)***

The animals were placed for 30 minutes in 20cm X 20cm Plexiglas boxes standing 20 cm above the bench. Animals were placed on the metallic grid which constituted the flooring of the box. An Electronic Von Frey hair unit (EVF-3, Bioseb, Chaville, France) was used: the sensitivity threshold is measured in one test, measurement ranging from 0 to 500 grams with a 0.2 gram accuracy. Punctuate stimulus was delivered to the mid-plantar area of each hind paw from below the mesh floor through a plastic spring tip and sensibility threshold result was

displayed on a screen. Paw sensitivity threshold was defined as the minimum pressure required eliciting a robust and immediate withdrawal reflex of the paw. Voluntary movement associated with locomotion was not taken as a withdrawal response. The stimulus was applied on each hind paw five times with a five seconds interval and the value adopted as a threshold for a rat was the average of the ten values measured. Mechanical allodynia was defined as a significant decrease in withdrawal thresholds to EVF-3 application. At least 2 minutes were allowed between two tests on the same animal.

***Dynamic mechanical allodynia (hind paws): the “paint-brush test”***

The dynamic mechanical allodynia observed in neuropathic patients was measured as developed in the laboratory and previously described (Thibault et al., 2008). While the animals were calmly seating in the testing box used in the previous test, a paint-brush was used to rub the plantar area of each hind paw from the heel to the toes as a stimulus. Two paint-brushes were used, one very smooth made of marten hairs and the other rough made of bristles pig, as previously described in (Thibault et al., 2008). The smooth paint-brush was firstly used then followed by the rough paint-brush. The stimulus was applied on each hind paw five times with a five seconds interval. Each stimulation give rise to a response that was scored 1. The lack of response was scored 0. The sum of the scores for the 5 stimulations was added, giving a total score between 0 and 5 for each hind paw.

***Heat Allodynia (tail)***

The animals were gently handled in the arms of the experimenter, without restrain and while the animal was not noticing, the tail was immersed in a water bath at 42°C. The time of tail lifting or redraw was measured once. A cut-off time of 1 minute was applied. A significant reduction of the time of tail redraw was considered as heat allodynia.

***Cold allodynia (hind paws)***

For the assessment of allodynia and hyperalgesia to a cold stimulus, the Cold Plate Analgesia Meter (Bioseb) was used. Five minutes after placing the animals individually in the transparent plastic cylinder (22cm diameter, 28cm high), temperature of the plate was decreased, driven by a computer, from 22°C (room temperature) to 0°C at a rate of 5°C/min. This slope was determined in preliminary experiments in order to have the opportunity to record easily with as small variations as possible the real thresholds at which an animal manifests particular behaviour. These behaviours were assessed at room temperature (22 ± 1°C) and scored by an observer who was unaware of the treatment condition. The temperature at which the animal showed a prototypic behavior was noted. These behaviors were the following:

- 1- Awareness: the animal stopped exploring or grooming and turned his head towards his hindpaws, examining the floor of the chamber. This behavior was observed for temperatures between 10°C and 13°C in control rats and was interpreted as an awareness of changes in cold perception.
- 2- Discomfort: the animal stopped moving and started placing his body weight on his toes, rather than on the full surface of his hindpaw. This behavior was considered as a reflection of the discomfort of the animal, but not yet a painful response, occurring at temperatures lower than 8°C in control rats.
- 3- Nociceptive response: the animal exhibits one of the following behaviours: licking or shaking one of his hindpaws or jumping. This behavior was considered as a nociceptive response, occurring at temperatures lower than 4°C in control rats.

#### ***Pinch test (hind paws)***

Rats were individually taken by experimenter and were held without restraint on the lap of the experimenter for 5 min. The threshold of static mechanical sensitivity was determined using the 'Pincher' (Bioseb, Chaville, France): the pressure applied with this calibrated forceps, (ranging from 0 to 800 grams) was measured by the apparatus. The mechanical stimulation was applied to the mid-plantar area of each hind paw. The paw sensitivity threshold was defined as the minimum pressure required eliciting a robust and immediate withdrawal reflex of the stimulated paw. Voluntary movement associated with locomotion was not taken as a withdrawal response. The stimulus was applied on each hind paw three times with a 2 minutes interval and the value adopted as a threshold for a rat was the average of the six values measured. Mechanical hyperalgesia was defined as a significant decrease in withdrawal thresholds to pincher application.

#### **Pharmacological study**

In order to fully characterize the chronic pain associated with EAE, we tested the ability of drugs known to relieve neuropathic pain (anticonvulsant: Gabapentin, antidepressant: Duloxetine), but also some other therapeutically approaches that are supposed to relieve neuropathic pain (Tramadol) or not (Acetaminophen).

This experiment included 6 groups of animals of n=10 animals in each group. Due to the high number of animals, the experiment was performed in two parts sequentially, each one including half of the animals from all groups. As previously mentioned in the 'design of the experiment', animals were received 2 weeks prior testing in the laboratory. Following 2

weeks of habituation EAE was induced as previously described. We chose the model with cyclosporine administration as it was the most robust model. Starting day 14 after EAE induction, rats received a daily intraperitoneal (i.p.) injection of either Acetaminophen (300 mg/kg, Sanofi Aventis, France), Duloxetine (30 mg/kg, Lilly, France), Tramadol (20 mg/kg Grünenthal, Aachen, Germany) and Gabapentin (45mg/kg, Pfizer) until the day 28 PI. Animals from the “saline” and “EAE” groups did not receive any intraperitoneal injections.

### **Statistical analysis**

All statistical analysis were performed using “Sigma Stat” software. In both parts of the study, statistical analysis of the results from the exploratory behavior, motor disturbances (Rotarod), heat allodynia, “Pinch test”, Electronic Von Frey and the Cold plate were analyzed using a Two-way ANOVA. Post-hoc tests were performed using students test. Statistical analysis of cold hyperalgesia (Tail) and the EAE score were performed using Kriskall Wallis. The post-hoc tests used were Man-Whitney.

\*P<0.05 “EAE + Cyclo” versus the “Saline” group; # P<0.05 “EAE + Cyclo” versus the “EAE” group; o P<0.05 “EAE” versus the “Saline” group.



## **Results**

### **1 - Sensory abnormalities associated with two different models of EAE**

#### ***Clinical signs associated with EAE***

In both model of EAE we observed that animals showed a chronic relapsing motor impairment. The EAE clinical score increased significantly from day post-inoculation (PI) 12 in both models, but it remained significantly increased for a much longer period of time only in the “EAE + Cyclo” model, where it is increased until day 16 PI (Figure 1A). In the “EAE” model, it is significantly increased only at days 12 and 13 PI.

Both models of EAE are associated with a reduction in weight gain from the days 14-15 PI until the day 30 PI (Figure 1B). At day 35 PI, animals had regained the average weight gain of the control group. Reduction in body weight was much more pronounced in the “EAE + Cyclo” group, compared with the “EAE” model. This phase of clinical changes was highlighted as a grey background in figures 1 to 4.

Analysis of motor disturbances using a rotarod showed that the model of “EAE + Cyclo” is associated with reduction in motor disturbances, from days PI 12 to 26 (Figure 1C). The exploratory behavior was also significantly reduced in animals of the “EAE + Cyclo” group from day 14 to 21 PI (Figure 1D). Animals of the “EAE” group on the other hand did not show any significant reduction of exploratory behavior or motor disturbances (Figure 1C-D).

#### ***Mechanical allodynia / hyperalgesia associated with EAE***

No statistically significant dynamic mechanical hyperaesthesia or allodynia could be observed in both models of EAE using the “Paint-brush test” (data not shown).

Variations in static mechanic sensitivity were tested for mechanical allodynia and mechanical hyperalgesia, using electronic Von Frey and the “Pinch test”, respectively. We observed that the animals from the “EAE + Cyclo” group developed mechanical allodynia after the emergence of their clinical signs (at days PI 21 and 26, Figure 2A). Animals of the “EAE” group showed a non-significant increased sensitivity. In addition, animals from both groups developed mechanical hyperalgesia after the emergence of clinical signs (from day 19 PI). Animals of the “EAE + Cyclo” group showed as well a mechanical hyperalgesia before the onset of clinical signs, i.e. at day 9 PI and five weeks after PI, i.e. at day 37 PI.

#### ***Changes in thermal sensitivity associated with EAE***

Analysis of heat allodynia at the level of the tail showed that animals of both models of EAE are more sensitive to water at 42C, a mechanism described as heat allodynia. This heat allodynia appeared before the onset of clinical signs (9 days PI, Figure 3A) and after most of the clinical signs have resumed (21 and 23 days PI, Figure 3A). Cold hyperalgesia at the level

of the tail was also observed in both models, but only before the onset of the clinical signs (9 days PI, Figure 3B).

Interestingly, while previous results of our study showed that animals of the “EAE” group were less clinically affected than animals of the “EAE + Cyclo” group, analysis of the temperature threshold at which animals displayed three typical behavior to cooling temperature at the level of the animal’s hind paws (awareness, discomfort and nociceptive response, Figure 4 A-C) showed that animals from both models of EAE had the same magnitude of cold allodynia and hyperalgesia. Cold allodynia started before and lasted during and after the onset of the clinical signs of EAE (Figure 4A), i.e. from days PI 8 to 35. Analysis in the changes of the threshold of “discomfort” showed higher amplitude of allodynia compared to the threshold of “attention”, but was observed later in the course of the disease, i.e. during and after the onset of clinical signs (Figure 4B). The time-course changes of this reduced threshold for “discomfort” appeared shifted between the two model of EAE compared as their pick of allodynia is at day 15 PI for the “EAE” model and at day 35 PI for the “EAE + Cyclo” model (Figure 4B). A reduced threshold for cold nociceptive stimulation was also noted in both models, but again with shifted time points: at day 15 PI for the “EAE” model and at day 35 PI for the “EAE + Cyclo” model (Figure 4C).

#### ***EAE-cyclosporine, a good model of chronic pain associated with multiple sclerosis: the pharmacological approach***

In order to fully characterize the chronic pain associated with EAE, we tested the ability of drugs known to relieve neuropathic pain (anticonvulsant: Gabapentin, antidepressant: Duloxetine), but also some other therapeutical approaches that are supposed to relieve neuropathic pain (Tramadol) or not (Acetaminophen). We observed that Gabapentin had a beneficial effect on mechanical hyperalgesia at days PI 21 and 28 and Duloxetine had a beneficial effect on mechanical hyperalgesia at day PI 28 only (Figure 5 A-B). On the other hand, Acetaminophen and Tramadol did not have any effect on the development of mechanical hyperalgesia (Figure 5 A-B). Cold hyperalgesia at the level of the tail was reduced but not significantly by Acetaminophen and Gabapentin 28 days PI (Figure 6A). Duloxetine and Tramadol on the other hand produced a potent anti-nociceptive effect on cold hyperalgesia (Figure 6B). At day 21, Duloxetine produced even hypalgesia, indeed we showed a significantly increase of withdrawal threshold compare to control rats.

Cold allodynia observed at the level of the hindpaws using the “awareness” threshold was reduced significantly by only partially both by Duloxetine and Tramadol at 21 and 35 days PI (Figure 7 B). Acetaminophen and Gabapentin did not have any effect on cold allodynia

(“awareness” threshold, Figure 7 A). Results collected for the “discomfort” threshold, which is a slightly different threshold than the previous one in term of behaviour, showed that none of the drugs used were able to reduce the cold allodynia measured with this threshold (Figure 8 A-B). Cold hyperalgesia at the level of the hindpaws was not reduced by any of the drugs tested (Figure 9 A-B).

## **Discussion**

Our study aimed at characterizing and comparing the time-course changes of motor and sensory disturbances in two models of EAE in the rat. We observed the emergence of symptoms of neuropathic pain in these models, with differences in the time-course and the gravity of these symptoms between the two models and suggest that these models in the rat are good translational models of chronic pain observed in MS patients, both from a behavioural and pharmacological point of view.

### ***Multiple sclerosis and chronic pain versus chronic pain in EAE***

In MS, the types of chronic pain have been described as central neuropathic pain, back pain, painful tonic spasms and headache (O'Connor et al., 2008). Because of the lack of behavioural approaches to evaluate backpain, painful spasms or headache in animal models of MS, these types of pain could not be studied. Therefore, the only type of pain that can be studied in animal models is central neuropathic pain. Central neuropathic pain includes dysesthetic extremity pain, Lhermitte's sign and trigeminal neuralgia. While trigeminal neuralgia could be studied in animal models of MS, this pathology has never been studied so far. Our and previous studies on pain associated to MS (Aicher et al., 2004; Sloane et al., 2009; Rodrigues et al., 2009; Lynch et al., 2008; Olechowski et al., 2009) have only investigated extremity pain. This form of pain is observed in 23% of patients, when the pain is experienced at some point in the course of their disease (Osterberg et al., 2005). These pain symptoms are bilateral, experienced in extremities, are more frequent in feet than hand (Osterberg and Boivie, 2009; Hansen et al., 1996; Osterberg et al., 2005) and are elicited by both thermal and mechanical innocuous stimuli (Osterberg and Boivie, 2009). MS patients who are suffering from central pain have abnormal thresholds to thermal and mechanical innocuous and noxious stimulations. Abnormal mechanical sensitivity includes numbness, hypoesthesia, hyperesthesia and allodynia (Svendsen et al., 2005; Osterberg and Boivie, 2009). Cold allodynia has been reported as the most common painful symptom associated with central neuropathic pain (Svendsen et al., 2005; Osterberg and Boivie, 2009).

Tables 1-3 compare the signs of neuropathic pain reported in MS patients and in animal models. It shows that most symptoms experienced in MS patients are also observed in these animal models of MS. For instance, cold allodynia which is very commonly observed in MS patients, was observed in a mice model of EAE using the acetone test (Olechowski et al., 2009) and was also observed in our study in both models of EAE using the "cold plate". This former test produced important information on alteration of different levels of sensory integration in EAE. The two first behaviours, i.e "awareness" and "discomfort" take into

account spinal and supra-spinal responses of the animal. On the other hand, the highest threshold, that we called the “nociceptive response” is due to a spinal response because it is a fast withdrawal response at high intensity stimuli. These three prototypic behaviours are the cold thermal homologue of the behavioural scales of the ‘Carroll and Lim’ test (Carroll and LIM, 1960).

Among the other clinical relevant symptoms observed in common between MS patients and EAE models were and mechanical hyperalgesia, hyperaesthesia and allodynia. In addition, as observed in MS patients, two animal studies ((Aicher et al., 2004) and our) showed that painful perception is not equivalent in the tail or in the hindpaws of the animals. As previously mentioned, in MS patients, lower extremities are more affected than higher one {Osterberg, 2009 98 /id}. A very striking observation was the fact that some of these chronic pain symptoms were observed before the any signs of neurological dysfunction. In MS patients, pain is sometimes the first symptom of the disease or starts being a major symptom at the onset of the disease (Osterberg et al., 2005). In conclusion, even if EAE models do not possess all the pathophysiological features of MS, they represent good models of the chronic pain experienced in MS patients.

#### ***Chronic pain associated with the” EAE” and “EAE + Cyclo” models***

Between the two models of EAE that we compared in this study, the model “EAE + Cyclo” was the most severe of the two, in terms of clinical alterations, including motor disturbances, reduced body weight gain and exploratory behaviour. The “EAE” model produced a much milder reduction of body weight and a large variation in the incidence of clinical signs observed between animals. Interestingly, most neuropathic pain symptoms which reflect spinal responses of the animals (mechanical hyperalgesia, hyperaesthesia and cold hyperalgesia) were strongly present in the robust model and almost absent in the mildest, i.e. the “EAE” model. However, when considering tests involving both supraspinal and spinal components, such as cold allodynia, a strong, homogeneous and sustained effect was observed in both models of EAE, with the same severity. These results suggest that mechanisms that evoke mechanical hyperalgesia, hyperaesthesia and cold allodynia may be different from both mechanistic and anatomic points of view.

#### ***Potential mechanisms involved in chronic pain associated with EAE***

Due to the similarity in the clinical signs of neuropathic pain between the EAE models and MS, it is tempting to conclude that, as observed in MS patients, chronic neuropathic pain in EAE might be a form of ‘central neuropathic pain’. However, such a definition can only be given if the presence of peripheral neuropathy has been excluded. Lesion of peripheral nerves

have indeed already been observed in the past in many EAE models (Pender et al., 1989;Pender and Sears, 1986;Pender and Sears, 1985), as well as reduction in nerve conduction velocity (Pender, 1988a;Pender, 1988b). As a consequence, chronic neuropathic pain observed in EAE is likely to be due to a combination of peripheral and central mechanisms.

The proposed current hypothesis to explain central neuropathic pain patients is lesion of the spinothalamic tract by focal lesions (Osterberg and Boivie, 2009). In animal models, the spinal cord is the site of extended inflammation (Pender et al., 1989), glial activation (Olechowski et al., 2009;Cammer et al., 1989) and demyelination (Pender et al., 1989) and are likely to play a role in the spinal hypersensitivity and reduction in motor performances. Spinal activation of astrocytes and microglia have been showed to be a key element in the development of peripheral neuropathic pain (Milligan and Watkins, 2009;Inoue and Tsuda, 2009), through the activation of specific intracellular signalling pathways (Ji and Strichartz, 2004;Suter et al., 2007), cytokines, chemokines (McMahon et al., 2005;Abbadie, 2005;White et al., 2007), receptors (Ulmann et al., 2008), aggravating trophic factors (BDNF) and change in chloride ion inversion potential, leading to neuronal hyperexcitability (Coull et al., 2005;Coull et al., 2003;Cramer et al., 2008). Our hypothesis is that reduction in withdrawal thresholds that we observed before the development of neurological dysfunction could be due to this spinal sensitization. On the other hand, during the phase of neurological deficit, the hypersensitivity of animals had resumed for the behaviours involving spinal nociceptive reflexes, such as mechanical hyperalgesia and hyperaesthesia, heat allodynia or cold hyperalgesia. Our hypothesis is that this loss of sensitivity is due to the peripheral and central demyelination that starts and further increases during this phase (Pender et al., 1989). However, during the same period, animals showed an increased sensitivity to cold (measured by the “awareness” and “discomfort” threshold). Because these two behaviours involve spinal and supraspinal components, our hypothesis is that this phase is mostly a phase of central neuropathic pain. Finally, at the recovery from these motor impairments, a partial remyelination of the peripheral nerve and the dorsal roots takes place and the spinal cord is still the site of inflammation and glial activation (Olechowski et al., 2009). These mechanisms as well as the up-regulation of sodium channels are the possible mechanisms underlying the chronic pain symptoms observed around day 19 PI. (Waxman et al., 2004). In conclusion, this model seems to be a combination of peripheral and central neuropathy as observed in MS patients.

### ***Pharmacological validation of the chronic pain associated with EAE***

Gabapentin, tricyclic antidepressant and opioid analgesic have each been recommended for the treatment of central and peripheral neuropathic pain. Our study showed that gabapentin, duloxetine or tramadol treatment relieve behavioural symptoms observed in EAE + Cyclo animals. These results confirmed that EAE + cyclo represent good model of the chronic neuropathic pain experienced in MS patients. Interestingly, the drugs tested were given after the emergence of clinical signs and they were not disease affecting molecules. The curative effect we observed may therefore give us some clues on the mechanisms underlying the development of neuropathic pain symptoms.

Moreover, we showed that Gabapentin treatment is benefic on mechanical hyperalgesia during all pharmacological treatment period. The mechanism of action of the antiepileptic and antineuropathic drugs of the gabapentinoid family has long been a mystery. Recent study showed that Gabapentin inhibits calcium currents, by disturbing the trafficking of  $\alpha(2)\delta-2$  and  $Ca(V)2$  channels (Hendrich et al., 2008). The benefic action of Gabapentin in our model suggests a dysregulation of calcium channel expression and/or trafficking of these channels to the plasma membrane in small diameters fibres, involved in the response of intense mechanical stimulus. It is interesting to note that this benefic effect is reversible if the treatment is stopped (J28 versus J35).

We showed that Duloxetine and Tramadol treatment were benefic on cold allodynia during all chronic phase of the disease. Tramadol has dual mechanisms of action by which analgesia may be achieved:  $\mu$ -opioid receptor activation and enhancement of serotonin and norepinephrine transmission. Duloxetine is also a serotonin–norepinephrine reuptake inhibitor. By increasing serotonin and norepinephrine neurotransmission, Tramadol and Duloxetine have the same effect on cold allodynia induced by EAE. We can thus hypothesize that animals presents serotonin/norepinephrine syndrome at the origin of cold allodynia relieved by chronic treatment of Tramadol or Duloxetine. Beneficial effects of these molecules, which persist during all the course of the disease, suggest long term effects.

Finally, we showed that Duloxetine and Tramadol treatments relieved cold hyperalgesia on the tail region. In the same way of cold allodynia this beneficial effects persist during all chronic period, suggest also long term effect of these molecule. It is interesting to note that Tramadol have antinociceptif effect at the end of pharmacological treatment. Indeed, at day 21, withdrawal threshold of Tramadol treated rats is significantly different of withdrawal threshold of control rats. This effect, not observed in Duloxetine treated rats, might be due to

$\mu$ -opioid receptor activation expressed on A $\delta$ -fibres involved in the response of thermal stimulus.



## Figure Legend

**Figure 1:** Comparison of the changes in clinical score (A), body weight gain (B), motor performance (C) and actimetry (D) in two models of Experimental Autoimmune Encephalomyelitis (EAE) in the rat. Both models “EAE”, “EAE + Cyclo” are characterized by clinical impairment (A), reduced body weight gain (B), motor (C) and locomotor activity (D). This phase of clinical impairment is highlighted by a grey background. Results are expressed as mean +/- SEM. N=6 saline, n=9 “EAE”, n=9 “EAE + Cyclo”, Statistical test A: Kriskal Wallis. Post-hoc tests: Man-Whitney; B-D: Two-Way ANOVA. Post-hoc tests: Student test. \*P<0.05 “EAE + Cyclo” versus the “Saline” group; # P<0.05 “EAE + Cyclo” versus the “EAE” group; o P<0.05 “EAE” versus the “Saline” group; + P<0.05 in the results of the group “EAE + Cyclo” at the time points indicated.

**Figure 2:** Time-course of mechanical allodynia and hyperalgesia at the level of the hindpaws in two models of EAE in the rat. A: threshold of mechanical allodynia measured using electronic Von Frey. A statistically significant mechanical allodynia is observed only in the “EAE + Cyclo” model at days PI 21 and 26. B: Changes in mechanical hyperalgesia measured by the “Pinch Test”. Results are expressed as variations of mechanical sensitivity compared to JO (the day of EAE induction). The phase of clinical impairment is highlighted by a grey background. Mechanical hyperalgesia is observed before and after the emergence of clinical signs of EAE mostly in the “EAE + Cyclo” model, and with at a smaller extent in the “EAE” model. Results are expressed as mean +/- SEM. N=6 saline, n=9 “EAE”, n=9 “EAE + Cyclo”, Statistical test Two-Way ANOVA. Post-hoc tests: Student test.\*P<0.05 “EAE + Cyclo” versus the “Saline” group; # P<0.05 “EAE + Cyclo” versus the “EAE” group; o P<0.05 “EAE” versus the “Saline” group; + P<0.05 in the results of the group “EAE + Cyclo” at the time points indicated.

**Figure 3:** Time-course of heat/cold sensitivity at the level of the tail in two models of EAE in the rat. A: Time of tail redrawing following Tail immersion in water bath at 42°C. Animals of both the “EAE + Cyclo” and the “EAE” groups suffer from heat allodynia before the onset of clinical signs (9 days PI, Figure 3A) and after most of these signs have resumed (21 and 23 days PI, Figure 3A). B: time-course of cold hyperalgesia at the levels of the tail. Results show the time of tail withdrawal following immersion in ice cooled water at +2°C. The phase of clinical impairment is highlighted by a grey background. Animals of both the “EAE + Cyclo” and the “EAE” groups display cold hyperalgesia before the onset of the clinical signs (9 days PI, Figure 3B). Results are expressed as mean +/- SEM. N=6 saline, n=9 “EAE”, n=9 “EAE + Cyclo”, Statistical test A: Two-Way ANOVA. Post-hoc tests: Student test. B: Kriskal Wallis.

Post-hoc tests: Man-Whitney \* $P < 0.05$  “EAE + Cyclo” versus the “Saline” group; #  $P < 0.05$  “EAE + Cyclo” versus the “EAE” group; o  $P < 0.05$  “EAE” versus the “Saline” group; +  $P < 0.05$  in the results of the group “EAE + Cyclo” at the time points indicated.

**Figure 4:** Time-course of cold sensitivity at the level of the hind paws in two models of EAE in the rat. Using the cold plate (Bioseb), temperature of the plate was decreased, from 22°C to 0°C at a rate of 5°C/min. The temperature at which the animal showed a prototypic behavior was noted. These behaviours were the following. A: Awareness: the animal stopped exploring or grooming and turned his head towards his hindpaws, examining the floor of the chamber. B: Discomfort: the animal stopped moving and started placing his body weight on his toes, rather than on the full surface of his hindpaws. C: Nociceptive response: the animal exhibits one of the following behaviour: licking or shaking one of his hindpaws or jumping. Results presented show the (mean +/- SEM) threshold in (C) and show that animals of both models of EAE have threshold at higher temperatures than the control group (Saline), suggesting that they suffer from cold allodynia before, during and after the onset of the clinical signs of EAE (Figure 4A, B), i.e. from days PI 8 to 35. In addition, animals from both models displayed a cold hyperalgesia. While this cold hyperalgesia was observed during the clinical signs of the disease for the “EAE” model animals (Figure 4C), it occurred later, after the recovery of the animals in the “EAE + Cyclo” animals (Figure 4C). The phase of clinical impairment is highlighted by a grey background. Results are expressed as mean +/- SEM. N=6 saline, n=9 “EAE”, n=9 “EAE + Cyclo”, Statistical test Two-Way ANOVA. Post-hoc tests: Student test. \* $P < 0.05$  “EAE + Cyclo” versus the “Saline” group; #  $P < 0.05$  “EAE + Cyclo” versus the “EAE” group; o  $P < 0.05$  “EAE” versus the “Saline” group; +  $P < 0.05$  in the results of the group “EAE + Cyclo” at the time points indicated; §§  $P < 0.001$  results of the group “EAE” at the time points indicated.

**Figure 5:** Time-course study of the potential curative effect of Acetaminophen, Gabapentin, Duloxetine and Tramadol on the mechanical hyperalgesia observed in the model “EAE + Cyclo”. From days PI 14 to 28, animals received a daily intraperitoneal injection of Acetaminophen, Gabapentin, Duloxetine and Tramadol. Results are expressed as mean +/- SEM of the variations in mechanical threshold (g) compared to the individual value at J0 (day of EAE induction). Results show that Gabapentin and the Duloxetine had beneficial effects on mechanical hyperalgesia at days PI 21 and 28. On the other hand, Acetaminophen and Tramadol did not have any effect. Results of the groups “Saline” and “EAE” are the same in A and B. Results of the 6 groups included in this pharmacological study are displayed in two graphs to improve the clarity of the results. Results are expressed as mean +/- SEM. N=10

animals in each group, Statistical test Two-Way ANOVA. Post-hoc tests: Student test. \*P<0.05 versus the “Saline” group; o P<0.05 versus the “EAE” group; ooo P<0.001 versus the “EAE” group; + P<0.05 in the results of the group “EAE” at the time points indicated.

**Figure 6:** Time-course of the potential curative effect of Acetaminophen, Gabapentin, Doluxetin and Tramadol on the thermal hyperalgesia at the level of the tail observed in the model “EAE + Cyclo”. Acetaminophen and Gabapentin did not produce any effect. On the other hand, Duloxetine and Tramadol produced a strong anti-nociceptive effect 21 and 35 days PI. Results of the 6 groups included in this pharmacological study are displayed in two graphs to improve the clarity of the results. Results are expressed as mean +/- SEM. N=10 animals in each group, Statistical test Two-Way ANOVA. Post-hoc tests: Student test. \*P<0.05 versus the “Saline” group; o P<0.05 versus the “EAE” group; ooo P<0.001 versus the “EAE” group.

**Figure 7:** Time-course of the pharmacological effect of Acetaminophen, Gabapentin, Doluxetin and Tramadol on thermal allodynia, using the “awareness threshold”. Only Duloxetine and TRamadol produced a significant reduction of thermal allodynia (7B). Results of the 6 groups included in this pharmacological study are displayed in two graphs to improve the clarity of the results. Results are expressed as mean +/- SEM. N=10 animals in each group, Statistical test Two-Way ANOVA. Post-hoc tests: Student test.\*P<0.05 versus the “Saline” group; o P<0.05 versus the “EAE” group; oo P<0.01 versus the “EAE” group.

**Figure 8:** Time-course of the pharmacological effect of Acetaminophen, Gabapentin, Doluxetin and Tramadol on cold allodynia at the level of the hindpaws, using the “discomfort threshold”.

None of these drugs reduced significantly this behavior. Results of the 6 groups included in this pharmacological study are displayed in two graphs to improve the clarity of the results. Results are expressed as mean +/- SEM. N=10 animals in each group, Statistical test: Two-Way ANOVA. Post-hoc tests: Student test. \*P<0.05 versus the “Saline” group; +++ P<0.001 in the results of the group “EAE” at the time points indicated.

**Figure 9:** Time-course of the pharmacological effect of Acetaminophen, Gabapentin, Doluxetin and Tramadol on thermal allodynia, using the threshold of “nociceptive responses”. None of these drugs reduced significantly this behavior. Results of the 6 groups included in this pharmacological study are displayed in two graphs to improve the clarity of the results. Results are expressed as mean +/- SEM. N=10 animals in each group, Statistical test: Two-

Way ANOVA. Post-hoc tests: Student test. \* $P < 0.05$  versus the “Saline” group; +++  $P < 0.001$  in the results of the group “EAE” at the time points indicated.

**Table 1:** Summary of the studies reporting changes in mechanical sensitivity associated with MS or in animal models of MS.

**Table 2:** Summary of the studies reporting changes in thermal heat sensitivity associated with MS or in animal models of MS.

**Table 3:** Summary of the studies reporting changes in thermal cold sensitivity associated with MS or in animal models of MS.

## Reference List

- Abbadie C (2005) Chemokines, chemokine receptors and pain. *Trends Immunol* 26:529-534.
- Aicher SA, Silverman MB, Winkler CW, Bebo BF, Jr. (2004) Hyperalgesia in an animal model of multiple sclerosis. *Pain* 110:560-570.
- Attal N, Cruccu G, Haanpaa M, Hansson P, Jensen TS, Nurmikko T, Sampaio C, Sindrup S, Wiffen P (2006) EFNS guidelines on pharmacological treatment of neuropathic pain. *Eur J Neurol* 13:1153-1169.
- Cammer W, Tansey FA, Brosnan CF (1989) Gliosis in the spinal cords of rats with experimental allergic encephalomyelitis: immunostaining of carbonic anhydrase and vimentin in reactive astrocytes. *Glia* 2:223-230.
- Carroll M, LIM RK (1960) Observations on the neuropharmacology of morphine and morphinelike analgesia. *Arch Int Pharmacodyn Ther* 125:383-403.
- Coull JA, Beggs S, Boudreau D, Boivin D, Tsuda M, Inoue K, Gravel C, Salter MW, De KY (2005) BDNF from microglia causes the shift in neuronal anion gradient underlying neuropathic pain. *Nature* 438:1017-1021.
- Coull JA, Boudreau D, Bachand K, Prescott SA, Nault F, Sik A, De KP, De KY (2003) Trans-synaptic shift in anion gradient in spinal lamina I neurons as a mechanism of neuropathic pain. *Nature* 424:938-942.
- Cramer SW, Baggott C, Cain J, Tilghman J, Allcock B, Miranpuri G, Rajpal S, Sun D, Resnick D (2008) The role of cation-dependent chloride transporters in neuropathic pain following spinal cord injury. *Mol Pain* 4:36.
- Duplan V, Bériou G, Heslan JM, Bruand C, Dutartre P, Mars LT, Liblau RS, Cuturi MC, Saoudi A (2006) LF 15-0195 treatment protects against central nervous system autoimmunity by favoring the development of Foxp3-expressing regulatory CD4 T cells. *J Immunol* 176:839-847.
- Dworkin RH, et al. (2003) Advances in neuropathic pain: diagnosis, mechanisms, and treatment recommendations. *Arch Neurol* 60:1524-1534.
- Finnerup NB, Gottrup H, Jensen TS (2002) Anticonvulsants in central pain. *Expert Opin Pharmacother* 3:1411-1420.
- Finnerup NB, Otto M, McQuay HJ, Jensen TS, Sindrup SH (2005) Algorithm for neuropathic pain treatment: an evidence based proposal. *Pain* 118:289-305.
- Friese MA, Montalban X, Willcox N, Bell JI, Martin R, Fugger L (2006) The value of animal models for drug development in multiple sclerosis. *Brain* 129:1940-1952.

- Hansen C, Hopf HC, Treede RD (1996) Paradoxical heat sensation in patients with multiple sclerosis. Evidence for a supraspinal integration of temperature sensation. *Brain* 119 ( Pt 5):1729-1736.
- Hendrich J, Van Minh AT, Heblich F, Nieto-Rostro M, Watschinger K, Striessnig J, Wratten J, Davies A, Dolphin AC (2008) Pharmacological disruption of calcium channel trafficking by the alpha2delta ligand gabapentin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105:3628-3633.
- Inoue K, Tsuda M (2009) Microglia and neuropathic pain. *Glia*.
- Ji RR, Strichartz G (2004) Cell signaling and the genesis of neuropathic pain. *Sci STKE* 2004:reE14.
- Lynch JL, Gallus NJ, Ericson ME, Beitz AJ (2008) Analysis of nociception, sex and peripheral nerve innervation in the TMEV animal model of multiple sclerosis. *Pain* 136:293-304.
- McMahon SB, Cafferty WB, Marchand F (2005) Immune and glial cell factors as pain mediators and modulators. *Exp Neurol* 192:444-462.
- Milligan ED, Watkins LR (2009) Pathological and protective roles of glia in chronic pain. *Nat Rev Neurosci* 10:23-36.
- O'Connor AB, Schwid SR, Herrmann DN, Markman JD, Dworkin RH (2008) Pain associated with multiple sclerosis: systematic review and proposed classification. *Pain* 137:96-111.
- Olechowski CJ, Truong JJ, Kerr BJ (2009) Neuropathic pain behaviours in a chronic-relapsing model of experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE). *Pain* 141:156-164.
- Osterberg A, Boivie J (2009) Central pain in multiple sclerosis - Sensory abnormalities. *Eur J Pain*.
- Osterberg A, Boivie J, Thuomas KA (2005) Central pain in multiple sclerosis--prevalence and clinical characteristics. *Eur J Pain* 9:531-542.
- Pender MP (1988a) The pathophysiology of myelin basic protein-induced acute experimental allergic encephalomyelitis in the Lewis rat. *J Neurol Sci* 86:277-289.
- Pender MP (1988b) The pathophysiology of acute experimental allergic encephalomyelitis induced by whole spinal cord in the Lewis rat. *J Neurol Sci* 84:209-222.
- Pender MP, Nguyen KB, Willenborg DO (1989) Demyelination and early remyelination in experimental allergic encephalomyelitis passively transferred with myelin basic protein-sensitized lymphocytes in the Lewis rat. *J Neuroimmunol* 25:125-142.
- Pender MP, Sears TA (1986) Involvement of the dorsal root ganglion in acute experimental allergic encephalomyelitis in the Lewis rat. A histological and electrophysiological study. *J Neurol Sci* 72:231-242.
- Pender MP, Sears TA (1985) Vulnerability of the dorsal root ganglion in experimental allergic encephalomyelitis. *Clin Exp Neurol* 21:211-223.

- Rodrigues DH, Sachs D, Teixeira AL (2009) Mechanical hypernociception in experimental autoimmune encephalomyelitis. *Arq Neuropsiquiatr* 67:78-81.
- Sloane E, Ledebor A, Seibert W, Coats B, van SM, Maier SF, Johnson KW, Chavez R, Watkins LR, Leinwand L, Milligan ED, Van Dam AM (2009) Anti-inflammatory cytokine gene therapy decreases sensory and motor dysfunction in experimental Multiple Sclerosis: MOG-EAE behavioral and anatomical symptom treatment with cytokine gene therapy. *Brain Behav Immun* 23:92-100.
- Suter MR, Wen YR, Decosterd I, Ji RR (2007) Do glial cells control pain? *Neuron Glia Biol* 3:255-268.
- Svendsen KB, Jensen TS, Hansen HJ, Bach FW (2005) Sensory function and quality of life in patients with multiple sclerosis and pain. *Pain* 114:473-481.
- Tanuma N, Shin T, Kogure K, Matsumoto Y (1999a) Differential role of TNF-alpha and IFN-gamma in the brain of rats with chronic relapsing autoimmune encephalomyelitis. *J Neuroimmunol* 96:73-79.
- Tanuma N, Shin T, Kogure K, Matsumoto Y (1999b) Differential role of TNF-alpha and IFN-gamma in the brain of rats with chronic relapsing autoimmune encephalomyelitis. *J Neuroimmunol* 96:73-79.
- Tanuma N, Shin T, Kogure K, Matsumoto Y (1999c) Differential role of TNF-alpha and IFN-gamma in the brain of rats with chronic relapsing autoimmune encephalomyelitis. *J Neuroimmunol* 96:73-79.
- Thibault K, Elisabeth B, Sophie D, Claude FZ, Bernard R, Bernard C (2008) Antinociceptive and anti-allodynic effects of oral PL37, a complete inhibitor of enkephalin-catabolizing enzymes, in a rat model of peripheral neuropathic pain induced by vincristine. *Eur J Pharmacol* 600:71-77.
- Ulmann L, Hatcher JP, Hughes JP, Chaumont S, Green PJ, Conquet F, Buell GN, Reeve AJ, Chessell IP, Rassendren F (2008) Up-regulation of P2X4 receptors in spinal microglia after peripheral nerve injury mediates BDNF release and neuropathic pain. *J Neurosci* 28:11263-11268.
- Waxman SG, Craner MJ, Black JA (2004) Na<sup>+</sup> channel expression along axons in multiple sclerosis and its models. *Trends Pharmacol Sci* 25:584-591.
- White FA, Jung H, Miller RJ (2007) Chemokines and the pathophysiology of neuropathic pain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104:20151-20158.

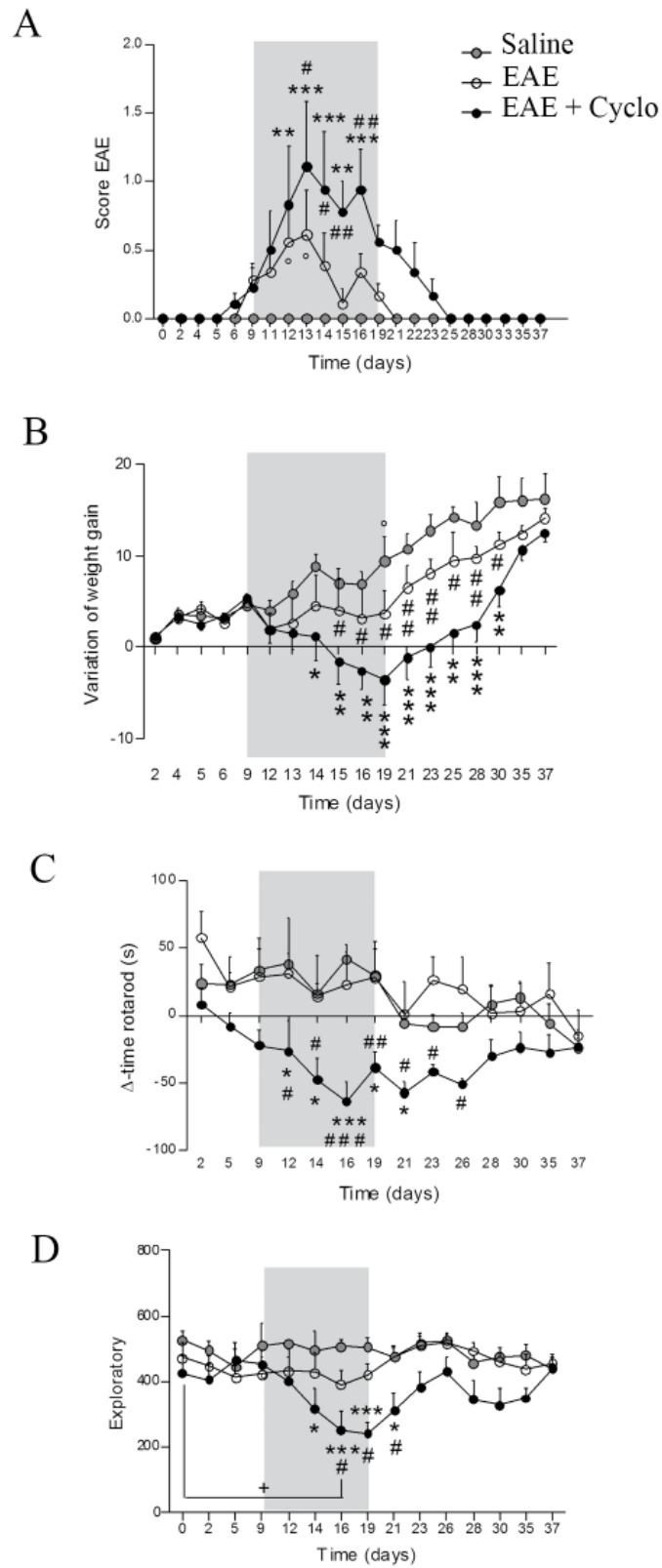


Figure 1



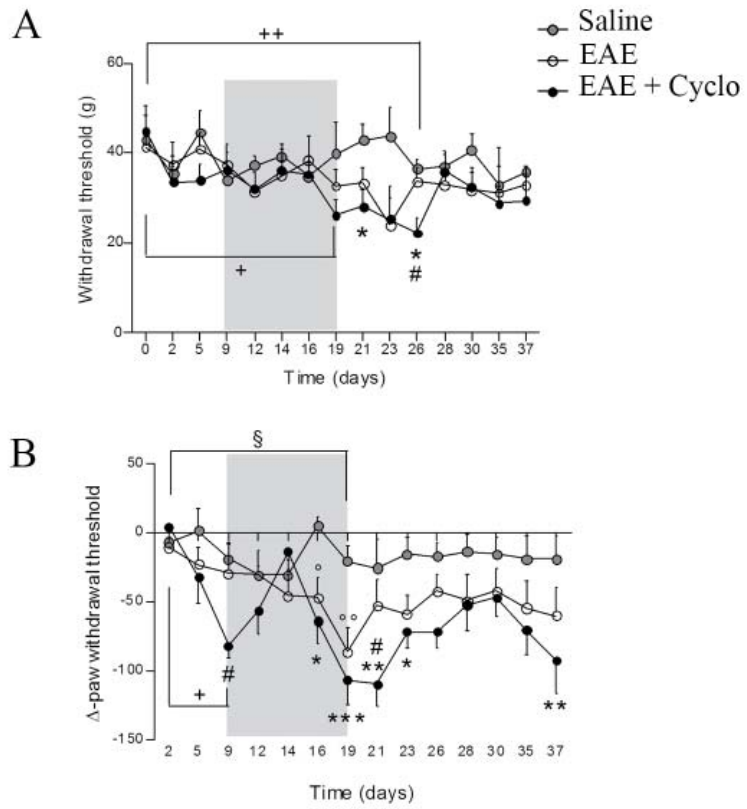


Figure 2

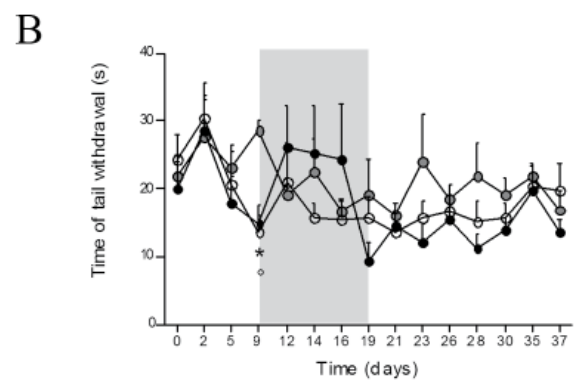
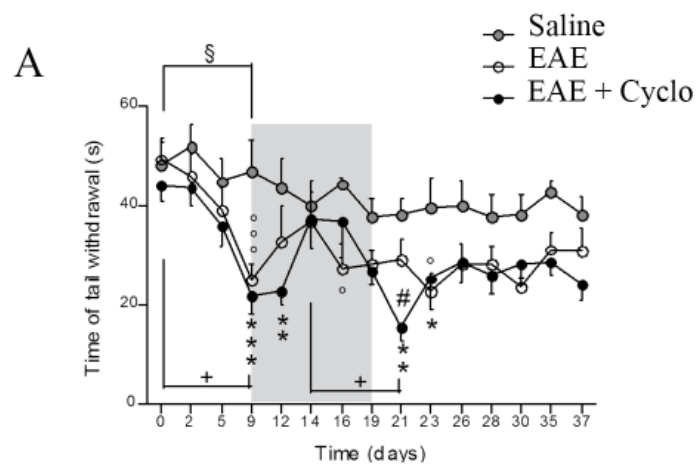


Figure 3

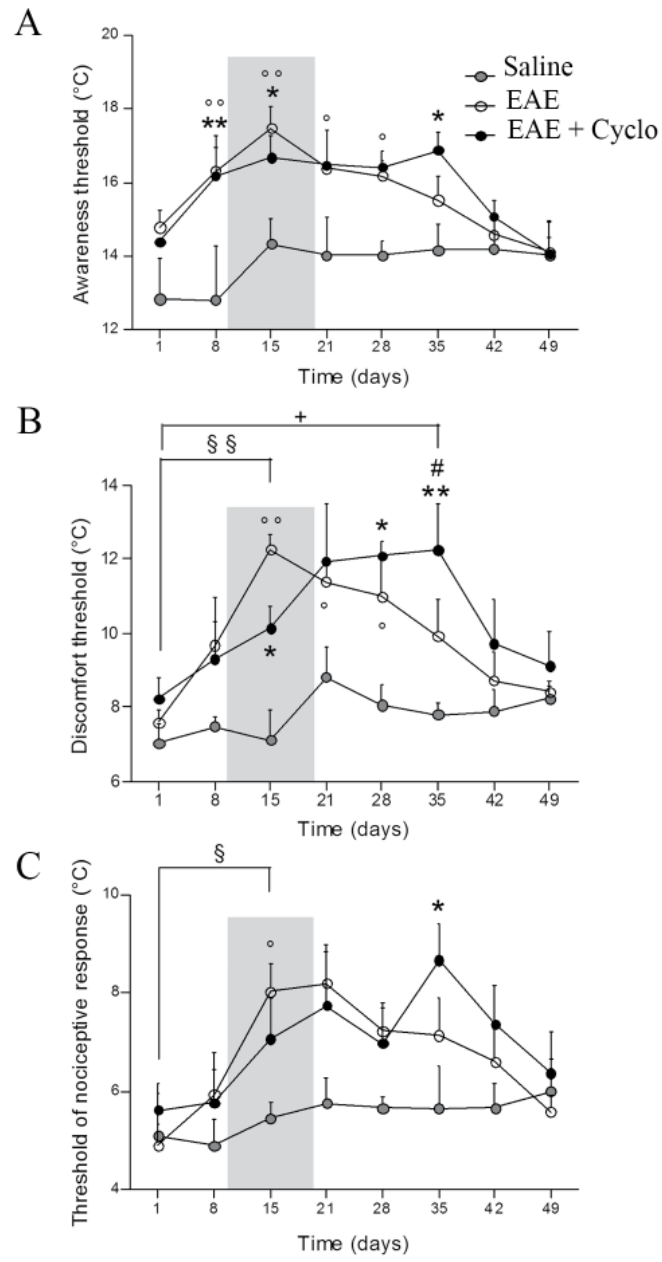


Figure 4

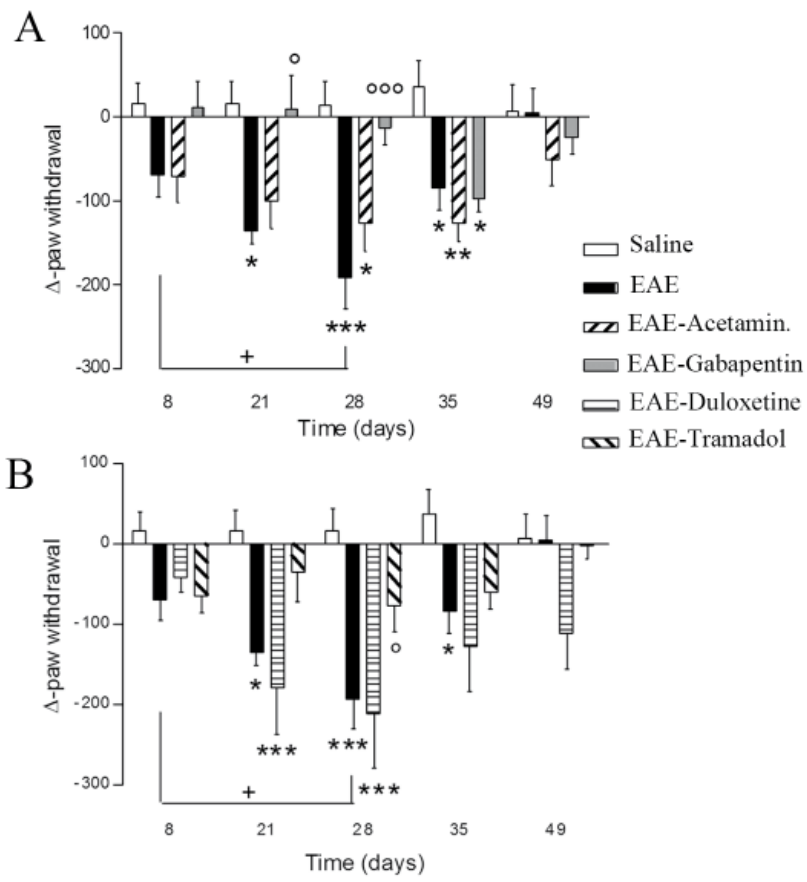


Figure 5

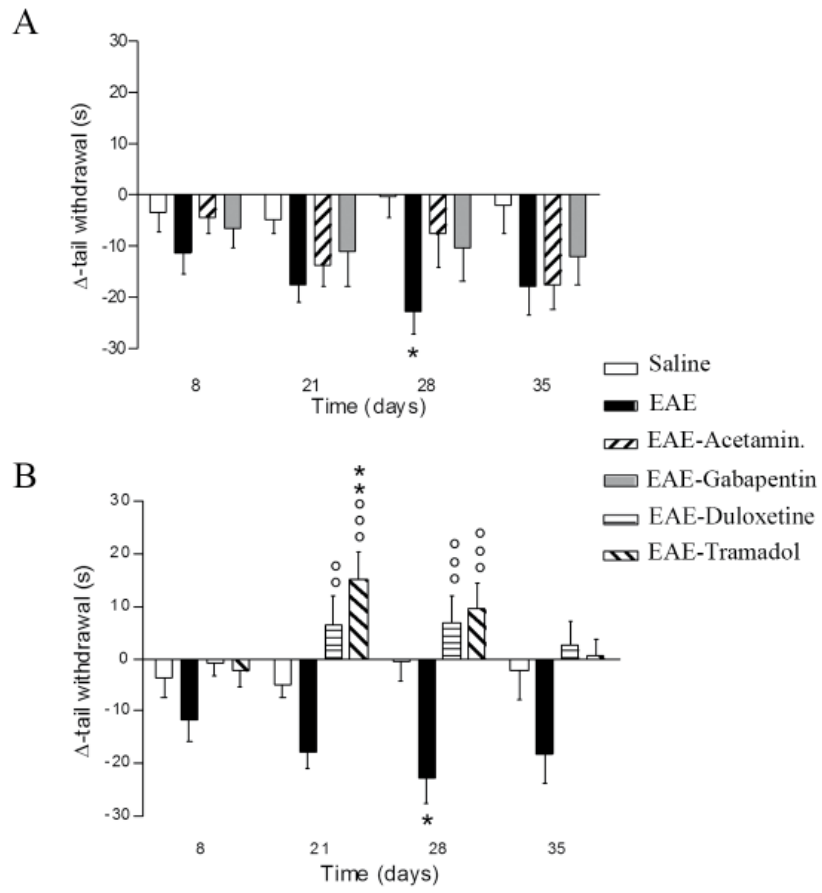


Figure 6

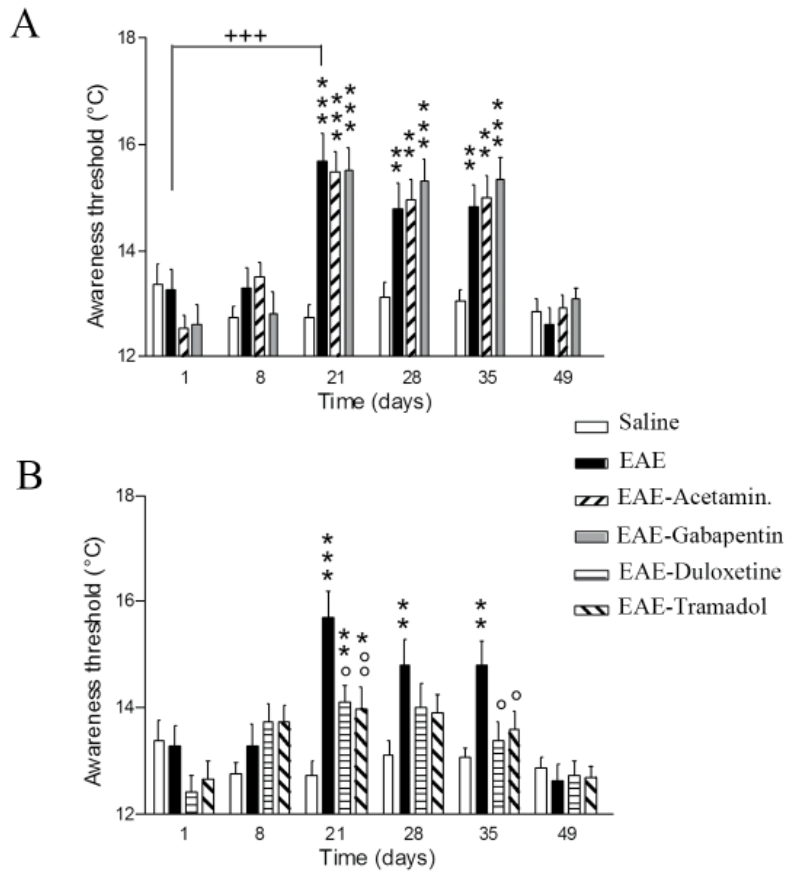


Figure 7

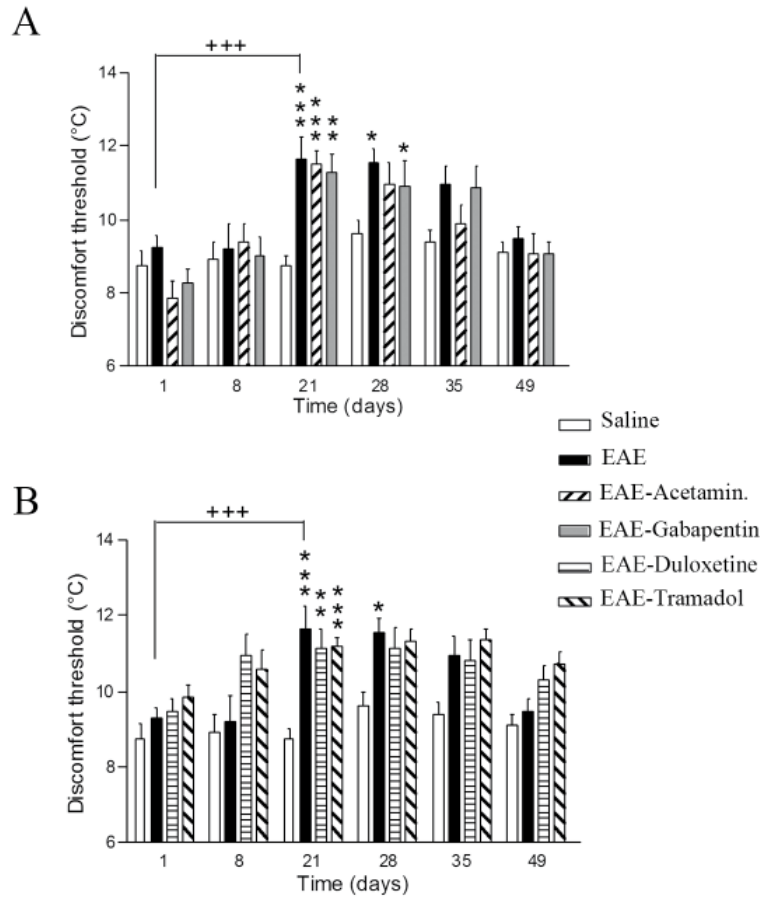


Figure 8

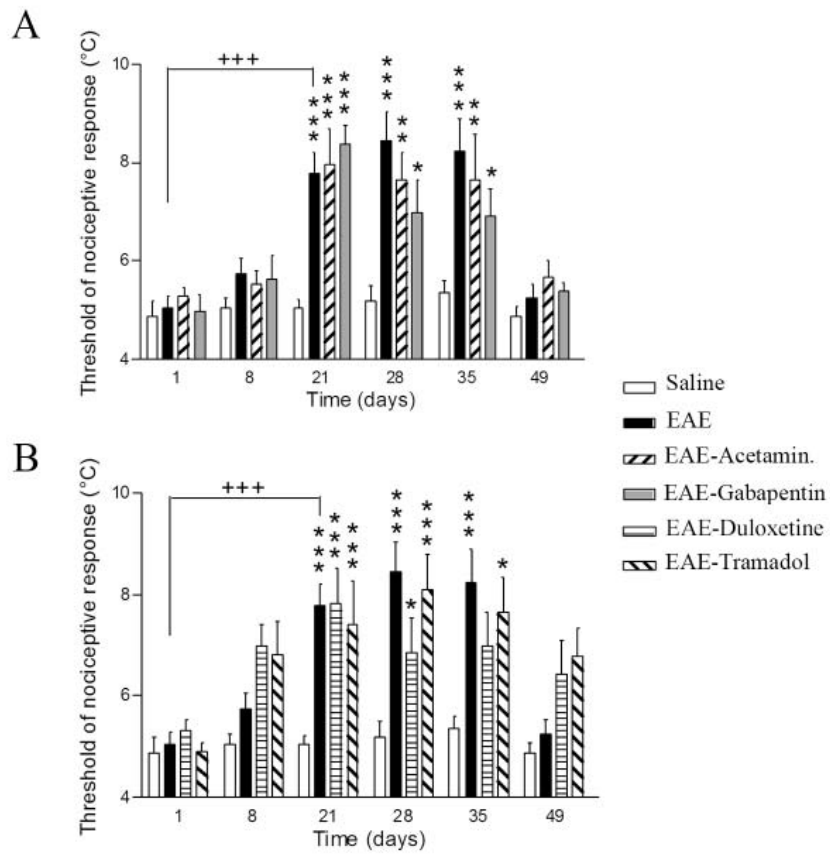


Figure 9



		Mechanical sensitivity					
		Allodynia		Hyperaesthesia		Hyperalgesia (Pincher)	
<b>MS patients</b>							
Osterberg 2005	Yes (cotton wool)	Yes (Von Frey)					
Svendsen 2005		Yes and pressure pain					
Osterberg 2009	Yes and tactile hypoesthesia	Yes but not very frequent					
<b>Animal Model</b>							
<b>Mouse</b>	<b>Before</b>	<b>Onset</b>	<b>After</b>	<b>Before</b>	<b>Onset</b>	<b>After</b>	<b>Before</b>
Aicher							
Olechowski	Yes	Yes	No				
Rodrigues		Yes	Yes		Yes		
Lynch		Yes					
<b>Rat</b>							
Sloane	Yes						
This study		No	Yes ++	No	Yes ++	No	Yes ++

Table1

Thermal sensitivity

	Heat allodynia			Heat hyperalgesia		
<b>MS patients</b>						
Morin 2002				No, heat hypoalgesia		
Svendsen 2005				No change in heat sensitivity		
Osterberg 2009				Yes		
<b>Animal Models</b>		<b>Tail</b>	<b>Paw</b>	<b>Tail</b>	<b>Paw</b>	
<b>Mouse</b>	<b>Before</b>	<b>After</b>	<b>Onset</b>	<b>Before</b>	<b>After</b>	<b>Onset</b>
Aicher			No	No	Yes ++	No
Olechowski						Yes +/-
Rodrigues						Hypoalgesi <sup>a</sup>
Lynch				Yes +		
<b>Rat</b>						
Sloane						
This study	Yes ++	Yes +	Yes +	Yes ++	Yes ++	Yes ++

Table 2

		Thermal sensitivity											
		Cold allodynia						Cold hyperalgesia					
<b>MS patients</b>		Tail		Paw		Tail		Paw		Before		After	
<b>Mouse</b>		<b>Before</b>	<b>Onset</b>	<b>After</b>	<b>Before</b>	<b>Onset</b>	<b>After</b>	<b>Before</b>	<b>Onset</b>	<b>After</b>	<b>Before</b>	<b>Onset</b>	<b>After</b>
Aicher													
Olechowski		Yes			Yes	Yes	No						
Rodrigues													
Lynch													
<b>Rat</b>													
Sloane													
This study		Yes ++	Yes ++	Yes ++	Yes ++	Yes ++	Yes ++	Yes +	Yes +	No	No	Yes +	Yes ++

Table 3

# **Discussion Générale**

## Discussion générale

Notre travail a eu pour but premier d'établir une description précise de paramètres comportementaux susceptibles d'évaluer les douleurs chroniques neuropathiques chez le rat. C'est ainsi que nous nous étés amenés à mettre au point de nouveaux tests pour évaluer des allodynies d'une part mécanique dynamique (test dit du pinceau), d'autre thermique au froid (test dit d'attention).

L'analyse de l'expression différentielle des gènes dans les deux premiers modèles étudiés (iatrogénie de deux molécules anticancéreuses) a permis de révéler que, bien que d'un point comportemental ces deux modèles sont très similaires, les patterns d'expression des gènes différentiellement exprimés sont très différents. Ces données incitent donc à penser que des modèles de douleurs neuropathiques proches, générés par deux molécules au mécanisme d'action très différent, mettent en jeu des processus physiopathologiques qui les sous-tendent très différenciés.

Secondairement, notre travail a eu également pour but de tenter de mettre en évidence de nouvelles cibles pharmacologiques dans ces modèles de douleurs chroniques neuropathiques afin, si possible, de générer de nouveaux traitements dans le but d'améliorer la prise en charge de ces douleurs. Ce travail de thèse a apporté des données fonctionnelles qui contribuent à la caractérisation des douleurs neuropathiques chez le rat à partir des données de la littérature concernant des modèles physiopathologiques rencontrés chez l'homme : deux modèles de douleurs neuropathiques iatrogènes générées par des molécules anticancéreuses (Vincristine et Oxaliplatine) et un modèle neuropathologique de sclérose en plaque. Cette discussion aura pour objectif, tout d'abord de dresser un bilan des connaissances acquises dans ce travail concernant ces trois modèles de douleurs neuropathiques chez le rat, puis d'établir, grâce aux données rapportées concernant ces types de douleurs, en quoi la modulation de l'expression de certaines protéines dans ces syndromes pourrait être la cible de nouveaux traitements pharmacologiques dans le traitement de ces douleurs neuropathiques chez l'homme.

## 1. Diversité des mécanismes sous-tendant l'apparition des douleurs neuropathiques.

Comme nous l'avons évoqué dans l'introduction, la multiplicité des mécanismes et des symptômes cliniques rencontrés au cours de l'évolution de douleurs neuropathiques dans différents syndromes rend difficile la mise au point d'un traitement unique de ces douleurs.

L'étude comportementale des trois modèles abordés dans ce travail a permis de mettre en évidence des modifications comportementales similaires chez le rat. En effet, après traitement par la Vincristine ainsi que par l'Oxaliplatine ou par induction de l'EAE chez le rat, nous avons observés l'apparition d'une allodynie et d'une hyperalgésie mécanique statique ainsi qu'une allodynie thermique au froid. Pourtant, les modifications comportementales observées dans les trois modèles semblent être générées par des mécanismes différents.

La Vincristine semble entraîner de nombreuses altérations du système nerveux périphérique. En effet, les résultats obtenus lors de ce travail indiquent une modification d'expression très importante de gènes dans les ganglions des racines dorsales. La recherche de marqueurs de lésions cellulaires révèle une altération des fibres myélinisées de gros diamètres à la fin du traitement par la Vincristine chez le rat. De plus nous avons montré pour la première fois, une modification comportementale des rats à la suite d'une stimulation mécanique dynamique de faible intensité. Ce résultat tend à confirmer une altération de fibres myélinisées de gros diamètres qui véhiculent les informations tactiles de faible intensité. Ce résultat est en accord avec les données de la littérature révélant des modifications morphologiques des fibres de gros diamètre après un traitement par la Vincristine (Authier et al., 2003; Topp et al., 2000). Nous avons également montré une augmentation du nombre de cellules c-Fos positives dans les couches intermédiaires de la corne dorsale de la moelle épinière à la suite d'une stimulation non nociceptive. Cette donnée suggère une sensibilisation des fibres A $\beta$  à la suite d'un traitement par la Vincristine du fait que ces couches constituent leur site principal de projections spinales.

Nous avons également montré une altération des fibres périphériques de petits et moyens diamètres à la suite d'un traitement par la Vincristine. En effet, nous avons observé une augmentation de 38% de l'expression du récepteur 5-HT<sub>2A</sub> dans ces fibres. L'expression du récepteur est associée à l'apparition de symptômes douloureux inflammatoires et neuropathiques et à ce titre peut être considérée dans ce modèle comme un marqueur de la douleur chronique. De plus, nous avons observé une augmentation de 76,3% de la densité des terminaisons axonales immunopositives pour le récepteur 5-HT<sub>2A</sub> dans les couches superficielles de la corne dorsale de la moelle épinière qui constituent le site de projection des fibres nociceptives de petits diamètres C/Aδ. Ce résultat est également en accord avec les données de la littérature révélant des modifications morphologiques et électrophysiologiques des fibres de petits et moyens diamètres après un traitement par la Vincristine (Tanner et al., 1998a; Tanner et al., 2003).

Les résultats de l'analyse différentielle de gène par puce ADN, a permis de mettre en évidence un nombre important de gène dont l'expression est modifiée dans les GRD après traitement par la Vincristine. Nous avons montré une augmentation de ATF3 et de la Caspase12, pouvant être considéré comme des marqueurs de blessures cellulaires, à la fin du traitement principalement dans les fibres afférentes de large diamètre Aβ. Nous avons également montré que ces fibres répondaient de manière plus importante à une stimulation tactile non-nociceptive.

L'ensemble de ces données tendent à prouver une altération du système nerveux périphérique induite par la Vincristine touchant aussi bien les fibres périphériques non-myélinisées de petits et moyens diamètres que les fibres myélinisées de gros diamètre. Des résultats complémentaires non présentés dans cette thèse sur l'étude de l'expression différentielle de gènes dans le cortex somatosensoriel à la suite d'un traitement par la Vincristine chez le rat semble confirmer cette atteinte préférentiellement périphérique. En effet, nous n'avons observé que 15 gènes différentiellement exprimés sur 9950 gènes exprimés sur les puces à ADN Illumina réalisées sur le cortex somatosensoriel de rat traité par la Vincristine en comparaison avec les rats contrôles. Ce petit nombre de gènes différentiellement exprimé dans le cortex, comparé à celui très important (174 gènes différentiellement exprimés sur les puces à ADN Illumina dans les GRD) souligne l'importance des processus périphériques plutôt que corticaux dans ce modèle.

En revanche, l'Oxaliplatine semble induire préférentiellement des modifications centrales. En effet, les résultats obtenus avec les puces à ADN indiquent un nombre de gènes différentiellement exprimés très important dans le cortex somatosensoriel après traitement par l'Oxaliplatine tandis que l'on observe très peu de gènes différentiellement exprimés dans les ganglions des racines dorsales et dans la corne dorsale de la moelle épinière. Ce résultat est surprenant au vu des données de la littérature qui montrent une atteinte des neurones sensoriels périphériques par accumulation des sels de platine au cours du traitement dans les GRDs (Cavaletti et al., 2001). Cette accumulation entraîne des modifications morphologiques des cellules et une diminution de la vitesse de conduction des axones périphériques (Holmes et al., 1998) (Cavaletti et al., 2001). Il est donc intéressant de noter que notre étude ne révèle que 4 gènes différentiellement exprimés dans les ganglions des racines dorsales à la suite d'un traitement chronique par l'Oxaliplatine. Plusieurs raisons peuvent expliquer ce résultat. Ainsi la complexité du tissu étudié peut en faire partie. En effet, l'hétérogénéité d'un tissu ou sa complexité cellulaire peut minimiser ou même cacher des modifications importantes d'expression de gènes se manifestant dans une sous-population cellulaire. De la même manière, le protocole expérimental des puces à ADN peut influencer les résultats. A l'image de nombreuses expériences *in vivo* chez le rat, nous sommes en face d'une variabilité interindividuelle et intergroupe importante. Il est donc indispensable de réaliser des répliques des expériences sur puces à ADN comme nous l'avons fait, mais malgré cela, il est possible que des gènes différentiellement exprimés ne soient pas révélés. Enfin, il a été montré qu'il était possible d'observer des modifications dans la quantité d'une protéine synthétisée dans les neurones sans modification détectable de la quantité de l'ARNm (Ji et al., 2002) (pour revue voir (Griffin et al., 2003)).

Nos résultats obtenus avec les puces à ADN sur les rats traités par l'Oxaliplatine indiquent donc un grand nombre de gènes différentiellement exprimés dans le cortex somatosensoriel. Par une autre approche, nous avons également montré une augmentation du nombre de cellules p-Erk positives dans différents cortex somatosensoriel primaires correspondant à différentes régions corporelles mais également dans des cortex limbiques comme le cortex cingulaire ou insulaire. Ce résultat suggère une sensibilisation centrale de certains neurones corticaux présents dans des structures clés de l'intégration du message douloureux à la suite d'un traitement par l'Oxaliplatine.



L'induction de l'EAE, quant à elle, semble entraîner chez le rat des modifications périphériques et centrales. En effet, les données de la littérature dans ce modèle mettent en évidence une démyélinisation périphérique accompagnée d'une activation astrocytaire et microgliale dans les couches superficielles de la corne dorsale des souris EAE (Olechowski et al., 2009). De plus des données préliminaires (données non publiés dans cette thèse) semblent indiquer une diminution de la taille du corps calleux chez les rats EAE mesurée par IRM (Imagerie par Résonance Magnétique).

Il est intéressant de noter que les modifications comportementales observées dans ces trois modèles présentent des temps d'apparition et des évolutions différentes. En effet, nous avons observé que l'allodynie et l'hyperalgésie thermique au froid sont des symptômes précoces des douleurs neuropathiques induites par un traitement par la Vincristine, tandis que l'allodynie et l'hyperesthésie mécanique dynamique semblent être des symptômes tardifs. Ce résultat suggère une atteinte différentielle dans le temps des fibres périphériques dans ce modèle. En effet, les fibres de gros diamètres A $\beta$ , qui véhiculent les informations tactiles non nociceptives, semblent être atteintes plus tardivement en comparaison avec les fibres de petits diamètres C/A $\delta$ , qui véhiculent les informations thermiques et mécaniques nociceptives. En revanche à la suite d'un traitement par l'Oxaliplatine, les premiers symptômes observés sont les allodynies mécaniques statique et dynamique ainsi que l'hyperesthésie mécanique dynamique. L'allodynie et l'hyperalgésie thermique au froid n'apparaissent que tardivement au cours du traitement. Ce résultat est en accord avec les données de la littérature, en effet, Jamieson et collaborateurs ont montré une atteinte préférentielle de l'Oxaliplatine sur les neurones de large diamètre dans les ganglions des racines dorsales (Jamieson et al., 2005). Nos résultats suggèrent donc que les fibres de petits et moyens diamètres sont atteintes plus tardivement dans ce modèle. Enfin, nous avons montré que les rats EAE présentaient une hyperalgésie mécanique statique ainsi qu'une hyperalgésie thermique au froid et au chaud de la queue de manière précoce par rapport à l'évolution des signes cliniques observés. En revanche, l'allodynie mécanique statique n'apparaît que tardivement dans l'évolution de la maladie. Ces données suggèrent une atteinte différentielle dans le temps dans le modèle EAE. Ceci souligne l'importance de la prise en compte de l'évolution des douleurs chez l'homme. En effet, la prise en charge des douleurs neuropathiques devra évoluer avec le décours temporel de l'administration des anticancéreux ou dans l'évolution de la sclérose en plaque.

L'ensemble de ces données met en avant la multiplicité des mécanismes qui sous-tendent l'apparition des douleurs neuropathiques et la nécessité de préciser les mécanismes cellulaires et moléculaires qui les sous-tendent, mécanismes qui permettront de trouver de nouvelles cibles pharmacologiques adéquates pour différents types de douleurs neuropathiques rencontrées

## 2. Découverte de nouvelle cible thérapeutique

### 2.1. Des canalopathies

L'utilisation des puces à ADN a permis d'avoir une vision plus large des modifications moléculaires intervenant dans les modèles iatrogènes étudiés. La capacité d'examiner le profil d'expression de l'ensemble du génome en une seule fois, offre la possibilité d'approches nouvelles et la découverte potentielle de nouvelles cibles pour l'établissement de nouveaux traitements.

Après un traitement par la Vincristine, nous avons observé grâce à l'analyse en puce à ADN une augmentation de l'expression de canaux connus pour être impliqués dans la genèse et/ou le maintien de décharges ectopiques et spontanées des fibres afférentes primaires. En effet, nous avons observé une augmentation de la sous-unité  $\alpha 2\delta$ -1 du canal calcique voltage dépendant  $Ca_v2.2$ . L'augmentation de cette sous-unité semble contribuer au développement des douleurs neuropathiques (Newton et al., 2001; Wang et al., 2002; Li et al., 2004). De plus, il a été montré que l'administration systémique de gabapentine et de prégabaline diminuait les allodynies et hyperalgésies mécaniques statiques après un traitement chronique de Vincristine par injection intraveineuse (Nozaki-Taguchi et al., 2001). La gabapentine et la prégabaline

sont des ligands inhibiteurs de la sous-unité  $\alpha 2\delta$ -1 (Brown and Gee, 1998;Field et al., 2006) et donc des régulateurs inhibiteurs de l'activité du canal calcique  $Ca_v2.2$ .

Toujours grâce à l'analyse en puce à ADN, nous avons également observé une augmentation de l'expression du canal sodique voltage dépendant  $Na_v1.1$ . Des études ont montré que l'expression de ce canal était augmentée dans une forme spontanée d'épilepsie au niveau de l'hippocampe chez le rat (Guo et al., 2008). Ce canal est connu pour être exprimé dans les neurones sensoriels primaires en particulier dans les neurones de gros diamètres (Fukuoka et al., 2008). L'augmentation de l'expression de ce canal après traitement par la Vincristine chez le rat pourrait contribuer à l'hyperexcitabilité des fibres de gros diamètres observés.

Ces données suggèrent que le traitement par la Vincristine induit chez le rat une canalopathie périphérique pouvant être la cible de nouveau traitement pharmacologique afin de soulager les douleurs neuropathiques iatrogènes induites par cette molécule anticancéreuse.

De la même manière, les données obtenues par l'analyse effectuée avec les puces à ADN ont permis de montrer une atteinte de l'expression de nombreux canaux après traitement par l'Oxaliplatine. Ainsi, nous avons émis l'hypothèse selon laquelle la diminution de l'expression de certains canaux potassiques dans les cellules du cortex somatosensoriel pouvait rendre compte de l'augmentation de l'excitabilité observée grâce à la phosphorylation de la MAPkinase Erk. En effet, Kim et collaborateurs ont montré que l'expression du canal voltage dépendant  $K_v2.2$  était diminuée dans les ganglions des racines dorsales dans le modèle de douleurs neuropathiques après constriction du nerf sciatique (Kim et al., 2002). De plus, ce canal a été montré comme ayant un rôle dans le maintien du potentiel de membrane ainsi que dans la genèse du potentiel d'action (Guan et al., 2007). L'ensemble de ces observations suggère un rôle du canal potassique voltage dépendant  $K_v2.2$  dans l'hyperexcitabilité cellulaire observé après traitement par l'Oxaliplatine.

Les données obtenues par l'analyse effectuée avec les puces à ADN ont permis de montrer une diminution d'expression du canal potassique  $Trek-2$ . Ce canal est un membre de la famille des canaux potassium mécano-sensible. Il a été suggérer un rôle de  $Trek-2$  dans les douleurs neuropathiques (pour revue voir (Huang and Yu, 2008)). Cette diminution d'expression des canaux potassiques pourrait contribuer à l'augmentation de l'excitabilité neuronale observée après traitement par l'Oxaliplatine.

Ces données suggèrent que le traitement par l'Oxaliplatine induit chez le rat une canalopathie potassique centrale pouvant être la cible de nouveau traitement pharmacologique afin de soulager les douleurs neuropathiques induites par cette molécule.

Enfin, dans le modèle EAE chez le rat, nous avons observé un effet bénéfique de l'administration systémique chronique de gabapentine sur l'hyperalgésie mécanique statique mesurée par le test de la pince. De la même manière que dans le modèle Vincristine, ce résultat suggère une atteinte des canaux calciques voltage dépendant après induction de l'EAE chez le rat. La gabapentine n'est malheureusement pas efficace sur les allodynies et hyperalgésies thermiques au froid observées dans ce modèle.

## 2.2. Le système sérotoninergique

Nous avons montré l'efficacité de l'utilisation d'un antagoniste du récepteur sérotoninergique 5-HT<sub>2A</sub> dans la diminution des douleurs neuropathiques induites par la Vincristine. En effet, l'allodynie et l'hyperalgésie mécanique statique diminuent de manière dépendante de la dose après injection de cet antagoniste. De plus, nous avons montré que des souris dont le gène de ce récepteur 5-HT<sub>2A</sub> a été invalidé ne présentent pas l'apparition de cette sensibilité mécanique observée chez les souris sauvages traitées par la Vincristine. Nous avons donc montré le rôle pro-nociceptif du récepteur 5-HT<sub>2A</sub> dans un modèle de douleurs neuropathiques induites par la Vincristine de la même manière que dans un modèle de douleurs neuropathiques induites par injection de ddC (Van Steenwinckel et al., 2008). Le rôle de ce récepteur dans les douleurs neuropathiques semble autant périphérique que central. En effet, les expériences de double marquage mettent en évidence une colocalisation du récepteur 5-HT<sub>2A</sub> et de la protéine c-Fos dans les couches profondes de la corne dorsale de la moelle épinière. Ces données suggèrent que ce récepteur participe à la sensibilisation centrale observée dans ce modèle et serait un bon candidat pour le développement de nouveaux traitements pour soulager les douleurs neuropathiques.

Ces données suggèrent que le système sérotoninergique est également fortement impliqué dans la genèse et/ou le maintien des douleurs neuropathiques induites par un traitement par la Vincristine chez le rat.

### 2.3. Le système opioïde endogène

Nous avons vu qu'un inhibiteur mixte de dégradation des enképhalines endogènes (le RB101) supprimait non seulement l'hyperalgésie mécanique induite par une constriction du nerf sciatique (Lee et al., 1994) mais également l'allodynie mécanique induit dans le modèle du diabète expérimental (STZ) chez le rat (Coudore-Civiale et al., 2001). Nous avons montré que l'administration d'un inhibiteur mixte, de dernière génération (le PL37), permet de diminuer l'allodynie mécanique statique ainsi que l'allodynie et l'hyperesthésie mécanique dynamique induites par la Vincristine.

En effet, nous avons montré que l'inhibition de la dégradation des enképhalines périphériques par le PL37 permet une diminution de la sensibilité mécanique induite par la Vincristine mais n'a pas d'effet sur l'allodynie thermique au froid. Ce résultat permettrait d'impliquer ces peptides opioïdes endogènes dans une action analgésique par leur liaison avec leurs récepteurs opioïdes périphériques exprimés sur les mécanorécepteurs A $\beta$  et/ou les mécanocicepteurs C et A $\delta$ . En effet, l'administration de naloxone-méthiodide, un analogue de la naloxone qui ne passe pas la barrière hémato-encéphalique, reverse totalement les effets du PL37 sur la sensibilité mécanique. Par contre, l'absence d'effet du PL37 sur l'allodynie thermique au froid tend à montrer que les enképhalines périphériques n'ont pas d'effet sur les thermorécepteurs, sans doute du fait d'une absence d'expression des récepteurs opioïdes sur les terminaisons périphériques des fibres thermoréceptrices.

Le fait que le PL37 présente une activité analgésique élevée dans ce modèle suggère l'hypothèse selon laquelle une quantité importante d'enképhalines serait libérée à la périphérie après traitement à la Vincristine, sans doute par les cellules du système immunitaire activées (Stein et al., 2003). Ce résultat renforce l'hypothèse selon laquelle la Vincristine aurait une atteinte préférentielle sur le système nerveux périphérique et valide, en

étude pré-clinique, l'utilisation des inhibiteurs de la dégradation des enképhalines endogènes dans le soulagement des douleurs neuropathiques induites par la Vincristine.

#### 2.4. Les stimulations périphériques analgésiques

Nous avons montré qu'une stimulation périphérique non-nociceptive de la patte postérieure d'un rat traité par l'Oxaliplatine entraînait une diminution significative de l'excitabilité mesurée dans certains neurones corticaux. Nous avons émis l'hypothèse d'un renforcement des contrôles inhibiteurs descendants dans ce modèle. Ce résultat offre une nouvelle approche pour le soulagement des douleurs neuropathiques induites par l'Oxaliplatine. En effet, l'histoire de la médecine est riche en observations relatant l'usage de techniques les plus diverses visant à soulager la douleur : massages, électrothérapie, applications de froid, de chaud, acupuncture... tous ces procédés physiques possèdent la caractéristique commune de soulager la douleur par une stimulation périphérique « opposante » qui les fait qualifier de « contre-stimulations ». L'observation de la diminution du nombre de cellules exprimant la forme phosphorylée de la MAPkinase Erk dans les neurones corticaux après une stimulation périphérique chez le rat, pourrait valider l'utilisation de la neurostimulation électrique transcutanée (NSTEC) dans le soulagement de ces douleurs. La NSTEC aurait pour objectif de renforcer ou de suppléer un mécanisme inhibiteur défaillant. Les indications les plus intéressantes rapportées pour l'utilisation de la NSTEC sont : les douleurs après lésion de nerf périphérique, amputation, zona, neuropathie périphérique, lombosciatiques séquellaires post-chirurgicales dues à une fibroarchoïdite (Boureau and Willer, 1982; Keravel and Sindou, 1983; Sedan et al., 1978; Sindou and Keravel, 1980) (Figure 25).

<p><b>Douleurs chroniques neurologiques</b></p> <p><i>Atteinte des nerfs périphériques</i>  Amputation (membre fantôme)  Lésion de nerf périphérique  Zona  Causalgie</p> <p><i>Atteinte radriculaire</i>  Fibroarachnoïdite  Arrachement du plexus brachial</p> <p><b>Douleurs chroniques non neurologiques</b>  Douleurs rhumatologiques  Douleurs myofaciales</p> <p><b>Douleurs aiguës</b>  Post-traumatiques  Post-chirurgicales  Accouchement</p>
---

Figure 25 : Principale indications de la NSTC (Woolf, 1984)

L'ensemble de ces données suggèrent que l'utilisation de la NSTEC lors de douleurs neuropathiques induites par l'Oxaliplatine pourrait être une nouvelle modalité thérapeutique pour le soulagement de ces douleurs.

En conclusion, l'ensemble de ces résultats met en évidence la multiplicité des cibles pharmacologiques potentielles dans ces différents modèles de douleurs neuropathiques. Il nous amène à proposer deux conclusions : d'une part une certaine spécificité des types de douleurs neuropathiques en fonction du modèle étudié, tant dans leur nature que dans leur délai d'apparition, ce qui laisse supposé l'utilisation d'une pharmacologie antalgique clinique différenciée en fonction du type de douleurs neuropathiques ; d'autre part la mise en place d'une polythérapie pharmacologique qui prenne en compte non pas une mais plusieurs cibles pharmacologiques (antagoniste 5-HT<sub>2A</sub> ; bloqueur des différent type de canaux ioniques Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>, Ca<sup>2+</sup>).

## Reference List

- (1979) Pain terms: a list with definitions and notes on usage. Recommended by the IASP Subcommittee on Taxonomy. *Pain* 6:249.
- Abbott FV, Hong Y, Blier P (1996) Activation of 5-HT<sub>2A</sub> receptors potentiates pain produced by inflammatory mediators. *Neuropharmacology* 35:99-110.
- Adelmann M, Wood J, Benzel I, Fiori P, Lassmann H, Matthieu JM, Gardinier MV, Dornmair K, Linington C (1995) The N-terminal domain of the myelin oligodendrocyte glycoprotein (MOG) induces acute demyelinating experimental autoimmune encephalomyelitis in the Lewis rat. *J Neuroimmunol* 63:17-27.
- Ahlgren SC, Levine JD (1994) Protein kinase C inhibitors decrease hyperalgesia and C-fiber hyperexcitability in the streptozotocin-diabetic rat. *J Neurophysiol* 72:684-692.
- Ahlgren SC, White DM, Levine JD (1992) Increased responsiveness of sensory neurons in the saphenous nerve of the streptozotocin-diabetic rat. *J Neurophysiol* 68:2077-2085.
- Aicher SA, Silverman MB, Winkler CW, Bebo BF, Jr. (2004) Hyperalgesia in an animal model of multiple sclerosis. *Pain* 110:560-570.
- Aley KO, Reichling DB, Levine JD (1996) Vincristine hyperalgesia in the rat: a model of painful vincristine neuropathy in humans. *Neuroscience* 73:259-265.
- Alvarez P, Dieb W, Hafidi A, Voisin DL, Dallel R (2009) Insular cortex representation of dynamic mechanical allodynia in trigeminal neuropathic rats. *Neurobiol Dis* 33:89-95.
- Archibald CJ, McGrath PJ, Ritvo PG, Fisk JD, Bhan V, Maxner CE, Murray TJ (1994) Pain prevalence, severity and impact in a clinic sample of multiple sclerosis patients. *Pain* 58:89-93.
- Attal N, Bouhassira D, Gautron M, Vaillant JN, Mitry E, Lepere C, Rougier P, Guirimand F (2009) Thermal hyperalgesia as a marker of oxaliplatin neurotoxicity: a prospective quantified sensory assessment study. *Pain* 144:245-252.
- Authier N, Coudore F, Eschalier A, Fialip J (1999) Pain related behaviour during vincristine-induced neuropathy in rats. *Neuroreport* 10:965-968.
- Authier N, Gillet JP, Fialip J, Eschalier A, Coudore F (2003) A new animal model of vincristine-induced nociceptive peripheral neuropathy. *Neurotoxicology* 24:797-805.
- Basbaum AI, Gautron M, Jazat F, Mayes M, Guilbaud G (1991) The spectrum of fiber loss in a model of neuropathic pain in the rat: an electron microscopic study. *Pain* 47:359-367.
- Baxter AG (2007) The origin and application of experimental autoimmune encephalomyelitis. *Nat Rev Immunol* 7:904-912.
- Bennett GJ (2003) Neuropathic pain: a crisis of definition? *Anesth Analg* 97:619-620.



- Bennett GJ, Xie YK (1988) A peripheral mononeuropathy in rat that produces disorders of pain sensation like those seen in man. *Pain* 33:87-107.
- Black JA, Cummins TR, Plumpton C, Chen YH, Hormuzdiar W, Clare JJ, Waxman SG (1999) Upregulation of a silent sodium channel after peripheral, but not central, nerve injury in DRG neurons. *J Neurophysiol* 82:2776-2785.
- Bouhassira D, Attal N, Alchaar H, Boureau F, Brochet B, Bruxelle J, Cunin G, Fermanian J, Ginies P, Grun-Overdyking A, Jafari-Schluep H, Lanteri-Minet M, Laurent B, Mick G, Serrie A, Valade D, Vicaut E (2005) Comparison of pain syndromes associated with nervous or somatic lesions and development of a new neuropathic pain diagnostic questionnaire (DN4). *Pain* 114:29-36.
- Boureau F (1988) Du symptôme au syndrome douloureux chronique. In: *Pratique du traitement de la douleur* (Doin éditeurs-paris, ed), pp 71-79.
- Boureau F, Willer J (1982) *La douleur: exploration, traitement par neurostimulation, électro-acupuncture*. Paris.
- Bradl M, Hohlfeld R (2003) Molecular pathogenesis of neuroinflammation. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 74:1364-1370.
- Brown JP, Gee NS (1998) Cloning and deletion mutagenesis of the alpha2 delta calcium channel subunit from porcine cerebral cortex. Expression of a soluble form of the protein that retains [3H]gabapentin binding activity. *J Biol Chem* 273:25458-25465.
- Calvino B, Crepon-Bernard MO, Le Bars D (1987) Parallel clinical and behavioural studies of adjuvant-induced arthritis in the rat: possible relationship with 'chronic pain'. *Behav Brain Res* 24:11-29.
- Canti C, Nieto-Rostro M, Foucault I, Heblich F, Wratten J, Richards MW, Hendrich J, Douglas L, Page KM, Davies A, Dolphin AC (2005) The metal-ion-dependent adhesion site in the Von Willebrand factor-A domain of alpha2delta subunits is key to trafficking voltage-gated Ca<sup>2+</sup> channels. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102:11230-11235.
- Cao H, Gao YJ, Ren WH, Li TT, Duan KZ, Cui YH, Cao XH, Zhao ZQ, Ji RR, Zhang YQ (2009) Activation of extracellular signal-regulated kinase in the anterior cingulate cortex contributes to the induction and expression of affective pain. *J Neurosci* 29:3307-3321.
- Carrasquillo Y, Gereau RW (2007) Activation of the extracellular signal-regulated kinase in the amygdala modulates pain perception. *J Neurosci* 27:1543-1551.
- Casey EB, Jelliffe AM, Le Quesne PM, Millett YL (1973) Vincristine neuropathy. Clinical and electrophysiological observations. *Brain* 96:69-86.
- Catterall WA, Yu FH (2006) Painful channels. *Neuron* 52:743-744.
- Cavaletti G, Tredici G, Petruccioli MG, Donde E, Tredici P, Marmioli P, Minoia C, Ronchi A, Bayssas M, Etienne GG (2001) Effects of different schedules of oxaliplatin treatment on the peripheral nervous system of the rat. *Eur J Cancer* 37:2457-2463.

- Chi XX, Jiang X, Nicol GD (2007) ATP-sensitive potassium currents reduce the PGE<sub>2</sub>-mediated enhancement of excitability in adult rat sensory neurons. *Brain Res* 1145:28-40.
- Clifford DB, Trotter JL (1984) Pain in multiple sclerosis. *Arch Neurol* 41:1270-1272.
- Coggeshall RE, Dougherty PM, Pover CM, Carlton SM (1993) Is large myelinated fiber loss associated with hyperalgesia in a model of experimental peripheral neuropathy in the rat? *Pain* 52:233-242.
- Colpaert FC, Meert T, De WP, Schmitt P (1982) Further evidence validating adjuvant arthritis as an experimental model of chronic pain in the rat. *Life Sci* 31:67-75.
- Cory AH, Hickerson DH, Cory JG (2000) Apoptosis induced by inhibitors of nucleotide synthesis in deoxyadenosine-resistant leukemia L1210 cells that lack p53 expression. *Anticancer Res* 20:4171-4178.
- Coudore-Civiale MA, Meen M, Fournie-Zaluski MC, Boucher M, Roques BP, Eschalier A (2001) Enhancement of the effects of a complete inhibitor of enkephalin-catabolizing enzymes, RB 101, by a cholecystokinin-B receptor antagonist in diabetic rats. *Br J Pharmacol* 133:179-185.
- Courteix C, Eschalier A, Lavarenne J (1993) Streptozocin-induced diabetic rats: behavioural evidence for a model of chronic pain. *Pain* 53:81-88.
- Cox JJ, Reimann F, Nicholas AK, Thornton G, Roberts E, Springell K, Karbani G, Jafri H, Mannan J, Raashid Y, Al-Gazali L, Hamamy H, Valente EM, Gorman S, Williams R, McHale DP, Wood JN, Gribble FM, Woods CG (2006) An SCN9A channelopathy causes congenital inability to experience pain. *Nature* 444:894-898.
- Dauge V, Mauborgne A, Cesselin F, Fournie-Zaluski MC, Roques BP (1996) The dual peptidase inhibitor RB101 induces a long-lasting increase in the extracellular level of Met-enkephalin-like material in the nucleus accumbens of freely moving rats. *J Neurochem* 67:1301-1308.
- de Castro CM, De SP, Gybels J, Van HJ (1981) Adjuvant-induced arthritis in rats: a possible animal model of chronic pain. *Pain* 10:173-185.
- Devor M, Wall PD, Catalan N (1992) Systemic lidocaine silences ectopic neuroma and DRG discharge without blocking nerve conduction. *Pain* 48:261-268.
- Doi-Saika M, Tokunaga A, Senba E (1997) Intradermal 5-HT induces Fos expression in rat dorsal horn neurons not via 5-HT<sub>3</sub> but via 5-HT<sub>2A</sub> receptors. *Neurosci Res* 29:143-149.
- Doly S, Madeira A, Fischer J, Brisorgueil MJ, Daval G, Bernard R, Verge D, Conrath M (2004) The 5-HT<sub>2A</sub> receptor is widely distributed in the rat spinal cord and mainly localized at the plasma membrane of postsynaptic neurons. *J Comp Neurol* 472:496-511.
- Dong XW, Goregoaker S, Engler H, Zhou X, Mark L, Crona J, Terry R, Hunter J, Priestley T (2007) Small interfering RNA-mediated selective knockdown of Na(V)1.8 tetrodotoxin-resistant sodium channel reverses mechanical allodynia in neuropathic rats. *Neuroscience* 146:812-821.

- Dougherty PM, Palecek J, Zorn S, Willis WD (1993) Combined application of excitatory amino acids and substance P produces long-lasting changes in responses of primate spinothalamic tract neurons. *Brain Res Brain Res Rev* 18:227-246.
- Duplan V, Beriou G, Heslan JM, Bruand C, Dutartre P, Mars LT, Liblau RS, Cuturi MC, Saoudi A (2006) LF 15-0195 treatment protects against central nervous system autoimmunity by favoring the development of Foxp3-expressing regulatory CD4 T cells. *J Immunol* 176:839-847.
- EINSTEIN ER, ROBERTSON DM, DICAPRIO JM, MOORE W (1962) The isolation from bovine spinal cord of a homogeneous protein with encephalitogenic activity. *J Neurochem* 9:353-361.
- England JD, Happel LT, Kline DG, Gamboni F, Thouron CL, Liu ZP, Levinson SR (1996) Sodium channel accumulation in humans with painful neuromas. *Neurology* 47:272-276.
- Fertleman CR, Baker MD, Parker KA, Moffatt S, Elmslie FV, Abrahamsen B, Ostman J, Klugbauer N, Wood JN, Gardiner RM, Rees M (2006) SCN9A mutations in paroxysmal extreme pain disorder: allelic variants underlie distinct channel defects and phenotypes. *Neuron* 52:767-774.
- Field MJ, Cox PJ, Stott E, Melrose H, Offord J, Su TZ, Bramwell S, Corradini L, England S, Winks J, Kinloch RA, Hendrich J, Dolphin AC, Webb T, Williams D (2006) Identification of the alpha2-delta-1 subunit of voltage-dependent calcium channels as a molecular target for pain mediating the analgesic actions of pregabalin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103:17537-17542.
- Fodor SP, Read JL, Pirrung MC, Stryer L, Lu AT, Solas D (1991) Light-directed, spatially addressable parallel chemical synthesis. *Science* 251:767-773.
- Forman AD (2004) Peripheral neuropathy and cancer. *Curr Oncol Rep* 6:20-25.
- Forman LJ, Estilow S, Lewis M, Vasilenko P (1986) Streptozocin diabetes alters immunoreactive beta-endorphin levels and pain perception after 8 wk in female rats. *Diabetes* 35:1309-1313.
- Francis JS, Dragunow M, During MJ (2004) Over expression of ATF-3 protects rat hippocampal neurons from in vivo injection of kainic acid. *Brain Res Mol Brain Res* 124:199-203.
- Fukuoka T, Kobayashi K, Yamanaka H, Obata K, Dai Y, Noguchi K (2008) Comparative study of the distribution of the alpha-subunits of voltage-gated sodium channels in normal and axotomized rat dorsal root ganglion neurons. *J Comp Neurol* 510:188-206.
- Gamelin E, Gamelin L, Bossi L, Quasthoff S (2002) Clinical aspects and molecular basis of oxaliplatin neurotoxicity: current management and development of preventive measures. *Semin Oncol* 29:21-33.
- Goettl VM, Huang Y, Hackshaw KV, Stephens RL, Jr. (2002) Reduced basal release of serotonin from the ventrobasal thalamus of the rat in a model of neuropathic pain. *Pain* 99:359-366.

- Goncalves L, Almeida A, Pertovaara A (2007) Pronociceptive changes in response properties of rostroventromedial medullary neurons in a rat model of peripheral neuropathy. *Eur J Neurosci* 26:2188-2195.
- Griffin RS, Mills CD, Costigan M, Woolf CJ (2003) Exploiting microarrays to reveal differential gene expression in the nervous system. *Genome Biol* 4:105.
- Groninger E, Meeuwssen-De Boer GJ, De Graaf SS, Kamps WA, De Bont ES (2002) Vincristine induced apoptosis in acute lymphoblastic leukaemia cells: a mitochondrial controlled pathway regulated by reactive oxygen species? *Int J Oncol* 21:1339-1345.
- Grothey A (2003) Oxaliplatin-safety profile: neurotoxicity. *Semin Oncol* 30:5-13.
- Gu JG, Albuquerque C, Lee CJ, MacDermott AB (1996) Synaptic strengthening through activation of Ca<sup>2+</sup>-permeable AMPA receptors. *Nature* 381:793-796.
- Guan D, Tkatch T, Surmeier DJ, Armstrong WE, Foehring RC (2007) Kv2 subunits underlie slowly inactivating potassium current in rat neocortical pyramidal neurons. *J Physiol* 581:941-960.
- Guo F, Yu N, Cai JQ, Quinn T, Zong ZH, Zeng YJ, Hao LY (2008) Voltage-gated sodium channel Nav1.1, Nav1.3 and beta1 subunit were up-regulated in the hippocampus of spontaneously epileptic rat. *Brain Res Bull* 75:179-187.
- Harris JA, Corsi M, Quartaroli M, Arban R, Bentivoglio M (1996) Upregulation of spinal glutamate receptors in chronic pain. *Neuroscience* 74:7-12.
- Hendrich J, Van Minh AT, Heblich F, Nieto-Rostro M, Watschinger K, Striessnig J, Wratten J, Davies A, Dolphin AC (2008) Pharmacological disruption of calcium channel trafficking by the alpha2delta ligand gabapentin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105:3628-3633.
- Hillman P, Wall PD (1969) Inhibitory and excitatory factors influencing the receptive fields of lamina 5 spinal cord cells. *Exp Brain Res* 9:284-306.
- Himes BT, Tessler A (1989) Death of some dorsal root ganglion neurons and plasticity of others following sciatic nerve section in adult and neonatal rats. *J Comp Neurol* 284:215-230.
- Hokfelt T, Zhang X, Wiesenfeld-Hallin Z (1994) Messenger plasticity in primary sensory neurons following axotomy and its functional implications. *Trends Neurosci* 17:22-30.
- Holmes J, Stanko J, Varchenko M, Ding H, Madden VJ, Bagnell CR, Wyrick SD, Chaney SG (1998) Comparative neurotoxicity of oxaliplatin, cisplatin, and ormaplatin in a Wistar rat model. *Toxicol Sci* 46:342-351.
- Huang D, Yu B (2008) Recent advance and possible future in TREK-2: a two-pore potassium channel may involved in the process of NPP, brain ischemia and memory impairment. *Med Hypotheses* 70:618-624.
- Impey S, Obrietan K, Storm DR (1999) Making new connections: role of ERK/MAP kinase signaling in neuronal plasticity. *Neuron* 23:11-14.

- Jagodac MM, Pathirathna S, Joksovic PM, Lee W, Nelson MT, Naik AK, Su P, Jevtovic-Todorovic V, Todorovic SM (2008) Upregulation of the T-type calcium current in small rat sensory neurons after chronic constrictive injury of the sciatic nerve. *J Neurophysiol* 99:3151-3156.
- Jamieson SM, Liu J, Connor B, McKeage MJ (2005) Oxaliplatin causes selective atrophy of a subpopulation of dorsal root ganglion neurons without inducing cell loss. *Cancer Chemother Pharmacol* 56:391-399.
- Jevtovic-Todorovic V, Todorovic SM (2006) The role of peripheral T-type calcium channels in pain transmission. *Cell Calcium* 40:197-203.
- Ji RR, Baba H, Brenner GJ, Woolf CJ (1999) Nociceptive-specific activation of ERK in spinal neurons contributes to pain hypersensitivity. *Nat Neurosci* 2:1114-1119.
- Ji RR, Samad TA, Jin SX, Schmoll R, Woolf CJ (2002) p38 MAPK activation by NGF in primary sensory neurons after inflammation increases TRPV1 levels and maintains heat hyperalgesia. *Neuron* 36:57-68.
- Joseph EK, Levine JD (2004) Caspase signalling in neuropathic and inflammatory pain in the rat. *Eur J Neurosci* 20:2896-2902.
- KABAT EA, WOLF A, BEZER AE (1946) Rapid Production of Acute Disseminated Encephalomyelitis in Rhesus Monkeys by Injection of Brain Tissue With Adjuvants. *Science* 104:362-363.
- Kajander KC, Bennett GJ (1992) Onset of a painful peripheral neuropathy in rat: a partial and differential deafferentation and spontaneous discharge in A beta and A delta primary afferent neurons. *J Neurophysiol* 68:734-744.
- Karim F, Wang CC, Gereau RW (2001) Metabotropic glutamate receptor subtypes 1 and 5 are activators of extracellular signal-regulated kinase signaling required for inflammatory pain in mice. *J Neurosci* 21:3771-3779.
- Kawano T, Zoga V, McCallum JB, Wu HE, Gemes G, Liang MY, Abram S, Kwok WM, Hogan QH, Sarantopoulos CD (2009) ATP-Sensitive potassium currents in rat primary afferent neurons: biophysical, pharmacological properties, and alterations by painful nerve injury. *Neuroscience*.
- Keravel Y, Sindou M (1983) Anatomical conditions of efficiency of transcutaneous electrical neurostimulation in deafferentation pain. In: *Advances in pain research and therapy* (Raven Press, ed), pp 763-767. New York.
- Khasabov SG, Rogers SD, Ghilardi JR, Peters CM, Mantyh PW, Simone DA (2002) Spinal neurons that possess the substance P receptor are required for the development of central sensitization. *J Neurosci* 22:9086-9098.
- Kim DS, Choi JO, Rim HD, Cho HJ (2002) Downregulation of voltage-gated potassium channel alpha gene expression in dorsal root ganglia following chronic constriction injury of the rat sciatic nerve. *Brain Res Mol Brain Res* 105:146-152.

- Kim SH, Chung JM (1992) An experimental model for peripheral neuropathy produced by segmental spinal nerve ligation in the rat. *Pain* 50:355-363.
- Kjorsvik BA, Warsame AA, Gustafsson H, Tjolsen A, Hole K, Stiller CO (2003) Stimulation of spinal 5-HT(2A/2C) receptors potentiates the capsaicin-induced in vivo release of substance P-like immunoreactivity in the rat dorsal horn. *Brain Res* 987:10-16.
- Kohno T, Ji RR, Ito N, Allchorne AJ, Befort K, Karchewski LA, Woolf CJ (2005) Peripheral axonal injury results in reduced mu opioid receptor pre- and post-synaptic action in the spinal cord. *Pain* 117:77-87.
- Kojima K, Berger T, Lassmann H, Hinze-Selch D, Zhang Y, Gehrmann J, Reske K, Wekerle H, Linington C (1994) Experimental autoimmune panencephalitis and uveoretinitis transferred to the Lewis rat by T lymphocytes specific for the S100 beta molecule, a calcium binding protein of astroglia. *J Exp Med* 180:817-829.
- Koltzenburg M, Torebjork HE, Wahren LK (1994) Nociceptor modulated central sensitization causes mechanical hyperalgesia in acute chemogenic and chronic neuropathic pain. *Brain* 117 ( Pt 3):579-591.
- Lai J, Gold MS, Kim CS, Bian D, Ossipov MH, Hunter JC, Porreca F (2002) Inhibition of neuropathic pain by decreased expression of the tetrodotoxin-resistant sodium channel, NaV1.8. *Pain* 95:143-152.
- Le Breton D (1995) *Anthropologie de la douleur*.
- Le Guen S, Honore P, Catheline G, Fournie-Zaluski MC, Roques BP, Besson JM (1999) The effects of RB101, a mixed inhibitor of enkephalin-catabolizing enzymes, on carrageenin-induced spinal c-Fos expression are completely blocked by beta-funaltrexamine, a selective mu-opioid receptor antagonist. *Brain Res* 834:200-206.
- Lee KA, Hai TY, SivaRaman L, Thimmappaya B, Hurst HC, Jones NC, Green MR (1987) A cellular protein, activating transcription factor, activates transcription of multiple E1A-inducible adenovirus early promoters. *Proc Natl Acad Sci U S A* 84:8355-8359.
- Lee SH, Kayser V, Guilbaud G (1994) Antinociceptive effect of systemic kelatorphan, in mononeuropathic rats, involves different opioid receptor types. *Eur J Pharmacol* 264:61-67.
- Lehky TJ, Leonard GD, Wilson RH, Grem JL, Floeter MK (2004) Oxaliplatin-induced neurotoxicity: acute hyperexcitability and chronic neuropathy. *Muscle Nerve* 29:387-392.
- Leriche (1936) *Neurochirurgie de la douleur*.
- Li CY, Song YH, Higuera ES, Luo ZD (2004) Spinal dorsal horn calcium channel alpha2delta-1 subunit upregulation contributes to peripheral nerve injury-induced tactile allodynia. *J Neurosci* 24:8494-8499.
- Li CY, Zhang XL, Matthews EA, Li KW, Kurwa A, Boroujerdi A, Gross J, Gold MS, Dickenson AH, Feng G, Luo ZD (2006) Calcium channel alpha2delta1 subunit mediates spinal hyperexcitability in pain modulation. *Pain* 125:20-34.

- Ling B, Authier N, Balayssac D, Eschalier A, Coudore F (2007) Behavioral and pharmacological description of oxaliplatin-induced painful neuropathy in rat. *Pain* 128:225-234.
- Lobert S, Isern N, Hennington BS, Correia JJ (1994) Interaction of tubulin and microtubule proteins with vanadate oligomers. *Biochemistry* 33:6244-6252.
- Lombard MC, Besson JM (1989) Attempts to gauge the relative importance of pre- and postsynaptic effects of morphine on the transmission of noxious messages in the dorsal horn of the rat spinal cord. *Pain* 37:335-345.
- Lombard MC, Nashold BS, Jr., be-Fessard D, Salman N, Sakr C (1979) Deafferentation hypersensitivity in the rat after dorsal rhizotomy: a possible animal model of chronic pain. *Pain* 6:163-174.
- Lumpkin EA, Caterina MJ (2007) Mechanisms of sensory transduction in the skin. *Nature* 445:858-865.
- Luukko M, Pertovaara A (1993) Influence of an experimental peripheral mononeuropathy on the responses of medial bulboreticular neurons to noxious skin stimulation and the modulation of the responses by an alpha 2-adrenoceptor agonist in the rat. *Exp Neurol* 124:390-394.
- Maldonado R, Valverde O, Turcaud S, Fournie-Zaluski MC, Roques BP (1994) Antinociceptive response induced by mixed inhibitors of enkephalin catabolism in peripheral inflammation. *Pain* 58:77-83.
- Mantyh PW, Rogers SD, Honore P, Allen BJ, Ghilardi JR, Li J, Daughters RS, Lappi DA, Wiley RG, Simone DA (1997) Inhibition of hyperalgesia by ablation of lamina I spinal neurons expressing the substance P receptor. *Science* 278:275-279.
- Mao J, Mayer DJ, Price DD (1993) Patterns of increased brain activity indicative of pain in a rat model of peripheral mononeuropathy. *J Neurosci* 13:2689-2702.
- Martin KC, Michael D, Rose JC, Barad M, Casadio A, Zhu H, Kandel ER (1997) MAP kinase translocates into the nucleus of the presynaptic cell and is required for long-term facilitation in Aplysia. *Neuron* 18:899-912.
- Maxwell DJ, Leranath C, Verhofstad AA (1983) Fine structure of serotonin-containing axons in the marginal zone of the rat spinal cord. *Brain Res* 266:253-259.
- Medhurst SJ, Walker K, Bowes M, Kidd BL, Glatt M, Muller M, Hattenberger M, Vaxelaire J, O'Reilly T, Wotherspoon G, Winter J, Green J, Urban L (2002) A rat model of bone cancer pain. *Pain* 96:129-140.
- Melzack R, Wall PD (1965) Pain mechanisms: a new theory. *Science* 150:971-979.
- Millan MJ (2002) Descending control of pain. *Prog Neurobiol* 66:355-474.
- Moulin DE, Foley KM, Ebers GC (1988) Pain syndromes in multiple sclerosis. *Neurology* 38:1830-1834.

- Newton RA, Bingham S, Case PC, Sanger GJ, Lawson SN (2001) Dorsal root ganglion neurons show increased expression of the calcium channel  $\alpha 2\delta$ -1 subunit following partial sciatic nerve injury. *Brain Res Mol Brain Res* 95:1-8.
- Noble F, Benturquia N, Bilkei-Gorzo A, Zimmer A, Roques BP (2008) Use of preproenkephalin knockout mice and selective inhibitors of enkephalinases to investigate the role of enkephalins in various behaviours. *Psychopharmacology (Berl)* 196:327-335.
- Noble F, Soleilhac JM, Soroca-Lucas E, Turcaud S, Fournie-Zaluski MC, Roques BP (1992) Inhibition of the enkephalin-metabolizing enzymes by the first systemically active mixed inhibitor prodrug RB 101 induces potent analgesic responses in mice and rats. *J Pharmacol Exp Ther* 261:181-190.
- Noguchi K, Dubner R, De LM, Senba E, Ruda MA (1994) Axotomy induces preprotachykinin gene expression in a subpopulation of dorsal root ganglion neurons. *J Neurosci Res* 37:596-603.
- Nozaki-Taguchi N, Chaplan SR, Higuera ES, Ajakwe RC, Yaksh TL (2001) Vincristine-induced allodynia in the rat. *Pain* 93:69-76.
- Oatway MA, Chen Y, Weaver LC (2004) The 5-HT<sub>3</sub> receptor facilitates at-level mechanical allodynia following spinal cord injury. *Pain* 110:259-268.
- Obata K, Yamanaka H, Fukuoka T, Yi D, Tokunaga A, Hashimoto N, Yoshikawa H, Noguchi K (2003) Contribution of injured and uninjured dorsal root ganglion neurons to pain behavior and the changes in gene expression following chronic constriction injury of the sciatic nerve in rats. *Pain* 101:65-77.
- Obrosova IG, Van HC, Fathallah L, Cao XC, Greene DA, Stevens MJ (2002) An aldose reductase inhibitor reverses early diabetes-induced changes in peripheral nerve function, metabolism, and antioxidative defense. *FASEB J* 16:123-125.
- Okamoto K, Imbe H, Morikawa Y, Itoh M, Sekimoto M, Nemoto K, Senba E (2002) 5-HT<sub>2A</sub> receptor subtype in the peripheral branch of sensory fibers is involved in the potentiation of inflammatory pain in rats. *Pain* 99:133-143.
- Olechowski CJ, Truong JJ, Kerr BJ (2009) Neuropathic pain behaviours in a chronic-relapsing model of experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE). *Pain* 141:156-164.
- Osterberg A, Boivie J, Thuomas KA (2005) Central pain in multiple sclerosis--prevalence and clinical characteristics. *Eur J Pain* 9:531-542.
- Owens T, Sriram S (1995) The immunology of multiple sclerosis and its animal model, experimental allergic encephalomyelitis. *Neurol Clin* 13:51-73.
- PAOLI F, DAR COURT G, COSSA P (1960) [Preliminary note on the action of imipramine in painful states.]. *Rev Neurol (Paris)* 102:503-504.
- Paulson PE, Casey KL, Morrow TJ (2002) Long-term changes in behavior and regional cerebral blood flow associated with painful peripheral mononeuropathy in the rat. *Pain* 95:31-40.



- Paulson PE, Morrow TJ, Casey KL (2000) Bilateral behavioral and regional cerebral blood flow changes during painful peripheral mononeuropathy in the rat. *Pain* 84:233-245.
- Pender MP (1986) Ascending impairment of nociception in rats with experimental allergic encephalomyelitis. *J Neurol Sci* 75:317-328.
- Perfettini JL, Kroemer G (2003) Caspase activation is not death. *Nat Immunol* 4:308-310.
- Perrot S, Kayser V, Fournie-Zaluski MC, Roques BP, Guilbaud G (1993) Antinociceptive effect of systemic PC 12, a prodrug mixed inhibitor of enkephalin-degrading enzymes, in normal and arthritic rats. *Eur J Pharmacol* 241:129-133.
- Pertovaara A (2000) Plasticity in descending pain modulatory systems. *Prog Brain Res* 129:231-242.
- Pertovaara A, Kauppila T (1989) Effect of chronic sciatic nerve section on saphenous nerve input to midline bulboreticular formation in the rat. *Neurosci Lett* 105:68-72.
- Pezet S, Cunningham J, Patel J, Grist J, Gavazzi I, Lever IJ, Malcangio M (2002a) BDNF modulates sensory neuron synaptic activity by a facilitation of GABA transmission in the dorsal horn. *Mol Cell Neurosci* 21:51-62.
- Pezet S, Malcangio M, Lever IJ, Perkinson MS, Thompson SW, Williams RJ, McMahon SB (2002b) Noxious stimulation induces Trk receptor and downstream ERK phosphorylation in spinal dorsal horn. *Mol Cell Neurosci* 21:684-695.
- Porreca F, Lai J, Bian D, Wegert S, Ossipov MH, Eglen RM, Kassotakis L, Novakovic S, Rabert DK, Sangameswaran L, Hunter JC (1999) A comparison of the potential role of the tetrodotoxin-insensitive sodium channels, PN3/SNS and NaN/SNS2, in rat models of chronic pain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:7640-7644.
- Porreca F, Ossipov MH, Gebhart GF (2002) Chronic pain and medullary descending facilitation. *Trends Neurosci* 25:319-325.
- Rahman W, Suzuki R, Webber M, Hunt SP, Dickenson AH (2006) Depletion of endogenous spinal 5-HT attenuates the behavioural hypersensitivity to mechanical and cooling stimuli induced by spinal nerve ligation. *Pain* 123:264-274.
- Ren K, Dubner R (2002) Descending modulation in persistent pain: an update. *Pain* 100:1-6.
- Rosen LB, Ginty DD, Weber MJ, Greenberg ME (1994) Membrane depolarization and calcium influx stimulate MEK and MAP kinase via activation of Ras. *Neuron* 12:1207-1221.
- Sandler SG, Tobin W, Henderson ES (1969) Vincristine-induced neuropathy. A clinical study of fifty leukemic patients. *Neurology* 19:367-374.
- Schwei MJ, Honore P, Rogers SD, Salak-Johnson JL, Finke MP, Ramnaraine ML, Clohisy DR, Mantyh PW (1999) Neurochemical and cellular reorganization of the spinal cord in a murine model of bone cancer pain. *J Neurosci* 19:10886-10897.

- Sedan R, Lazorthes Y, Verdier JC, Peragut JC, Bourrhis A, Carillo JP, Fanarier G, Lagarrigue J, Sarramon JP (1978) [Therapeutic electric neurostimulation]. *Neurochirurgie* 24 Suppl 1:1-138.
- Seiffers R, Mills CD, Woolf CJ (2007) ATF3 increases the intrinsic growth state of DRG neurons to enhance peripheral nerve regeneration. *J Neurosci* 27:7911-7920.
- Seltzer Z, Dubner R, Shir Y (1990) A novel behavioral model of neuropathic pain disorders produced in rats by partial sciatic nerve injury. *Pain* 43:205-218.
- Serrie A (2009) Pain: 10 years, that is enough! "Pain is not medically correct". *Douleurs* 10:1-3.
- Sindou M, Keravel Y (1980) [Pain relief through transcutaneous electrical nerve stimulation (TENS). Results on painful neurological disorders in 180 cases (author's transl)]. *Neurochirurgie* 26:153-157.
- Stein C, Schafer M, Machelska H (2003) Attacking pain at its source: new perspectives on opioids. *Nat Med* 9:1003-1008.
- Steinman L, Zamvil SS (2006) How to successfully apply animal studies in experimental allergic encephalomyelitis to research on multiple sclerosis. *Ann Neurol* 60:12-21.
- Stewart W, Maxwell DJ (2000) Morphological evidence for selective modulation by serotonin of a subpopulation of dorsal horn cells which possess the neurokinin-1 receptor. *Eur J Neurosci* 12:4583-4588.
- Suzuki R, Morcuende S, Webber M, Hunt SP, Dickenson AH (2002) Superficial NK1-expressing neurons control spinal excitability through activation of descending pathways. *Nat Neurosci* 5:1319-1326.
- Suzuki R, Rahman W, Hunt SP, Dickenson AH (2004) Descending facilitatory control of mechanically evoked responses is enhanced in deep dorsal horn neurones following peripheral nerve injury. *Brain Res* 1019:68-76.
- Suzuki R, Rahman W, Rygh LJ, Webber M, Hunt SP, Dickenson AH (2005) Spinal-supraspinal serotonergic circuits regulating neuropathic pain and its treatment with gabapentin. *Pain* 117:292-303.
- Svendsen KB, Jensen TS, Hansen HJ, Bach FW (2005) Sensory function and quality of life in patients with multiple sclerosis and pain. *Pain* 114:473-481.
- Svendsen KB, Jensen TS, Overvad K, Hansen HJ, Koch-Henriksen N, Bach FW (2003) Pain in patients with multiple sclerosis: a population-based study. *Arch Neurol* 60:1089-1094.
- Sweatt JD (2001) The neuronal MAP kinase cascade: a biochemical signal integration system subserving synaptic plasticity and memory. *J Neurochem* 76:1-10.
- Tandrup T, Woolf CJ, Coggeshall RE (2000) Delayed loss of small dorsal root ganglion cells after transection of the rat sciatic nerve. *J Comp Neurol* 422:172-180.

- Tanner KD, Levine JD, Topp KS (1998a) Microtubule disorientation and axonal swelling in unmyelinated sensory axons during vincristine-induced painful neuropathy in rat. *J Comp Neurol* 395:481-492.
- Tanner KD, Reichling DB, Gear RW, Paul SM, Levine JD (2003) Altered temporal pattern of evoked afferent activity in a rat model of vincristine-induced painful peripheral neuropathy. *Neuroscience* 118:809-817.
- Tanner KD, Reichling DB, Levine JD (1998b) Nociceptor hyper-responsiveness during vincristine-induced painful peripheral neuropathy in the rat. *J Neurosci* 18:6480-6491.
- Tanuma N, Shin T, Kogure K, Matsumoto Y (1999) Differential role of TNF-alpha and IFN-gamma in the brain of rats with chronic relapsing autoimmune encephalomyelitis. *J Neuroimmunol* 96:73-79.
- Thakor DK, Lin A, Matsuka Y, Meyer EM, Ruangsri S, Nishimura I, Spigelman I (2009) Increased peripheral nerve excitability and local NaV1.8 mRNA up-regulation in painful neuropathy. *Mol Pain* 5:14.
- Todorovic SM, Meyenburg A, Jevtovic-Todorovic V (2004) Redox modulation of peripheral T-type Ca<sup>2+</sup> channels in vivo: alteration of nerve injury-induced thermal hyperalgesia. *Pain* 109:328-339.
- Tokunaga A, Saika M, Senba E (1998) 5-HT<sub>2A</sub> receptor subtype is involved in the thermal hyperalgesic mechanism of serotonin in the periphery. *Pain* 76:349-355.
- Tomiyama M, Furusawa K, Kamijo M, Kimura T, Matsunaga M, Baba M (2005) Upregulation of mRNAs coding for AMPA and NMDA receptor subunits and metabotropic glutamate receptors in the dorsal horn of the spinal cord in a rat model of diabetes mellitus. *Brain Res Mol Brain Res* 136:275-281.
- Topp KS, Tanner KD, Levine JD (2000) Damage to the cytoskeleton of large diameter sensory neurons and myelinated axons in vincristine-induced painful peripheral neuropathy in the rat. *J Comp Neurol* 424:563-576.
- Tsubokawa T, Katayama Y, Yamamoto T, Hirayama T, Koyama S (1991a) Treatment of thalamic pain by chronic motor cortex stimulation. *Pacing Clin Electrophysiol* 14:131-134.
- Tsubokawa T, Katayama Y, Yamamoto T, Hirayama T, Koyama S (1991b) Chronic motor cortex stimulation for the treatment of central pain. *Acta Neurochir Suppl (Wien)* 52:137-139.
- Tsujino H, Kondo E, Fukuoka T, Dai Y, Tokunaga A, Miki K, Yonenobu K, Ochi T, Noguchi K (2000) Activating transcription factor 3 (ATF3) induction by axotomy in sensory and motoneurons: A novel neuronal marker of nerve injury. *Mol Cell Neurosci* 15:170-182.
- Van Steenwinckel J, Brisorgueil MJ, Fischer J, Verge D, Gingrich JA, Bourgoin S, Hamon M, Bernard R, Conrath M (2008) Role of spinal serotonin 5-HT<sub>2A</sub> receptor in 2',3'-dideoxycytidine-induced neuropathic pain in the rat and the mouse. *Pain* 137:66-80.

Van Steenwinckel J, Noghero A, Thibault K, Brisorgueil MJ, Fischer J, Conrath M (2009) The 5-HT<sub>2A</sub> receptor is mainly expressed in nociceptive sensory neurons in rat lumbar dorsal root ganglia. *Neuroscience* 161:838-846.

Vlug AS, Teuling E, Haasdijk ED, French P, Hoogenraad CC, Jaarsma D (2005) ATF3 expression precedes death of spinal motoneurons in amyotrophic lateral sclerosis-SOD1 transgenic mice and correlates with c-Jun phosphorylation, CHOP expression, somato-dendritic ubiquitination and Golgi fragmentation. *Eur J Neurosci* 22:1881-1894.

Vos BP, Benoist JM, Gautron M, Guilbaud G (2000) Changes in neuronal activities in the two ventral posterior medial thalamic nuclei in an experimental model of trigeminal pain in the rat by constriction of one infraorbital nerve. *Somatosens Mot Res* 17:109-122.

Vos BP, Strassman AM, Maciewicz RJ (1994) Behavioral evidence of trigeminal neuropathic pain following chronic constriction injury to the rat's infraorbital nerve. *J Neurosci* 14:2708-2723.

Wall PD, Devor M, Inbal R, Scadding JW, Schonfeld D, Seltzer Z, Tomkiewicz MM (1979) Autotomy following peripheral nerve lesions: experimental anaesthesia dolorosa. *Pain* 7:103-111.

Wang H, Sun H, Della PK, Benz RJ, Xu J, Gerhold DL, Holder DJ, Koblan KS (2002) Chronic neuropathic pain is accompanied by global changes in gene expression and shares pathobiology with neurodegenerative diseases. *Neuroscience* 114:529-546.

Wei F, Zhuo M (2008) Activation of Erk in the anterior cingulate cortex during the induction and expression of chronic pain. *Mol Pain* 4:28.

Weiss N, De Waard M (2006) Les canaux calciques dépendants du voltage au cœur de la douleur. *Médecine Sciences* 22:396-404.

Weng HR, Cordella JV, Dougherty PM (2003) Changes in sensory processing in the spinal dorsal horn accompany vincristine-induced hyperalgesia and allodynia. *Pain* 103:131-138.

Wilson RH, Lehky T, Thomas RR, Quinn MG, Floeter MK, Grem JL (2002) Acute oxaliplatin-induced peripheral nerve hyperexcitability. *J Clin Oncol* 20:1767-1774.

Woolf CJ (1984) Transcutaneous and implanted nerve stimulation. Edinburgh.

Wu S, Zhu M, Wang W, Wang Y, Li Y, Yew DT (2001) Changes of the expression of 5-HT receptor subtype mRNAs in rat dorsal root ganglion by complete Freund's adjuvant-induced inflammation. *Neurosci Lett* 307:183-186.

Yamamura T, Namikawa T, Endoh M, Kunishita T, Tabira T (1986) Experimental allergic encephalomyelitis induced by proteolipid apoprotein in Lewis rats. *J Neuroimmunol* 12:143-153.

Yang Y, Wang Y, Li S, Xu Z, Li H, Ma L, Fan J, Bu D, Liu B, Fan Z, Wu G, Jin J, Ding B, Zhu X, Shen Y (2004) Mutations in SCN9A, encoding a sodium channel alpha subunit, in patients with primary erythralgia. *J Med Genet* 41:171-174.

Yoshimura M, Yonehara N (2006) Alteration in sensitivity of ionotropic glutamate receptors and tachykinin receptors in spinal cord contribute to development and maintenance of nerve injury-evoked neuropathic pain. *Neurosci Res* 56:21-28.