

Université de Montréal

**Administration de [6]-gingérol intrathécal pour le
traitement de la douleur neuropathique chez le rat mâle
Sprague-Dawley**

par

Marie-Lou Gauthier

Département de biomédecine vétérinaire

Faculté de médecine vétérinaire

Mémoire présenté à la Faculté de médecine vétérinaire

en vue de l'obtention du grade de

maître ès Sciences (M. Sc.)

en sciences vétérinaires

option pharmacologie

Avril 2014

© Marie-Lou Gauthier, 2014

Université de Montréal

Ce mémoire intitulé

**Administration de [6]-gingérol intrathécal pour le
traitement de la douleur neuropathique chez le rat mâle
Sprague-Dawley**

par

Marie-Lou Gauthier

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes

Dr Younès Chorfi, Président-rapporteur

Dr Francis Beaudry, Directeur de recherche

Dr Pascal Vachon, Codirecteur de recherche

Dr Paul Carrière, Membre du jury

Résumé

Le [6]-gingérol est un analogue structurel de la capsaïcine, une molécule agoniste au récepteurs TRPV1 et ayant des propriétés thérapeutiques connues dans le traitement de la douleur. Deux objectifs principaux ont été poursuivis lors de la réalisation de ce projet de recherche. D'abord, établir une meilleure caractérisation du métabolisme du [6]-gingérol chez le rat. Pour ce faire, une méthode sensible et spécifique pour la quantification du [6]-gingérol et ses métabolites par HPLC-ESI/MS/MS a été développée. Une étude de stabilité métabolique *in vitro* utilisant des microsomes hépatiques de rats a ensuite été réalisée. Les résultats démontrent une dégradation lente avec un temps de demi-vie de 163 minutes et une clairance intrinsèque relativement basse de 0.0043 mL/min. D'autres analyses ont ensuite été effectuées pour caractériser les métabolites *in vitro* et *in vivo*. Trois principaux métabolites de phase I et quatre métabolites de phase II ont été identifiés par HPLC-MS/MS et HPLC-MSD TOF. Les résultats suggèrent que le principal métabolite excrété dans l'urine est un glucuronide du [6]-gingérol hydroxylé.

Le second objectif de ce projet était de déterminer l'effet central du [6]-gingérol sur la douleur neuropathique lorsqu'injecté par voie intrathécale. La distribution de la molécule a d'abord été évaluée suite à une administration intra-péritonéale de 40 mg/kg de [6]-gingérol et les ratios des concentrations cerveau-plasma et moelle épinière-plasma (0.73 et 1.7, respectivement) suggèrent que le [6]-gingérol se distribue efficacement au niveau du système nerveux central. Une injection intrathécale de 10 µg de [6]-gingérol a été effectuée chez les rats suite à l'induction de douleur par la pose de ligatures au niveau du nerf sciatique. Les résultats suggèrent une réduction significative de l'allodynie mécanique et de l'hyperalgésie thermique à 30 min, 2 h et 4 h suivant l'injection ($p < 0.05$, $p < 0.01$ et $p < 0.001$).

Le [6]-gingérol se distribue donc adéquatement au niveau du système nerveux central des rats, permettant une action au niveau des récepteurs TRPV1. Ainsi, le [6]-gingérol pourrait soulager la douleur neuropathique en agissant centralement au niveau de la moelle épinière.

Mots-clés : [6]-gingérol, métabolisme, spectrométrie de masse, douleur neuropathique, pharmacocinétique, rats.

Abstract

[6]-Gingerol is a structural analog of capsaicin, an agonist of the transient receptor potential channel vanilloid 1, which is known to have therapeutic properties for the treatment of pain. Based on this premise, this research project had two main objectives. The first objective was to establish a better characterization of [6]-gingerol metabolism in rat. A selective and sensitive method for the quantification of [6]-gingerol and its metabolites by HPLC-ESI/MS/MS was first developed. An *in vitro* metabolic stability study using rat liver microsomes was then performed. The results show slow degradation with a $T_{1/2}$ of 163 min and a relatively low intrinsic clearance of 0.0043 mL/min. Further analyses were performed to characterize *in vitro* and *in vivo* metabolites. Three main phase I metabolites and four phase II metabolites were identified by HPLC-MS/MS and HPLC-MSD TOF. The results suggest that glucuronidation of hydroxylated [6]-gingerol is the primary metabolite excreted in urine.

The second objective of this study was to determine the central effect of [6]-gingerol on neuropathic pain when injected intrathecally at the level of the lumbar spinal cord. [6]-Gingerol distribution was evaluated following a 40 mg/kg intraperitoneal injection, and the brain-to-plasma and spinal cord-to-plasma ratios (0.73 and 1.7, respectively) suggest that [6]-gingerol has a good distribution in the central nervous system of rats. Induction of pain was performed using the sciatic nerve ligation model on rats. Following the surgery, a 10- μ g intrathecal injection of [6]-gingerol was performed to evaluate its central effect. The results suggest a significant decrease of secondary mechanical allodynia assessed with the Von Frey filaments after 30 min, 2 h and 4 h ($p < 0.05$, $p < 0.01$ and $p < 0.001$) and thermal hyperalgesia assessed with the Hargreave's test after 30 min, 2 h and 4 h ($p < 0.05$, $p < 0.01$ and $p < 0.01$).

In conclusion, [6]-gingerol has a good distribution in the central nervous system of rats, suggesting a possible interaction with the TRPV1 receptors. [6]-Gingerol could therefore alleviate neuropathic pain by acting centrally at the level of the spinal cord and be an interesting alternative to the traditional molecules currently used in pain management.

Keywords: [6]-gingerol, metabolism, mass spectrometry, neuropathic pain, pharmacokinetics, rats.

Table des matières

Résumé.....	iii
Abstract.....	iv
Table des matières.....	v
Liste des tableaux.....	viii
Liste des figures.....	ix
Liste des sigles et des abréviations.....	xii
Dédicace.....	xvii
Remerciements.....	xviii
Introduction.....	1
Chapitre 1 : Recension de la littérature.....	4
1. Le [6]-gingérol.....	4
1.1 Historique.....	4
1.2 Propriétés pharmacologiques.....	5
1.3 Propriétés pharmacocinétiques.....	6
1.4 Modes d'action.....	10
1.4.1 <i>Action anti-inflammatoire.....</i>	<i>10</i>
1.4.2 <i>Action anti-oxydante.....</i>	<i>11</i>
1.4.3 <i>Action analgésique.....</i>	<i>11</i>
1.5 Structure moléculaire.....	12
2. Les récepteurs vanilloïdes.....	14
2.1 Les nocicepteurs.....	14
2.2 Caractérisation et localisation des récepteurs vanilloïdes.....	14
2.3 Les récepteurs TRPV1.....	15
2.4 Les molécules agonistes et antagonistes au TRPV1.....	18
2.4.1 <i>Propriétés pharmacologiques de la capsaïcine.....</i>	<i>19</i>
2.4.2 <i>Propriétés pharmacologiques de l'eugénol.....</i>	<i>20</i>
2.4.3 <i>Propriétés pharmacologiques de la vanilline.....</i>	<i>21</i>
3. La douleur.....	22

3.1 Définition.....	22
3.2 Différents types de douleur.....	24
3.3 Fonctionnement de la nociception.....	25
3.4 L’hyperalgésie et l’allodynie.....	28
3.5 Neurotransmetteurs impliqués dans la transmission de la douleur.....	31
3.6 Traitements actuels.....	35
3.7 Les modèles animaux.....	39
3.7.1 <i>Spécificités du modèle CCI</i>	40
3.8 Les tests d’évaluation de la douleur.....	42
3.8.1 <i>Évaluation de l’hyperalgésie thermique</i>	42
3.8.2 <i>Évaluation de l’allodynie mécanique</i>	43
3.8.3 <i>Évaluation de la coordination motrice</i>	44
Chapitre 2 : Objectifs et hypothèses.....	45
Chapitre 3 : Articles.....	47
1. Premier article	47
1.1 Abstract.....	48
1.2 Introduction.....	48
1.3 Materials and methods.....	50
1.4 Results and discussion.....	54
1.5 Conclusion.....	57
1.6 Acknowledgements.....	58
1.7 References.....	58
1.8 Tables.....	62
1.9 Figures.....	63
2. Deuxième article	70
2.1 Abstract.....	71
2.2 Introduction.....	71
2.3 Materials and methods.....	72
2.4 Results and discussion.....	74
2.5 Acknowledgements.....	76
2.6 References.....	76

2.7 Figures.....	78
Chapitre 4 : Discussion générale.....	81
1. Caractérisation du métabolisme du [6]-gingérol.....	82
2. Distribution du [6]-gingérol dans le système nerveux central.....	85
3. Traitement de la douleur neuropathique par le [6]-gingérol.....	86
4. Élimination des facteurs confondants.....	89
5. Histologie.....	90
6. Limites et perspectives.....	90
Conclusion.....	93
Bibliographie.....	94

Liste des tableaux

Recension de la littérature

Tableau I : Propriétés pharmacocinétiques du [6]-gingérol obtenues dans la littérature. Source : information tirée de (Ding et al., 1991; Jiang et al., 2008; Naora et al., 1992; Wang et al., 2009a, b).....9

Tableau II : Médicaments utilisés dans le traitement de la douleur neuropathique. Source : information tirée de (Beaulieu and ebrary Inc., 2005; Moulin et al., 2007).....36

Premier article

Table I : Exact mass determination of [6]-gingerol metabolites using HPLC/MSD TOF.....62

Liste des figures

Recension de la littérature

<u>Figure 1</u> : Structure moléculaire de différentes molécules de la famille des vanilloïdes.....	13
<u>Figure 2</u> : Les activateurs du récepteur TRPV1. <u>Source</u> : modifiée de (Anand and Bley, 2011).....	17
<u>Figure 3</u> : Les voies de la douleur. <u>Source</u> : modifiée de (Beaulieu and ebrary Inc., 2005).....	23
<u>Figure 4</u> : Hyperalgésie primaire. <u>Source</u> : modifiée de (Beaulieu and ebrary Inc., 2005; Julius and Basbaum, 2001).....	29
<u>Figure 5</u> : Hyperalgésie secondaire. <u>Source</u> : modifiée de (Beaulieu and ebrary Inc., 2005; Dickenson et al., 1997).....	30
<u>Figure 6</u> : Les molécules impliquées dans la transmission de la douleur. <u>Source</u> : modifiée de (Milligan and Watkins, 2009).....	34
<u>Figure 7</u> : Représentation graphique du modèle de Bennett et Xie. <u>Source</u> : modifiée de (Hogan, 2002).....	40
<u>Figure 8</u> : Chirurgie de constriction du nerf sciatique selon le modèle de Bennett et Xie.....	41
<u>Figure 9</u> : Animaux en position pour le test de Hargreaves.	42
<u>Figure 10</u> : Test de filaments de Von Frey.....	43
<u>Figure 11</u> : Rotarod treadmill.....	44

Premier article

Figure 1 : Molecular structure of [6]-gingerol and capsaicin.....63

Figure 2 : Determination of Michaelis constant K_m using non-linear regression fitting.....64

Figure 3 : Depletion profile of [6]-gingerol in pooled rat liver microsomes. Data presented in a linear scale and each point represents the mean (\pm SD) of six replicate determinations.....65

Figure 4 : Identification of major phase 1 metabolites excreted in rat microsomes. (a) Full-scan total ion chromatogram (m/z 150–350). (b) Extracted ion chromatogram of m/z 295. (c) Extracted ion chromatogram of m/z 277. (d) Extracted ion chromatogram of m/z 293. (e) Extracted ion chromatogram of m/z 311.....66

Figure 5 : Identification of major phase 1 metabolites excreted in rat urine. (a) Full-scan total ion chromatogram (m/z 150–350). (b) Product ion spectra of m/z 295. (c) Product ion spectra of m/z 277. (d) Product ion spectra of m/z 311.....67

Figure 6 : Identification of major phase 2 metabolites excreted in rat urine. (a) Full-scan total ion chromatogram (m/z 150–650). (b) Product ion spectra of m/z 471. (c) Product ion spectra of m/z 469. (d) Product ion spectra of m/z 487.....68

Figure 7 : Observed [6]-Gingerol biotransformation pathway in Sprague–Dawley rat.....69

Deuxième article

Figure 1 : Mean (\pm SEM) concentration profiles of [6]-gingerol in plasma, brain and lumbar spinal cord following an intraperitoneal administration (40 mg/kg) in male Sprague-Dawley rats ($n = 3$ animals/time point).....79

Figure 2 : Mechanical allodynia and thermal hyperalgesia assessments in Sprague-Dawley rats ($n=8$). (A) Mean (\pm SEM) mechanical sensitivity was tested using Von Frey filaments prior surgery (P1 to P3) and following CCI surgery of the right leg (the left leg was unaffected) on 10

days (N1 to N10) following 48 h recovery. (B) Mean (\pm SEM) withdrawal threshold of neuropathic baseline (N6 to N10) were compared to withdrawal thresholds following cyclodextrin formulation (placebo) and 10 μ g [6]-gingerol intrathecal administration as well as daily thresholds for the 3 days following the gingerol administration (PG). (C) Mean (\pm SEM) thermal sensitivity was tested using the Hargreave's test prior to surgery (P1 to P3) and following CCI surgery of the right leg (the left leg was unaffected) on 10 days (N1 to N10) following 48 h recovery. (D) Mean (\pm SEM) withdrawal time of neuropathic baseline (N6 to N10) were compared to withdrawal thresholds following cyclodextrin formulation (placebo) and 10 μ g [6]-gingerol intrathecal administration as well as daily thresholds for the 3 days following the gingerol administration (PG).....80

Liste des sigles et des abréviations

AAHA : American Animal Hospital Association

ad libitum : à volonté

ADN : Acide désoxyribonucléique

ADP : Adénosine-di-phosphate

AMP : Adenosine-mono-phosphate

AMPA : α -amino-3-hydroxy-5-méthyl-isoxazole propionate

ANOVA : analysis of variance

Apaf-1 : Apoptotic peptidase activating factor 1

ATP : Adénosine-tri-phosphate

AUC : Area under the curve

AUC_{0-inf} : Area under the curve extrapolated to infinity

AUC_{0-t} : Area under the curve from time 0 to the last measurable plasmatic concentration

Bcl-2 : B-cell lymphoma 2

BDNF : Brain derived growth factor

bFGF : basic fibroblast growth factor

CB1 : Cannabinoid receptor type 1

CB2 : Cannabinoid receptor type 2

CGRP : Calcitonin gene-related peptid

Ca²⁺ : Calcium

CCI : Chronic constriction injury model

CL : Clairance

CL_i : Clairance intrinsèque

C_{max} : Concentration plasmatique maximale

CMH-2 : Complexe majeur d'histocompatibilité 2

CNS : Central nervous system

COX-1 : Cyclo-oxygénase 1

COX-2 : Cyclo-oxygénase 2

CV : Coefficient of variance

Da : Dalton

DRG : Dorsal root ganglia

ERK : Extracellular signal-regulated kinase

etc : Et cetera

F : Biodisponibilité

FDA : Food and Drug Administration

g : gramme

G : Gauge

GABA : Acide gaba-aminobutyrique

GCD : Ganglion de la corne dorsale

GLAST : Glutamate/Aspartate transporter

GLT1 : Glutamate transporter type 1

h : heure

H₁ : Récepteur à l'histamine 1

HepG2 : Human hepatocellular carcinoma cell line

HPLC : High performance liquid chromatography

HPLC-MS/MS : High performance liquid chromatography – tandem mass spectrometry

HPLC-ESI/MS/MS : High performance liquid chromatography / electrospray ionization tandem mass spectrometry

IASP : International Association for the Study of Pain

IL-1 β : Interleukine 1 beta

IL-6 : Interleukine 6

IL-10 : Interleukine 10

IL-12 : Interleukine 12

iNOS : inducible nitric oxide synthase

Ins(1,4,5)P₃ : Inositol-1,4,5-triphosphate

interferon γ : interferon gamma

IP : Intra péritonéal

IT : Intrathécal

IV : Intra veineux

JCAHO : Joint Commission on Accreditation of Healthcare Organizations

JNK : c-Jun-N-terminal kinase
kg : kilogramme
 K_m : Michaelis constant
KO : Knock-out
L : Litre
LC/MSD TOF : Time-of-flight mass spectrometer
LD₅₀ : Lethal dose 50 per cent, median lethal dose
LPS : Lipopolysaccharide
L5, L6 : nerfs lombaire 5 et 6
L6, L7 vertebrae : vertèbres lombaires 6 et 7
m : mètre
MA : Massachusetts
MAPK : Mitogen-activated protein kinase
mg: milligramme
 Mg^{2+} : Magnésium
mGluR : metabotropic glutamate receptor
min : minute
mL : millilitre
MO : Missouri
ms : milliseconde
MS : Mass spectrometry
MUC5AC : nom d'un gène
m/z : rapport masse/charge
n : nombre de sujet dans un groupe
NADPH : Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate
NF- κ B : Nuclear factor kappa B
ng : nanogramme
NGF : Nerve growth factor
NJ : New Jersey
NK1 : Neurokinine de type 1
NMDA : N-méthyl-D-aspartate

NO : Nitric oxide

NRM : Nucleus raphe magnus

NSERC : Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada

NY : New York

p : niveau statistiquement significatif

P2X3 : Purinorécepteurs 3

P-gps : P-glycoproteins

pH : mesure de l'acidité d'une solution

phase G1 : phase growth 1

PO : *per os*

ppm : parti par million

psi : pound per square inch

QC : Québec

r : coefficients of correlation

RAW 264.7 : mouse leukaemic monocyte macrophage cell line

RTX : Résinifératoxine

s : seconde

SE : Standard error

SEM : Standard error of the mean

SGPA : Substance grise périaqueducule

SNC : Système nerveux central

SRM : Selected reaction-monitoring mode

T_{max} : Time to maximum plasma concentration

TNF α : Tumor necrosis factor alpha

TRAIL : Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand

TRP : Transient Receptor Potential

TRPA1 : Transient Receptor Potential cation channel, subfamily A, member 1

TRPV1 : Transient Receptor Potential Vanilloid type 1

TRPV2 : Transient Receptor Potential Vanilloid type 2

TRPV3 : Transient Receptor Potential Vanilloid type 3

TRPV4 : Transient Receptor Potential Vanilloid type 4

TRPM8: Transient Receptor Potential Melastatin 8

$t_{1/2}$: temps de demi-vie

T13 : vertèbre thoracique 13

UDPGA : Uridine diphosphate glucuronic acid

USA : United States of America

UVB : Ultraviolet B

v : volume

V : Volt

VEGF : Vascular endothelial growth factor

VGCC : Voltage gated calcium currents

V_i : initial velocity

VR1: Vanilloid receptor 1

w : weight

WDR : Wide dynamic range

ZTX42 : rac-2-hydroxy-1-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)dodecan-3-one

$1\kappa\text{B-}\alpha$: Protéine 1 kappa B - alpha

5-HT3 : Récepteur sérotoninergique de type 3

[6]-DPH : rac-[6]-dihydroparadol

α_2 -adrénergiques : Récepteurs alpha 2 adrénergiques

β -glucuronidases : beta-glucuronidases

μg : microgramme

μL : microlitre

μM : micromolaire

$^{\circ}\text{C}$: degré Celsius

% : per cent

% CV : Coefficient de variation

% NOM : Pourcentage nominal

Dédicace

À Ginette et Jocelyn,

À Marie-Hélène et Vanessa,

À Ana et Katie.

Remerciements

Mes sincères remerciements au Dr Francis Beaudry pour son aide, son support, ses encouragements et son extrême patience. Merci aussi Francis d'avoir partagé avec moi ta passion pour la recherche. Tu as été un mentor dévoué et disponible tout au long de cette aventure et merci d'y avoir cru jusqu'à la fin.

Merci au Dr Pascal Vachon pour son aide, son enthousiasme, son humour, son support et sa patience. Vous m'avez enseigné non seulement la médecine des animaux de laboratoire mais également l'amour d'un métier et l'art d'avoir du plaisir en travaillant. Merci sincèrement.

Merci à Jennifer Douat pour son aide et son support. Merci Jennifer d'avoir accepté de m'aider dans ce projet et d'avoir rendu les journées de travail tellement plus agréables.

Merci au Dres Vanessa Lalonde-Robert et Marie-Hélène Dumur pour la motivation et pour avoir toujours cru en moi et supporté mes choix, même les plus fous.

Merci à mes parents, Ginette et Jocelyn pour le support et l'amour inconditionnel.

Finalement, merci à Bonzaï et Mistigris, mon chien et mon chat, mes deux complices de toujours qui nous ont tous deux quittés récemment. Vous resterez toujours dans mon cœur.

Introduction

La douleur neuropathique est une condition commune qui affecte environ 2 à 3% de la population vivant dans les pays industrialisés. Au Canada, il est estimé qu'environ un million de personnes souffrirait de ce type de douleur (Moulin et al., 2007). La douleur neuropathique se définit comme étant une douleur provenant d'une atteinte directe du système nerveux central ou périphérique (Dworkin et al., 2003). Elle est généralement perçue comme une sensation de douleur généralisée inexplicable, un déficit sensoriel, une sensation de brûlure ou le développement d'hyperalgésie et/ou d'allodynie. L'hyperalgésie se définit comme une réponse exagérée suite à une stimulation normalement douloureuse tandis que l'allodynie se définit plutôt comme la perception de douleur suite à un stimulus non-douloureux (Marchand, 2005; Parenti et al., 2012). La douleur neuropathique peut perdurer plusieurs mois et peut également perdurer malgré la résolution de la condition qui a occasionnée la douleur initialement (Milligan and Watkins, 2009). La douleur chronique, quant à elle, se définit comme une douleur qui persiste au-delà du temps attendu de guérison, peu importe son origine. Il peut également s'agir d'une douleur persistante causée par une condition dont la guérison n'a pas eu lieu ou une condition qui a guéri puis récidivé (Price and Nolan, 2007). Les douleurs chroniques regroupent plusieurs types de douleurs dont la douleur neuropathique.

Les gens atteints de douleur chronique ou neuropathique voient souvent leur qualité de vie diminuer grandement et sont souvent contraints de consommer des médicaments pour des périodes de temps prolongées. Ces médicaments peuvent également parfois avoir des effets secondaires néfastes affectant aussi la qualité de vie ou tout simplement être inefficaces pour certains individus. Le développement de nouvelles stratégies thérapeutiques pour le soulagement de la douleur neuropathique demeure donc toujours un sujet d'actualité et d'importance.

Depuis plusieurs années, la douleur chronique est également devenue un phénomène de plus en plus reconnu chez les animaux. En 2003, l'AAHA (American Animal Hospital Association) a par ailleurs ajouté la douleur comme quatrième signe vital à reconnaître chez les

animaux (Hellyer et al., 2007). Les vétérinaires sont donc désormais plus que jamais appelés à reconnaître et tenter de soulager la douleur chez leurs patients. Il est donc possible de noter que le soulagement de la douleur est un enjeu dans toutes les sphères de la santé, aussi bien humaine qu'animale.

Des molécules de la famille des vanilloïdes, telles l'eugénol et la vanilline, ont déjà été démontrées comme possédant un potentiel intéressant dans le traitement de la douleur neuropathique chez le rat (Beaudry et al., 2010; Lionnet et al., 2010). Ces molécules provenant de substances et d'épices naturelles telles le clou de girofle et la vanille, il est possible de penser que leurs effets secondaires pourraient être moindres qu'avec des molécules synthétiques. Le [6]-gingérol, principal constituant du gingembre, est également une molécule faisant partie de la famille des vanilloïdes. La capsaïcine, aussi une molécule membre de la famille des vanilloïdes, est un agoniste connu aux récepteurs TRPV1 (Caterina et al., 1997). Ces récepteurs jouent un rôle important dans le développement de la douleur et sont présents au niveau du système nerveux central et périphérique. À la lumière de ces informations, le potentiel analgésique du [6]-gingérol, par une action possible au niveau des récepteurs TRPV1, mérite d'être étudié plus en détail lors d'une administration de la molécule directement au niveau du système nerveux central.

Ce projet de maîtrise s'inscrit dans la continuité d'expériences précédemment réalisées sur des molécules membres de la famille des vanilloïdes afin d'élucider plus précisément la biodisponibilité, ou fraction de la substance administrée qui atteint la circulation sanguine sous forme inchangée, la distribution et le lieu d'action du [6]-gingérol. L'action centrale de cette molécule sur la douleur neuropathique sera également étudiée suite à une administration directement au niveau du système nerveux central.

Afin de réaliser ce projet, dans un premier temps, nous avons développé une méthode sensible, précise, exacte et spécifique pour la quantification du [6]-gingérol et ses métabolites par HPLC-ESI/MS/MS. Cette méthode analytique nous a permis de caractériser de manière précise les paramètres pharmacocinétiques du [6]-gingérol, étant donné les paramètres discordants précédemment retrouvés dans la littérature. Une étude du métabolisme *in vitro*

utilisant des microsomes hépatiques de rats a par la suite été réalisée afin de déterminer la stabilité métabolique de la molécule, car il est déjà connu que plusieurs molécules de la famille des vanilloïdes ont une faible stabilité métabolique, ce qui réduit considérablement l'exposition de l'animal au médicament (Beaudry and Vachon, 2009). La stabilité métabolique est un facteur important pour le maintien des concentrations systémiques et pour permettre un effet thérapeutique prolongé. L'absorption, la distribution, le métabolisme et l'élimination du médicament doivent être bien caractérisés afin de mieux comprendre la relation dose, concentration et effet. Cette relation est centrale à l'utilisation thérapeutique des médicaments.

Dans un autre volet expérimental, nous avons étudié l'effet central du [6]-gingérol sur le soulagement de la douleur neuropathique. Pour ce faire, nous avons utilisé le modèle chirurgical de constriction chronique du nerf sciatique de Bennett. Ce modèle est validé et largement utilisé pour induire et étudier la douleur neuropathique chez le rat (Bennett and Xie, 1988). Afin de nous assurer du développement de la neuropathie ainsi que d'évaluer l'effet de la molécule, nous avons employé deux tests comportementaux, les filaments de von Frey et le test de Hargreaves, réalisés avant et après la chirurgie, permettant d'évaluer l'allodynie mécanique et l'hyperalgésie thermique, respectivement. Ces évaluations serviront spécifiquement à valider les propriétés analgésiques du [6]-gingérol au niveau central. L'utilisation du [6]-gingérol en tant qu'analgésique est potentiellement une alternative très intéressante aux traitements actuels utilisés pour soulager la douleur, particulièrement à cause du peu d'effet indésirable occasionné par la molécule, et ce même à très forte dose.

L'ensemble des travaux réalisés dans le cadre de ce projet de recherche a fait évoluer les connaissances sur les propriétés pharmacocinétiques et pharmacodynamiques du [6]-gingérol lorsqu'administré par voie intrathécale chez des rats mâles Sprague-Dawley. Les résultats obtenus permettent également de confirmer le potentiel intéressant des récepteurs TRPV1 comme nouvelles cible thérapeutiques, justifiant d'avantage d'études sur le sujet. Ce projet a finalement permis de mettre en lumière le potentiel analgésique du [6]-gingérol afin de développer de nouvelles stratégies de traitement de la douleur neuropathique qui seraient plus efficaces et possédant moins d'effets secondaires.

Chapitre 1 : Recension de la littérature

1. Le [6]-gingérol

1.1 Historique

Déjà au 16^e siècle, les populations indiennes et chinoises consommaient le rhizome du gingembre (*Zingiber officinale* Roscoe) autant pour ces propriétés en médecine traditionnelle orientale qu'en tant qu'épice (Hickok et al., 2007; Wang et al., 2009a). En effet, des références à l'utilisation du gingembre ont été retrouvées dans des textes anciens chinois et sanskrit (une ancienne langue indo-européenne parlée autrefois dans le sous-continent indien) ainsi que dans la littérature médicale grecque, romaine et arabe (Zick et al., 2008). Le gingembre est issu d'une plante qui pousse principalement en Asie et dans les régions tropicales (White, 2007). Celui-ci était employé en médecine traditionnelle chinoise entre autres pour ses vertus dans le soulagement de l'arthrite, des rhumatismes, des entorses, des douleurs musculaires et de la douleur en générale. Il était également employé pour traiter les maux de gorge, les crampes, la constipation, les indigestions et vomissements, le mal des transports, l'hypertension, la démence, la fièvre et certaines maladies infectieuses bactériennes, virales et parasitaires (Ali et al., 2008; Brown et al., 2009; Chrubasik et al., 2005). En plus, déjà à cette époque, on reconnaissait des propriétés antispasmodiques, antiplaquettaires, anti-oxydantes, anti-inflammatoires, immunomodulatrices, cardiotoniques et anticonvulsivantes à cette plante (Beg et al., 2008; Bhattarai et al., 2001; Bhattarai et al., 2007; Naora et al., 1992). Finalement, dans les dernières années, les chercheurs se sont surtout intéressés aux propriétés chimiopréventives du gingembre, étant donné ses actions anti-oxydante et anti-inflammatoire (Brown et al., 2009; Chrubasik et al., 2005). Encore aujourd'hui, le gingembre est d'intérêt en recherche afin de valider ses utilisations ancestrales car il demeure une des épices possédant le plus de bienfaits et étant la plus fréquemment consommée à travers le monde (Lee et al., 2009). De plus, la US Food and Drug Administration (FDA) considère le gingembre comme un additif alimentaire "generally recognized as safe (GRAS)" (généralement reconnue sécuritaire) à cause de sa source naturelle démontrant peu de toxicité (Park et al., 2008; White, 2007).

Les principales molécules donnant au gingembre son goût relevé sont les gingérols (Pfeiffer et al., 2006; Zick et al., 2008), une série homologue de phénols (Ali et al., 2008) se différenciant selon la longueur de leur chaîne alkyl (Pfeiffer et al., 2006; Zick et al., 2008). Ces composés phénoliques sont synthétisés par les plantes pour les protéger contre le stress photosynthétique et les radicaux libres grâce, entre autres, à leur propriété anti-oxydante (Park et al., 2006b). Ces composés protègent aussi les plantes contre les blessures par les herbivores car certains mammifères sont sensibles à ces composés phénoliques et lorsqu'ils en ingèrent, peuvent développer un dessèchement de la bouche et une baisse de fertilité. De plus, ces composés procurent aux plantes un arôme et un parfum particuliers qui participent également à éloigner les herbivores (Yang et al., 2001). Ces molécules sont retrouvées surtout dans les racines de gingembre fraîches tandis que la forme déshydratée, les shogaols, se retrouvent dans le gingembre séché ou suite à l'entreposage ou un processus de chauffage des gingérols (Bhattarai et al., 2001; Bhattarai et al., 2007; Sang et al., 2009; Zick et al., 2008). Les concentrations de gingérols et de shogaols retrouvées dans un produit dépendent du type de gingembre, de la partie de la plante utilisée et de la formulation du produit (Brown et al., 2009). Parmi le groupe des gingérols, la molécule la plus abondante et pharmacologiquement active est le [6]-gingérol (Ali et al., 2008; Pfeiffer et al., 2006; Zick et al., 2008).

1.2 Propriétés pharmacologiques

Le [6]-gingérol a suscité de l'intérêt dans les dernières années et a été étudié pour valider plusieurs de ses propriétés présumées. D'abord, l'activité antiémétique du gingérol par antagonisme du récepteur 5-HT₃ (Abdel-Aziz et al., 2006) et par diminution des retards de vidange gastrique chez des patients adultes souffrant d'un syndrome de détresse respiratoire (Shariatpanahi et al., 2010) a été étudiée. Par la suite, cette activité antiémétique a été appliquée à la nausée induite par la chimiothérapie chez des patients atteints de cancer (Hickok et al., 2007; Qian et al., 2010). Aussi, des propriétés antidiabétiques, hypolipidémiques, hypoglycémiques et hypocholestérolémiques lui ont été attribuées (Al-Amin et al., 2006). Le [6]-gingérol s'est aussi révélé avoir un possible effet anti-hypersécrétoire via la suppression de l'expression du gène MUC5AC induite par l'interleukine-1 β dans les cellules épithéliales des voies respiratoires des humains (Kim et al., 2009). Ses actions antibactériennes contre

Helicobacter pylori (Chrubasik et al., 2005; Park et al., 2006b) et contre des bactéries responsables de parodontite (Park et al., 2008); antifongiques contre *Candida albicans* (Chrubasik et al., 2005); antiparasitaires contre *Angiostrongylus cantonensis*, *Dirofilaria immitis*, *Anisakis larvae* et *simplex* (Lin et al., 2010a; Lin et al., 2010b) ont aussi été rapportées. Ses propriétés anti-inflammatoires (Aktan et al., 2006), anti-génotoxiques prévenant les atteintes du génome (Beg et al., 2008), anti-carcinogéniques (Brown et al., 2009; Ishiguro et al., 2007; Jeong et al., 2009; Lee et al., 2008b; Nigam et al., 2010; Yagihashi et al., 2008), anti-oxydantes (Dugasani et al., 2010; Kim et al., 2007; Nigam et al., 2009) et analgésique (Young et al., 2005) ont aussi été démontrées et seront détaillées plus loin. L'administration systémique de [6]-gingérol a aussi été étudiée en relation avec sa capacité de causer de l'hypothermie chez des rats suite à une diminution du taux métabolique des animaux après une injection intrapéritonéale (25 mg/kg). Une interaction entre le [6]-gingérol et les mécanismes de thermorégulation a été avancée pour expliquer ce phénomène (Ueki et al., 2008).

1.3 Propriétés pharmacocinétiques

Plusieurs études ont été menées sur les propriétés pharmacocinétiques du [6]-gingérol (Ding et al., 1991; Jiang et al., 2008; Naora et al., 1992; Wang et al., 2009a, b). Celle-ci semble suivre un modèle à deux compartiments (Ding et al., 1991; Jiang et al., 2008). Les résultats obtenus sont présentés dans le tableau 1. Cependant, il demeure pertinent de s'interroger sur la pharmacocinétique de cette molécule car certaines disparités, entre autres au niveau de la clairance, de l' AUC_{0-inf} et de la demi-vie de la molécule apparaissent entre des études au design expérimental similaire (Ding et al., 1991; Naora et al., 1992). De plus, certaines études ont été effectuées avec des mixtures et non du [6]-gingérol pur. Il pourrait donc y avoir des influences des autres composantes de la mixture sur les propriétés pharmacocinétiques du [6]-gingérol, au niveau de la libération de la molécule, l'absorption, du métabolisme et du passage dans le système nerveux central entre autres. De plus, certaines valeurs d'AUC sont particulièrement élevées, ce qui suggèrent un volume de distribution faible ce qui est peu probable étant donné la nature lipophile du composé.

Dans l'optique d'une utilisation du gingérol pour le contrôle de la douleur neuropathique, il est important de déterminer si le [6]-gingérol se rend au niveau des récepteurs TRPV1 situés dans le système nerveux central pour y exercer son action (Mezey et al., 2000; Spicarova and Palecek, 2008). Or, une étude de Jiang et al. (2008) a démontré un ratio AUCcerveau/AUCplasma équivalent à 1,86, donc la présence du [6]-gingérol dans le SNC et un effet au niveau des récepteurs sont possibles.

Lorsqu'administré par voie orale, le [6]-gingérol subit un effet de premier passage hépatique, ce qui diminue sa biodisponibilité par cette voie d'administration (Jiang et al., 2008; Wang et al., 2009b). En plus de ce premier passage par le foie, le microbiote semble jouer un rôle dans le métabolisme de ce composé (Nakazawa and Ohsawa, 2002; Wang et al., 2009a). Aussi, le [6]-gingérol semble subir une recirculation entéro-hépatique (Wang et al., 2009a). Pour ce qui est des métabolites du [6]-gingérol, la majorité de la molécule semble être excrétée dans la bile sous forme d'un glucuronide. Aussi, quelques métabolites mineurs ont été trouvés dans l'urine suite à une extraction à l'éthyl acétate et une incubation avec des β -glucuronidases (Nakazawa and Ohsawa, 2002). Une incubation de [6]-gingérol dans des microsomes hépatiques de rats a révélé la présence de huit métabolites. De plus, lorsque l'incubation s'est faite en présence de UDPGA, deux glucuronides ont été identifiés (Pfeiffer et al., 2006). Une étude de Naora et al. (1992) a rapporté que l'excrétion rénale ne jouait pas un rôle majeur dans l'élimination du [6]-gingérol et que celui-ci était principalement éliminé par voie biliaire, cependant dans une étude de Wang et al. (2009a), le foie et les reins se sont avérés importants dans l'élimination de la molécule. Ce point demeure donc d'intérêt à explorer. Dans un autre ordre d'idée, la liaison du [6]-gingérol aux protéines plasmatiques a été établie à plus de 90 % (Ding et al., 1991; Naora et al., 1992; Wang et al., 2009b). Pour ce qui est de la toxicité du [6]-gingérol, les LD₅₀ (mg/kg) se chiffrent à : 25,5 (23,4 – 27,7) lorsqu'administré par voie intra-veineuse, 58,1 (47,1 – 71,6) par voie intra-péritonéale et 250,0 (215,2 – 290,4) par voie orale (Suekawa et al., 1984). Les symptômes d'intoxication lorsqu'administré par voie IV se manifestent généralement par de l'agonie suite à l'administration, la mort pouvant survenir en moins de cinq minutes. Si l'animal survit, il présentera des signes de sédation qui peuvent persister entre 30 minutes et 2 heures après lesquelles l'animal devrait être de retour à son état

normal. Les mêmes symptômes peuvent être observés lors d'administration IP et PO (Suekawa et al., 1984).

Tableau I : Propriétés pharmacocinétiques du [6]-gingérol obtenues dans la littérature

animaux/ rats particularités, source	produit administré	voie	dose (mg/kg)	T _{max} (h)	C _{max} (µg/mL ou µg/g)	t _{1/2} (h)	CL (mL/min/kg)	AUC _{0-t} (µg h/mL)	AUC _{0-inf} (µg min/mL ou µg min/g)
(Ding et al., 1991)	6-gingerol	IV (bolus)	3			0,12	16,8		238,1
(Naora et al., 1992)	6-gingerol	IV (bolus)	3			0,16	47,8		66,3
insuffisance rénale (Naora et al., 1992)	6-gingerol	IV (bolus)	3			0,18	52,7		70,6
(Naora et al., 1992)	6-gingerol	IV (bolus)	1,5			0,14	80,7		19,8
insuffisance hépatique (Naora et al., 1992)	6-gingerol	IV (bolus)	1,5			0,18	50,1		35,9
(Wang et al., 2009a)	6-gingerol	IP	30	0,083	5,96	0,381		4,06	
(Wang et al., 2009a)	6-gingerol	PO	120	0,083	1,90	0,766		1,33	
(Wang et al., 2009b)	oléorésine de gingembre	PO	300	1,167	0,0009	3,574	957,2	1,69	
valeurs plasmatiques (Jiang et al., 2008)	extrait de gingembre (53% de 6- gingerol)	PO	240	0,17	4,23	1,77	680		138,6
valeurs au niveau du cerveau (Jiang et al., 2008)	extrait de gingembre (53% de 6- gingerol)	PO	240	0,5	2,30	2,06			258

T_{max} : temps pour atteindre la concentration maximale

C_{max} : concentration plasmatique maximale

t_{1/2} : temps de demi-vie

CL : clairance

AUC_{0-t} : aire sous la courbe du temps 0 jusqu'à la dernière concentration plasmatique mesurée

AUC_{0-inf} : aire sous la courbe extrapolée à l'infini

Source : information tirée de (Ding et al., 1991; Jiang et al., 2008; Naora et al., 1992; Wang et al., 2009a, b)

1.4 Modes d'action

Le [6]-gingérol exprime ses différentes propriétés selon plusieurs mécanismes d'action.

1.4.1 Action anti-inflammatoire

Un métabolite stable du [6]-gingérol, le rac-[6]-dihydroparadol ([6]-DHP), ainsi qu'un analogue synthétique du gingérol et de la capsaïcine, le CapsarolTM ZTX42 (rac-2-hydroxy-1-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)dodecan-3-one) ont démontré la capacité d'inhiber la synthèse de iNOS induite par le LPS in vitro dans des cellules RAW 264,7. Pour y arriver, ils inhibent la dégradation de la protéine 1κB-α et la translocation du NF-κB dans le noyau ce qui a pour résultat d'atténuer l'expression du gène de l'iNOS modulée par le NF-κB, le tout sans altérer la viabilité cellulaire (Aktan et al., 2006; Dugasani et al., 2010; Lee et al., 2009). Le [6]-gingérol a aussi un effet inhibiteur sur le NF-κB, empêchant sa translocation dans le noyau via la suppression de la phosphorylation du 1κB-α, ce qui prévient la liaison à l'ADN et l'activation de ce facteur, ce qui a un effet sur l'expression des médiateurs de l'inflammation (Brown et al., 2009; Ishiguro et al., 2007; Kim et al., 2007; Kim et al., 2005; Lee et al., 2009; Nigam et al., 2009). Le [6]-gingérol aurait aussi un effet sur l'inflammation via l'inhibition de la synthèse de thromboxane secondairement à l'inhibition du métabolisme de l'acide arachidonique, lui conférant ainsi une action antithrombotique (Aktan et al., 2006; Brown et al., 2009; Lee et al., 2008a). Le [6]-gingérol possède aussi d'autres fonctions inhibitrices entre autres sur les cyclooxygénases (COX-1, COX-2), la biosynthèse des prostaglandines, les leukotriènes et les cytokines et médiateurs de l'inflammation dont le TNF-α, le NO, l'IL-10, l'IL-1β et l'IL-12 (Aktan et al., 2006; Dugasani et al., 2010; Isa et al., 2008; Jeong et al., 2009; Kim et al., 2007; Kim et al., 2005; Lee et al., 2008a; Lee et al., 2009; Park et al., 1998; Shimoda et al., 2010; Tripathi et al., 2007). Malgré l'inhibition de plusieurs cytokines, le [6]-gingérol ne semble pas

interférer avec la fonction de présentation des antigènes par les macrophages car il ne modifie pas l'expression du CMH-2 et n'inhibe pas la prolifération des cellules T induite pas les macrophages activés (Tripathi et al., 2007).

1.4.2 Action anti-oxydante

Le gingembre exprime ses propriétés anti-oxydantes entre autres en neutralisant les radicaux superoxyde et hydroxyl et en inhibant la peroxydation des lipides (Beg et al., 2008; Chrubasik et al., 2005; Dugasani et al., 2010; Lee et al., 2008a; Young et al., 2005). Aussi, l'effet protecteur du gingérol pourrait être attribuable à la prévention de l'augmentation de calcium intracellulaire induite par le peroxyde d'hydrogène (Lee et al., 2009). De plus, une étude menée *in vitro* sur des lymphocytes humains traités avec de la Norethandrolone et de l'Oxandrolone, des stéroïdes oraux synthétiques anaboliques et androgéniques, a démontré que le [6]-gingerol pouvait diminuer le nombre de cellules anormales avec aberrations chromosomiques et le nombre de cellules avec échange de chromatides sœurs induites par ces stéroïdes via l'inhibition de la peroxydation des lipides et des radicaux superoxide et hydroxyl (Beg et al., 2008). Une autre démonstration de l'effet anti-oxydant du [6]-gingérol est sa capacité d'inhiber l'expression de la COX-2 induite par les rayons UVB au niveau de la peau. Pour ce faire, il empêche l'accumulation intracellulaire de radicaux libres, prévient l'activation de caspases par les UVB et inhibe l'activation du NF- κ B (Kim et al., 2007; Lee et al., 2009; Nigam et al., 2009; Yagihashi et al., 2008). Le [6]-gingérol possède aussi un effet inhibiteur sur la xanthine oxydase, responsable de la génération de radicaux libres, en créant une inhibition compétitive de l'enzyme en compétitionnant comme substrat avec la xanthine (Park et al., 1998).

1.4.3 Action analgésique

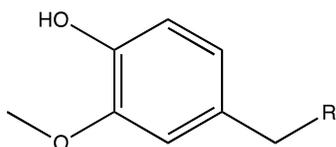
Il a été démontré que le gingérol était en fait un agoniste du récepteur à la capsaïcine, le TRPV1, qui peut aussi être activé par une chaleur nocive et un faible pH (Aktan et al., 2006; Someya et al., 2003). Ces récepteurs jouent un rôle important dans la transmission et la modulation de la douleur aigue et chronique. Ils sont localisés autant au niveau des terminaisons nerveuses périphériques qu'au niveau du système nerveux central, particulièrement au niveau de la corne dorsale de la moelle épinière (Spicarova and Palecek, 2008). La puissance d'action des

gingérols sur ce récepteur augmenterait avec la longueur de la chaîne latérale de la molécule ainsi qu'avec l'hydrophobicité (Dedov et al., 2002). En effet, les gingérols ont démontré la capacité d'induire une augmentation du calcium intracellulaire au niveau des cellules possédant des récepteurs TRPV1 chez le rat, similaire à celle observée par la capsaïcine (Ali et al., 2008; Dedov et al., 2002). Cet effet a par ailleurs été annulé par la capsazépine, un antagoniste reconnu du TRPV1 (Dedov et al., 2002; Walker et al., 2003). De plus, le [6]-gingérol induirait une augmentation de la conductance de la membrane plasmique des neurones de la corne dorsale sensibles à la capsaïcine (Dedov et al., 2002). L'action du [6]-gingérol sur le TRPV1 a aussi été étudiée dans une étude de Someya et al. (2003) en comparant la contraction de l'iléon d'un cochon d'inde induite par la capsaïcine à celle induite par le gingérol. Il a été démontré que le [6]-gingérol, à une concentration de 0,3 μM , pouvait augmenter la contraction induite par la capsaïcine à 3 μM tandis qu'une concentration de [6]-gingérol supérieure à 3 μM inhibait cette contraction. Ceci suggère une possible fermeture du canal à de plus haute concentration de gingérol. En effet, il a déjà été démontré que lors de la liaison initiale d'une molécule vanilloïde au niveau des récepteurs TRPV1, ces molécules possèdent un effet agoniste au récepteur et permettent ainsi l'entrée de calcium intracellulaire et une dépolarisation des neurones. Il se produit par la suite un effet antagoniste de ces molécules qui entraîne la fermeture du canal et par le fait même un effet réfractaire à tous stimuli, incluant les stimuli douloureux, expliquant en partie l'effet analgésique observé (Caterina et al., 1997; Tominaga and Tominaga, 2005). L'effet analgésique du [6]-gingérol pourrait aussi s'expliquer par le fait que cette molécule réduirait les niveaux de récepteurs NK1 soit par la diminution de la substance P suite à l'inactivation des récepteurs TRPV1 ou l'inhibition de la synthèse et de l'expression des récepteurs NK1. Cette action serait liée à l'effet antagoniste du [6]-gingérol qui survient suite à son effet agoniste provoqué lors de sa liaison initiale avec le récepteur TRPV1 (Qian et al., 2009; Qian et al., 2010).

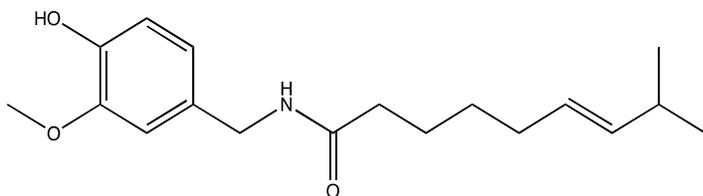
1.5 Structure moléculaire

Tel que mentionné précédemment, le [6]-gingérol (1-[4'-hydroxy-3'-methoxyphenyl]-5-hydroxy-3-decanone) (Lee et al., 2008a) est un composé phénolique faisant parti du groupe des gingérols. Le [6]-gingérol partage avec les autres molécules de ce groupe ([8]-gingérol, [10]-

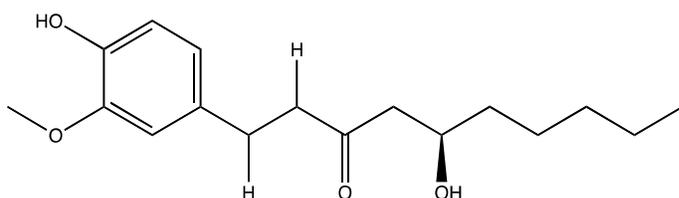
gingérol et [12]-gingérol) le même cycle aromatique et le même groupement fonctionnel aliphatique 3-keto-5-hydroxy, mais se différencie par la longueur de sa chaîne alkyl à C-5 (Pfeiffer et al., 2006) Plusieurs éléments structurels suggèrent que le [6]-gingérol pourrait agir au niveau des récepteurs vanilloïdes dont sa lipophilicité et sa ressemblance avec la capsaïcine (Dedov et al., 2002). En effet, le [6]-gingérol est un analogue structurel de la capsaïcine et possède comme celle-ci un groupement fonctionnel vanillyl (Dedov et al., 2002; Someya et al., 2003). Ce groupement en fait aussi un membre de la famille des vanilloïdes tout comme l'eugénol et la vanilline qui sont aussi des analogues de la capsaïcine (Yang et al., 2003). Cependant, la chaîne latérale du [6]-gingérol est plus longue que celle de l'eugénol et de la vanilline, ce qui pourrait permettre de penser que le [6]-gingérol puisse avoir un effet prolongé au niveau des récepteurs vanilloïdes comparativement à ces deux autres molécules.



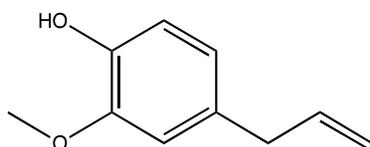
Structure moléculaire du groupement fonctionnel vanillyl



Structure moléculaire de la capsaïcine



Structure moléculaire du [6]-gingérol



Structure moléculaire de l'eugénol

Figure 1 : Structure moléculaire de différentes molécules de la famille des vanilloïdes.

2. Les récepteurs vanilloïdes

2.1 Les nocicepteurs

Les nocicepteurs sont les premiers intervenants impliqués dans la transmission de la douleur. Il s'agit en fait de terminaisons nerveuses libres qui se retrouvent sur toute la surface du corps, mais également au niveau des muscles, tendons et viscères (Marchand, 2005). Les nocicepteurs peuvent répondre à des stimuli mécaniques, thermiques ou chimiques et possèdent deux caractéristiques précises : ils répondent de façon proportionnelle à l'intensité d'un stimulus et ils possèdent un seuil de réponse plus élevé que les simples thermorécepteurs et mécanorécepteurs répondant à des stimuli légers (Besson et al., 1982). Suite à une stimulation, les nocicepteurs activés vont transformer l'énergie issue de cette stimulation en potentiel d'action ou influx nerveux via des canaux ioniques et des canaux Transient Receptor Potential (TRP) situés au niveau de leur membrane neuronale (Anand and Bley, 2011; Milligan and Watkins, 2009). Cet influx sera ensuite acheminé aux différents centres de transmission et d'intégration de la douleur au niveau du système nerveux central. L'étude des canaux TRP comme cible thérapeutique potentielle devient intéressante dans la mesure où ceux-ci ont une contribution connue dans la détection de stimuli physiques, thermiques et chimiques causant une activation et une sensibilisation des nocicepteurs (Spicarova and Palecek, 2008). Il a également été démontré qu'une sous-classe des canaux TRP, les récepteurs TRPV1 (Transient receptor potential vanilloid 1) se retrouvent aussi au niveau de la membrane neuronale des nocicepteurs, en plus de se retrouver à plusieurs autres niveaux du système nerveux central, en faisant donc également une cible thérapeutique potentielle intéressante (Acs et al., 1994).

2.2 Caractérisation et localisation des récepteurs vanilloïdes

Les récepteurs vanilloïdes sont des canaux ioniques exprimés dans différentes portions du système nerveux central et périphérique. Des neurones sensitifs responsables de transmettre de l'information douloureuse de la périphérie au cerveau peuvent être excités et désensibilisés par l'administration de capsaïcine. Ces neurones sont en général de diamètre petit à modéré et donne origine aux fibres nociceptives non-myélinisées aussi appelées fibres C ainsi qu'aux

fibres myélinisées de petit diamètre A δ (Planells-Cases et al., 2005). Dans ce cas, il a longtemps été pensé que la capsaïcine agirait en se liant à un site de reconnaissance spécifique. Il a été plus tard démontré, en utilisant la résinifératoxine (RTX), un puissant analogue de la capsaïcine, que celle-ci se lie à un site particulier mieux décrit en tant que récepteur vanilloïde (Szallasi et al., 1995). Ces récepteurs sont exprimés entre autres au niveau du ganglion du nerf trijumeau (Szallasi et al., 1995), du ganglion de la corne dorsale de la moelle épinière (Guo et al., 1999; Szallasi et al., 1995), du ganglion du nerf vague (Acs et al., 1994), de l'hypothalamus (Jancso-Gabor et al., 1970), de la formation réticulée, du noyau gris de la base, du mésencéphale, des bulbes olfactifs, du pont, du cervelet, du cortex, du thalamus et de l'hippocampe (Sasamura et al., 1998). Au niveau spinal, les récepteurs vanilloïdes sont exprimés au niveau pré et post-synaptique de la corne dorsale de la moelle épinière et sont distribués en plus grande concentration au niveau de la moelle épinière lombaire, entre les segments nerveux L4 et L6, qu'au niveau de la moelle cervicale et thoracique (Guo et al., 1999; Spicarova and Palecek, 2008; Szallasi et al., 1995).

2.3 Les récepteurs TRPV1

Une avenue dans le développement de nouveaux traitements contre la douleur est de cibler les récepteurs impliqués. Les canaux Transient Receptor Potential (TRP) ont émergés dans les dernières années comme une cible potentielle étant donné leur contribution dans la détection de stimuli physiques thermiques, mécaniques ou chimiques causant une activation et sensibilisation des nocicepteurs. On compte six sous-classes des TRP qui sont exprimés au niveau des nocicepteurs primaires afférents : TRPV1, TRPV2, TRPV3, TRPV4, TRPM8 et TRPA1 (Spicarova and Palecek, 2008). Les récepteurs TRPV1, TRPV2, TRPV3 et TRPM8 sont souvent classés comme thermorécepteurs alors que le TRPV4 et TRPA1 appartiennent plutôt aux mécanorécepteurs. Cependant, une caractéristique importante des canaux TRP est leur mode d'activation polymodale (Levine and Alessandri-Haber, 2007).

Le Transient receptor potential vanilloid 1 (TRPV1), aussi appelé VR1 (vanilloid receptor 1) ou récepteur à la capsaïcine, est un récepteur polymodal qui peut être activé par différents stimuli douloureux : les composés vanilloïdes tels que la capsaïcine et la

résinifératoxine, différents protons, une chaleur modérée ($>43^{\circ}\text{C}$), différents lipides endogènes dérivés de la dopamine et un pH bas (<5.9) (Levine and Alessandri-Haber, 2007; Planells-Cases et al., 2005; Spicarova and Palecek, 2008; Tominaga and Tominaga, 2005). Bien que le TRPV1 soit exprimé au niveau de différentes cellules neuronales et non-neuronales, son niveau d'expression le plus important est au niveau des neurones sensitifs périphérique ainsi qu'au niveau de la corne dorsale de la moelle épinière (Caterina and Julius, 2001; Guo et al., 1999; Szallasi et al., 1994). Au niveau périphérique, ces récepteurs se retrouvent principalement au niveau des terminaisons nerveuses des neurones sensitifs ou nocicepteurs. Au niveau central, on les retrouve au niveau des branches centrales des neurones sensitifs du ganglion de la racine dorsale de la moelle épinière. Ces neurones expriment ces récepteurs non seulement au niveau de leurs terminaisons centrales et périphériques mais également au niveau de leur corps cellulaire (Acs et al., 1994). Les fibres afférentes primaires sensibles à la capsaïcine terminent majoritairement au niveau de la lamina I et de la lamina II de la corne dorsale superficielle de la moelle épinière (Guo et al., 1999; Valtschanoff et al., 2001). Cependant, une expression considérable des récepteurs TRPV1 a également été notée au niveau de la voie latérale collatérale, où une majorité de fibres viscérales afférentes terminent. Une expression de ces récepteurs a également été notée occasionnellement au niveau des lamine III et V de la corne dorsale (Hwang and Valtschanoff, 2003). Bien que présents au niveau de la moelle épinière cervicale et thoracique, on retrouve une concentration deux fois plus élevée des récepteurs TRPV1 au niveau de la moelle épinière lombaire, principalement entre les segments lombaires L4 et L6, rendant une administration intrathécale à ce niveau particulièrement intéressante (Szallasi et al., 1995). Récemment, il a également été démontré qu'au niveau central, en plus de se retrouver au niveau des neurones de la corne dorsale de la moelle épinière, les récepteurs TRPV1 sont aussi présents au niveau des cellules gliales présentes dans la lamina I et II telles que les astrocytes (Doly et al., 2004).

Lors de l'activation du récepteur par la liaison d'une molécule vanilloïde, un influx de cations, principalement de calcium, se produit à travers la membrane ce qui engendre la propagation de potentiels d'action perçus comme douloureux (Caterina et al., 1997; Holzer, 1991). Suite à une exposition prolongée à un stimulus, le récepteur se désensibilise et devient réfractaire à la capsaïcine ou tout autre stimuli douloureux, expliquant ainsi son intérêt dans la

recherche pour le développement de traitement contre la douleur (Caterina et al., 1997; Tominaga and Tominaga, 2005). Cette période réfractaire serait liée à un changement de conformation de la protéine récepteur suite à son activation et à la fermeture du canal (Holzer, 1991).

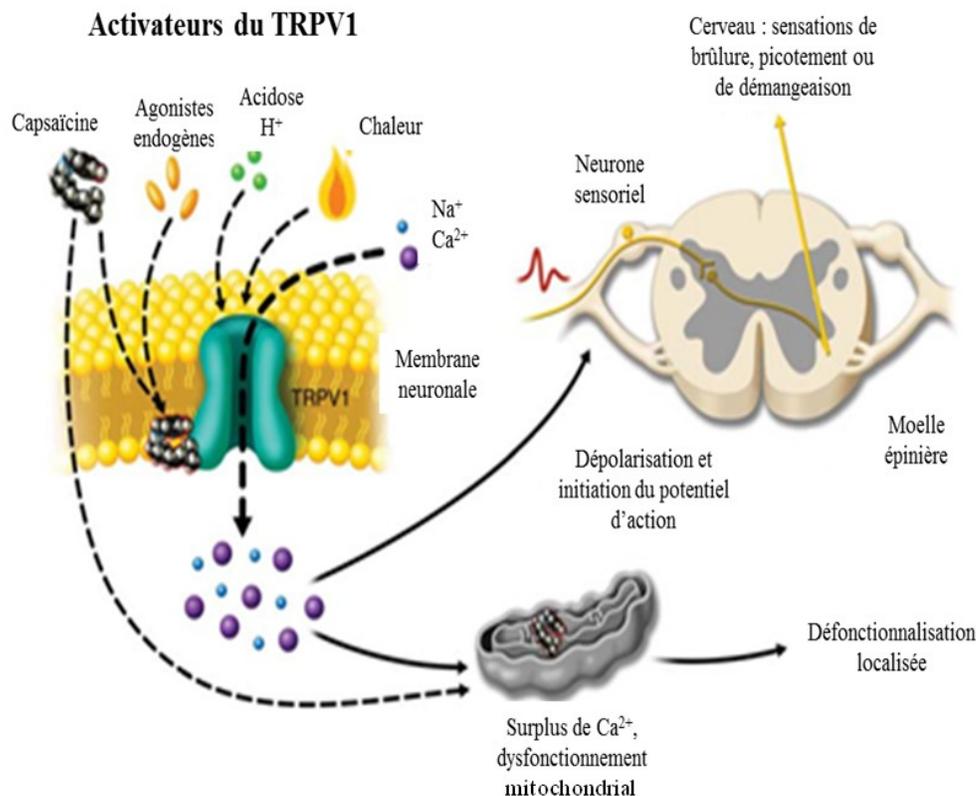


Figure 2 : La cascade d'évènements activant le récepteur TRPV1 et entraînant la sensibilisation locale par des agonistes endogènes, l'acidité ou la chaleur induisent l'ouverture des canaux calciques et sodiques entraînant une dépolarisation cellulaire et la sensibilisation centrale et périphérique. La capsaïcine désactive le récepteur TRPV1 suite à la dépolarisation initiale.

Source : modifiée de (Anand and Bley, 2011)

L'action du récepteur TRPV1 peut être influencée et modulée par plusieurs mécanismes, en faisant ainsi un participant important à la sensibilisation périphérique et au développement de la douleur neuropathique. En effet, la relâche de médiateurs de l'inflammation tels que la bradykinine, les prostaglandines E2, l'ATP, le glutamate et le NGF peut indirectement

sensibiliser le TRPV1 et ainsi diminuer son seuil d'activation. Elle peut également augmenter le niveau d'expression membranaire du récepteur, induire une phosphorylation du récepteur par des protéines kinases ou diminuer l'inhibition du récepteur par des substances endogènes (Spicarova and Palecek, 2008). En plus des médiateurs de l'inflammation, la relâche de protéases telles les trypsines et la tryptase des mastocytes lors d'inflammation participe également à la sensibilisation des récepteurs (Levine and Alessandri-Haber, 2007). Un autre phénomène participant au développement d'hyperalgésie est la libération de neuropeptides pro-inflammatoires tels la substance P et le CGRP par des terminaisons nerveuses sensibles au niveau de la corne dorsale de la moelle épinière suite à la liaison de la capsaïcine aux récepteurs TRPV1 (Saria et al., 1986). Cependant, une fois les récepteurs désensibilisés suite à une exposition prolongée à la molécule, la relâche de ces neuropeptides cesse ce qui participerait à l'action analgésique procurée suite à la liaison d'une molécule vanilloïde au récepteur TRPV1 (Planells-Cases et al., 2005; Tominaga and Tominaga, 2005).

2.4 Les molécules agonistes et antagonistes au TRPV1

Plusieurs molécules sont reconnues comme étant agonistes ou antagonistes au récepteur TRPV1. L'intérêt de ses molécules réside dans leur potentielle utilisation pour le développement de traitements contre la douleur inflammatoire et neuropathique. La principale molécule agoniste au TRPV1 est sans doute la capsaïcine qui sert souvent de molécule référence afin de déterminer le potentiel agoniste de diverses autres molécules (Holzer, 1991). En effet, plusieurs molécules agonistes ont été étudiées grâce à leur ressemblance structurelle avec la capsaïcine, lorsque celles-ci possèdent un groupement fonctionnel vanillyl (Dedov et al., 2002). Parmi les molécules agonistes naturelles reconnues, on retrouve la pipérine, la zingérone (Liu and Simon, 1996b), la résinifératoxine (rtx) (Szallasi and Blumberg, 1993; Szallasi et al., 1993), le guaïacol (Ohkubo and Shibata, 1997), l'olvanil (Caterina and Julius, 2001), la trialkylglycine (Garcia-Martinez et al., 2002), l'eugénol (Guenette et al., 2007b; Yang et al., 2003) et le gingérol (Dedov et al., 2002). De plus, l'action de ces molécules au niveau du récepteur TRPV1 peut être inhibée suite à l'administration d'une molécule antagoniste compétitive à ce même récepteur, la capsazépine (Caterina et al., 1997; Walpole et al., 1994). Ces molécules agonistes produisent des réponses physiologiques semblables mais parfois

différentes, ce qui peut être expliqué entre autres par leur différente cinétique d'activation et de désensibilisation du récepteur cible et par l'existence de différents sous-types de récepteurs vanilloïdes (Liu and Simon, 1996b).

2.4.1 Propriétés pharmacologiques de la capsaïcine

La capsaïcine (8-méthyl-N-vanillyl-6-nonénamide) est une molécule membre de la famille des alcaloïdes et une des composantes principales du piment fort (*Capsicum*). Il s'agit d'une molécule qui est utilisée depuis plusieurs années entre autres en tant qu'épice et dans les vaporisateurs de poivre mais également, plus récemment, dans le domaine médical pour le traitement de neuropathie virale ou diabétique, d'arthrite rhumatoïde et d'ostéoarthrose ou dans le développement de crème ou lotion visant le soulagement de la douleur musculaire ou neuropathique (Caterina et al., 1997; Kalff et al., 2010; Szallasi and Blumberg, 1999). La capsaïcine cause une sensation initiale de brûlure en activant sélectivement des neurones sensoriels dont le rôle est de transmettre l'information provenant de stimuli thermiques douloureux au système nerveux central. Suivant cette excitation initiale des nocicepteurs, ceux-ci deviennent insensibles à la capsaïcine ou tout autre stimulus thermal douloureux, permettant ainsi de réduire la sensation de douleur (Caterina et al., 2000; Caterina et al., 1997; Liu et al., 1996). Ce phénomène résulterait principalement d'un changement de conformation temporaire des nocicepteurs mais pourrait aussi résulter de la mort cellulaire par apoptose des neurones suite à une entrée intracellulaire massive de calcium (Caterina et al., 1997; Davies et al., 2010; Jancso et al., 1977; Liu et al., 1996). La capsaïcine agit principalement en se liant au récepteur TRPV1 pour lequel elle agit comme un agoniste sélectif (Caterina et al., 1997). Le taux de désensibilisation des récepteurs vanilloïdes provoqué par la liaison de la capsaïcine varie selon le type de cellule étudiée, la concentration de capsaïcine utilisée, le temps de contact avec le récepteur et la présence ou l'absence de calcium extracellulaire (Holzer, 1991; Liu et al., 1996).

Malgré son effet analgésique intéressant, il existe plusieurs inconvénients à l'utilisation clinique de la capsaïcine. Tel que mentionné précédemment, cette molécule possède un potentiel de toxicité neuronale important lorsqu'utilisée à forte dose (Jancso et al., 1977), elle cause une sensation de brûlure initiale lors d'application topique qui peut être difficilement toléré par le patient (Caterina et al., 1997) et elle possède une pauvre stabilité métabolique avec

un court temps de demi-vie (Beaudry and Vachon, 2009). Considérant ces facteurs, l'étude des propriétés analgésiques d'autres molécules de la famille des vanilloïdes devient intéressante dans la perspective où celles-ci pourraient offrir d'autres options dans le soulagement de la douleur et potentiellement moins d'effet toxique et une meilleure stabilité métabolique favorisant une action prolongée. L'eugénol, la vanilline et le [6]-gingérol deviennent donc des molécules d'intérêt particulier.

2.4.2 Propriétés pharmacologiques de l'eugénol

L'eugénol [2-methoxy-4-(2-propenyl)phenol] est une des principales molécules constituant le clou de girofle (*Eugenia aromatica*). Depuis plusieurs siècles, elle a été utilisée pour ces différentes propriétés analgésique, antibactérienne, anticancer, antihistaminique et anesthésique. Un usage bien connu de l'eugénol est son utilisation pour réduire la douleur dans le domaine de la dentisterie (Park et al., 2009a; Park et al., 2006a). Mais cette molécule a aussi déjà été étudiée pour ses propriétés anesthésiques et analgésiques chez les poissons et les amphibiens (Guenette et al., 2007a). Le rôle analgésique de l'eugénol pourrait entre autre s'expliquer par sa ressemblance structurelle avec la capsaïcine. L'eugénol, tout comme la capsaïcine, possède un groupement fonctionnel vanillyl laissant supposer qu'elle pourrait se lier et agir au niveau des récepteurs vanilloïdes et plus précisément au niveau du TRPV1. Cette action au niveau de ce récepteur a d'ailleurs déjà été démontré in vitro (Yang et al., 2003). L'action analgésique de l'eugénol s'expliquerait aussi par son action agoniste sur les récepteurs GABA et antagoniste sur les récepteurs NMDA (Yang et al., 2003) importants dans le développement de la douleur. L'administration d'eugénol pour réduire le développement de douleur neuropathique chez des rats ayant subi une intervention visant à créer le développement d'un tel type de douleur a été étudiée à différentes occasions. Une administration orale d'eugénol, lorsque comparée à l'administration de saline, a été démontrée efficace dans le soulagement de l'hypersensibilité thermique chez des rats suivant l'induction de douleur neuropathique (Guenette et al., 2007b). Une étude réalisée par Lionnet et al. (2010) a aussi permis de démontrer une distribution de l'eugénol au niveau du cerveau (brain-to-plasma ratio 3.3) et de la moelle épinière (spinal cord-to plasma ratio 6.7) suite à une administration orale de la molécule chez des rats Sprague-Dawley à une dose de 40 mg/kg. Cette distribution de la molécule permettrait ainsi une potentielle action au niveau des récepteurs TRPV1 présents

au niveau de la corne dorsale de la moelle épinière. Le même groupe a d'ailleurs démontré qu'une administration intrathécale de 50 µg d'eugénol chez des rats Sprague-Dawley a permis de réduire le développement d'hyperalgésie thermique et d'allodynie mécanique suite à l'induction de douleur neuropathique par le modèle de constriction du nerf sciatique de Bennett (Lionnet et al., 2010).

2.4.3 Propriétés pharmacologiques de la vanilline

La vanilline (4-hydroxy-3-méthoxybenzaldéhyde) est une molécule extraite des gousses de vanille (*Vanilla Planifolia*) lors de la préparation de celles-ci comme épice. Cette molécule possède une un groupement fonctionnel vanillyl et une chaîne acyl insaturée rendant sa structure similaire celle de la capsaïcine et de l'eugénol. Cette similarité de structure porte à croire que la vanilline pourrait se lier et agir au niveau des récepteurs vanilloïdes et ainsi avoir une action anti-nociceptive (Beaudry et al., 2010; Walpole et al., 1993). Les propriétés analgésiques de cette molécule ont par ailleurs déjà été étudiées dans différentes situations et pour différents types de douleur. De par une potentielle action sur les récepteurs TRPV1, la vanilline pourrait réduire la douleur neuropathique et il a été démontré qu'une administration orale de 50 mg/kg de vanilline à des rats, suivant la constriction chronique du nerf sciatique, selon le modèle de Bennett, a permis de réduire le développement d'allodynie mécanique. Toutefois, aucun bénéfice sur le développement d'hyperalgésie thermique n'a été noté (Beaudry et al., 2010). La vanilline a aussi été étudiée pour son rôle anti-inflammatoire et inhibiteur de facteur nucléaire κ B. En effet, il a été démontré que l'administration de vanilline pouvait réduire les impacts macroscopiques et microscopiques de la colite induite par l'administration d'acide trinitrobenzène sulfonique chez le rat. Le mécanisme d'action expliquant cet effet serait via la réduction de l'expression de cytokines pro-inflammatoires telles que l'IL-1 β , l'IL-6, l'interféron- γ et le TNF- α par la vanilline dans les tissus coloniques. La vanilline stimulerait aussi l'expression d'interleukine 4, une cytokine aux propriétés anti-inflammatoires (Wu et al., 2009). La vanilline aurait finalement une action anti-nociceptive contre la douleur viscérale suite à une action sur les récepteurs α 2-adrénergiques et sur les récepteurs opioïdes (Park et al., 2009b).

3. La douleur

3.1 Définition

Le phénomène de la douleur est de plus en plus considéré dans l'évaluation du bien-être animal. En effet, en 2003, l'American Animal Hospital Association (AAHA) a suivi les recommandations de la Joint Commission on Accreditation of Healthcare Organizations (JCAHO) et a ajouté la douleur comme quatrième signe vital chez les animaux, en complément à la température, au pouls et à la fréquence respiratoire (Hellyer et al., 2007). L'International Association for the Study of Pain (IASP) définit la douleur comme étant une sensation ou une expérience émotionnelle déplaisante en lien avec un dommage tissulaire réel ou potentiel ou décrite en termes évoquant un tel dommage (Price and Nolan, 2007). Cependant, il peut être difficile de bien caractériser la douleur chez les animaux étant donné que ceux-ci ne peuvent verbaliser leur expérience (Price and Nolan, 2007). C'est pourquoi une définition de la douleur a aussi été pensée en fonction de la réalité animale : une sensation ou expérience émotionnelle désagréable faisant suite à l'appréhension de l'animal face à un dommage à ses tissus ou une menace à l'intégrité de ceux-ci, entraînant des changements physiologiques et comportementaux afin de réduire ou éviter les dommages tissulaires, diminuer la probabilité de récurrence et favoriser la guérison (Molony and Kent, 1997).

La douleur s'exprime dans l'organisme via un influx nerveux nociceptif qui voyage de la périphérie, au niveau des nocicepteurs, vers les centres supérieurs, le cerveau (Marchand, 2005). Sur son parcours, l'influx subit l'influence de plusieurs mécanismes endogènes pouvant moduler la perception douloureuse par des phénomènes inhibiteurs ou excitateurs (Marchand, 2005). Aussi, la douleur est une expérience subjective qui peut être modulée selon plusieurs facteurs tels la peur, la mémoire, le stress émotionnel, etc. (Price and Nolan, 2007).

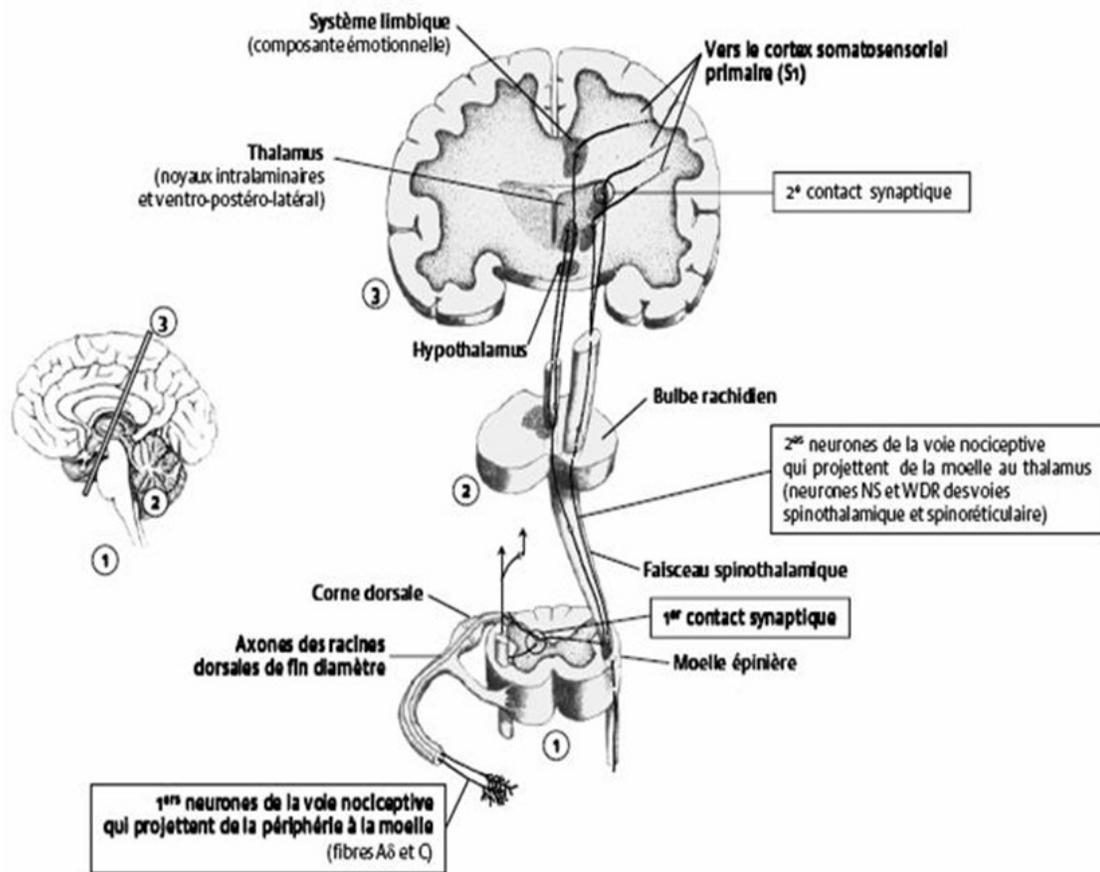


Figure 3 : *Voies de conduction de la douleur. Le neurone primaire provient de la périphérie (fibres Aδ ou C). Il fait un contact synaptique avec le neurone secondaire qui est soit un neurone nociceptif spécifique ou un neurone nociceptif non spécifique. Les fibres de ces seconds neurones croisent immédiatement dans la moelle pour se projeter vers les noyaux latéraux du thalamus par la voie spinothalamique ou vers différentes structures du tronc cérébral et les noyaux médians du thalamus par la voie spinoréticulaire. Un deuxième contact synaptique se fait aux noyaux latéraux ou médians du thalamus. Les neurones des noyaux latéraux projettent vers les centres corticaux sensoridiscriminatifs du cortex somatosensoriel, tandis que les neurones des noyaux médians projettent vers les centres corticaux motivo-affectifs du système limbique.*

NS : neurones nociceptifs spécifiques

WDR : neurones ayant un spectre dynamique étendu (Wide Dynamic Range)

Source: modifiée de (Beaulieu and ebrary Inc., 2005)

3.2 Différents types de douleur

Plusieurs types de douleur peuvent s'exprimer, entre autres : la douleur nociceptive, la douleur inflammatoire et la douleur neuropathique, les deux dernières étant souvent regroupées sous l'appellation douleur clinique (Costigan et al., 2006; Price and Nolan, 2007). Les douleurs nociceptives sont souvent transitoires et font suite à une stimulation nociceptive qui peut être thermique, mécanique ou chimique. Les douleurs inflammatoires quant à elles font suite au processus d'inflammation et se caractérisent principalement par de l'hyperalgésie. Cette douleur peut avoir une origine périphérique et impliquer des cellules telles les macrophages, les mastocytes et les neutrophiles mais peut également être centrale, soit l'inflammation neurogénique. Finalement, les douleurs neuropathiques proviennent d'une atteinte directe du système nerveux soit au niveau périphérique ou central (Dworkin et al., 2003). Elles se manifestent généralement par une douleur généralisée inexplicable, un déficit sensoriel, une sensation de brûlure ou le développement d'hyperalgésie et d'allodynie. Cette douleur peut perdurer plusieurs mois et son origine reste souvent non identifiée. De plus, lorsqu'une cause particulière est identifiée, la douleur perdure souvent malgré le traitement de cette cause initiale (Milligan and Watkins, 2009).

Aussi, il est possible distinguer une première douleur et une seconde douleur (Marchand, 2005). Cette distinction vient du fait que l'influx nerveux nociceptif voyage dans différentes fibres nerveuses de conduction rapide (fibres A δ) ou plus lente (fibres C) (Marchand, 2005). En effet, suite à la stimulation nociceptive, les fibres A δ conduisent rapidement l'influx nerveux ce qui provoque une sensation douloureuse brève et aiguë à l'endroit atteint (Marchand, 2005). C'est d'ailleurs cette sensation qui est à l'origine du réflexe de retrait. Par la suite, l'information acheminée par les fibres C engendre une sensation s'apparentant à une brûlure plus diffuse, ou seconde douleur (Marchand, 2005). Aussi, la douleur se différencie entre douleur aiguë et chronique. La douleur aiguë se définit souvent comme une douleur dite "physiologique" puisqu'elle met l'organisme en garde contre un stimulus potentiellement dangereux et accomplit ainsi un rôle de protection. La douleur chronique, par opposition à la douleur aiguë, n'accomplit aucune fonction physiologique de protection. Elle devient en elle-même la maladie à combattre (Parenti et al., 2012; Price and Nolan, 2007). La douleur chronique se définit comme étant une

douleur qui persiste au-delà du temps attendu de guérison ou une douleur persistante causée par une condition dont la guérison n'a pas eu lieu ou une condition qui a guéri puis récidivé (Price and Nolan, 2007). Une définition a aussi été établie pour le chien : douleur persistant plus d'un mois associée à un large éventail de symptômes comportementaux souvent subtils (Wiseman-Orr et al., 2004). Celle-ci résulte souvent d'un mal fonctionnement au niveau de la transmission nerveuse de l'influx nociceptif (Price and Nolan, 2007). Les douleurs chroniques, ou cliniques, comprennent entre autres les douleurs neuropathiques dont l'hyperalgésie et l'allodynie (Marchand, 2005).

3.3 Fonctionnement de la nociception

Tel que mentionné précédemment, la douleur est le résultat du cheminement d'un influx nociceptif de la périphérie vers les centres supérieurs. Or, cet influx prend origine au niveau des terminaisons nerveuses libres, appelées nocicepteurs, qui se situent sur toute la surface corporelle mais aussi au niveau des muscles, tendons et viscères, lorsque ceux-ci subissent une stimulation nociceptive soit mécanique, chimique ou thermique (Marchand, 2005). Suite à une stimulation, les nocicepteurs, via des canaux TRP (transient receptor potential) et ioniques vont transformer l'énergie dérivée de cette stimulation en potentiel d'action ou influx nerveux (Milligan and Watkins, 2009). Pour parvenir au cortex, l'influx devra transiter via trois neurones différents. En premier, il emprunte le neurone primaire qui lie les nocicepteurs à la corne dorsale de la moelle épinière. À cet endroit, ce premier neurone fait synapse avec le deuxième neurone ou neurone secondaire, aussi appelé neurone de projection. Ces neurones se retrouvent dans les lames superficielles (I et II) et profondes (IV et V) de la moelle. Il y aura une décussation dans la moelle avant que le neurone secondaire ne forme la voie spinothalamique, en position ventrolatérale, et conduise le signal nociceptif jusqu'au niveau des complexes ventrobasal et centromédian du thalamus sensoriel. En plus de former la voie spinothalamique, le neurone secondaire fait aussi synapse au niveau du tronc cérébral avec la substance grise périaqueducule (SGPA) et avec les noyaux du raphé (*nucleus raphe magnus* (NRM)). Ce neurone établit aussi un contact synaptique avec le neurone tertiaire au niveau du thalamus. Celui-ci achemine ensuite l'information reçue au cortex somatosensoriel et à

certaines structures limbiques (Huang et al., 2006; Marchand, 2005; Milligan and Watkins, 2009; Truini and Cruccu, 2006).

Au niveau de la moelle épinière, les neurones secondaires se subdivisent en 2 groupes soit les neurones de projection nociceptifs spécifiques et non spécifiques. Les neurones spécifiques, tel que leur nom l'indique, répondent seulement à des stimuli mécaniques ou thermiques qui peuvent avoir des répercussions réelles sur l'organisme. Ils peuvent recevoir de l'information acheminée par les fibres A δ seulement ou A δ et C. Les seconds, non spécifiques ou à large gamme dynamique (WDR; wide dynamic range), sont des neurones possédant de petits champs récepteurs percevant l'influx provenant de tous les types de fibres nerveuses (A β , A δ et C). Ils peuvent donc répondre de manière proportionnelle à différentes intensités de stimuli. Les champs récepteurs associés à ces neurones peuvent contenir des surfaces excitatrices autant qu'inhibitrices et des changements apportés à ces champs pourraient avoir un rôle à jouer dans certaines douleurs chroniques (Marchand, 2005; Milligan and Watkins, 2009).

Les neurones secondaires de la moelle épinière, plus précisément des voies spinothalamique et spinoréticulaire, transmettent ensuite l'influx nociceptif vers les noyaux du thalamus. Ces noyaux recevant les afférences nociceptives peuvent être divisés en deux groupes : les noyaux du complexe ventrobasal et centromédians ou intralaminaires. Ces noyaux acheminent ensuite l'information vers le cortex somatosensoriel primaire et secondaire et vers différentes structures du système limbique respectivement. Le thalamus est un centre d'intégration des informations nociceptives qui joue un rôle déterminant dans la modulation de la douleur.

Il a aussi été mentionné plus tôt que l'influx nociceptif est soumis à des mécanismes inhibiteurs ou excitateurs. Au niveau périphérique, certaines cellules immunitaires ont récemment été associées à des propriétés d'altération de la nociception. En effet, les mastocytes, neutrophiles, macrophages et lymphocytes T, dont la présence est souvent associée à la présence d'inflammation, se sont vu attribués un rôle important dans le développement de douleur neuropathique ou chronique (Thacker et al., 2007; Vallejo et al., 2010). Or, ces influences inhibitrices ou excitatrices se produisent également lorsqu'il y a contact synaptique

entre deux neurones (Marchand, 2005). Il y a aussi modulation de l'influx au niveau de la moelle sensorielle. En effet, celle-ci renferme plusieurs interneurones, neurotransmetteurs et récepteurs ayant le pouvoir de modifier l'information véhiculée dans la moelle. (D'Mello and Dickenson, 2008; Marchand, 2005). En effet, l'influx nociceptif peut être modulé et rehaussé au niveau synaptique suite à la relâche de médiateurs inflammatoires tels les prostaglandines, la bradykinine, l'ATP et le nerve growth factor (NGF) lors de dommage tissulaire (Huang et al., 2006). C'est également au niveau synaptique que se produit la première étape de la sensibilisation centrale via l'action de différents neurotransmetteurs dont la substance P et le glutamate (Milligan and Watkins, 2009). L'influx nociceptif peut aussi être modulé grâce à la microglie et aux astrocytes présent au niveau neuronal. Ces deux structures ont été reconnues pour avoir des propriétés pro-inflammatoires mais aussi, plus récemment, en différentes circonstances, des propriétés neuroprotectives utiles dans la régulation de la douleur (Abbadie et al., 2009; Milligan and Watkins, 2009; Moalem and Tracey, 2006).

La première et seconde douleur, phénomène précédemment mentionné, s'explique par le fait que les terminaisons nerveuses libres sont associées à des fibres nerveuses de vitesses de conduction différentes. Il existe trois types de fibres nerveuses somatiques soit les fibres A β , A δ et C (Marchand, 2005; Milligan and Watkins, 2009).

Fibres A β : Ces fibres myélinisées, de gros calibre et à conduction rapide (35 à 75 m/s) conduisent principalement des informations de nature non nociceptives. De plus, celles-ci jouent un rôle dans la modulation de la douleur en recrutant des interneurones inhibiteurs au niveau des cornes dorsales de la moelle épinière. Ces interneurones agiront en bloquant l'influx nociceptif. Aussi, ces fibres semblent être impliquées dans la régulation des informations nociceptives puisque si elles sont inhibées de manière sélective, il est possible de noter une augmentation dans la perception douloureuse suite à une stimulation nociceptive (Marchand, 2005).

Fibres A δ : Ce sont ces fibres qui sont associées à la première douleur ressentie. Ceci s'explique entre autres car il s'agit de fibres myélinisées et de petit diamètre qui possèdent une vitesse de conduction assez rapide (5 à 30 m/s). Elles possèdent un seuil de recrutement élevé et

transmettent de l'information nociceptive rapide et précise. Les fibres A δ se divisent en mécanonocicepteurs et en récepteurs polymodaux. Les premiers réagissent à des stimulations mécaniques importantes tandis que les seconds répondent à des stimuli mécaniques ou thermiques intenses. De plus, le seuil de recrutement des mécanonocicepteurs peut être abaissé suite à une stimulation thermique considérable (Marchand, 2005).

Fibres C : Les fibres C sont responsables quant à elles du phénomène de seconde douleur. Il s'agit de fibres non myélinisées et de faible calibre qui ont une vitesse de conduction lente (0,5 à 2 m/s). Elles génèrent donc des informations lentes et diffuses et majoritairement nociceptives. Ces fibres sont stimulées par des événements thermiques, mécaniques et chimiques ce qui en font des fibres polymodales (Marchand, 2005). Les fibres C sont aussi impliquées dans le phénomène de *windup* ou sensibilisation périphérique. Celui-ci consiste à une accumulation d'activités nociceptives au niveau des neurones secondaires dans la corne dorsale de la moelle épinière et participe à la sensibilisation spinale ou centrale (Li et al., 1999; Marchand, 2005; Truini and Cruccu, 2006). L'implication des fibres C se traduit par une augmentation de leur fréquence de décharge. La sensibilisation quant à elle se manifeste suite à une augmentation de l'excitabilité et des décharges spontanées des neurones des cornes postérieures de la moelle, un élargissement des champs récepteurs et une augmentation des réponses évoquées par la stimulation des fibres de petit calibre (hyperalgésie) et de grand calibre (allodynie) (Marchand, 2005). Sont particulièrement impliqués dans ce phénomène les neurones nociceptifs non spécifiques de la moelle épinière et les récepteurs N-méthyl-D-aspartate (NMDA) (D'Mello and Dickenson, 2008).

3.4 L'hyperalgésie et l'allodynie

L'hyperalgésie se définit comme étant une réponse exagérée à une stimulation normalement douloureuse (Marchand, 2005; Parenti et al., 2012). Le phénomène d'hyperalgésie regroupe l'hyperalgésie primaire et secondaire. L'hyperalgésie primaire survient suite à la libération, en périphérie, de neurotransmetteurs de la douleur et facteurs inflammatoires tels que des prostaglandines, bradykinine, histamine, substance P, sérotonine et autres (Huang et al.,

2006). Ceux-ci activent et recrutent les nocicepteurs situés à proximité de la lésion. En conséquence, les tissus situés à proximité auront un seuil de douleur plus bas.

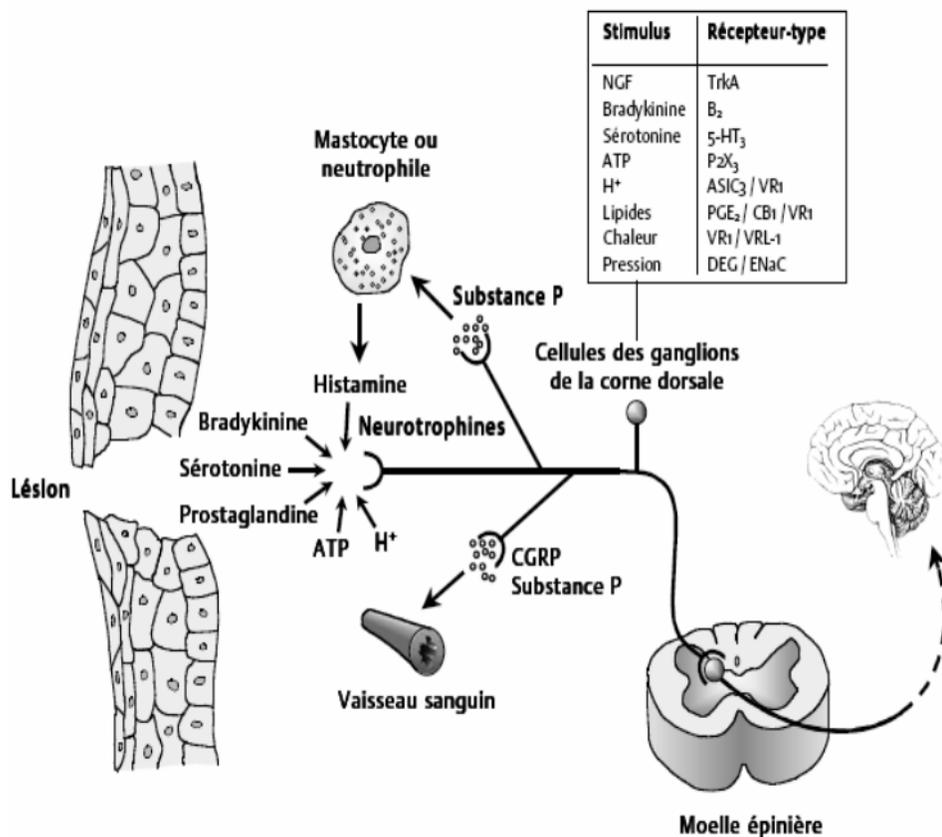


Figure 4 : L'hyperalgésie primaire s'explique par la sensibilisation des nocicepteurs par des substances pro-nociceptives relâchées à la suite d'une lésion. Les différents facteurs inflammatoires sensibiliseront aussi les nocicepteurs avoisinant la lésion, ce qui explique que l'hyperalgésie primaire s'étend autour du site lésé.

Source: modifiée de (Beaulieu and ebrary Inc., 2005; Julius and Basbaum, 2001)

L'hyperalgésie secondaire survient suite à un phénomène de sensibilisation centrale au cours duquel les neurones de projections situés dans les cornes postérieures de la moelle épinière deviennent sensibilisés suite au recrutement répété des fibres C. Lorsque stimulées de manière soutenue, ces fibres libèrent des acides aminés excitateurs comme le glutamate et l'aspartate et des peptides tels que la substance P et le CGRP (Truini and Cruccu, 2006). Ces neurotransmetteurs activeront par la suite leur récepteurs respectifs ce qui aura pour effet de

produire une sensibilisation cellulaire de longue durée. C'est pour cette raison que l'hyperalgésie secondaire peut se poursuivre dans le temps même une fois la blessure résolue (Marchand, 2005).

L'allodynie quant-à elle se définit comme étant la perception de douleur suite à un stimulus normalement non-douloureux (Parenti et al., 2012). L'allodynie peut se produire également à deux niveaux, périphérique et central. Au niveau périphérique, l'allodynie se produit suite à une réduction anormale du seuil d'activation des nocicepteurs. Une sensibilisation centrale s'installe et participe également au phénomène d'allodynie. Les fibres Aβ seraient les fibres impliquées dans le développement d'allodynie (Truini and Cruccu, 2006).

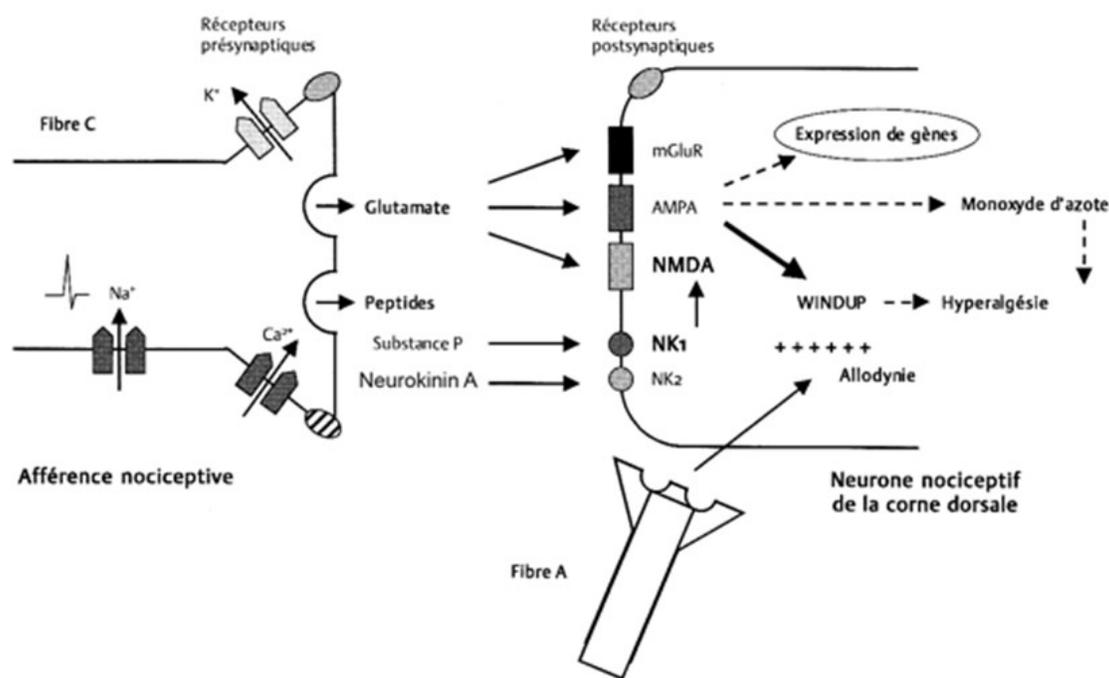


Figure 5 : L'hyperalgésie secondaire s'explique par une sensibilisation des neurones nociceptifs des cornes dorsales de la moelle. Une activation soutenue des afférences nociceptives (fibres C) produira la libération de peptides (substance P et CGRP) et de glutamate. Cette activation soutenue de récepteurs NK1 et NMDA produira des changements cellulaires, dont l'activation de gènes à expression rapide. Ces changements abaisseront la sensibilité du neurone

secondaire qui répondra dorénavant à plus haute fréquence à des stimulations nociceptives (hyperalgésie) et/ou à des stimulations non nociceptives (allodynie).

Source : modifiée de (Beaulieu and ebrary Inc., 2005; Dickenson et al., 1997)

3.5 Neurotransmetteurs impliqués dans la transmission de la douleur

Un stimulus douloureux aura pour effet de provoquer la relâche de différents neurotransmetteurs et substances pronociceptives qui entraîneront le recrutement des nocicepteurs avoisinants et une sensibilisation essentielle au développement de la douleur neuropathique. Parmi ces substances algogènes, c'est-à-dire substances qui provoquent ou maintiennent la douleur, on retrouve les prostaglandines, la bradykinine, l'histamine, la substance P, la sérotonine, l'ATP, l'ADP, l'AMP, le glutamate, le CGRP, le NGF, le facteur nécrosant de tumeur alpha et différentes interleukines (Marchand, 2005; Milligan and Watkins, 2009). Suite à la libération de ces facteurs, le seuil de douleur au site de la lésion et au niveau des tissus avoisinants sera diminué. Ces neurotransmetteurs produisent leur action de manière directe et indirecte. Certains médiateurs agissent directement en se liant à différents récepteurs au niveau de la membrane cellulaire des neurones. Une fois ces récepteurs activés, la production de messagers secondaires et l'activation de protéines kinases et phospholipases se produit. Les messagers secondaires régulent l'activité de plusieurs récepteurs et canaux ioniques calciques et sodiques, menant au développement de la sensibilisation périphérique. Les canaux ioniques s'ouvrent aussi en réponse à un stimulus douloureux et provoquent ainsi l'initiation et la propagation de potentiels d'action au niveau des neurones sensoriels. L'excitation de ces neurones mène à la libération de neurotransmetteurs par les terminaisons nerveuses centrales pré-synaptiques au niveau de la corne dorsale de la moelle épinière. Ces neurotransmetteurs se lient alors aux récepteurs post-synaptiques, dont les récepteurs glutamatergiques post-synaptiques de type AMPA (α -amino-3-hydroxy-5-méthyl-isoxazole) et NMDA (N-méthyl-D-aspartate) pour les acides aminés excitateurs tels le glutamate et les récepteurs NK1 pour la substance P, participant ainsi au développement de la sensibilisation centrale (Marchand, 2005; Okuse, 2007). Certains neurotransmetteurs agissent plutôt de manière indirecte en provoquant la libération de prostaglandines ou en agissant à différents niveaux de transmission de la

douleur comme au niveau des axones, de la moelle épinière ou du tronc cérébral (Moalem and Tracey, 2006).

En plus de la libération de neurotransmetteurs par les fibres nerveuses, un stimulus douloureux produira aussi une infiltration de cellules inflammatoires telles les mastocytes, neutrophiles, macrophages et lymphocytes T au niveau du site atteint. Une activation des cellules immunes résidentes telles la microglie et les astrocytes se produira aussi en réponse à un dommage au niveau du système nerveux. Ces différentes cellules entraineront à leur tour la production et sécrétion de plusieurs médiateurs de l'inflammation ou neurotransmetteurs. Cette réponse immunitaire et inflammatoire a d'ailleurs été démontré comme jouant un rôle important dans le développement de neuropathies démyélinisantes telle que la sclérose en plaques chez l'humain dont l'un des principaux symptômes est la présence de douleur (Moalem and Tracey, 2006). Les cytokines sont également des participantes essentielles dans la cascade neuro-inflammatoire. En effet, une augmentation de ces substances, entre autres de l'IL-1 β , l'IL-6 et du TNF- α , a été démontrée au niveau de la corne dorsale de la moelle épinière suite à une lésion au niveau d'un nerf périphérique contribuant ainsi à la manifestation d'hypersensibilité (Whitehead et al., 2010). Le TNF- α et l'IL-1 β agirait entre autres en augmentant l'excitabilité neuronale par l'augmentation de la conductivité des récepteurs NMDA et AMPA et en augmentant le nombre de ces récepteurs à la surface des neurones (Milligan and Watkins, 2009). Le NGF, un puissant dégranulateur des mastocytes, est aussi impliqué dans le développement d'hyperalgésie et d'inflammation et la présence de ce neurotransmetteur augmente de manière significative au niveau de tissus enflammés ou de nerf endommagés. Le rôle de ce neurotransmetteur dans la douleur se confirme aussi par la réduction d'hyperalgésie et d'inflammation lors de l'administration d'anticorps anti-NGF. Le NGF cause aussi une régulation à la hausse des canaux calciques voltage dépendant, des récepteurs TRP, de la substance P, du CGRP et des récepteurs à la bradykinine (Moalem and Tracey, 2006; Okuse, 2007).

La substance P est un neurotransmetteur libéré par les neurones afférents pré-synaptiques et qui se lie au niveau des récepteurs neurokinine 1 (NK1) aussi appelé récepteurs tachykinine 1 situés au niveau de la membrane post-synaptiques des neurones de la corne

dorsale de la moelle épinière. La relâche de substance P est régulée entre autres par la co-expression des récepteurs pré et post-synaptiques AMPA et NMDA. Lorsqu'une stimulation nociceptive est persistante, une quantité suffisante de substance P et de glutamate est relâchée pour provoquer une dépolarisation soutenue des neurones de la moelle épinière. Dans cette situation, le magnésium (Mg^{2+}) normalement présent à l'intérieur des récepteurs NMDA est retiré, permettant ainsi une entrée intracellulaire de calcium (Ca^{2+}), facilitant la transmission spinale. Cet influx de calcium déclenche aussi la production et libération d'oxyde nitrique et de prostaglandines. Ces deux molécules augmentent l'excitabilité des neurones de la moelle épinière en réponse à des signaux douloureux et provoquent la relâche exagérée de neurotransmetteurs à partir des terminaisons nerveuses afférentes pré-synaptiques. L'activation des récepteurs NMDA résulte donc en l'amplification des messages de douleur qui sont transmis aux centres supérieurs du cerveau (Milligan and Watkins, 2009).

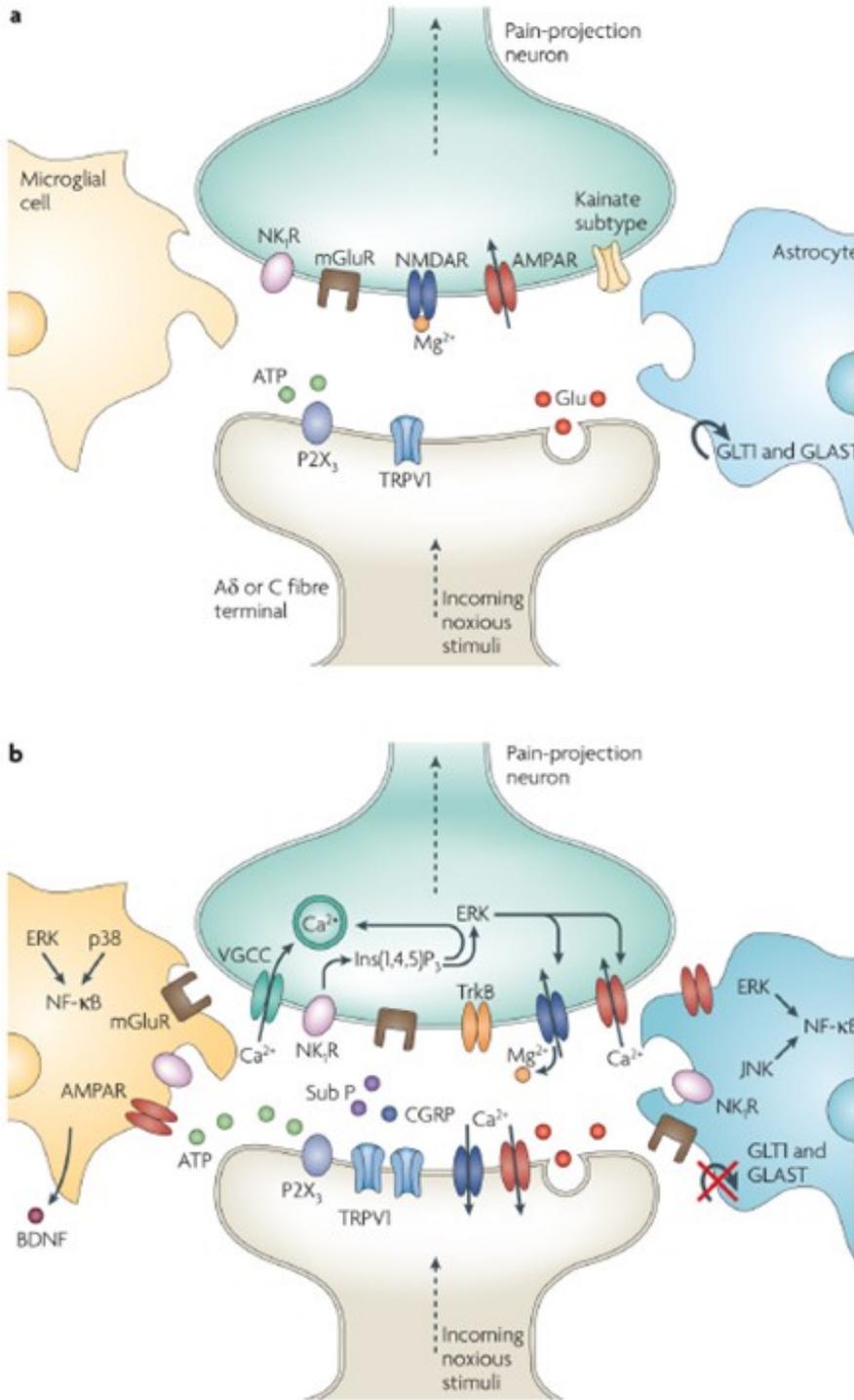


Figure 6 : a) En situation non-pathologique, l'activation à basse fréquence des fibres Aδ et C par de faibles stimuli douloureux provoque la libération de glutamate des terminaisons nerveuses afférentes pré-synaptiques de la corne dorsale de la moelle épinière. Il s'ensuit l'activation à court terme des récepteurs AMPA. Les récepteurs NMDA, de leur côté,

demeurent silencieux à cause de l'ion Mg^{2+} présent en leur centre. Les astrocytes et la microglie restent inchangés par ces événements synaptiques.

b) Après la répétition des communications synaptiques, les neurones de la corne dorsale répondent davantage aux stimuli. La libération concomitante de substance P et de CGRP provoque l'activation du récepteur NMDA créant ainsi des courants calciques voltage-dépendants (VGCCs). De plus, la voie de signalisation de l'inositol-1,4,5-triphosphate (Ins(1,4,5)P3) et les MAPKs comme la kinase régulée par un signal extracellulaire (ERK) et la kinase c-Jun-N-terminale (JNK) sont activées. Dans les neurones, l'ERK peut continuer de sensibiliser les récepteurs AMPA et NMDA. L'activation des purinorécepteurs par l'ATP, des récepteurs à la substance P (NK1), des récepteurs métabotropiques au glutamate (mGluR) et la libération de BDNF contribuent à accentuer la transmission nociceptive. Les astrocytes et la microglie expriment différents récepteurs et sont activés par le glutamate, l'ATP et la substance P. Au niveau synaptique, lorsqu'il y a trop longtemps présence de glutamate, les transporteurs au glutamate GLT1 et la navette Glutamate-Aspartate (GLAST), qui jouent un rôle crucial dans la clairance du glutamate de la fente synaptique, se dérèglent. Une excitation prolongée peut entraîner une activation des JNK et ERK au sein de la microglie et des astrocytes. Chacune de ces kinases peut activer la transcription du facteur nucléaire κB (NF κB) ce qui induit la synthèse de facteurs pro-inflammatoires. L'activation des récepteurs TRPV1 en période d'inflammation contribue également au phénomène de sensibilisation.

Source : modifiée de (Milligan and Watkins, 2009)

3.6 Traitements actuels

La Société Canadienne de la Douleur a publié en 2007 un consensus et ligne de conduite sur le contrôle pharmacologique de la douleur neuropathique chronique. Des recommandations ont ainsi été formulées quant à l'utilisation de différentes classes de médicaments. Ces recommandations sont basées sur l'efficacité analgésique, l'innocuité, la facilité d'utilisation et la rentabilité de ces médicaments. En accord avec ces lignes de conduite, les médicaments de première ligne incluent certains antidépresseurs dont les antidépresseurs tricycliques et certains anticonvulsivants dont la gabapentine et la prégabaline. Les inhibiteurs du recaptage de la sérotonine et de la noradrénaline et la lidocaïne topique constituent les médicaments de

deuxième ligne. La troisième ligne de traitement inclue le tramadol et les analgésiques opioïdes à libération contrôlée pour les douleurs moyennes à graves. Finalement, la quatrième ligne de traitement recommandée est constituée de la méthadone, des cannabinoïdes et de certains anticonvulsivants dont la lamotrigine, le topiramate et l'acide valproïque (Moulin et al., 2007). Cependant, comme tous médicaments, ceux-ci démontre des effets secondaires et désavantages qui renforcent la nécessité de continuer la recherche pour élaborer de nouvelles approches thérapeutiques pour le soulagement de la douleur neuropathique.

Tableau II : Médicaments utilisés dans le traitement de la douleur neuropathique

Agents	Récepteurs et/ou mode d'action	Effets adverses	Commentaires
Antidépresseurs tricycliques : Amitriptyline et Nortriptyline	- Blocage des canaux sodiques, - Bloque la recapture neuronale et gliale de GABA, - Se lie aux transporteurs sérotoninergiques et noradrénergiques, - Bloque les récepteurs muscariniques, histaminergiques de type H ₁ et α ₁ -adrénergiques	- Somnolence, - Confusion, - Hypotension, - Constipation, - Rétention urinaire, - Arythmie	- Contrindiqué chez les patients souffrant de glaucome et de maladies cardiovasculaires
Inhibiteurs du recaptage de la sérotonine et noradrénaline	- Se lie sélectivement aux transporteurs sérotoninergiques et noradrénergiques,	- Nausée, - Étourdissement, - Somnolence, - Hypertension,	- Ajustement de dosage nécessaire pour les patients atteints d'insuffisance

	récepteurs $\alpha 2$ -adrénergiques et 5-HT	- Ataxie, - Constipation	rénale, - Contre-indiqué dans les cas de glaucome
Anticonvulsivants : Gabapentine et Prégabaline	- Régulateurs négatifs de l'excitabilité neuronale qui empêchent l'activité électrique excessive, - Blocage des canaux cationiques voltage-dépendants, - Potentialisation de la neurotransmission inhibitrice de l'acide γ -aminobutyrique (GABA), - Inhibition de la transmission excitatrice glutamatergique	- Somnolence, - Étourdissement, - Œdème périphérique, - Trouble visuel, - Ataxie	- Ajustement de dosage nécessaire pour les patients atteints d'insuffisance rénale
Opioides : Morphine, Oxycodone et Fentanyl	Actions au niveau cellulaire : - Inhibent l'adénylate cyclase, - Ouverture des canaux potassiques entraînant une hyperpolarisation cellulaire, - Inhibent l'ouverture	- Nausée, - Vomissement, - Sédation, - Étourdissement, - Rétention urinaire, - Constipation, - Dépression respiratoire	- Le développement de dépendance est infrequent sauf chez les patients ayant un historique de consommation

	<p>de canaux calciques dépendants du voltage réduisant la libération de neurotransmetteurs.</p> <p>Actions centrales :</p> <ul style="list-style-type: none"> - Stimulation des fibres inhibitrices GABAergiques bloquant la libération de substance P ou de glutamate <p>Actions spinales :</p> <ul style="list-style-type: none"> - Action au niveau des récepteurs opioïdes μ, γ et κ qui se retrouve au niveau de la corne dorsale de la moelle épinière 		
Autres			
Tramadol	<ul style="list-style-type: none"> - Opioïde synthétique d'action centrale, agoniste partiel μ, inhibe le recaptage de la noradrénaline et de la sérotonine 	<ul style="list-style-type: none"> - Ataxie, - Sédation, - Constipation, - Convulsion 	<ul style="list-style-type: none"> - Utiliser avec précaution chez des patients épileptiques
Lidocaïne	<ul style="list-style-type: none"> - Bloque la transmission de l'influx nerveux le 		<ul style="list-style-type: none"> - Utile dans les cas de neuralgie post-herpétique

Cannabinoïdes	<p>long de la membrane lipidique axonale</p> <p>- Agit sur 2 sous-types de récepteurs cannabinoïdes : CB₁ – localisé au niveau du système nerveux central et périphérique et CB₂ – localisé au niveau du système immunitaire</p>	<p>- Étourdissement,</p> <p>- Fatigue,</p> <p>- Nausée,</p> <p>- Euphorie</p>	
---------------	--	---	--

Source : information tirée de (Beaulieu and ebrary Inc., 2005; Moulin et al., 2007)

3.7 Les modèles animaux

Plusieurs modèles animaux existent pour étudier les différents types de douleur incluant la douleur inflammatoire, neuropathique, viscérale, post-opératoire et cancéreuse. Des modèles d'électrophysiologie sur animaux anesthésiés et des modèles *in vitro* utilisant des cultures cellulaires existent également. Aussi, de plus en plus de modèles de souris modifiées génétiquement, modèle *knock-out* (KO), sont utilisés. Ces modèles sont souvent créés dans l'objectif de reproduire une douleur similaire à la douleur ressentie par un humain pour différentes conditions cliniques communes (Héon, 2005). Ces modèles doivent aussi être reproductibles quant aux déficits sensoriels créés, c'est-à-dire l'allodynie et l'hyperalgésie, pendant une période suffisante nécessaire aux différents tests sensoriels. Parmi les différents modèles existants, la plupart des modèles utilisés pour étudier la douleur inflammatoire ont recours à l'injection intraplantaire, intradermique ou sous-cutanée de substances irritantes. Pour étudier les douleurs viscérales, des modèles animaux induisant la dilatation d'organes creux, l'injection de substances irritantes dans la cavité abdominale ou dans les viscères, l'ischémie, l'inflammation et la stimulation électrique de certains organes ont été utilisés. Finalement, pour étudier la douleur neuropathique, la création chirurgicale de diverses lésions impliquant des

nerfs périphériques ou centraux ont été utilisées. Parmi ceux-ci on retrouve le plus fréquemment le modèle d'hémisection spinale de Bennett qui consiste à pratiquer une hémisection de la moelle épinière le plus souvent au niveau de T13, ce qui entraîne une douleur centrale persistante (Bennett et al., 2000), le modèle de ligature partielle du nerf sciatique de Seltzer qui consiste à scinder le nerf sciatique d'un membre postérieur dans le sens longitudinal puis à ligaturer le tiers ou la moitié des fibres nerveuses, ce qui entraîne une allodynie mécanique et une hypersensibilité mécanique et thermique qui peuvent persister plusieurs mois (Seltzer et al., 1990) et le modèle de ligature de nerfs spinaux de Kim et Chung qui consiste à ligaturer et sectionner les nerfs spinaux L5 et L6 près du ganglion de la racine dorsale (Kim and Chung, 1992). Le modèle de ligature et section des nerfs tibial et péronier commun (*spared nerve injury model*) de Decosterd and Woolf est aussi fréquemment utilisé et consiste en la section de deux branches du nerf sciatique, les nerfs tibial et péronier, mais où la troisième branche, le nerf sural est laissée intacte (Decosterd and Woolf, 2000).

3.7.1 Spécificités du modèle CCI

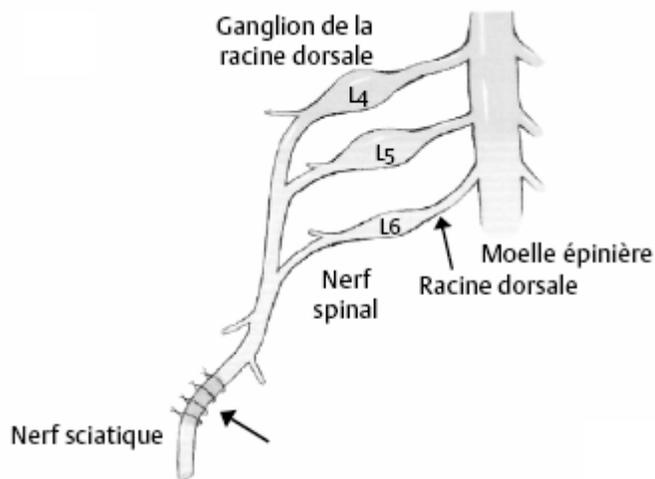


Figure 7 : Représentation du modèle chirurgical de Bennett et Xie qui consiste en la pose de 4 ligatures lâches autour du nerf sciatique.

Source : modifiée de (Hogan, 2002)

Un autre modèle fréquemment utilisé est le modèle de constriction chronique du nerf sciatique de Bennett (CCI). Dans ce modèle, quatre ligatures lâches sont placées autour du nerf sciatique proximale à sa trifurcation ce qui entraîne généralement chez l'animal des comportements nociceptifs importants incluant la protection du membre affecté, une boiterie et une réduction de l'appui sur ce membre. Dans ce modèle, l'allodynie et l'hyperalgésie se développent en 10 à 14 jours et persistent environ 8 semaines. La constriction du nerf provoque la perte des grosses fibres myélinisées. Elle provoque aussi la formation d'œdème intraneural, de l'ischémie focale et la dégénérescence axonale du nerf impliqué. (Bennett and Xie, 1988) Une étude récente a aussi démontré une augmentation de la concentration de TNF- α et IL-10 au niveau du ganglion de la racine dorsale de la moelle épinière bilatéralement au niveau du renflement lombaire chez des rats ayant subi le modèle CCI. Cette augmentation est pour le moment attribuée à une réaction générale neuro-inflammatoire, et est probablement impliquée dans les mécanismes de douleur observés suite à la chirurgie. (Jancalek et al., 2010) Plusieurs autres modèles existent de même que des variations des modèles précédemment décrits, mais ceux-ci sont utilisés moins fréquemment.



Figure 8 : *Rat subissant une chirurgie de constriction chronique du nerf sciatique selon le modèle de Bennett et Xie.*

3.8 Les tests d'évaluation de la douleur

Plusieurs tests ont été décrits pour permettre l'évaluation de la douleur chez les animaux. Il faut cependant tenir compte du fait que l'expression de la douleur peut varier entre les individus, mais aussi entre les différentes espèces (Héon, 2005). Par exemple, leur nature de proie a amené les rongeurs à s'adapter et à masquer leurs signes de douleur afin de ne pas éveiller l'attention d'éventuels prédateurs (Héon, 2005). De plus, l'environnement des animaux peut influencer leur réponse aux différents tests, ce qui souligne l'importance de laisser à ceux-ci une période d'acclimatation suffisante dans les différents appareils avant d'effectuer les prises de mesures (Héon, 2005).

3.8.1 *Évaluation de l'hyperalgésie thermique*

Pour évaluer le degré de neuropathie développé par des animaux suite à différents modèles de douleur neuropathique, plusieurs tests ont été décrits. La neuropathie s'exprimant principalement sous forme d'hyperalgésie thermique et d'allodynie mécanique, se sont ces phénomènes qui sont souvent évalués. Les principaux tests permettant d'évaluer l'hyperalgésie thermique incluent le test de retrait de la queue (D'Amour and Smith, 1941), le test de la plaque chauffante (Mogil et al., 1999), le test de la plaque refroidissante (Jasmin et al., 1998) et le test de retrait de la patte de Hargreaves (Hargreaves et al., 1988). Dans ce dernier test, les rats sont placés dans des boîtes en plexiglas où une source lumineuse chauffante est appliquée sous un de leur membre pelvien jusqu'à ce qu'ils démontrent un réflexe de retrait. Un appareil électronique permet de mesurer le temps nécessaire à l'expression de ce réflexe.



Figure 9 : *Animaux en position pour le test de Hargreaves.*

Un des avantages de ce test est qu'il est moins affecté par les évaluations répétitives que le test de la plaque chauffante (Héon, 2005). Aussi, il permet d'évaluer chaque patte indépendamment l'une de l'autre (Menéndez et al., 2002). De plus, ce test s'effectue sur des animaux sans contention ni anesthésie et permet l'application d'un stimulus d'intensité progressive (Cheppudira, 2006), ce qui permet d'évaluer le seuil de douleur. Le temps de retrait de la patte des animaux diminue lorsqu'il y a présence d'hyperalgésie (Cheppudira, 2006), ce qui permet d'évaluer une éventuelle réponse à un traitement. Une variante de ce test a été décrite chez la souris et consiste à l'utilisation d'une plaque chauffante unilatérale (Menéndez et al., 2002).

3.8.2 Évaluation de l'allodynie mécanique

Pour évaluer l'allodynie mécanique, le test de pression sur la patte (Randall and Selitto, 1957) peut être utilisé de même que le test des filaments de Von Frey (Chaplan et al., 1994). Ce test consiste à appliquer, tour à tour, des filaments de diamètre croissant sur la surface plantaire de la patte arrière des animaux jusqu'à ce que ceux-ci retirent leur membre. Le diamètre du fil est alors noté et est associé à la force en gramme qu'il représente.



Figure 10 : *Test des filaments de Von Frey.*

Cependant, ce test peut produire des résultats faux négatifs, car la valeur seuil de base des animaux est souvent assignée étant donné que ceux-ci n'ont souvent pas de réponse au test avant l'insulte ou le traitement. La valeur ainsi déterminée est alors souvent plus faible que la valeur seuil de base réelle. Donc, un effet subtil suite au traitement peut être masqué et entraîner un résultat faux négatif (Bove, 2006). Aussi, le poids que l'animal porte sur sa patte lésée peut devenir un facteur confondant dans l'évaluation de l'allodynie mécanique (Kauppila et al., 1998). Une variante du test des filaments de Von Frey existe et consiste en une version électronique de celui-ci où l'intensité de la pression appliquée sur la patte est automatiquement enregistrée suite au retrait du membre. Cette variante serait plus sensible que la version originale du test (Vivancos et al., 2004).

Finalement, la sensibilité chimique des animaux peut être évaluée à l'aide du test de contraction abdominale (Mogil et al., 1999) ou d'une injection intraplantaire de capsaïcine (Dougherty et al., 1998) ou de formol (Dubuisson and Dennis, 1977). Ce dernier test permet de produire des sensations de douleur de différentes intensités selon la concentration de formaline utilisée (Aloisi et al., 1995).

3.8.3 *Évaluation de la coordination motrice*

Afin de permettre une meilleure interprétation des différents tests d'évaluation de la douleur, la coordination motrice des animaux doit être préalablement évaluée. Pour ce faire, les animaux sont placés sur un "rotarod treadmill" et le temps pendant lequel ils y restent est mesuré, car le test de rotarod est sensible aux drogues qui affectent la coordination motrice (Rustay et al., 2003). Lorsqu'il a été décrit par Dunham et al. (1957), le test de rotarod était d'ailleurs utilisé comme outil pour mesurer les déficits neurologiques chez les rongeurs.

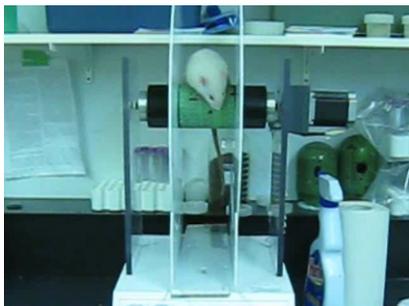


Figure 11 : *Rotarod treadmill.*

Chapitre 2 : Objectifs et hypothèses

Suite à la revue de littérature, il est possible de constater la nécessité de trouver des alternatives pour le traitement de la douleur neuropathique. Le potentiel analgésique du [6]-gingérol a également été mis en relief, cependant aucune donnée précise n'a été établie pour démontrer sa capacité à soulager la douleur neuropathique suite à une administration intrathécale chez le rat. De plus, plusieurs données contradictoires ont été soulevées quant aux propriétés pharmacocinétiques et pharmacodynamiques de la molécule.

Nos hypothèses de départ sont :

- 1) Considérant la ressemblance structurelle du [6]-gingérol avec la capsaïcine (Dedov et al., 2002), le [6]-gingérol devrait agir au niveau des mêmes récepteurs que la capsaïcine, soit les récepteurs TRPV1.
- 2) Le [6]-gingérol, une molécule lipophile, devrait être absorbée rapidement et se distribuer efficacement dans le système nerveux central permettant ainsi son action au niveau des récepteurs TRPV1 situés au niveau de la corne dorsale de la moelle épinière.
- 3) Le [6]-gingérol posséderait des propriétés analgésiques comparables à celles de l'eugénol et de la vanilline, deux molécules précédemment étudiées (Beaudry et al., 2010; Lionnet et al., 2010), permettant de réduire l'hyperalgésie thermique et l'allodynie mécanique chez des rats ayant subi une chirurgie visant le développement de douleur neuropathique en agissant sur le récepteur TRPV1.

Nos objectifs sont :

- 1) Développer une nouvelle méthode HPLC-ESI/MS/MS capable de quantifier le [6]-gingérol dans des matrices biologiques.
- 2) Déterminer la stabilité métabolique du [6]-gingérol dans des microsomes hépatiques de rats.
- 3) Identifier et caractériser les métabolites du [6]-gingérol *in vivo* et *in vitro*.

- 4) Étudier la pharmacocinétique et la distribution du [6]-gingérol au niveau du système nerveux central de rats males Sprague-Dawley suivant une administration intrapéritonéale de [6]-gingérol à une dose de 40 mg/kg.
- 5) Déterminer l'effet du [6]-gingérol sur le soulagement de l'hyperalgésie thermique et de l'allodynie mécanique suite à une administration intrathécale de 10 µg de la molécule sur des rats souffrant de douleur neuropathique suite à une chirurgie causant la constriction chronique du nerf sciatique, selon le modèle de Bennett (Bennett and Xie, 1988). La voie d'administration intrathécale a été privilégiée étant donné que nous désirons étudier l'effet central de molécule comparativement à un possible effet périphérique.

Chapitre 3 : Articles

1. Premier article

Characterization of [6]-Gingerol Metabolism in Rat by Liquid Chromatography Electropray Tandem Mass Spectrometry

Marie-Lou Gauthier¹, Jennifer Douat^{1,3}, Pascal Vachon¹ and Francis Beaudry^{1,2}

1- Département de biomédecine vétérinaire, Faculté de médecine vétérinaire, Université de Montréal, St-Hyacinthe, Québec, Canada J2S 2M2

2- Groupe de Recherche en Pharmacologie Animale du Québec (GREPAQ), Faculté de médecine vétérinaire, Université de Montréal, Saint-Hyacinthe, Québec, Canada J2S 2M2

3- Institut de Chimie Pharmaceutique Albert Lespagnol, Université de Lille 2, Lille BP83–59006, France

Published in *Biomedical Chromatography*, 2011, volume 25 (10), 1150-1158.

1.1 Abstract

[6]-Gingerol is a structural analog of capsaicin, an agonist of the transient receptor potential channel vanilloid 1, which is known to have therapeutic properties for the treatment of pain and inflammation. A selective and sensitive quantitative method for the determination of [6]-gingerol by HPLC-ESI/MS/MS was developed. The method consisted of a protein precipitation extraction followed by analysis using liquid chromatography electrospray tandem mass spectrometry. The chromatographic separation was achieved using a Thermo 100 x 2.1 mm C₈ column combined with an isocratic mobile phase composed of acetonitrile, water and formic acid (80:20:0.1) at a flow rate of 250 µL/min. The mass spectrometer was operating in SRM mode and an analytical range set at 20-5000 ng/mL was used to construct a calibration curve in rat plasma. The interbatch precision (% CV) and accuracy (% NOM) observed were 2.9-10.8 % and 98.1-102.1 % in rat plasma. Similarly, precision and accuracy in rat liver microsomal suspension were also evaluated at nominal concentrations of 1, 25 and 100 µM; the precision (% CV) was < 3.4% and the accuracy (% NOM) observed ranged from 89.7 to 109.4%. An *in vitro* metabolic stability study using rat liver microsomes was performed to determine intrinsic clearance of [6]-gingerol. The results show slow degradation with a $T_{1/2}$ of 163 min and relatively low intrinsic clearance suggesting that phase I metabolism may not be a major contributor of the drug clearance. Further analyses were performed to characterize *in vitro* and *in vivo* metabolites. Three main phase I metabolites and four phase II metabolites were identified by HPLC-MS/MS and HPLC-MSD TOF. However, the results suggest that glucuronidation of hydroxylated [6]-gingerol is the primary metabolite excreted in rat urine.

1.2 Introduction

[6]-Gingerol [(*S*)-5-hydroxy-1-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-3-decanone] is one of the major pungent components of ginger (*Zingiber officinale* Roscoe, Zingiberaceae), a plant widely used as a spice in a variety of food and beverages, and as a drug in traditional Chinese medicine (Schwertner and Rios, 2007; Jiang *et al.*, 2008; Wang *et al.*, 2009). Pharmacological effects of [6]-gingerol include antioxidant, anti-inflammatory and antitumor activities (Dugasania *et al.*, 2010; Suhr, 1999, 2002). However, our interest in [6]-gingerol resides in its

potential action on the relief of neuropathic pain. [6]-Gingerol is a structure analog of capsaicin, the most abundant pungent molecule present in chili pepper (Szallasi and Blumberg, 1999) and the molecular structures are shown in Fig. 1. Capsaicin is a selective agonist of the transient receptor potential channel, vanilloid subfamily member 1 (TRPV1), a non-selective cation channel expressed by nociceptors. TRPV1 is activated by capsaicin and other vanilloids, protons or noxious heat (Levine and Alessandri-Haber, 2007; Caterina *et al.* 1997). TRPV1 is well known for its role in acute thermal nociception, inflammation and injuries inducing mechanical and thermal hyperalgesia (Walker *et al.*, 2003; Caterina *et al.*, 2000; Davis *et al.*, 2000). Recent molecular modeling studies indicated that both the vanillyl moiety as well as the long unsaturated acyl chain has a significant impact on relative binding affinities with TRPV1 receptor (Viswanadhan *et al.*, 2007; Walpole *et al.*, 1996). Consequently, the chemical structure similarities of [6]-gingerol with capsaicin suggest that it could be a good ligand of the TRPV1 receptor and potentially be used to treat neuropathic and chronic pain.

A recent investigation of pharmacokinetic properties of [6]-gingerol following oral administration of a ginger extract, containing 53% [6]-gingerol, was published (Jiang *et al.*, 2008). The pharmacokinetics parameters presented may not be representative since a cocktail of multiple components from a crude ginger extract was administered. Consequently, co-administered molecules may impact the absorption and the metabolism of [6]-gingerol. However, results suggest that [6]-gingerol is rapidly absorbed and well distributed in tissues. Another study (Ding *et al.*, 1991) following intravenous administration in rats showed that [6]-gingerol was rapidly eliminated with a short terminal half-life (7.23 min). However, other results (Suekawa *et al.*, 1984) suggested that measurable pharmacological effects were maintained for 180 min following an intravenous and/or oral administration. Additionally, recent results showed relatively high tissue concentrations (Jiang *et al.*, 2008) following an oral administration of [6]-gingerol and the lipophilicity may explain the accumulation and slow elimination. As demonstrated by these contradictory results, it is necessary to better characterize the pharmacokinetics and metabolism of [6]-gingerol to adequately assess its potential for the treatment of neuropathic pain.

There are few analytical methods available in the literature for the measurement of [6]-gingerol in biological matrices. A recent method was published with adequate results (Wang *et al.* 2009), but used selected ion monitoring instead of the more sensitive and selective selected reaction-monitoring mode (SRM), which is routinely used in small molecule quantitation. The first objective of the current study was to develop a novel HPLC-ESI/MS/MS method capable of quantifying [6]-gingerol in plasma and microsomal suspensions. The second objective was to determine the intrinsic clearance of [6]-gingerol in rat liver microsomes. At the moment, no information related to metabolic stability of [6]-gingerol in liver microsomes is published. Intrinsic clearance (Cl_i) is a very important parameter used to rank compounds prior to their development by pharmaceutical companies (Obach, 1999). Clearance is probably the most useful parameter for the evaluation of drug elimination mechanism and has probably the most consequences for drug response and the duration of pharmacological effect. Finally, [6]-gingerol *in vitro* and *in vivo* metabolite identification and characterization were performed based on MS survey scan and MS/MS spectra.

1.3 Materials and methods

Reagents. [6]-Gingerol and capsaicin were obtained from Sigma-Aldrich (St Louis, MO, USA). Other chemicals, including acetonitrile, formic acid, acetone and methanol, were purchased from J.T. Baker (Phillipsburg, NJ, USA). Pooled rat, dog and human microsomes were obtained from BD Biosciences (Woburn, MA, USA). Microsomes were tested for activities with standard testing procedure prior usage.

Quantitative analytical methods. The concentrations of [6]-gingerol were determined using an HPLC-ESI/MS/MS assay. Briefly, 50 μ L of sample matrix (i.e. plasma or microsomal suspension) was mixed with 250 μ L of internal standard solution (500 ng/mL of capsaicin in 50:50 methanol:acetone) in a 1.5 mL centrifuge tube. The sample was then vortexed vigorously and the samples were allowed to rest for 10 min at room temperature prior to centrifugation. Samples were centrifuged at approximately 12,000g for 10 min and 200 μ L of the supernatant was transferred into an injection vial. Ten microliters of samples were injected with a Perkin Elmer Series 200 HPLC (Shelton, CT, USA) onto a Thermo 100 x 2.1 mm C₈ column (5 μ m) at

a flow rate of 250 $\mu\text{L}/\text{min}$. The mobile phase consisted of a mixture of acetonitrile, water and formic acid at ratio of 80:20:0.1. The AB SCIEX API 3+ mass spectrometer (Concord, Ontario, Canada) was interfaced with the HPLC system using a pneumatic assisted electrospray ion source. The nitrogen pressure of the nebulizer gas was set at 40 psi and the ESI electrode was set to 4000 V. The nebulization was assisted with nitrogen gas heated to 415°C and set to a flow rate of 4 L/min. The declustering potential was set at 10 V and the collision energy (E_{lab}) at 20 V. The collision gas used was argon at 2.7×10^{14} molecules/cm². The SRM transitions were m/z 295 \rightarrow 171 and 306 \rightarrow 137 for [6]-gingerol and capsaicin, respectively. The dwell time was set at 150 ms and the pause time at 5 ms.

Microsomal incubation. The incubation was performed as previously described (Chanda *et al.*, 2008) and all incubations were performed in triplicate. The incubations were performed in a microcentrifuge tube and contained various concentrations ranging from 1 to 100 μM of [6]-gingerol, 1 mg/mL of microsomal proteins diluted in 0.1 M phosphate buffer, pH 7.4. Microsomal suspensions were preincubated with NADPH (1mM) for 5 min at 37°C prior to fortification with [6]-gingerol. Immediately after fortification of [6]-gingerol into the microsomal suspension containing NADPH, the sampling point for $t = 0$ was taken, and further sampling points were taken at 5, 10, 15, 20, 30, 45 and 60 min. Fifty microliter samples were taken and mixed with 250 μL of internal standard solution (500 ng/mL of capsaicin in 50:50 methanol:acetone) in a 1.5 mL centrifuge tube. Samples were centrifuged at approximately 12,000g for 10 min and 200 μL of the supernatant was transferred into an injection vial for HPLC-ESI/MS/MS analysis.

Determination of Michaelis constant, K_m . The Michaelis–Menten equation describes the rates of irreversible enzymatic reactions that are generally observed in liver microsomes. Michaelis-Menten parameters can be estimated by various linearization methods. However, nonlinear regression analysis was performed using the well-known Michaelis-Menten equation (Michaelis and Menten, 1913):

$$\frac{d[S]}{dt} = v_i = \frac{V_{\max} [S]}{K_m + [S]} \quad (1)$$

The initial velocity (v_i) was determined using equation (2):

$$v_i \approx \frac{\Delta[S]}{\Delta t} = \frac{[S]_{t=0\text{min}} - [S]_{t=10\text{min}}}{10} \quad (2)$$

The v_i was calculated based on the concentration measured after 10 min incubation of [6]-gingerol in microsomes. Nonlinear regression analysis was performed with PRISM (version 5.0c) GraphPad software (La Jolla, CA, USA) using the nonlinear curve-fitting module with an estimation of the goodness of fit.

Determination of metabolic stability. Following sample analysis, the analyte/internal standard peak area ratio was used to determine [6]-gingerol concentration. All depletion data were fitted to the monoexponential decay model described in equation (3), including a 1/y weighting.

$$C(t) = C_0 e^{-kt} \quad (3)$$

In vitro half-life was obtained using equation (4):

$$T_{1/2} = \frac{0.693}{k} \quad (4)$$

The intrinsic clearance (CL_i) can be derived from *in vitro* $T_{1/2}$ data [equation (4)]. The fundamental basis behind this simple approach was demonstrated from the derivation of the integrated Michaelis-Menten equation (Obach, 1999; Segel, 1975):

$$CL_i = V \times \frac{0.693}{T_{1/2}} \quad (5)$$

Animal dosing. A total of three male Sprague–Dawley rats (Charles River, St-Constant, QC, Canada) weighing 250–350 g were used for these experiments. Rats received tap water and a standard laboratory rodent diet (Charles River Rodent chow 5075, St-Constant, QC, Canada) *ad libitum*. [6]-Gingerol dosing solutions were prepared in sterile saline (Abbott Laboratories, USA) including 5% (v/v) of cremophor. Male Sprague–Dawley rats received a single

intraperitoneal (i.p.) dose of 40 mg/kg and rats were kept in metabolic cages and observed following each treatment for any signs of behavioral changes, reaction to test item or ill health. Urine and feces samples were collected over a 24 h period for the determination of [6]-gingerol excretion pathway. Feces samples were homogenized at a ratio 1:5 (w:v) with methanol and a 400 μ L aliquot was filtered prior to analysis by HPLC-MS/MS. The experimental protocol was approved by the Institutional Animal Care and Use Committee of the Faculty of Veterinary Medicine of the University of Montreal prior to animal use and is in accordance with the guidelines of the Canadian Council on Animal Care.

Metabolite identification by HPLC-MS/MS. Matrix samples (microsomal suspension and urine) were precipitated when mixed with methanol at a ratio of 1:5 and centrifuge at 12,000g for 10 min. The supernatant was transferred into HPLC vials. Two-microliter aliquots were chromatographed onto a Thermo Biobasic C₈ 100 x 1 mm column using a Thermo Surveyor HPLC system (San Jose, CA, USA) and a linear gradient. The initial mobile phase condition consisted of acetonitrile and water both fortified with 0.2% (v/v) of formic acid and was maintained at a ratio of 5:95 from 0 to 2 min. From 2 to 12 min a linear gradient was applied and a ratio of 80:20 was maintained from 12 to 13 min. At 13.1 min, the mobile phase composition reverted to 5:95 and the column was allowed to equilibrate for 8 min for a total run time of 21 min. The flow rate was fixed at 100 μ L/min and [6]-gingerol eluted at 10.7 min. The eluates were analyzed using a Thermo LCQ Advantage ion trap mass spectrometer (San Jose, CA, USA) interface with a pneumatic assisted electrospray ion source equipped with a metal needle. The sheath gas was set to 5 units, the ESI electrode was set to 4000 V and the capillary temperature was set at 300°C. The mass spectrometer was operating in full-scan MS [150-650] and product ion spectra were collected for all peaks of interest at a collision energy set to 35%. The identification was based on specific relative mass shift and the [6]-gingerol MS/MS spectrum was used as a template model for structure identification, assuming the fragmentation pattern from the product-ion spectrum of the parent drug could be used to deduce the structures of the metabolites (Hopfgartner and Bourgoigne, 2003). Further analyses were performed on an Agilent HPLC/MSD TOF (Santa Clara, CA, USA) to measure accurate mass of detected metabolites since MS/MS data provide limited structural information.

1.4 Results and discussion

Bioanalytical results. Full-scan and product ion mass spectra for [6]-gingerol and capsaicin were obtained in positive ion mode. The full-scan spectra of [6]-gingerol and capsaicin showed an intense signal for the protonated molecular ion at m/z 295 ($[M+H]^+$) and 306 ($[M+H]^+$), respectively. However, for [6]-gingerol, ions at m/z 277 corresponding to loss of water was observed and declustering potential needed to be adjusted to limit in source fragmentation. The product ion spectrum of [6]-gingerol has a predominant fragment ion at m/z 171 and the capsaicin product ion spectrum has a predominant fragment ion at m/z 137. The SRM transition for quantitation was set for best sensitivity at 295 \rightarrow 171 and 306 \rightarrow 137 for [6]-gingerol and capsaicin, respectively. The limit of detection was established at 5 pg injected on column in the positive electrospray mode. A linear regression (weighted 1/concentration) was judged to produce the best fit for the concentration-detector relationship. The regression model used was determined using the sum of the squares of the deviation to verify the best fit (Beaudry, 1999). The mean calculated coefficients of correlation (r) were 0.992 (\pm 0.001) for an analytical range set at 20-5000 ng/mL. The precision (coefficient of variance, % CV) and accuracy (% NOM) at nominal concentration of 50, 500 and 5000 ng/mL were determined in 18 replicates of rat plasma analyzed in three individual runs containing six replicates of each quality control samples. The interbatch precision (% CV) and accuracy (% NOM) observed were 2.9-10.8% and 98.1-102.1% in rat plasma. Similarly, precision and accuracy in rat liver microsomal suspension were also evaluated at nominal concentrations of 1, 25 and 100 μ M and the precision (% CV) was $<$ 3.4% and accuracy (% NOM) observed ranged from 89.7 to 109.4%. Extracted blank plasma or microsomal suspension did not show any significant interference. The limit of quantification was set at 20 ng/mL and, according to the bioanalytical validation guideline published by the FDA in May 2001 (CDER and CVM, 2001), acceptable precision and accuracy results were achieved.

Calculation of Michaelis constant K_m . The effect of substrate concentration on the initial rate (v_i) of an enzyme-catalyzed reaction is a fundamental concept in enzyme kinetics. The Michaelis constant K_m of an enzyme represents the substrate concentration at which the reaction

occurs at half of the maximum rate. K_m is an indicator of the affinity that an enzyme has for a particular substrate, and hence the stability of the enzyme-substrate complex. Low K_m value may suggest that enzymes have a greater affinity for substrate and vice-versa. Indirectly, the Michaelis constant K_m approximates the dissociation constant of the enzyme-substrate complex. To adequately determine the value of K_m , the data was fitted starting with the Michaelis-Menton equation 1. The initial rate (v_i) was calculated (2) using concentrations of [6]-gingerol at $t = 0$ and $t = 10$ min determined by the analytical method described previously. The plot illustrated in Fig. 2 shows results coherent with kinetics following a Michaelis-Menton enzymatic reaction. The derived results from the nonlinear regression suggest a [6]-gingerol K_m value relatively high at 80.3 μM , indicating that rat liver microsomal enzymes have a relatively low affinity for [6]-gingerol. These results suggest that phase 1 metabolism is not saturable and the drug clearance should not be impaired at pharmacological relevant systemic concentrations.

[6]-Gingerol metabolic stability evaluation in rat liver microsomes. Metabolism is a major contributor of drug clearance and it directly influences the systemic drug exposure. [6]-Gingerol metabolic stability at 10 μM ($[S] \ll K_m$) was evaluated in pooled rat liver microsomes. The data presented in Fig. 3 were fitted with a mono-exponential decay model as described in equation 3 (weighted $1/y$) and the coefficients of correlation (r) were better than >0.96 for each fitted data series of samples, suggesting that first-order kinetics were observed for [6]-gingerol and the condition of the model was met (Masimirembwa *et al.*, 2001). [6]-Gingerol *in vitro* $T_{1/2}$ was 163.4 (± 18.5) min and derived Cl_i was 0.0043 (± 0.0004) mL/min in pooled rat liver microsomes. The extent of degradation in rat liver microsomes was modest and 76.7% of [6]-gingerol remained unchanged after a 60 min incubation period. Metabolic stability of [6]-gingerol in dog and human liver microsomes was also assessed and *in vitro* $T_{1/2}$ values observed were 171.5 (± 23.4) min and 545.6 (± 104.3) min, respectively (data not shown). The observed *in vitro* $T_{1/2}$ of 163.4 min indicates relatively slow degradation of [6]-gingerol in rat liver microsomes, suggesting that phase 1 liver metabolism is unlikely to significantly contribute to [6]-gingerol elimination pathway.

In vitro metabolite identification by HPLC-MS/MS. Chromatograms were used to profile components with relative retention time, while pseudo molecular ions ($[M+H]^+$) were detected and further structural information was collected with by HPLC-MS/MS. The [6]-gingerol MS/MS spectrum was used as a template model for structure identification, assuming the fragmentation pattern from the product-ion spectrum of the parent drug could be used to deduce the structures of the metabolites. However, MS/MS spectrum of [6]-gingerol does not provide rich structural information. Full-scan MS spectra (m/z 150-350) were collected following a 60 min incubations of [6]-gingerol in rat liver microsomes and results shown in Fig. 4 suggest the presence of the parent compound at m/z 295, [6]-shogaol at m/z 277 (M-18), dehydro [6]-gingerol at m/z 293 (M-2) and hydroxylated [6]-gingerol at m/z 311 (M+16). [6]-Shogaol is a well know biodegradation product of [6]-gingerol but the most predominant phase I metabolite observed in rat liver microsomes was the hydroxylated [6]-gingerol. These results were compatible with our previous kinetic data showing that [6]-gingerol was the most abundant analyte present following a 60 min incubation period in rat liver microsomes. Full-scan MS/MS spectra were collected (data not shown) and fragments observed were compatible with parent structure.

In vivo metabolite identification by HPLC-MS/MS. Urine and feces samples were collected following a single i.p. dose of 40 mg/kg in male Sprague–Dawley rats. The samples were analyzed using an ion trap and a time of flight (TOF) mass spectrometer. Phase I metabolites were detected principally in urine samples. Figure 5 shows the presence of the parent drug at m/z 295 as well as two metabolites. [6]-Shogaol at m/z 277 (M-18) and hydroxylated [6]-gingerol at m/z 311 (M+16) were clearly detected in rat urine. The MS/MS spectra were coherent with the structures and suggest that hydroxylation of [6]-gingerol is related to an oxidation of the aliphatic side chain forming 9-hydroxy [6]-gingerol. However, MS/MS spectra did not provide sufficient information to fully support this affirmation. Conjugated metabolites were also detected as depicted in Fig. 6. Conjugated glucuronide metabolites of [6]-gingerol (m/z 471), dehydro [6]-gingerol (m/z 469) and hydroxylated [6]-gingerol (m/z 487) were detected and specific ions related to neutral loss of 176 or 192 Da were observed. The conjugated glucuronide metabolite of hydroxylated [6]-gingerol (m/z 487) is particularly interesting since MS/MS spectra contain a predominant ion at m/z 295

corresponding to a neutral loss of 192 Da, suggesting that conjugation is occurring on the aliphatic hydroxyl group rather than the phenol group. In feces, we mostly detected glucuronide metabolite of [6]-gingerol and only traces of the others phase II metabolites. Further analyses were required in order to strengthen our results since MS/MS spectra [6]-gingerol and metabolites did not reveal sufficient structural information. Samples were analyzed using an Agilent HPLC/MSD TOF to measure the exact mass of each associated peak detected in previous experiments. The results shown in Table 1 demonstrate with a mass accuracy within 5 ppm that previously suggested metabolites were observed in rat urine. Additionally, these experiments also suggested the presence of a [6]-shogaol glucuronide metabolite, not previously detected on the ion trap mass spectrometer. As illustrated in Fig. 7, seven metabolites of [6]-gingerol were identified including three phase I and four phase II metabolites. These metabolites are likely to play a significant role in the drug elimination. The semi-quantitative comparison of mass chromatograms and abundance shows that phase I metabolites abundance is relatively low compared with phase II metabolites.

1.5 Conclusion

A novel high-performance liquid chromatographic–mass spectrometric SRM method was developed to quantify [6]-gingerol by HPLC-ESI/MS/MS. The novel method meets all requirements of specificity, sensitivity, linearity, precision, accuracy and stability generally accepted in bioanalytical chemistry (CDER and CVM, 2001) and can be used to properly characterize [6]-gingerol pharmacokinetic parameters. *In vitro* metabolism studies were performed in rat liver microsomes and the analytical method was used to determine intrinsic clearance of [6]-gingerol. Results show relatively high metabolic stability of [6]-gingerol with $T_{1/2}$ of 163.4 min and low clearance value. This result is interesting and contrasts with the results obtained of 2.3 min half-life with capsaicin a strong agonist of the TRPV1 receptor (Beaudry and Vachon, 2009). Additional *in vivo* investigations were performed, allowing the identification of three main phase I metabolites and four phase II metabolites, but the main metabolites observed were the glucuronide metabolite of hydroxylated [6]-gingerol. Interestingly, this result is also compatible with our *in vitro* investigation where hydroxylated [6]-gingerol was the principal metabolite observed.

1.6 Acknowledgments

The authors acknowledge financial support from the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada. Marie-Lou Gauthier received a scholarship from the Fond du Centenaire of the Faculté de médecine vétérinaire de l'Université de Montréal. The authors would like to thank Dr Alexandra Furtos from the Regional Center for Mass Spectrometry of the Université de Montréal for her generous time on the Agilent HPLC/MSD TOF instrument.

1.7 References

Beaudry F. Statistical evaluation of linearity and non-linearity of LC-MS/MS quantitation analysis, *Pharmaceutical Science* 1999; 1(S1):2437.

Beaudry F, Vachon P. Quantitative determination of capsaicin, a transient receptor potential channel vanilloid 1 agonist, by liquid chromatography quadrupole ion trap mass spectrometry: evaluation of in vitro metabolic stability. *Biomedical Chromatography* 2009; 23: 204–211.

Caterina MJ, Schumacher MA, Tominaga M, Rosen TA, Levine JD, Julius D. The capsaicin receptor: a heat-activated ion channel in the pain pathway. *Nature* 1997; 389: 816–824.

Caterina MJ, Leffler A, Malmberg AB, Martin WJ, Trafton J, Petersen-Zeitz KR, Koltzenburg M, Basbaum AL, Julius D. Impaired nociception and pain sensation in mice lacking the capsaicin receptor. *Science* 2000; 288: 306.

CDER and CVM. Guidance for Industry. Bioanalytical Method Validation. Center for Drug Evaluation and Research and Center for Veterinary Medicine, May 2001. Available from: <http://www.fda.gov/cder/guidance/4252fnl.pdf> [accessed June 2010]

Chanda S, Bashir M, Babbar S, Koganti A, Bley K. *In Vitro* Hepatic and Skin Metabolism of Capsaicin. *Drug Metabolism and Disposition* 2008; 36(4): 670–675.

Davis, J.B., Gray, J., Gunthorpe, M.J., Hatcher, J.P., Davey, P.T., Overend, P., Harries, M.H., Latcham, J., Clapham, C., Atkinson, K., Hughes, S.A., Rance, K., Grau, E., Harper, A.J., Pugh, P.L., Rogers, D.C., Bingham, S., Randall, A. and Sheardown, S.A. Vanilloid receptor-1 is essential for inflammatory thermal hyperalgesia. *Nature*, 2000;405:183–187.

Ding G, Naora K, Hayashibara M, Katagiri Y, Kano Y and Ywamoto K. Pharmacokinetics of [6]-gingerol after intravenous administration in rats. *Chemical and pharmaceutical bulletin* 1991; 39(6): 1612-1614.

Dugasania S, Pichika MR, Nadarajah VD, Balijepalli MK, Tandra S, Korlakunta JN. Comparative antioxidant and anti-inflammatory effects of [6]-gingerol, [8]-gingerol, [10]-gingerol and [6]-shogaol. *Journal of Ethnopharmacology* 2010; 127: 515–520.

Hopfgartner, G. and Bourgoigne, E., Quantitative high-throughput analysis of drugs in biological matrices by mass spectrometry. *Mass Spectrometry Review*, 2003;22(3):195-214

Jiang SZ, Wang NS, Mi SQ. Plasma pharmacokinetics and tissue distribution of [6]-Gingerol in rats. *Biopharmaceutics & drug disposition* 2008; 29: 529–537.

Levine JD, Alessandri-Haber N. TRP channels: target for the relief of pain. *Biochimica et Biophysica Acta* 2007; 1772: 989-1003.

Obach RS. Prediction of human clearance of twenty-nine drugs from hepatic microsomal intrinsic clearance data: an examination of in vitro half-life approach and nonspecific binding to microsomes. *Drug Metabolism and Disposition* 1999; 27: 1350–1359.

Masimirembwa, C.M., Thompson, R. and Andersson, T.B., In vitro high throughput screening of compounds for favorable metabolic properties in drug discovery, *Combinatorial Chemistry and High Throughput Screening*. 2001;4(3):245-263.

Michaelis, L., and M. L. Menten. Die Kinetik der Invertinwirkung. *Biochemische Zeitschrift* 1913; 49:334–336.

Schwertner HA, Rios DC. High-performance liquid chromatographic analysis of 6-gingerol, 8-gingerol, 10-gingerol, and 6-shogaol in ginger-containing dietary supplements, spices, teas, and beverages. *Journal of Chromatography B* 2007; 856: 41-47.

Segel I, Enzyme Kinetics. behavior analysis of rapid equilibrium and steady-state systems, ed. by Segel, 1975, pp 54-55, John Wiley & Son

Suekawa M, Ishige A, Yuasa K, Sudo K, Aburada M and Hosoya E. Pharmacological studies on ginger. I. Pharmacological actions of pungent constituents, (6)-gingerol and (6)-shogaol. *Journal of Pharmacobio-Dynamics* 1984; 7: 836-848.

Suhr YJ. Molecular mechanisms of chemopreventive effects of selected dietary and medicinal phenolic substances. *Mutation Research* 1999; 428: 305-327.

Suhr YJ. Anti-tumor promoting potential of selected spice ingredients with antioxidative and anti-inflammatory activities: a short review. *Food and Chemical Toxicology* 2002; 40: 1091–1097.

Szallasi, A. and Blumberg, P. M., Vanilloid (capsaicin) receptors and mechanisms. *Pharmacological Review*. 1999;51:159–212

Viswanadhan VN, Sun Y and Norman MH. Three-dimensional quantitative structure-activity relationships and activity predictions of human TRPV1 channel antagonists: comparative molecular field analysis and comparative molecular similarity index analysis of cinnamides. *Journal of Medicinal Chemistry* 2007; 50(23): 5608–5619.

Walker, K.M., Urban, L., Medhurst, S.J., Patel, S., Panesar, M., Fox, A.J. and McIntyre, P. The VR1 antagonist capsazepine reverses mechanical hyperalgesia in models of inflammatory and

neuropathic pain, *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. 2003;304(1):56-62.

Walpole CSJ, Bevan S, Bloomfield G, Breckenridge R, James IF, Ritchie T, Szallasi A, Winter J, Wrigglesworth R. Similarities and differences in the structure-activity relationships of capsaicin and resiniferatoxin analogues. *Journal of Medicinal Chemistry* 1996; 39: 2939-2952.

Wang W, Li CY, Wen XD, Li P, Qi LW. Plasma pharmacokinetics, tissue distribution and excretion study of 6-gingerol in rat by liquid chromatography–electrospray ionization time-of-flight mass spectrometry. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 2009; 49: 1070–1074.

1.8 Tables

Table I. Exact mass determination of [6]-gingerol metabolites using HPLC/MSD TOF

Molecular ID	Monoisotopic Mass [M+H] ⁺	Observed mass	Deviation	ppm
[6]-Gingerol	295.19039	295.19083	0.00044	1.49
M1	277.17982	277.17980	-0.00002	-0.07
M2	293.17474	293.17549	0.00075	2.56
M3	311.18530	311.18552	0.00022	0.71
M4	471.22247	471.22138	-0.00109	-2.31
M5	453.21191	453.20958	-0.00233	-5.14
M6	469.20682	469.20539	-0.00143	-3.05
M7	487.21739	487.21628	-0.00111	-2.28

1.9 Figures

Figure 1. Molecular structure of [6]-gingerol and capsaicin.

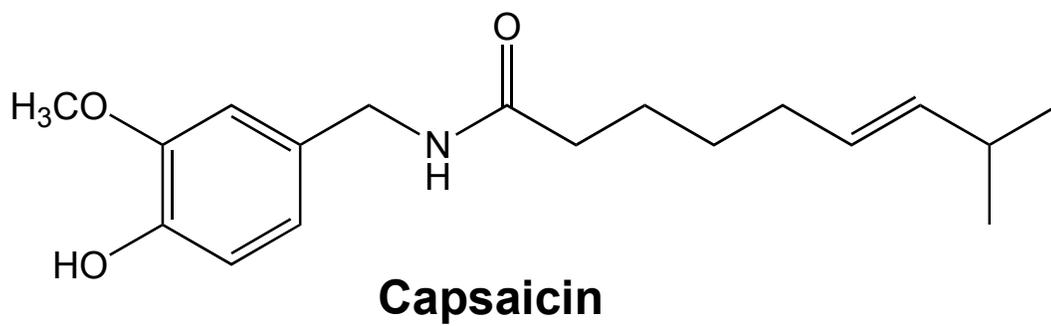
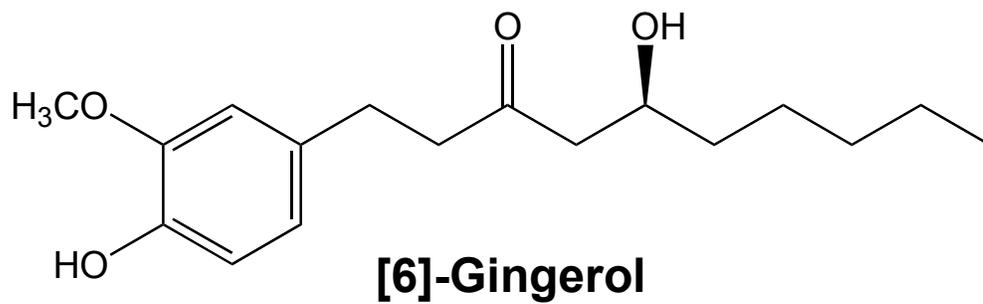


Figure 2. Determination of Michaelis constant K_m using non-linear regression fitting.

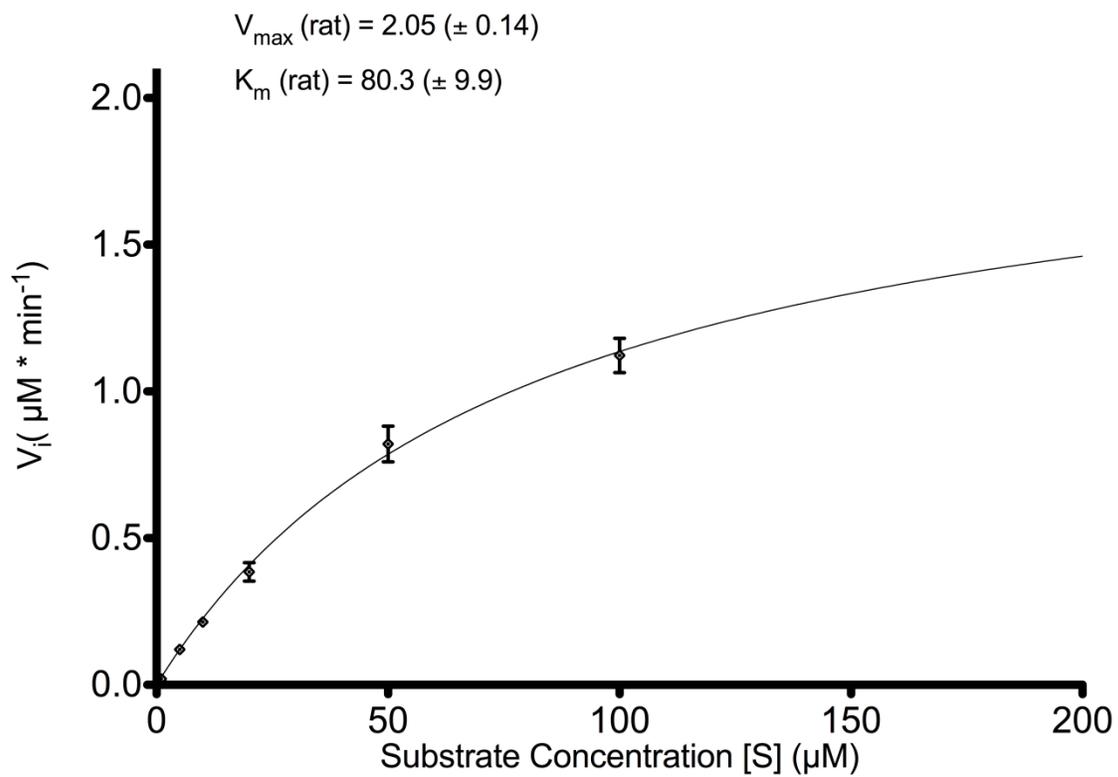


Figure 3. Depletion profile of [6]-gingerol in pooled rat liver microsomes. Data presented in a linear scale and each point represents the mean (\pm SD) of six replicate determinations.

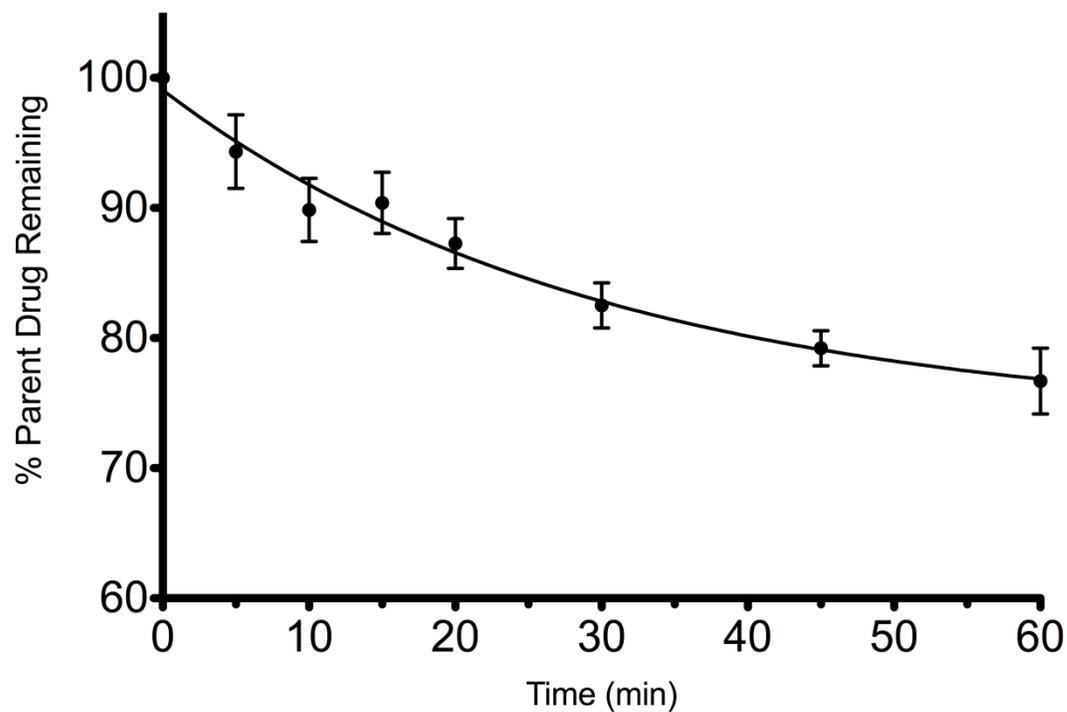


Figure 4. Identification of major phase 1 metabolites excreted in rat microsomes. (a) Full-scan total ion chromatogram (m/z 150–350). (b) Extracted ion chromatogram of m/z 295. (c) Extracted ion chromatogram of m/z 277. (d) Extracted ion chromatogram of m/z 293. (e) Extracted ion chromatogram of m/z 311.

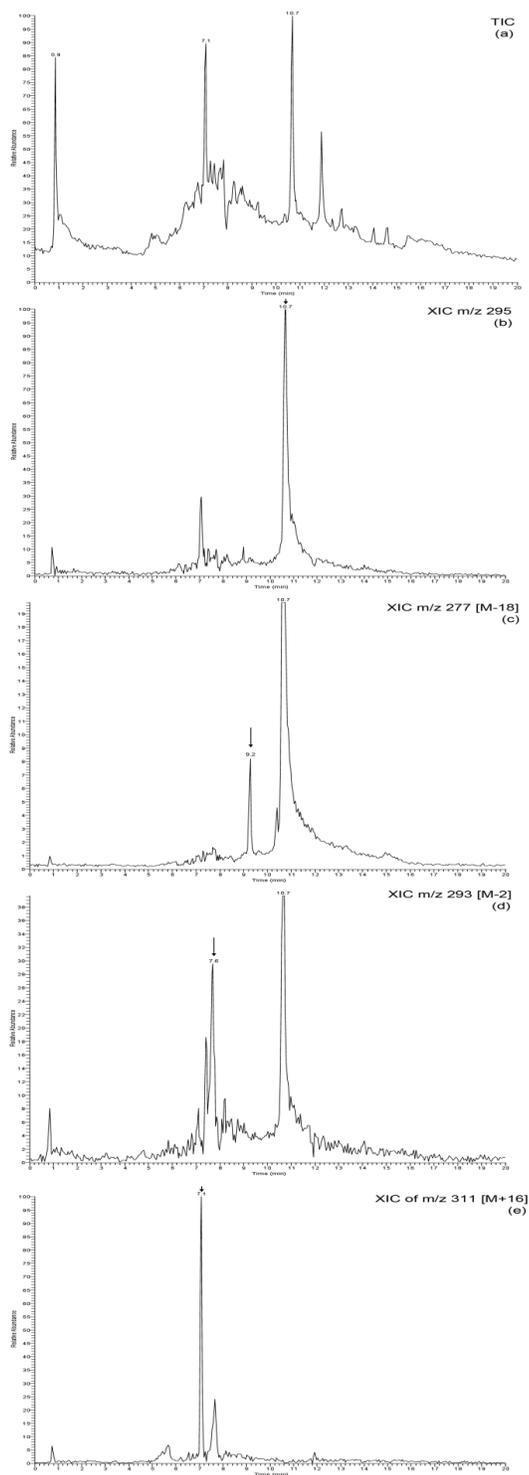


Figure 5. Identification of major phase 1 metabolites excreted in rat urine. (a) Full-scan total ion chromatogram (m/z 150–350). (b) Product ion spectra of m/z 295. (c) Product ion spectra of m/z 277. (d) Product ion spectra of m/z 311.

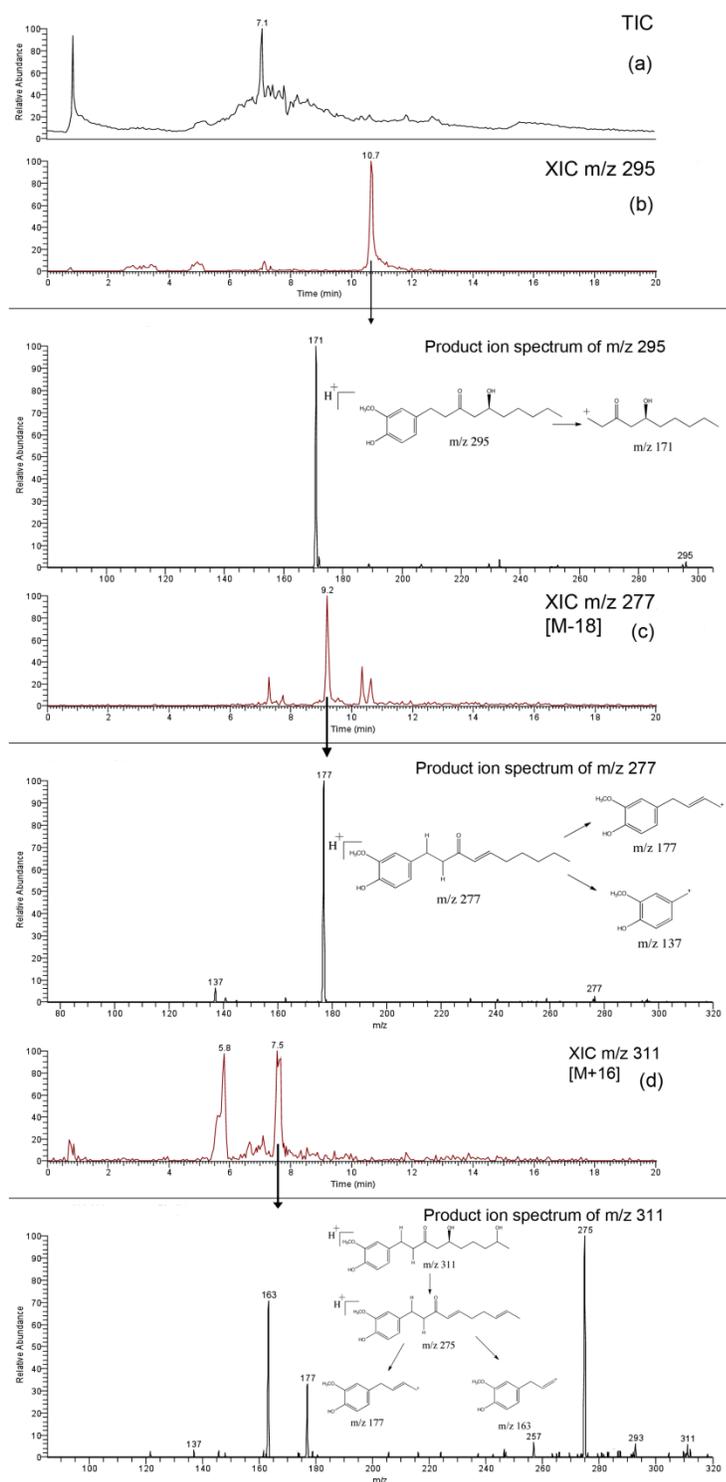


Figure 6. Identification of major phase 2 metabolites excreted in rat urine. (a) Full-scan total ion chromatogram (m/z 150–650). (b) Product ion spectra of m/z 471. (c) Product ion spectra of m/z 469. (d) Product ion spectra of m/z 487.

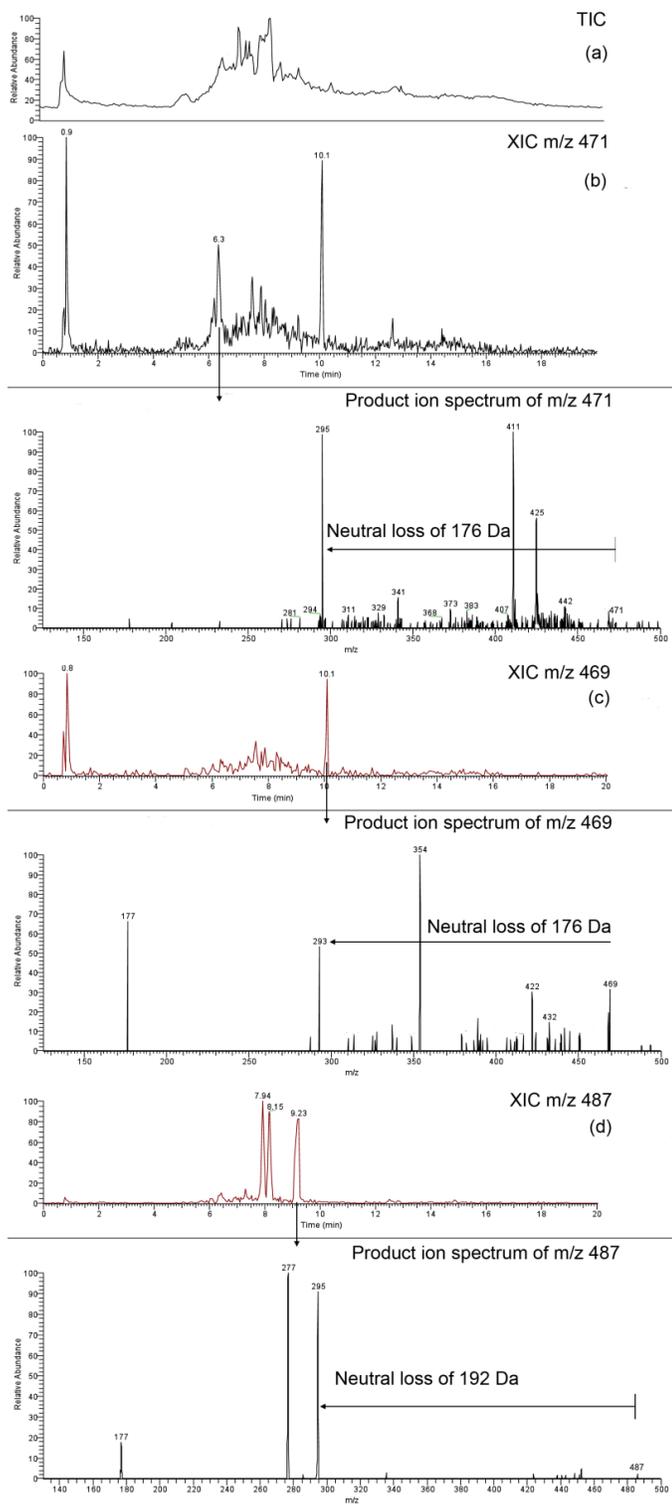
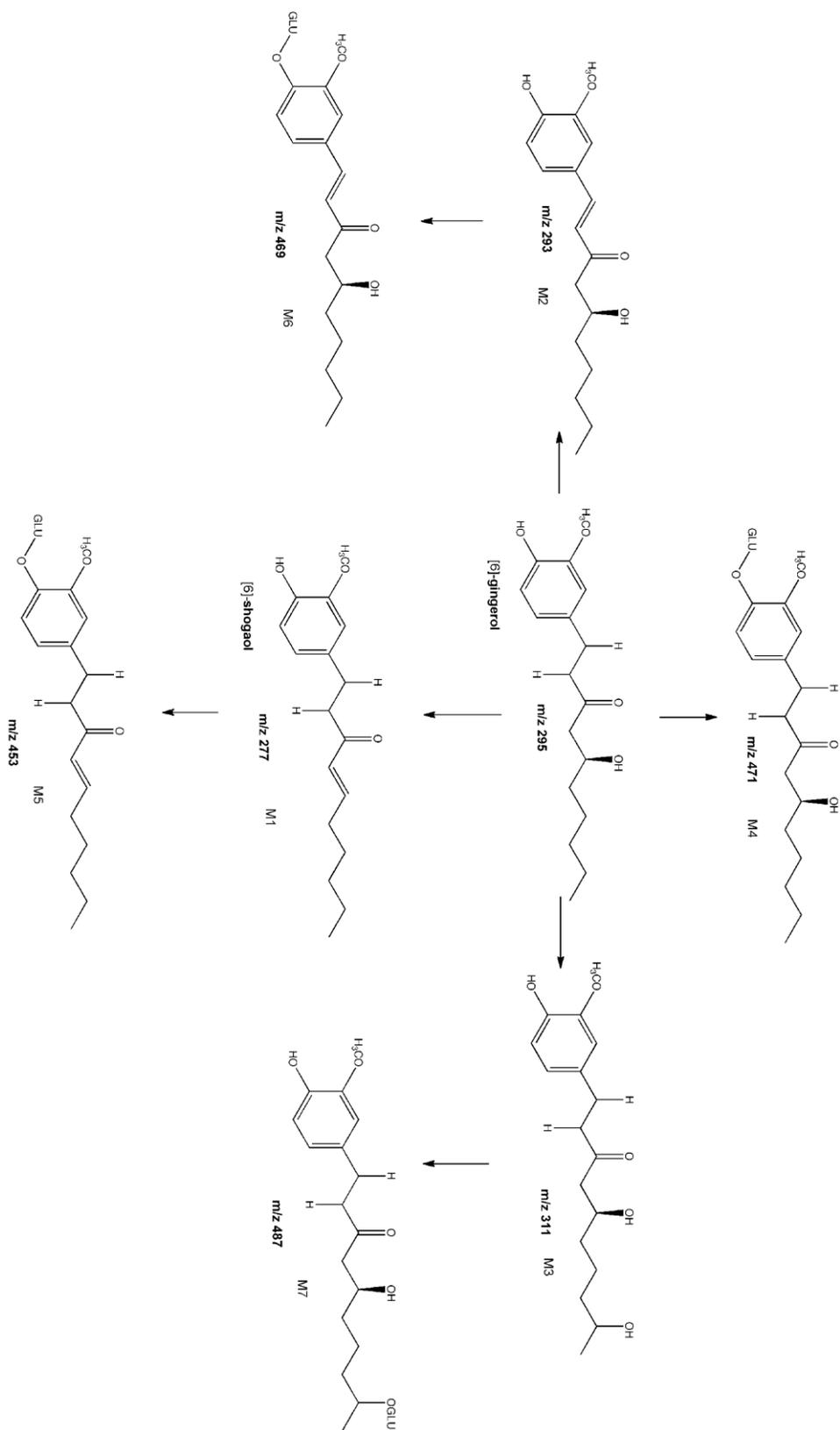


Figure 7. Observed [6]-Gingerol biotransformation pathway in Sprague–Dawley rat.



2. Deuxième article

Intrathecal [6]-Gingerol Administration Alleviates Peripherally-induced Neuropathic Pain in Male Sprague-Dawley Rats

Marie-Lou Gauthier¹, Francis Beaudry¹, Pascal Vachon²

¹Groupe de Recherche en Pharmacologie Animale du Québec (GREPAQ), Département de biomédecine vétérinaire, Faculté de médecine vétérinaire, Université de Montréal, Saint-Hyacinthe, Québec, Canada

² Département de biomédecine vétérinaire, Faculté de médecine vétérinaire, Université de Montréal, Saint-Hyacinthe, Québec, Canada

Published in *Phytotherapy Research*, 2013, volume 27 (8), 1251-1254.

2.1 Abstract

[6]-Gingerol, a structural analog of capsaicin, is an agonist of the transient receptor potential vanilloid 1 channel, which is known to have therapeutic properties for the treatment of pain and inflammation. The main objective of this study was to determine the central effect of [6]-gingerol on neuropathic pain when injected intrathecally at the level of the lumbar spinal cord. [6]-Gingerol distribution was evaluated following a 40 mg/kg intraperitoneal injection, and the brain-to-plasma and spinal cord-to-plasma ratios (0.73 and 1.7, respectively) suggest that [6]-gingerol penetrates well the central nervous system of rats. Induction of pain was performed using the sciatic nerve ligation model on rats, and a 10- μ g intrathecal injection of [6]-gingerol was performed to evaluate its central effect. The results suggest a significant decrease of secondary mechanical allodynia after 30 min, 2 h and 4 h ($p < 0.05$, $p < 0.01$ and $p < 0.001$) and thermal hyperalgesia after 30 min, 2 h and 4 h ($p < 0.05$, $p < 0.01$ and $p < 0.01$). These promising results illustrate that [6]-gingerol could alleviate neuropathic pain by acting centrally at the level of the spinal cord.

2.2 Introduction

Pain is complex and multidimensional (i.e. consisting of physiological, psychological and environmental factors), and it is perhaps one of the most widely experienced and expressed clinical symptoms (Woolf, 2010). Pain management medicines are amongst the most prescribed drugs by physicians (Woolf, 2010). However, effectiveness remains in most cases limited especially within patients suffering from chronic pain. While considerable advancements have been obtained from basic pain science research using animal models, findings have not yet translated into effective medicines. Our recent results (Guénette *et al.*, 2007; Lionnet *et al.*, 2010; Beaudry *et al.*, 2010) support the hypothesis that natural vanilloids may alleviate neuropathic pain, both allodynia and hyperalgesia, by acting centrally most probably at the level of the dorsal horn of the spinal cord and on peripheral nerves where vanilloid receptors can be found.

Transient receptor potential cation channel, subfamily V member 1 (TRPV1), is an important integrator of chemical and heat stimuli. TRPV1 ion channel is activated by capsaicin, the active ingredient in red chili peppers (Caterina and Julius, 2001). TRPV1 is well known for its role in acute thermal nociception, inflammation and injuries inducing mechanical and thermal hyperalgesia (Szallasi and Blumberg, 1999). [6]-Gingerol [(S)-5-hydroxy-1-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-3-decanone] is one of the major pungent components of ginger (*Zingiber officinale*), a plant commonly used as a spice in a variety of food preparations and beverages, and as a drug in traditional Chinese medicine (Grzanna *et al.*, 2005). [6]-Gingerol is a structural analog of capsaicin, and recent molecular modeling studies indicate that the vanillyl moiety, as well as the long unsaturated acyl chain, have significant impacts on relative binding affinities with the TRPV1 receptor (Viswanadhan *et al.*, 2007). Consequently, the chemical structure similarities of [6]-gingerol with capsaicin suggest that it could be a good ligand of the TRPV1 receptor and potentially be used to treat neuropathic and chronic pain. Very few studies have evaluated the effects of [6]-gingerol on different neuroreceptors; however, eugenol, another vanilloid molecule, is known to bind to calcium, potassium and sodium voltage-gated channels that are known to be important in pain transmission (Lionnet *et al.*, 2010), and therefore TRPV1 may not be the only targeted receptor for [6]-gingerol.

The objectives of this study were to determine the penetrability of [6]-gingerol in the central nervous system of Sprague-Dawley rats and then investigate its effect on neuropathic pain following an intrathecal administration using the chronic constriction sciatic nerve model (Bennett and Xie, 1998).

2.3 Materials and methods

Animals. A total of 42 male Sprague-Dawley rats (Charles River, St-Constant, QC, Canada) weighing 250 – 350 g were used for these experiments. Animals were housed in polycarbonate cages (Ancare, Bellmore, NY, USA) on hardwood bedding (Beta chip, Northeastern Products Co., Warrenburg, NY, USA) and acclimated for at least 5 days prior to the initiation of the study. Rats received tap water and a standard laboratory rodent diet (Charles River Rodent chow 5075, St-Constant, QC, Canada) *ad libitum*. The experimental protocol was

approved by the Institutional Animal Care and Use Committee of the Faculty of Veterinary Medicine of the University of Montreal prior to animal use and is in accordance with the guidelines of the Canadian Council on Animal Care.

[6]-Gingerol pharmacokinetic study. The penetrability of [6]-gingerol in the brain and spinal cord was assessed in rats ($n=24$). Following intraperitoneal injection administration of the [6]-gingerol solution (40 mg/kg) and under isoflurane anesthesia, intracardiac blood samples were collected in sodium heparin tubes at predose, 0.083, 0.25, 0.5, 1, 2, 6 and 24 h (3 animals per time point). Blood samples were maintained on ice and centrifuged (3200 g for 10 min) within 30 min of collection. Immediately following blood collection, rats were decapitated, the brain and spinal cord were rapidly removed and frozen in isopentane (-70°C). All samples were kept at -80°C pending analysis. The analysis of [6]-gingerol in rat plasma was performed as previously described (Gauthier *et al.*, 2011). Pharmacokinetic parameters (AUC, λ_z and $T_{1/2}$) were calculated using a non-compartmental approach. Calculations were performed using WinNonlin version 1.5 (Pharsight software).

Evaluation of [6]-gingerol analgesic effect. The peripheral mononeuropathy was produced in rats by loosely tying four ligatures around the right sciatic nerve with 4.0 Catgut suture material as previously described (Bennett and Xie, 1988; Beaudry *et al.*, 2010; Lionnet *et al.*, 2010). Following a 2-day recovery period from surgery, thermal and mechanical sensitivity of the left (unoperated) and the right hind paws were determined using the Hargreave's test and the Von Frey filaments for 10 days (Monday-Friday) over 2 weeks to assess the induction of neuropathic pain. On the 16th day following the surgery, a placebo intrathecal injection (20 μL of a cyclodextrin formulation) was first performed as a control, and on the 17th day, [6]-gingerol was injected intrathecally, under general anesthesia with isoflurane, at dose of 10 μg (20 μL of dosing solution). Injections were made with a 25G needle, between L6 and L7 vertebrae, after clipping and disinfection of the injection site. This procedure took less than 1 min. Animals were then tested daily on 3 consecutive days following a [6]-gingerol administration. Mechanical and thermal sensitivities were evaluated with the Von Frey filaments and the Hargreaves apparatus at 0.5, 2 and 4 h following the administration of the cyclodextrin (placebo) and the [6]-gingerol solutions. Finally, to assess if [6]-gingerol would have an effect

on motor behavior, two groups of six rats were tested for motor coordination using the rotarod treadmill (Rotarod ENV-576, Med Associates Inc., St-Albans, VT, USA) which received an intrathecal injection of 10 µg (20 µL of dosing solution) of [6]-gingerol or an intrathecal injection of 20 µL of a placebo (i.e. cyclodextrin solution) 30 min prior testing. The maximum time the rat stayed on the rotarod was recorded.

Statistical analysis. Results are presented as means (\pm SEM). The statistical significance of differences between groups was assessed with repeated measures ANOVA with Dunnett's post-hoc test using GraphPad Prism version 5d for OS X (GraphPad Software); $p < 0.05$ was considered significant.

2.4 Results and discussion

Fig. 1 illustrates the distribution of [6]-gingerol in the brain and spinal cord following a 40 mg/kg IP administration. The mean spinal cord concentrations of [6]-gingerol were significantly higher compared to the observed concentrations in plasma and brain particularly between 0.5 h to 24 h post administration. The AUC_{∞} observed were 3039, 2036 and 5356 µg.h.L⁻¹ for plasma, brain and spinal cord, respectively. The apparent terminal half-lives ($T_{1/2}$) were 11.7, 11.7 and 7.3 h for plasma, brain and spinal cord, respectively. The brain-to-plasma and spinal cord-to-plasma ratios ($AUC_{\infty \text{ tissue}} / AUC_{\infty \text{ plasma}}$) of [6]-gingerol were 0.73 and 1.7, respectively. Spinal cord to plasma ratio was significantly higher than brain to plasma ratio suggesting [6]-gingerol could be a substrate to P-glycoproteins (P-gps) limiting the brain exposure. P-gps limit brain distribution of xenobiotics via an active efflux pump mechanism. Alternatively, the significant difference in lipid concentration present in the spinal cord may be responsible for this result as [6]-gingerol is highly lipophilic. These results show that following a [6]-gingerol administration, the molecule is readily available in the spinal cord favoring a central spinal effect of [6]-gingerol. TRPV1 is expressed in terminal fibers from dorsal root ganglion neurons that play an important role in the modulation of synaptic transmission.

Tactile allodynia and thermal hyperalgesia (Fig. 2 A and C) are clearly present during the last 5 days of the establishment of neuropathy ($p < 0.001$ for the Von Frey test and $p < 0.05$

for the Hargreaves test). Values for the left paw (unaffected paw) were not significantly different from baseline. Thermal hyperalgesia and mechanical allodynia were assessed at 30 min, 2 h and 4 h following injections of cyclodextrin and 10 μg of [6]-gingerol for both paws. The results were compared with the mean neuropathy values (N6 to N10) to perform a Dunnett's test. The placebo results show no significant effect on both, mechanical allodynia and thermal hyperalgesia. Following a 10 μg [6]-gingerol intrathecal administration (Fig. 2B), the mechanical allodynia decreased significantly after 30 min, 2 h and 4 h ($p < 0.05$, $p < 0.01$ and $p < 0.001$). The effect of [6]-gingerol was still present on the day following its administration. Results show that [6]-gingerol significantly decreased thermal hyperalgesia at 30 min, 2 h and 4 h post dose ($p < 0.05$, $p < 0.01$, $p < 0.01$). At the end of the experiment, spinal cords were collected and submitted for hematoxylin-eosin-saffron staining. No cellular necrosis or apoptosis was seen in the dorsal horn of the spinal cord. On the rotarod treadmill test, [6]-gingerol did not cause any effect on motor coordination. Interestingly, the results obtained with [6]-gingerol were equivalent to slightly better when compared to our previous studies with other vanilloids including eugenol (Guénette *et al.*, 2007; Lionnet *et al.*, 2010) and vanillin (Beaudry *et al.*, 2010). This is in line with the fact that [6]-gingerol has more structural similarities with capsaicin including a long unsaturated acyl chain that improves binding affinities with TRPV1 receptor.

In conclusion, [6]-gingerol alleviates pain in a neuropathic animal model. Since its action is most probably on TRPV1, which is an integrator of noxious stimuli found in the peripheral and central nervous system, it could modulate pain transmission pathways. TRPV1 ligands can potentially be used for managing different pain inducing pathologies, including osteoarthritis, chronic low back pain, neuropathic pain and cancer pain. The *in vivo* results following a [6]-gingerol administration suggest an interesting therapeutic potential to treat these conditions.

2.5 Acknowledgements

This research project was funded by the National Sciences and Engineering Research Council of Canada (F. Beaudry NSERC Discovery grant No. 386637-2010). M.L. Gauthier received a scholarship from *Le fonds du centenaire* of the *Faculté de médecine vétérinaire de l'Université de Montréal*.

Conflict of interest

The authors declared they have no conflict of interest.

2.6 References

Beaudry F, Ross A, Lema PP, Vachon P. 2010. Pharmacokinetics of vanillin and its effects on mechanical hypersensitivity in a rat model of neuropathic pain. *Phytother Res.* 24: 525-530.

Bennett GJ, Xie YKA. 1988. A peripheral mononeuropathy in rat that produces disorders of pain sensation like those seen in man. *Pain* 33: 87–107.

Caterina MJ, Julius D. 2001. The vanilloid receptor: a molecular gateway to the pain pathway. *Annu Rev Neurosci* 24: 487–517.

Gauthier ML, Douat J, Vachon P, Beaudry F. 2011. Characterization of [6]-gingerol metabolism in rat by liquid chromatography electrospray tandem mass spectrometry. *Biomed Chromatogr.* 25: 1150-1158

Grzanna R, Lindmark L, Frondoza CG. 2005. Ginger--an herbal medicinal product with broad anti-inflammatory actions. *J Med Food.* 8: 125-132.

Guénette SA, Ross A, Marier JF, Beaudry F, Vachon P. 2007. Pharmacokinetics of eugenol and its effects on thermal hypersensitivity in rats. *Eur J Pharmacol.* 562: 60-67

Lionnet L, Beaudry F, Vachon P. 2010. Intrathecal eugenol administration alleviates neuropathic pain in male Sprague-Dawley rats. *Phytother Res.* 24: 1645-1653.

Szallasi A, Blumberg PM. 1999. Vanilloid (capsaicin) receptors and mechanisms. *Pharmacol Rev* 51: 159–212.

Viswanadhan VN, Sun Y, Norman MH. 2007. Three-dimensional quantitative structure-activity relationships and activity predictions of human TRPV1 channel antagonists: comparative molecular field analysis and comparative molecular similarity index analysis of cinnamides. *J Med Chem.* 50: 5608-5619.

Woolf CJ. 2010. Overcoming obstacles to developing new analgesics. *Nat Med.* 16:1241-1247.

2.7 Figures

Figure 1. Mean (\pm SEM) concentration profiles of [6]-gingerol in plasma, brain and lumbar spinal cord following an intraperitoneal administration (40 mg/kg) in male Sprague-Dawley rats ($n = 3$ animals/time point).

Figure 2. Mechanical allodynia and thermal hyperalgesia assessments in Sprague-Dawley rats ($n=8$). (A) Mean (\pm SEM) mechanical sensitivity was tested using Von Frey filaments prior surgery (P1 to P3) and following CCI surgery of the right leg (the left leg was unaffected) on 10 days (N1 to N10) following 48 h recovery. (B) Mean (\pm SEM) withdrawal threshold of neuropathic baseline (N6 to N10) were compared to withdrawal thresholds following cyclodextrin formulation (placebo) and 10 μ g [6]-gingerol intrathecal administration as well as daily thresholds for the 3 days following the gingerol administration (PG). (C) Mean (\pm SEM) thermal sensitivity was tested using the Hargreave's test prior to surgery (P1 to P3) and following CCI surgery of the right leg (the left leg was unaffected) on 10 days (N1 to N10) following 48 h recovery. (D) Mean (\pm SEM) withdrawal time of neuropathic baseline (N6 to N10) were compared to withdrawal thresholds following cyclodextrin formulation (placebo) and 10 μ g [6]-gingerol intrathecal administrations as well as daily thresholds for the 3 days following the gingerol administration (PG).

Figure 1.

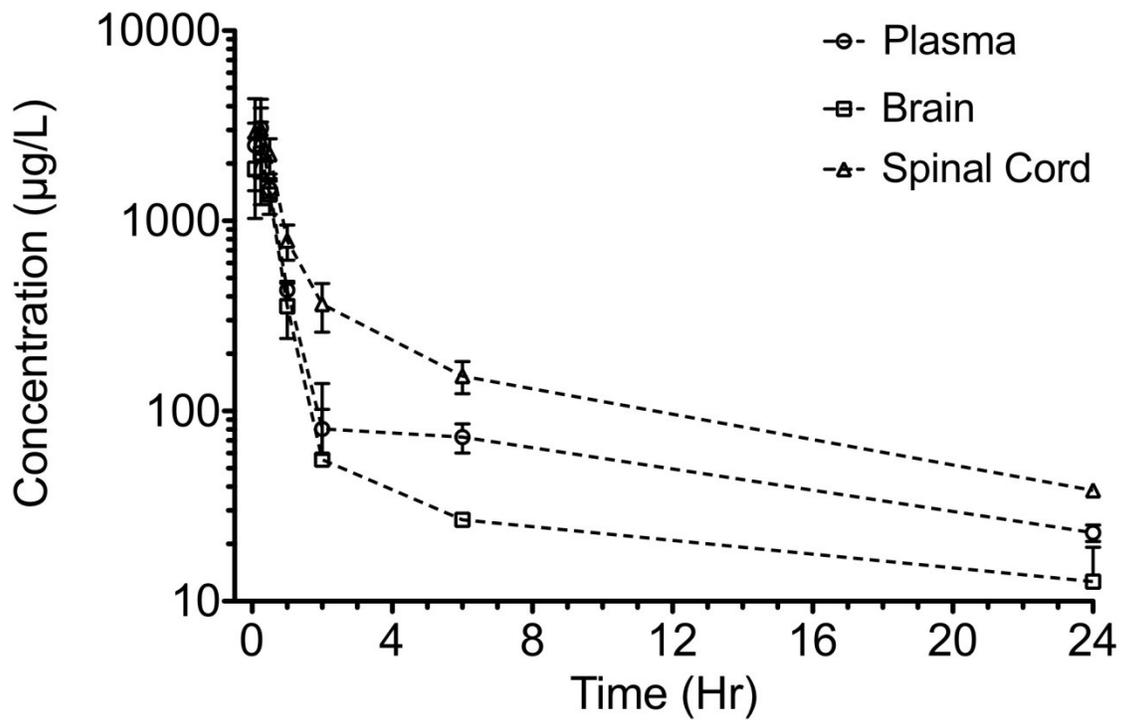
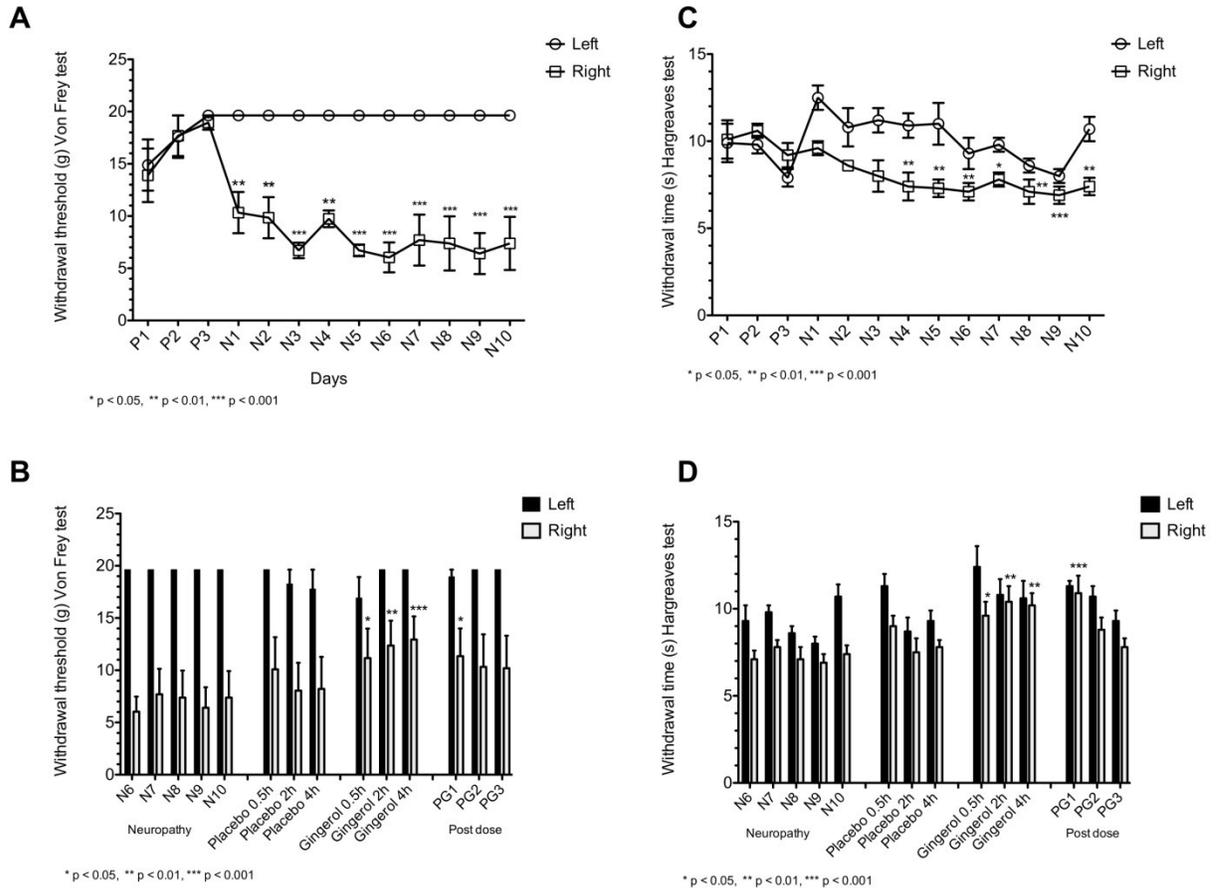


Figure 2.



Chapitre 4 : Discussion générale

Bien qu'un sujet d'importance clinique et étudié depuis très longtemps en médecine humaine, la douleur est désormais un phénomène reconnu et auquel on accorde de plus en plus d'importance en médecine vétérinaire. En effet, en 2003, l'AAHA a ajouté la douleur comme quatrième paramètre vital chez les animaux en plus du rythme cardiaque, de la température et de la fréquence respiratoire (Hellyer et al., 2007). La douleur neuropathique plus particulièrement se produit lors d'une atteinte directe du système nerveux central ou périphérique et peut se manifester par une sensation de douleur généralisée inexplicable, un déficit sensoriel, une sensation de brûlure ou le développement d'hyperalgésie et d'allodynie (Milligan and Watkins, 2009). L'hyperalgésie représente une réponse exagérée à une stimulation normalement douloureuse tandis que l'allodynie se caractérise plutôt par la perception de douleur suite à un stimulus généralement non-douloureux (Marchand, 2005; Parenti et al., 2012). Plusieurs traitements sont actuellement utilisés en médecine humaine et vétérinaire pour contrer la douleur neuropathique, mais ceux-ci ne sont malheureusement pas toujours efficaces ni dépourvus d'effets secondaires négatifs pouvant affecter la qualité de vie des patients, d'où l'intérêt de développer de nouvelles stratégies thérapeutiques contre ce type de douleur. Le gingembre est utilisé pour la médecine traditionnelle par diverses populations depuis plusieurs siècles entre autres pour son effet analgésique. Une des molécules actives du gingembre, le [6]-gingérol, fait partie de la famille des vanilloïdes telles que la capsaïcine et l'eugénol. Ces deux molécules ont été démontrées par le passé avoir une action analgésique en agissant entre autres au niveau des récepteurs TRPV1 (Caterina et al., 1997; Guenette et al., 2006; Lionnet et al., 2010; Liu et al., 1996), mais également au niveau d'autres récepteurs tels les récepteurs GABA et les canaux sodium voltage dépendant. L'administration intrathécale d'eugénol a d'ailleurs démontré un potentiel intéressant dans le traitement de la douleur puisqu'elle a entraîné une réduction de l'hyperalgésie et de l'allodynie lors de neuropathie et ceci 4 jours suivant son administration (Lionnet et al., 2010). Les récepteurs TRPV1, présents au niveau du système nerveux périphérique et central, entre autres au niveau de la corne dorsale de la moelle épinière, jouent un rôle important dans le développement et la transmission de la douleur (Levine and Alessandri-Haber, 2007; Szallasi et al., 1995). Suite à la liaison d'une molécule agoniste telle la

capsaïcine, le récepteur est initialement sensibilisé mais se produit par la suite un changement de conformation du récepteur entraînant la fermeture du pore du canal créant une désensibilisation et une période réfractaire pendant laquelle le récepteur devient insensible aux molécules vanilloïdes ou tout autres stimuli douloureux (Holzer, 1991). Un blocage de ces récepteurs entraîne donc une analgésie et serait le mode d'action présumé du [6]-gingérol. Les présentes études visaient à déterminer le métabolisme du [6]-gingérol ainsi que sa distribution au niveau du système nerveux central chez le rat et à étudier l'effet analgésique central de la molécule sur la douleur neuropathique suite à une injection au niveau lombaire dans un modèle animal de douleur neuropathique.

1. Caractérisation du métabolisme du [6]-gingérol

Avant de nous intéresser à l'action analgésique du [6]-gingérol comme telle, nous voulions effectuer une meilleure caractérisation du métabolisme de la molécule étant donné les données contradictoires trouvées dans la littérature (Ding et al., 1991; Jiang et al., 2008; Suekawa et al., 1984). La clairance intrinsèque de la molécule de même que ses principaux métabolites ont été déterminés. L'incubation de [6]-gingérol à des concentrations variant entre 1 et 100 μM dans des microsomes hépatiques de rats a été performée selon une méthode déjà développée (Chanda et al., 2008). Des échantillons ont été prélevés aux temps 0, 5, 10, 15, 20, 30, 45 et 60 minutes suite à la mise en suspension de la molécule. Ces échantillons ont été analysés par chromatographie liquide à haute performance combinée à la spectrométrie de masse en tandem afin de déterminer la concentration de [6]-gingérol présente dans la solution aux différents temps prédéterminés. À l'aide de ces concentrations mesurées et de différentes équations, la constante de Michaelis (K_m) a pu être déterminée de même que la vitesse initiale. Cette dernière a été calculée à partir des concentrations mesurées au temps 10 minutes. Suite aux analyses, le temps de demi-vie de la molécule a pu également être calculé et a été utilisé afin de déterminer la clairance intrinsèque. Les résultats obtenus démontrent que la K_m du [6]-gingérol est relativement élevée avec une valeur de 80,3 μM suggérant une faible affinité de la molécule avec les enzymes du cytochrome P-450 hépatiques. Ces résultats suggèrent également que le métabolisme de phase 1 de la molécule serait difficilement saturable. La stabilité métabolique du [6]-gingérol à une concentration de 10 μM a ensuite été évaluée. Les résultats démontrent une dégradation relativement lente de la molécule avec un temps de demi-vie de

163,4 minutes dans des microsomes hépatiques de rats ainsi qu'une faible clairance intrinsèque avec une valeur de 0,0043 mL/min. Ce dernier résultat suggère que l'élimination de la molécule se ferait principalement via le métabolisme de phase 2 plutôt que par le métabolisme de phase 1. Après 60 minutes d'incubation, 76,7% de la molécule était demeurée inchangée. Le temps de demi-vie du [6]-gingérol a également été déterminé dans des microsomes hépatiques de chiens et d'humains et les résultats étaient respectivement de 171,5 min et 545,6 min. Si on considère la capsaïcine qui possède un temps de demi-vie de 2,3 minutes chez le rat (Beaudry and Vachon, 2009), les résultats obtenus pour le [6]-gingérol confirme notre hypothèse selon laquelle le [6]-gingérol posséderait une meilleure stabilité métabolique que la capsaïcine et par le fait même un meilleur maintien de son effet pharmacologique par une plus grande exposition systémique. Ce point devient important lorsque l'on considère l'utilisation de ces molécules comme traitement contre la douleur. En effet, la courte demi-vie de la capsaïcine rend son utilisation clinique complexe et oblige une administration fréquente de la molécule afin de maintenir son effet. C'est une des raisons pour laquelle elle est surtout utilisée dans des formulations topiques. Le [6]-gingérol, possédant une meilleure stabilité métabolique, pourrait permettre une action thérapeutique prolongée nécessitant une administration moins fréquente, permettant ainsi son utilisation via d'autres voies d'administration. La courte demi-vie de la capsaïcine nous laisse aussi penser que certains de ses métabolites pourraient avoir une contribution dans l'effet thérapeutique de la molécule. En effet, lorsque l'on observe la structure des différents métabolites de la capsaïcine, il est possible de constater que plusieurs d'entre eux ont des structures chimiques similaires à d'autres molécules faisant partie de la famille des vanilloïdes. On note entre autre la formation de vanillylamine, un analogue structurel de l'eugénol ainsi que des composés similaires à la vanilline et au zingérone (Beaudry and Vachon, 2009). Le zingérone est un composé issu du chauffage à haute température en l'absence d'oxygène de l'oléorésine de gingembre que l'on retrouve dans le rhizome du gingembre. Une étude entreprise sur cette substance a d'ailleurs permis de démontrer une action physiologique similaire avec la capsaïcine, donc une action probable au niveau des récepteurs TRPV1 (Liu and Simon, 1996b). Considérant ce phénomène, il devient également intéressant de s'interroger sur le potentiel thérapeutique des métabolites du [6]-gingérol. En plus de son court temps de demi-vie, d'autres facteurs limitent également l'utilisation clinique de la capsaïcine telle la sensation de brûlure engendrée lors de son application initiale qui peut être mal tolérée par les patients

(Caterina et al., 1997). Le [6]-gingérol étant significativement moins irritant que la capsaïcine, il ne semble pas démontrer cet effet rendant son utilisation d'autant plus intéressante.

Pour déterminer les différents métabolites du [6]-gingérol, une injection intrapéritonéale de 40 mg/kg de la molécule a été administrée à 3 rats mâles Sprague-Dawley. Ces rats ont été gardés dans des cages métaboliques pour une période de 24 heures afin que l'urine et les selles puissent être récoltées pour analyse par HPLC-MS/MS. La masse exacte des métabolites identifiés a également été déterminée à l'aide de la méthode HPLC-MSD TOF afin de recueillir plus d'information quant à la structure moléculaire de ceux-ci. Les résultats obtenus ont permis de démontrer la présence de trois métabolites de phase I et de quatre métabolites de phase II. Il a également été démontré que les métabolites de phase II étaient présents en quantité plus importante que les métabolites de phase I. Ces métabolites jouent un rôle central dans l'élimination de la molécule. Le métabolisme de phase I regroupe principalement les réactions d'oxydation, catalysées par le cytochrome P-450 hépatique, mais également, de façon moindre, les réactions de réduction et d'hydrolyse. Le métabolisme de phase II, quant-à lui, regroupe les réactions de conjugaison des groupements fonctionnels issus des réactions de phase I. La réaction la plus fréquemment observée est la glucuronoconjugaison, qui consiste en la conjugaison des groupements avec l'acide glucuronique. Les principaux métabolites de phase I retrouvés dans l'urine incluent le [6]-gingérol, molécule parent inchangée, avec un rapport masse/charge (m/z) de 295, le [6]-shogaol avec un m/z de 277 correspondant à une perte d'eau ainsi que le [6]-gingérol hydroxylé avec un m/z de 311. Cependant, le métabolite retrouvé en plus grande quantité est un métabolite de phase II qui consiste en une glucuronidation du [6]-gingérol hydroxylé avec un m/z de 487. Ces résultats sont intéressants dans la mesure où ils suggèrent une administration sécuritaire de la molécule à des patients souffrant d'insuffisance rénale étant donné que les métabolites de phase 2 du [6]-gingérol sont principalement éliminés par voie biliaire. Si l'on considère qu'un nombre important de patients, humains ou vétérinaires, souffrant de douleur chroniques sont gériatriques, cette caractéristique devient particulièrement intéressante (Cheigh, 1977). De plus, un grand nombre de médicaments actuellement utilisés dans le traitement de la douleur ont des effets secondaires rénaux limitant leur utilisation ou obligeant une diminution de la dose employée dont les anti-inflammatoires non-stéroïdiens et les inhibiteurs du recaptage de la

sérotonine et de la noradrénaline. Le [6]-gingérol pourrait donc devenir une alternative intéressante pour ces patients.

2. Distribution du [6]-gingérol dans le système nerveux central

Suite à la première partie du projet qui a permis de démontrer la stabilité métabolique du [6]-gingérol, nous voulions nous assurer que la molécule se distribuait adéquatement au niveau du système nerveux central et plus précisément au niveau de la moelle épinière, où se trouve les récepteurs TRPV1 (Caterina and Julius, 2001; Szallasi et al., 1994). Les résultats obtenus ont permis de démontrer une distribution significative de la molécule au niveau du système nerveux central. En effet, une concentration plus élevée de la molécule a été démontrée au niveau de la moelle épinière et du cerveau comparativement au plasma. Les concentrations de [6]-gingérol dans le cerveau et la moelle épinière (aire sous la courbe) furent comparées aux concentrations plasmatiques afin d'établir un ratio. Ce ratio était plus élevé pour la moelle épinière (1,7) que pour le cerveau (0,73) indiquant que le [6]-gingérol se retrouve en plus grande quantité dans la moelle épinière que dans le cerveau. Ce phénomène pourrait s'expliquer entre autres par la possibilité que le [6]-gingérol soit en fait un substrat des glycoprotéines-P (P-gps) présentes en concentration différente au niveau du cerveau et de la moelle épinière. Ces protéines sont en fait des transporteurs présents au niveau des cellules endothéliales des capillaires du système nerveux et ont pour fonction de limiter la pénétrabilité de certaines substances en les excréant activement, les empêchant ainsi de franchir la barrière méningo-encéphalique (Mariappan et al., 2014; Matheny et al., 2001). Une autre possibilité pour expliquer cette différence de distribution serait la différence de concentration en lipides au niveau de la moelle épinière et du cerveau, étant donné la nature lipophile du [6]-gingérol. D'autres études seraient nécessaires afin de confirmer ou infirmer ces hypothèses. Il serait entre autres intéressant d'effectuer le même type d'étude pharmacocinétique mais en utilisant des bloqueurs de P-gps.

La distribution de la molécule au niveau du système nerveux central rend donc possible son action au niveau des récepteurs TRPV1 situés au niveau de la corne dorsale de la moelle épinière, tel que prévu dans nos hypothèses de départ. Établir l'action centrale de la molécule comparativement à une possible action périphérique au niveau des récepteurs TRPV1 localisés à cet endroit était également un de nos objectifs. Dans un contexte de douleur neuropathique ou

chronique, une action au niveau centrale est nécessaire afin d'obtenir un soulagement efficace de la douleur. En effet, une action de la molécule au niveau périphérique, après que l'insulte ou la blessure à l'origine de la douleur se soit produite, ne préviendrait pas le phénomène de *windup* et de sensibilisation centrale contribuant au développement de douleur.

3. Traitement de la douleur neuropathique par le [6]-gingérol

Puisqu'il y a une très bonne distribution de la molécule de [6]-gingérol au niveau du système nerveux central, nous voulions évaluer l'action de cette molécule dans le soulagement de la douleur neuropathique lors d'une administration intrathécale. Les résultats ont démontré que le [6]-gingérol possède une action analgésique permettant de réduire l'allodynie mécanique et l'hyperalgésie thermique. Cet effet a été maintenu pour 24 heures suivant l'administration de [6]-gingérol, suggérant un effet résiduel de la molécule. Ce résultat concorde avec nos résultats précédents selon lesquels le [6]-gingérol possède un long temps de demi-vie et une lente clairance intrinsèque suggérant une redistribution de la molécule vers la circulation systémique et une élimination lente.

Ces résultats sont semblables aux résultats obtenus lors d'études précédentes qui visaient l'évaluation de différentes molécules de la famille des vanilloïdes, dont l'eugénol et la vanilline, dans le soulagement de la douleur neuropathique (Beaudry et al., 2010; Lionnet et al., 2010). Les résultats obtenus dans ces études, combinés à nos résultats suggèrent fortement une action des molécules vanilloïdes, lorsqu'administrées de façon centrale, au niveau des récepteurs TRPV1 situés au niveau de la corne dorsale de la moelle épinière. Le fait que le [6]-gingérol injecté par voie intrathécale a induit de l'analgésie démontre la contribution centrale de la molécule dans l'atténuation de la douleur, tel que mentionné dans nos hypothèses de départ.

Si on considère l'étude sur les propriétés analgésiques de l'eugénol (Lionnet et al., 2010), il est important de mentionner que deux différentes doses ont été utilisées : une injection intrathécale de 10 µg d'eugénol ainsi qu'une injection de 50 µg. Il est donc à noter que la première injection de 10 µg a produit un effet significatif de réduction de l'allodynie mécanique seulement à 2 heures suivant l'injection, tandis que la plus forte dose a produit un effet significatif à 15 minutes, 2 et 4 heures suivant l'injection. L'hyperalgésie thermique a quant-à elle été diminuée de manière significative à 2 et 4 heures suivant l'injection, et ce pour les deux

doses utilisées. Considérant qu'une seule dose de 10 µg de [6]-gingérol a été utilisée dans notre étude et que des réductions significatives de l'allodynie mécanique et de l'hyperalgésie thermique se sont produites à 30 minutes, 2 et 4 heures suivant l'injection intrathécale de la molécule, il est possible de penser que le [6]-gingérol posséderait une action analgésique plus importante que celle de l'eugénol. La réalisation de notre étude avec une plus forte dose de [6]-gingérol aurait sans doute permis de confirmer cette affirmation. Aussi, lors de l'évaluation de l'effet rémanent de l'eugénol suite à l'administration intrathécale de la dose de 50 µg, une amélioration significative des résultats aux tests des filaments de von Frey et de Hargreaves a été observée pour les deux membres postérieurs, soit la patte droite ayant subi la chirurgie CCI, mais également la patte gauche non-affectée. Ces résultats laissent présager la possibilité que l'eugénol puisse avoir un effet sur la transmission normale de la douleur, ce qui n'a pas été observé pour le [6]-gingérol. Ce phénomène pourrait s'avérer important dans le cadre d'une utilisation clinique chez l'humain où l'altération de la transmission et possiblement de la perception normale de la douleur n'est pas nécessairement souhaitée.

De plus, dans l'étude des propriétés analgésiques de l'eugénol, un effet rémanent de 4 jours a été observé suite à une administration intrathécale (Lionnet et al., 2010). Étant donné la nature lipophile du [6]-gingérol et son accumulation au niveau des tissus contenant une grande quantité de lipides, il serait intéressant de performer le même type d'étude que nous avons réalisé avec une dose plus élevée de [6]-gingérol afin de déterminer si un effet rémanent de plus de 24 heures pourrait être observé secondairement à la redistribution de la molécule. Ceci pourrait être bénéfique dans l'optique d'une utilisation à long terme de la molécule.

Pour ce qui est de l'étude des propriétés analgésiques de la vanilline (Beaudry et al., 2010), plusieurs points diffèrent du point de vue de la réalisation du projet comparativement à notre étude, rendant une comparaison directe des résultats obtenus difficile. Entre autres, la distribution de la vanilline au niveau du système nerveux central n'a pas été étudiée. Aussi, une administration par voie orale a été réalisée afin d'évaluer les propriétés analgésiques de la molécule, comparativement à une administration centrale par voie intrathécale dans le cas du [6]-gingérol. Cependant, il est tout de même intéressant de noter que l'utilisation de la vanilline a permis de réduire de manière significative l'allodynie mécanique, mais pas l'hyperalgésie thermique chez les rats. Ces résultats pourraient possiblement s'expliquer par une différence

structurelle de la vanilline avec les autres molécules de la famille des vanilloïdes, qui pourrait affecter l'affinité de la molécule avec les récepteurs TRPV1. Aussi, considérant le phénomène de sensibilisation centrale important dans le développement de l'hyperalgésie secondaire, si la molécule ne se distribue pas efficacement au niveau du système nerveux central, son action au niveau des récepteurs TRPV1 périphériques pourrait être insuffisante afin d'éliminer ou de réduire la douleur ressentie par les animaux.

Une des limites d'utilisation du [6]-gingérol est sa faible biodisponibilité lorsqu'administré par voie orale. En effet, lors d'étude pharmacocinétiques réalisées chez des rats, il a été démontré que la molécule subit l'effet d'un premier passage hépatique qui réduit grandement sa disponibilité (Jiang et al., 2008; Wang et al., 2009a). Il a également été démontré que le microbiote pourrait jouer un rôle dans le métabolisme de la molécule, diminuant son absorption intestinale (Nakazawa and Ohsawa, 2002). Ceci rend difficile une administration quotidienne de la molécule. Également, lors d'une administration par voie orale, une interaction médicament-aliments pourrait se produire si la molécule est consommée sous forme de mixture ou à l'intérieur d'une matrice alimentaire, pouvant altérer le métabolisme et les paramètres pharmacocinétiques obtenus avec la substance pure. Dans notre projet, bien que nous ayons démontré une efficacité du [6]-gingérol lorsqu'administré par voie intrathécale, la voie d'administration choisie est incompatible avec une administration quotidienne. Il serait donc intéressant d'étudier le développement de différentes formulations qui pourraient rendre l'utilisation clinique du [6]-gingérol plus facilement applicable. Chez l'humain, la muqueuse orale est un site d'absorption de plusieurs drogues. Cette voie d'administration a surtout été étudiée afin de permettre une administration non-invasive quotidienne de molécules possédant une faible biodisponibilité, un court temps de demi-vie ou nécessitant la prise de doses multiples. Plusieurs techniques sont d'ailleurs en développement afin de favoriser l'absorption de différentes drogues via la muqueuse de la cavité orale (Giannola et al., 2013). L'application de ces techniques au [6]-gingérol pourrait être le sujet d'un projet futur.

La comparaison directe de l'effet du [6]-gingérol sur le soulagement de la douleur neuropathique avec celle des médicaments traditionnellement utilisés est rendue compliquée par le fait que la majorité des traitements actuels sont rarement administrés par voie intrathécale. Il serait cependant intéressant de développer une méthode qui permettrait de comparer l'utilisation

du [6]-gingérol avec des molécules plus couramment employées telles que les anti-inflammatoires non stéroïdiens, la gabapentine, les opioïdes, etc.

4. Élimination des facteurs confondants

Plusieurs éléments avaient le potentiel d'affecter nos résultats tels que l'effet possible de l'isoflurane et du cyclodextrin qui était employé comme molécule contrôle et comme véhicule pour le [6]-gingérol. Également, il fallait considérer le potentiel sédatif du [6]-gingérol qui aurait pu être confondu avec son action analgésique. Ces différents éléments ont donc été évalués séparément afin de déterminer leur effet réel. L'effet de l'isoflurane sur la douleur neuropathique a déjà été déterminé dans une étude précédente (Lionnet et al., 2010). Pour ce faire, des rats ayant subi le modèle chirurgical CCI ont été anesthésiés avec de l'isoflurane avant d'être testés avec les tests de Von Frey et de Hargreaves et aucun effet significatif du gaz n'a été démontré dans la manifestation de douleur par les animaux. Afin d'évaluer l'effet du cyclodextrin, nous avons administré 20 μ L d'une solution de cyclodextrin à nos animaux de façon intrathécale, 16 jours après qu'ils aient subi leur chirurgie. Ceux-ci ont ensuite été testés avec les filaments de Von Frey et l'appareil de Hargreaves 30 minutes, 2 heures et 4 heures suivant l'administration de la solution. L'administration du cyclodextrin n'a engendré aucun effet sur la manifestation d'allodynie mécanique ou d'hyperalgésie thermique chez les rats, suggérant ainsi qu'un effet rapporté suite à l'administration intrathécale de [6]-gingérol serait vraiment dû à l'action de la molécule plutôt qu'à son véhicule.

Des propriétés anesthésiques ont été attribuées à l'eugénol, une autre molécule de la famille des vanilloïdes, lorsqu'administré à forte dose (Guenette et al., 2006). Afin de déterminer si le [6]-gingérol pouvait causer de la sédation susceptible d'interférer avec l'évaluation de douleur, 6 rats ont reçu une injection intra-péritonéale de [6]-gingérol à une dose de 40 mg/kg avant d'être soumis au test d'évaluation de la coordination motrice du rotarod treadmill. Lors de ce test, les animaux marchent sur une roue qui tourne sur elle-même de plus en plus vite. Lorsque les rats se laissent tomber, le temps resté sur l'appareil est enregistré. Plus l'animal reste sur l'appareil en mouvement longtemps, meilleure est sa coordination motrice. Les animaux sous l'effet d'une sédation ont une moins bonne coordination motrice et devraient tomber plus rapidement qu'en temps normal. Les animaux ont donc été testés tous les jours

pendant une semaine avant l'administration de la molécule afin d'établir une valeur de base. Suite à l'administration du [6]-gingérol, les animaux ont été re-testés de la même manière et aucune différence significative n'a pu être établie comparativement à la valeur de base. Ce résultat suggère donc que le [6]-gingérol ne cause pas de sédation significative susceptible d'affecter les résultats obtenus dans la suite de notre étude. Une évaluation similaire du cyclodextrin a été performée dans une autre étude et aucun effet significatif n'a été démontré sur la coordination motrice des animaux (Lionnet et al., 2010).

5. Histologie

À l'aide de l'histologie des moelles épinières, nous voulions confirmer que les propriétés analgésiques attribuées au [6]-gingérol n'étaient pas reliées à une mort neuronale. En effet, le [6]-gingérol est un analogue structurel de la capsaïcine, une molécule qui peut entraîner une mort cellulaire à forte dose. La capsaïcine agit en entraînant une entrée massive de calcium à l'intérieur des neurones, ce qui provoque la mort cellulaire et par le fait même une interruption dans la transmission de l'influx nerveux nociceptif (Jancso et al., 1977; Liu and Simon, 1996a). Suite à l'analyse, aucune évidence de nécrose cellulaire ou d'apoptose n'a été observée au niveau de la corne dorsale de la moelle épinière des échantillons étudiés. Ce résultat suggère donc que la molécule serait sécuritaire suite à son administration au niveau central.

6. Limites et perspectives

Donc, à la lumière des résultats obtenus, le [6]-gingérol apparaît comme une molécule ayant un potentiel intéressant en tant que nouvelle stratégie dans le développement de traitements contre la douleur neuropathique. En effet, tel que mentionné dans nos hypothèses de départ, le [6]-gingérol possède une meilleure stabilité métabolique que la capsaïcine et se distribue de manière efficace au niveau du système nerveux central, où l'on retrouve une concentration importante des récepteurs TRPV1 (Szallasi et al., 1994). La molécule s'est aussi avérée efficace dans le soulagement de l'allodynie mécanique et de l'hyperalgésie thermique chez des rats souffrant de douleur neuropathique après avoir subi une chirurgie visant la constriction chronique du nerf sciatique (Bennett and Xie, 1988). Cette action analgésique serait reliée à l'action du [6]-gingérol au niveau des récepteurs TRPV1 situés au niveau central, confirmant l'intérêt de ces récepteurs comme cible thérapeutique.

Cependant, ce projet de recherche comporte aussi plusieurs limites. Premièrement, le nombre d'animaux utilisé pour étudier les propriétés pharmacodynamiques de la molécule est très restreint. Une population plus nombreuse de rats aurait été bénéfique afin d'augmenter la portée de notre étude. Par la suite, une seule dose de [6]-gingérol a été évaluée. Selon nos hypothèses de départ, étant donné la chaîne alkyl latérale plus longue du [6]-gingérol comparativement à la capsaïcine et l'eugénol, une stabilité métabolique élevée se traduisant par un effet rémanent prolongé de la molécule était attendue. La stabilité métabolique du [6]-gingérol s'est en effet avérée meilleure comparativement à celle de la capsaïcine, confirmant une partie de notre hypothèse. Cependant, une étude précédente réalisée avec de l'eugénol a démontré une persistance de l'effet analgésique de la molécule pour 4 jours suivant l'administration de la celle-ci par voie intrathécale (Lionnet et al., 2010). Ce résultat ne corrobore pas notre hypothèse de départ si on considère qu'un effet résiduel de 24 heures seulement a été observé pour le [6]-gingérol. Il aurait été intéressant d'utiliser plusieurs doses différentes et plus élevées de [6]-gingérol afin de confirmer si, lorsqu'administré à plus forte dose, un effet rémanent prolongé peut être observé. Ceci aurait été possible d'autant plus qu'aucun effet toxique ou évidence de nécrose cellulaire n'a été observé à la dose que nous avons employée. Une autre limite de ce projet réside en l'absence de comparaison avec un autre médicament généralement utilisé dans le traitement de la douleur. Il aurait été intéressant de comparer l'effet analgésique du [6]-gingérol avec l'effet de molécules connues telles les opioïdes, les anti-inflammatoires stéroïdiens ou non-stéroïdiens, la gabapentine, etc. Cette comparaison aurait permis de mieux situer l'importance et la pertinence clinique du [6]-gingérol comparativement aux traitements actuels. Finalement, bien qu'un effet au niveau des récepteurs TRPV1 semble être l'explication la plus probable à l'action analgésique du [6]-gingérol, nous ne pouvons pas exclure l'action de la molécule au niveau de différents récepteurs. En effet, il a été démontré dans le passé que l'eugénol, une autre molécule membre de la famille des vanilloïdes, possède une action sur les récepteurs GABA et NMDA qui contribue à son action analgésique (Yang et al., 2003). En ce moment, ce phénomène ne peut pas être exclu en ce qui concerne le [6]-gingérol. L'utilisation de souris ou rats knock-out pour ce récepteur aurait pu être une alternative intéressante afin de confirmer l'importance et l'implication des récepteurs TRPV1 dans l'action analgésique de la molécule.

Dans l'avenir, à la lumière des limites précédemment soulevées, il serait donc intéressant d'effectuer une étude de pharmacodynamie semblable mais avec une dose de [6]-gingérol plus élevée et comportant plus d'animaux afin de valider l'effet analgésique de la molécule ainsi que son innocuité. Il serait également intéressant de performer une étude avec des souris KO pour le récepteur TRPV1 afin de confirmer l'action du [6]-gingérol au niveau de ce récepteur. Finalement, étant donné qu'une administration intrathécale se prête difficilement à une utilisation clinique quotidienne, différentes voies d'administration ou formulations du médicament pourraient être étudiées afin de rendre cette molécule plus facilement accessible dans un contexte clinique considérant son potentiel intéressant dans le soulagement de la douleur neuropathique.

Conclusion

La réalisation de ce projet de maîtrise aura permis de démontrer l'action analgésique du [6]-gingérol, molécule naturelle extraite du gingembre, lorsqu'administrée de façon intrathécale à une dose de 10 µg chez des rats ayant subi une chirurgie visant le développement de douleur neuropathique selon le modèle CCI de Bennett. Suite à l'administration de la molécule, une réduction significative de l'allodynie mécanique et de l'hyperalgésie thermique a pu être observée. Cette action de la molécule serait reliée à l'interaction du [6]-gingérol avec les récepteurs TRPV1 situés au niveau de la corne dorsale de la moelle épinière. Avant de performer cette étape de l'expérimentation, il a d'abord été démontré que le [6]-gingérol se distribue efficacement au niveau du système nerveux central incluant le cerveau et la moelle épinière, rendant donc une interaction avec ces récepteurs possible. Il a aussi été démontré que contrairement à la capsaïcine qui induit une toxicité neuronale par apoptose à forte dose, le [6]-gingérol semble sécuritaire et aucun signe de toxicité n'a pu être établi dans notre étude. Plusieurs molécules de la famille des vanilloïdes ont été étudiées par le passé telles que l'eugénol (Lionnet et al., 2010) et la vanilline (Beaudry et al., 2010) et ont été démontrées efficaces dans le soulagement de la douleur neuropathique. Il est cependant pensé que le [6]-gingérol aurait une meilleure stabilité métabolique que ces composés étant donné sa structure chimique, ce qui permettrait une action prolongée de la molécule. Dans l'avenir, il serait intéressant de s'interroger sur l'efficacité et l'innocuité du [6]-gingérol suite à une administration à plus forte dose. Cette molécule ayant démontré un potentiel intéressant dans le soulagement de la douleur neuropathique et considérant les besoins actuels de trouver des thérapies alternatives pour le soulagement de la douleur chronique, différentes routes d'administration pourraient être étudiées dans l'optique de pouvoir éventuellement utiliser cette molécule dans un contexte clinique.

Bibliographie

- Abbadie, C., Bhangoo, S., De Koninck, Y., Malcangio, M., Melik-Parsadaniantz, S., White, F.A., 2009, Chemokines and pain mechanisms. *Brain Res Rev* 60, 125-134.
- Abdel-Aziz, H., Windeck, T., Ploch, M., Verspohl, E.J., 2006, Mode of action of gingerols and shogaols on 5-HT₃ receptors: Binding studies, cation uptake by the receptor channel and contraction of isolated guinea-pig ileum. *Eur. J. Pharmacol.* 530, 136-143.
- Acs, G., Palkovits, M., Blumberg, P.M., 1994, Comparison of [³H]resiniferatoxin binding by the vanilloid (capsaicin) receptor in dorsal root ganglia, spinal cord, dorsal vagal complex, sciatic and vagal nerve and urinary bladder of the rat. *Life Sci* 55, 1017-1026.
- Aktan, F., Hennes, S., Tran, V.H., Duke, C.C., Roufogalis, B.D., Ammit, A.J., 2006, Gingerol metabolite and a synthetic analogue Capsarol inhibit macrophage NF-kappaB-mediated iNOS gene expression and enzyme activity. *Planta Med.* 72, 727-734.
- Al-Amin, Z.M., Thomson, M., Al-Qattan, K.K., Peltonen-Shalaby, R., Ali, M., 2006, Anti-diabetic and hypolipidaemic properties of ginger (*Zingiber officinale*) in streptozotocin-induced diabetic rats. *Br. J. Nutr.* 96, 660-666.
- Ali, B.H., Blunden, G., Tanira, M.O., Nemmar, A., 2008, Some phytochemical, pharmacological and toxicological properties of ginger (*Zingiber officinale* Roscoe): A review of recent research. *Food Chem. Toxicol.* 46, 409-420.
- Aloisi, A.M., Albonetti, M.E., Carli, G., 1995, Behavioural effects of different intensities of formalin pain in rats. *Physiol Behav* 58, 603-610.
- Anand, P., Bley, K., 2011, Topical capsaicin for pain management: therapeutic potential and mechanisms of action of the new high-concentration capsaicin 8% patch. *Br J Anaesth* 107, 490-502.
- Beaudry, F., Ross, A., Lema, P.P., Vachon, P., 2010, Pharmacokinetics of vanillin and its effects on mechanical hypersensitivity in a rat model of neuropathic pain. *Phytother Res* 24, 525-530.
- Beaudry, F., Vachon, P., 2009, Quantitative determination of capsaicin, a transient receptor potential channel vanilloid 1 agonist, by liquid chromatography quadrupole ion trap mass spectrometry: evaluation of in vitro metabolic stability. *Biomed Chromatogr* 23, 204-211.
- Beaulieu, P., ebrary Inc., 2005, *Pharmacologie de la douleur*. Presses de l'Université de Montréal, Montréal, Que.

- Beg, T., Siddique, Y.H., Ara, G., Gupta, J., Afzal, M., 2008, Antigenotoxic effect of genistein and gingerol on genotoxicity induced by norethandrolone and oxandrolone in cultured human lymphocytes. *International Journal of Pharmacology* 4, 177-183.
- Bennett, A.D., Everhart, A.W., Hulsebosch, C.E., 2000, Intrathecal administration of an NMDA or a non-NMDA receptor antagonist reduces mechanical but not thermal allodynia in a rodent model of chronic central pain after spinal cord injury. *Brain Res* 859, 72-82.
- 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.
- Besson, J.M., Guilbaud, G., Abdelmoumene, M., Chaouch, A., 1982, [Physiology of nociception]. *J Physiol (Paris)* 78, 7-107.
- Bhattarai, S., Tran, V.H., Duke, C.C., 2001, The stability of gingerol and shogaol in aqueous solutions. *J. Pharm. Sci.* 90, 1658-1664.
- Bhattarai, S., Tran, V.H., Duke, C.C., 2007, Stability of [6]-gingerol and [6]-shogaol in simulated gastric and intestinal fluids. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 45, 648-653.
- Bove, G., 2006, Mechanical sensory threshold testing using nylon monofilaments: The pain field's "Tin Standard". *Pain* 124, 13-17.
- Brown, A.C., Shah, C., Liu, J., Pham, J.T.H., Zhang, J.G., Jadus, M.R., 2009, Ginger's (*Zingiber officinale* Roscoe) inhibition of rat colonic adenocarcinoma cells proliferation and angiogenesis *in vitro*. *Phytother. Res.* 23, 640-645.
- Caterina, M.J., Julius, D., 2001, The vanilloid receptor: a molecular gateway to the pain pathway. *Annu. Rev. Neurosci.* 24, 487-517.
- Caterina, M.J., Leffler, A., Malmberg, A.B., Martin, W.J., Trafton, J., Petersen-Zeitz, K.R., Koltzenburg, M., Basbaum, A.I., Julius, D., 2000, Impaired nociception and pain sensation in mice lacking the capsaicin receptor. *Science* 288, 306-313.
- Caterina, M.J., Schumacher, M.A., Tominaga, M., Rosen, T.A., Levine, J.D., Julius, D., 1997, The capsaicin receptor: a heat-activated ion channel in the pain pathway. *Nature* 389, 816-824.
- Chanda, S., Bashir, M., Babbar, S., Koganti, A., Bley, K., 2008, In vitro hepatic and skin metabolism of capsaicin. *Drug Metabolism and Disposition: The Biological Fate of Chemicals* 36, 670-675.
- Chaplan, S.R., Bach, F.W., Pogrel, J.W., Chung, J.M., Yaksh, T.L., 1994, Quantitative assessment of tactile allodynia in the rat paw. *J Neurosci Methods* 53, 55-63.
- Cheigh, J.S., 1977, Drug administration in renal failure. *Am J Med* 62, 555-563.

- Cheppudira, B.P., 2006, Characterization of hind paw licking and lifting to noxious radiant heat in the rat with and without chronic inflammation. *J. Neurosci. Methods* 155, 122-125.
- Chrubasik, S., Pittler, M.H., Roufogalis, B.D., 2005, *Zingiberis rhizoma*: A comprehensive review on the ginger effect and efficacy profiles. *Phytomedicine* 12, 684-701.
- Costigan, M., Scholz, J., Samad, T., Woolf, C.J., 2006, Pain, In: *Basic neurochemistry : molecular, cellular and medical aspects*. Elsevier, Amsterdam ;, pp. 927-937.
- D'Amour, F.E., Smith, D.L., 1941, A method for determining loss of pain sensation. *J Pharmacol Exp Ther* 72, 74-79.
- D'Mello, R., Dickenson, A.H., 2008, Spinal cord mechanisms of pain. *Br J Anaesth* 101, 8-16.
- Davies, J.W., Hainsworth, A.H., Guerin, C.J., Lambert, D.G., 2010, Pharmacology of capsaicin-, anandamide-, and N-arachidonoyl-dopamine-evoked cell death in a homogeneous transient receptor potential vanilloid subtype 1 receptor population. *Br. J. Anaesth.* 104, 596-602.
- Decosterd, I., Woolf, C.J., 2000, Spared nerve injury: an animal model of persistent peripheral neuropathic pain. *Pain* 87, 149-158.
- Dedov, V.N., Tran, V.H., Duke, C.C., Connor, M., Christie, M.J., Mandadi, S., Roufogalis, B.D., 2002, Gingerols: a novel class of vanilloid receptor (VR1) agonists. *Br. J. Pharmacol.* 137, 793-798.
- Dickenson, A.H., Chapman, V., Green, G.M., 1997, The pharmacology of excitatory and inhibitory amino acid-mediated events in the transmission and modulation of pain in the spinal cord. *Gen Pharmacol* 28, 633-638.
- Ding, G.H., Naora, K., Hayashibara, M., Katagiri, Y., Kano, Y., Iwamoto, K., 1991, Pharmacokinetics of [6]-gingerol after intravenous administration in rats. *Chem Pharm Bull (Tokyo)* 39, 1612-1614.
- Doly, S., Fischer, J., Salio, C., Conrath, M., 2004, The vanilloid receptor-1 is expressed in rat spinal dorsal horn astrocytes. *Neurosci Lett* 357, 123-126.
- Dougherty, P.M., Willis, W.D., Lenz, F.A., 1998, Transient inhibition of responses to thermal stimuli of spinal sensory tract neurons in monkeys during sensitization by intradermal capsaicin. *Pain* 77, 129-136.
- Dubuisson, D., Dennis, S.G., 1977, The formalin test: a quantitative study of the analgesic effects of morphine, meperidine, and brain stem stimulation in rats and cats. *Pain* 4, 161-174.

- Dugasani, S., Pichika, M.R., Nadarajah, V.D., Balijepalli, M.K., Tandra, S., Korlakunta, J.N., 2010, Comparative antioxidant and anti-inflammatory effects of [6]-gingerol, [8]-gingerol, [10]-gingerol and [6]-shogaol. *J. Ethnopharmacol.* 127, 515-520.
- Dunham, N.W., Miya, T.S., 1957, A note on a simple apparatus for detecting neurological deficit in rats and mice. *J Am Pharm Assoc Am Pharm Assoc (Baltim)* 46, 208-209.
- Dworkin, R.H., Backonja, M., Rowbotham, M.C., Allen, R.R., Argoff, C.R., Bennett, G.J., Bushnell, M.C., Farrar, J.T., Galer, B.S., Haythornthwaite, J.A., Hewitt, D.J., Loeser, J.D., Max, M.B., Saltarelli, M., Schmader, K.E., Stein, C., Thompson, D., Turk, D.C., Wallace, M.S., Watkins, L.R., Weinstein, S.M., 2003, Advances in neuropathic pain: diagnosis, mechanisms, and treatment recommendations. *Arch. Neurol.* 60, 1524-1534.
- Garcia-Martinez, C., Humet, M., Planells-Cases, R., Gomis, A., Caprini, M., Viana, F., De La Pena, E., Sanchez-Baeza, F., Carbonell, T., De Felipe, C., Perez-Paya, E., Belmonte, C., Messeguer, A., Ferrer-Montiel, A., 2002, Attenuation of thermal nociception and hyperalgesia by VR1 blockers. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 2374-2379.
- Giannola, L.I., Sutera, F.M., De Caro, V., 2013, Physical methods to promote drug delivery on mucosal tissues of the oral cavity. *Expert Opin. Drug Deliv.* 10, 1449-1462.
- Guenette, S.A., Beaudry, F., Marier, J.F., Vachon, P., 2006, Pharmacokinetics and anesthetic activity of eugenol in male Sprague-Dawley rats. *J. Vet. Pharmacol. Ther.* 29, 265-270.
- Guenette, S.A., Helie, P., Beaudry, F., Vachon, P., 2007a, Eugenol for anesthesia of African clawed frogs (*Xenopus laevis*). *Vet Anaesth Analg* 34, 164-170.
- Guenette, S.A., Ross, A., Marier, J.F., Beaudry, F., Vachon, P., 2007b, Pharmacokinetics of eugenol and its effects on thermal hypersensitivity in rats. *Eur J Pharmacol* 562, 60-67.
- Guo, A., Vulchanova, L., Wang, J., Li, X., Elde, R., 1999, Immunocytochemical localization of the vanilloid receptor 1 (VR1): relationship to neuropeptides, the P2X3 purinoceptor and IB4 binding sites. *Eur J Neurosci* 11, 946-958.
- 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.
- Hellyer, P.W., Robertson, S.A., Fails, A.D., 2007, Pain and its management, In: Lumb & Jones' veterinary anesthesia and analgesia. Blackwell Pub., Ames, Iowa, pp. 31-57.
- Héon, H., 2005, Les modèles animaux de douleur, In: Beaulieu, P., Inc., e. (Eds.) *Pharmacologie de la douleur*. Presses de l'Université de Montréal, Montréal, Que., pp. 284-322.
- Hickok, J.T., Roscoe, J.A., Morrow, G.R., Ryan, J.L., 2007, A Phase II/III Randomized, Placebo-Controlled, Double-Blind Clinical Trial of Ginger (*Zingiber officinale*) for

Nausea Caused by Chemotherapy for Cancer: A Currently Accruing URCC CCOP Cancer Control Study. *Support Cancer Ther* 4, 247-250.

Hogan, Q., 2002, Animal pain models. *Reg. Anesth. Pain Med.* 27, 385-401.

Holzer, P., 1991, Capsaicin: cellular targets, mechanisms of action, and selectivity for thin sensory neurons. *Pharmacol Rev* 43, 143-201.

Huang, J., Zhang, X., McNaughton, P.A., 2006, Inflammatory pain: the cellular basis of heat hyperalgesia. *Curr Neuropharmacol* 4, 197-206.

Hwang, S.J., Valtschanoff, J.G., 2003, Vanilloid receptor VR1-positive afferents are distributed differently at different levels of the rat lumbar spinal cord. *Neurosci Lett* 349, 41-44.

Isa, Y., Miyakawa, Y., Yanagisawa, M., Goto, T., Kang, M.-S., Kawada, T., Morimitsu, Y., Kubota, K., Tsuda, T., 2008, 6-Shogaol and 6-gingerol, the pungent of ginger, inhibit TNF-[alpha] mediated downregulation of adiponectin expression via different mechanisms in 3T3-L1 adipocytes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 373, 429-434.

Ishiguro, K., Ando, T., Maeda, O., Ohmiya, N., Niwa, Y., Kadomatsu, K., Goto, H., 2007, Ginger ingredients reduce viability of gastric cancer cells via distinct mechanisms. *Biochem Biophys Res Commun* 362, 218-223.

Jancalek, R., Dubovy, P., Svizenska, I., Klusakova, I., 2010, Bilateral changes of TNF-alpha and IL-10 protein in the lumbar and cervical dorsal root ganglia following a unilateral chronic constriction injury of the sciatic nerve. *J. Neuroinflammation* 7, 11.

Jancso-Gabor, A., Szolcsanyi, J., Jancso, N., 1970, Stimulation and desensitization of the hypothalamic heat-sensitive structures by capsaicin in rats. *J Physiol* 208, 449-459.

Jancso, G., Kiraly, E., Jancso-Gabor, A., 1977, Pharmacologically induced selective degeneration of chemosensitive primary sensory neurones. *Nature* 270, 741-743.

Jasmin, L., Kohan, L., Franssen, M., Janni, G., Goff, J.R., 1998, The cold plate as a test of nociceptive behaviors: description and application to the study of chronic neuropathic and inflammatory pain models. *Pain* 75, 367-382.

Jeong, C.-H., Bode, A.M., Pugliese, A., Cho, Y.-Y., Kim, H.-G., Shim, J.-H., Jeon, Y.-J., Li, H., Jiang, H., Dong, Z., 2009, [6]-Gingerol Suppresses Colon Cancer Growth by Targeting Leukotriene A4 Hydrolase. *Cancer Res.* 69, 5584-5591.

Jiang, S.-z., Wang, N.-s., Mi, S.-q., 2008, Plasma pharmacokinetics and tissue distribution of [6]-gingerol in rats. *Biopharm. Drug Dispos.* 29, 529-537.

Julius, D., Basbaum, A.I., 2001, Molecular mechanisms of nociception. *Nature* 413, 203-210.

- Kalff, K.-M., El Mouedden, M., van Egmond, J., Veening, J., Joosten, L., Scheffer, G.J., Meert, T., Vissers, K., 2010, Pre-treatment with capsaicin in a rat osteoarthritis model reduces the symptoms of pain and bone damage induced by monosodium iodoacetate. *Eur. J. Pharmacol.* 641, 108-113.
- Kauppila, T., Kontinen, V.K., Pertovaara, A., 1998, Weight bearing of the limb as a confounding factor in assessment of mechanical allodynia in the rat. *Pain* 74, 55-59.
- Kim, J.-K., Kim, Y., Na, K.-M., Surh, Y.-J., Kim, T.-Y., 2007, [6]-Gingerol prevents UVB-induced ROS production and COX-2 expression in vitro and in vivo. *Free Radic. Res.* 41, 603-614.
- Kim, J.H., Chang, J.H., Yoon, J.H., Kwon, S.H., Bae, J.H., Kim, K.S., 2009, [6]-Gingerol suppresses interleukin-1 beta-induced MUC5AC gene expression in human airway epithelial cells. *Am J Rhinol Allergy* 23, 385-391.
- 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.
- Kim, S.O., Kundu, J.K., Shin, Y.K., Park, J.-H., Cho, M.-H., Kim, T.-Y., Surh, Y.-J., 2005, [6]-Gingerol inhibits COX-2 expression by blocking the activation of p38 MAP kinase and NF- κ B in phorbol ester-stimulated mouse skin. *J. Biol. Chem.* 280, 2558-2567.
- Lee, H.S., Seo, E.Y., Kang, N.E., Kim, W.K., 2008a, [6]-Gingerol inhibits metastasis of MDA-MB-231 human breast cancer cells. *The Journal of Nutritional Biochemistry* 19, 313-319.
- Lee, S.-H., Cekanova, M., Baek, S.J., 2008b, Multiple mechanisms are involved in 6-gingerol-induced cell growth arrest and apoptosis in human colorectal cancer cells. *Mol. Carcinog.* 47, 197-208.
- Lee, T.-Y., Lee, K.-C., Chen, S.-Y., Chang, H.-H., 2009, 6-Gingerol inhibits ROS and iNOS through the suppression of PKC- α and NF- κ B pathways in lipopolysaccharide-stimulated mouse macrophages. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 382, 134-139.
- Levine, J.D., Alessandri-Haber, N., 2007, TRP channels: targets for the relief of pain. *Biochim Biophys Acta* 1772, 989-1003.
- Li, J., Simone, D.A., Larson, A.A., 1999, Windup leads to characteristics of central sensitization. *Pain* 79, 75-82.
- Lin, R.J., Chen, C.Y., Chung, L.Y., Yen, C.M., 2010a, Larvicidal activities of ginger (*Zingiber officinale*) against *Angiostrongylus cantonensis*. *Acta Trop.* 115, 69-76.
- Lin, R.J., Chen, C.Y., Lee, J.D., Lu, C.M., Chung, L.Y., Yen, C.M., 2010b, Larvicidal Constituents of *Zingiber officinale* (Ginger) against *Anisakis simplex*. *Planta Med.*

- Lionnet, L., Beaudry, F., Vachon, P., 2010, Intrathecal eugenol administration alleviates neuropathic pain in male Sprague-Dawley rats. *Phytother. Res.* 9999, n/a.
- Liu, L., Simon, S.A., 1996a, Capsaicin-induced currents with distinct desensitization and Ca²⁺ dependence in rat trigeminal ganglion cells. *J Neurophysiol* 75, 1503-1514.
- Liu, L., Simon, S.A., 1996b, Similarities and differences in the currents activated by capsaicin, piperine, and zingerone in rat trigeminal ganglion cells. *J Neurophysiol* 76, 1858-1869.
- Liu, L., Wang, Y., Simon, S.A., 1996, Capsaicin activated currents in rat dorsal root ganglion cells. *Pain* 64, 191-195.
- Marchand, S., 2005, neurophysiologie de la douleur, In: Beaulieu, P., ebrary Inc. (Eds.) *Pharmacologie de la douleur*. Presses de l'Université de Montréal, Montréal, Que., pp. 5-37.
- Mariappan, T.T., Kurawattimath, V., Gautam, S.S., Kulkarni, C.P., Kallem, R., Taskar, K.S., Marathe, P.H., Mandlekar, S., 2014, Estimation of the Unbound Brain Concentration of P-Glycoprotein Substrates or Nonsubstrates by a Serial Cerebrospinal Fluid Sampling Technique in Rats. *Mol. Pharm.*
- Matheny, C.J., Lamb, M.W., Brouwer, K.R., Pollack, G.M., 2001, Pharmacokinetic and pharmacodynamic implications of P-glycoprotein modulation. *Pharmacotherapy* 21, 778-796.
- Menéndez, L., Lastra, A., Hidalgo, A., Baamonde, A., 2002, Unilateral hot plate test: a simple and sensitive method for detecting central and peripheral hyperalgesia in mice. *J. Neurosci. Methods* 113, 91-97.
- Mezey, E., Toth, Z.E., Cortright, D.N., Arzubi, M.K., Krause, J.E., Elde, R., Guo, A., Blumberg, P.M., Szallasi, A., 2000, Distribution of mRNA for vanilloid receptor subtype 1 (VR1), and VR1-like immunoreactivity, in the central nervous system of the rat and human. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 3655-3660.
- Milligan, E.D., Watkins, L.R., 2009, Pathological and protective roles of glia in chronic pain. *Nat. Rev. Neurosci.* 10, 23-36.
- Moalem, G., Tracey, D.J., 2006, Immune and inflammatory mechanisms in neuropathic pain. *Brain Res Rev* 51, 240-264.
- Mogil, J.S., Wilson, S.G., Bon, K., Lee, S.E., Chung, K., Raber, P., Pieper, J.O., Hain, H.S., Belknap, J.K., Hubert, L., Elmer, G.I., Chung, J.M., Devor, M., 1999, Heritability of nociception I: responses of 11 inbred mouse strains on 12 measures of nociception. *Pain* 80, 67-82.
- Molony, V., Kent, J.E., 1997, Assessment of acute pain in farm animals using behavioral and physiological measurements. *J. Anim. Sci.* 75, 266-272.

- Moulin, D.E., Clark, A.J., Gilron, I., Ware, M.A., Watson, C.P., Sessle, B.J., Coderre, T., Morley-Forster, P.K., Stinson, J., Boulanger, A., Peng, P., Finley, G.A., Taenzer, P., Squire, P., Dion, D., Cholkan, A., Gilani, A., Gordon, A., Henry, J., Jovey, R., Lynch, M., Mailis-Gagnon, A., Panju, A., Rollman, G.B., Velly, A., 2007, Pharmacological management of chronic neuropathic pain - consensus statement and guidelines from the Canadian Pain Society. *Pain Res. Manag.* 12, 13-21.
- Nakazawa, T., Ohsawa, K., 2002, Metabolism of [6]-gingerol in rats. *Life Sci.* 70, 2165-2175.
- Naora, K., Ding, G., Hayashibara, M., Katagiri, Y., Kano, Y., Iwamoto, K., 1992, Pharmacokinetics of [6]-gingerol after intravenous administration in rats with acute renal or hepatic failure. *Chem Pharm Bull (Tokyo)* 40, 1295-1298.
- Nigam, N., Bhui, K., Prasad, S., George, J., Shukla, Y., 2009, [6]-Gingerol induces reactive oxygen species regulated mitochondrial cell death pathway in human epidermoid carcinoma A431 cells. *Chem. Biol. Interact.* 181, 77-84.
- Nigam, N., George, J., Srivastava, S., Roy, P., Bhui, K., Singh, M., Shukla, Y., 2010, Induction of apoptosis by [6]-gingerol associated with the modulation of p53 and involvement of mitochondrial signaling pathway in B[a]P-induced mouse skin tumorigenesis. *Cancer Chemother. Pharmacol.* 65, 687-696.
- Ohkubo, T., Shibata, M., 1997, The selective capsaicin antagonist capsazepine abolishes the antinociceptive action of eugenol and guaiacol. *J Dent Res* 76, 848-851.
- Okuse, K., 2007, Pain signalling pathways: from cytokines to ion channels. *Int J Biochem Cell Biol* 39, 490-496.
- Parenti, C., Aricò, G., Ronsisvalle, G., Scoto, G.M., 2012, Supraspinal injection of Substance P attenuates allodynia and hyperalgesia in a rat model of inflammatory pain. *Peptides* 34, 412-418.
- Park, C.-K., Kim, K., Jung, S.J., Kim, M.J., Ahn, D.K., Hong, S.-D., Kim, J.S., Oh, S.B., 2009a, Molecular mechanism for local anesthetic action of eugenol in the rat trigeminal system. *Pain* 144, 84-94.
- Park, C.-K., Li, H.Y., Yeon, K.-Y., Jung, S.J., Choi, S.-Y., Lee, S.J., Lee, S., Park, K., Kim, J.S., Oh, S.B., 2006a, Eugenol Inhibits Sodium Currents in Dental Afferent Neurons. *J. Dent. Res.* 85, 900-904.
- Park, K.K., Chun, K.S., Lee, J.M., Lee, S.S., Surh, Y.J., 1998, Inhibitory effects of [6]-gingerol, a major pungent principle of ginger, on phorbol ester-induced inflammation, epidermal ornithine decarboxylase activity and skin tumor promotion in ICR mice. *Cancer Lett* 129, 139-144.

- Park, M., Bae, J., Lee, D.-S., 2008, Antibacterial activity of [10]-gingerol and [12]-gingerol isolated from ginger rhizome against periodontal bacteria. *Phytother. Res.* 22, 1446-1449.
- Park, S.-H., Sim, Y.-B., Choi, S.-M., Seo, Y.-J., Kwon, M.-S., Lee, J.-K., Suh, H.-W., 2009b, Antinociceptive profiles and mechanisms of orally administered vanillin in the mice. *Arch. Pharm. Res.* 32, 1643-1649.
- Park, Y.J., Wen, J., Bang, S., Park, S.W., Song, S.Y., 2006b, [6]-Gingerol Induces Cell Cycle Arrest and Cell Death of Mutant p53-expressing Pancreatic Cancer Cells. *Yonsei Med. J.* 47, 688-697.
- Pfeiffer, E., Heuschmid, F.F., Kranz, S., Metzler, M., 2006, Microsomal Hydroxylation and Glucuronidation of [6]-Gingerol. *J. Agric. Food Chem.* 54, 8769-8774.
- Planells-Cases, R., Garcia-Sanz, N., Morenilla-Palao, C., Ferrer-Montiel, A., 2005, Functional aspects and mechanisms of TRPV1 involvement in neurogenic inflammation that leads to thermal hyperalgesia. *Pflügers Archiv European Journal of Physiology* 451, 151-159.
- Price, J., Nolan, A., 2007, The physiology and pathophysiology of pain, In: *BSAVA manual of canine and feline anaesthesia and analgesia*. British Small Animal Veterinary Association, Gloucester, England, pp. 79-88.
- Qian, Q.-h., Yue, W., Wang, Y.-x., Yang, Z.-h., Liu, Z.-t., Chen, W.-h., 2009, Gingerol inhibits cisplatin-induced vomiting by down regulating 5-hydroxytryptamine, dopamine and substance P expression in minks. *Arch. Pharm. Res.* 32, 565-573.
- Qian, Q.H., Yue, W., Chen, W.H., Yang, Z.H., Liu, Z.T., Wang, Y.X., 2010, Effect of gingerol on substance P and NK1 receptor expression in a vomiting model of mink. *Chin Med J (Engl)* 123, 478-484.
- Randall, L.O., Selitto, J.J., 1957, A method for measurement of analgesic activity on inflamed tissue. *Arch Int Pharmacodyn Ther* 111, 409-419.
- Rustay, N.R., Wahlsten, D., Crabbe, J.C., 2003, Influence of task parameters on rotarod performance and sensitivity to ethanol in mice. *Behav Brain Res* 141, 237-249.
- Sang, S., Hong, J., Wu, H., Liu, J., Yang, C.S., Pan, M.H., Badmaev, V., Ho, C.T., 2009, Increased growth inhibitory effects on human cancer cells and anti-inflammatory potency of shogaols from *Zingiber officinale* relative to gingerols. *J Agric Food Chem* 57, 10645-10650.
- Saria, A., Gamse, R., Petermann, J., Fischer, J.A., Theodorsson-Norheim, E., Lundberg, J.M., 1986, Simultaneous release of several tachykinins and calcitonin gene-related peptide from rat spinal cord slices. *Neurosci Lett* 63, 310-314.

- Sasamura, T., Sasaki, M., Tohda, C., Kuraishi, Y., 1998, Existence of capsaicin-sensitive glutamatergic terminals in rat hypothalamus. *Neuroreport* 9, 2045-2048.
- 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.
- Shariatpanahi, Z.V., Taleban, F.A., Mokhtari, M., Shahbazi, S., 2010, Ginger extract reduces delayed gastric emptying and nosocomial pneumonia in adult respiratory distress syndrome patients hospitalized in an intensive care unit. *J Crit Care*.
- Shimoda, H., Shan, S.J., Tanaka, J., Seki, A., Seo, J.W., Kasajima, N., Tamura, S., Ke, Y., Murakami, N., 2010, Anti-inflammatory properties of red ginger (*Zingiber officinale* var. *Rubra*) extract and suppression of nitric oxide production by its constituents. *J. Med. Food* 13, 156-162.
- Someya, A., Horie, S., Yamamoto, H., Murayama, T., 2003, Modifications of Capsaicin-Sensitive Neurons in Isolated Guinea Pig Ileum by [6]-Gingerol and Lafutidine. *J. Pharmacol. Sci.* 92, 359-366.
- Spicarova, D., Palecek, J., 2008, The role of spinal cord vanilloid (TRPV1) receptors in pain modulation. *Physiol Res* 57 Suppl 3, S69-77.
- Suekawa, M., Ishige, A., Yuasa, K., Sudo, K., Aburada, M., Hosoya, E., 1984, Pharmacological studies on ginger. I. Pharmacological actions of pungent constituents, (6)-gingerol and (6)-shogaol. *J Pharmacobiodyn* 7, 836-848.
- Szallasi, A., Blumberg, P.M., 1993, [3H]resiniferatoxin binding by the vanilloid receptor: species-related differences, effects of temperature and sulfhydryl reagents. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 347, 84-91.
- Szallasi, A., Blumberg, P.M., 1999, Vanilloid (Capsaicin) receptors and mechanisms. *Pharmacol Rev* 51, 159-212.
- Szallasi, A., Blumberg, P.M., Nilsson, S., Hökfelt, T., Lundberg, J.M., 1994, Visualization by [3H]resiniferatoxin autoradiography of capsaicin-sensitive neurons in the rat, pig and man. *Eur J Pharmacol* 264, 217-221.
- Szallasi, A., Lewin, N.A., Blumberg, P.M., 1993, Vanilloid (capsaicin) receptor in the rat: positive cooperativity of resiniferatoxin binding and its modulation by reduction and oxidation. *J Pharmacol Exp Ther* 266, 678-683.
- Szallasi, A., Nilsson, S., Farkas-Szallasi, T., Blumberg, P.M., Hökfelt, T., Lundberg, J.M., 1995, Vanilloid (capsaicin) receptors in the rat: distribution in the brain, regional differences in the spinal cord, axonal transport to the periphery, and depletion by systemic vanilloid treatment. *Brain Res.* 703, 175-183.

- Thacker, M.A., Clark, A.K., Marchand, F., McMahon, S.B., 2007, Pathophysiology of peripheral neuropathic pain: immune cells and molecules. *Anesth Analg* 105, 838-847.
- Tominaga, M., Tominaga, T., 2005, Structure and function of TRPV1. *Pflügers Archiv European Journal of Physiology* 451, 143-150.
- Tripathi, S., Maier, K.G., Bruch, D., Kittur, D.S., 2007, Effect of 6-Gingerol on Pro-Inflammatory Cytokine Production and Costimulatory Molecule Expression in Murine Peritoneal Macrophages. *J. Surg. Res.* 138, 209-213.
- Truini, A., Cruccu, G., 2006, Pathophysiological mechanisms of neuropathic pain. *Neurol. Sci.* 27 Suppl 2, S179-182.
- Ueki, S., Miyoshi, M., Shido, O., Hasegawa, J., Watanabe, T., 2008, Systemic administration of [6]-gingerol, a pungent constituent of ginger, induces hypothermia in rats via an inhibitory effect on metabolic rate. *Eur. J. Pharmacol.* 584, 87-92.
- Vallejo, R., Tilley, D.M., Vogel, L., Benyamin, R., 2010, The Role of Glia and the Immune System in the Development and Maintenance of Neuropathic Pain. *Pain Pract.*
- Valtschanoff, J.G., Rustioni, A., Guo, A., Hwang, S.J., 2001, Vanilloid receptor VR1 is both presynaptic and postsynaptic in the superficial laminae of the rat dorsal horn. *J Comp Neurol* 436, 225-235.
- Vivancos, G.G., Verri Jr., W.A., Cunha, T.M., Schivo, I.R.S., Parada, C.A., Cunha, F.Q., Ferreira, S.H., 2004, An electronic pressure-meter nociception paw test for rats. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 37, 391-399.
- Walker, K.M., Urban, L., Medhurst, S.J., Patel, S., Panesar, M., Fox, A.J., McIntyre, P., 2003, The VR1 antagonist capsazepine reverses mechanical hyperalgesia in models of inflammatory and neuropathic pain. *J Pharmacol Exp Ther* 304, 56-62.
- Walpole, C.S., Bevan, S., Bovermann, G., Boelsterli, J.J., Breckenridge, R., Davies, J.W., Hughes, G.A., James, I., Oberer, L., Winter, J., et al., 1994, The discovery of capsazepine, the first competitive antagonist of the sensory neuron excitants capsaicin and resiniferatoxin. *J Med Chem* 37, 1942-1954.
- Walpole, C.S., Wrigglesworth, R., Bevan, S., Campbell, E.A., Dray, A., James, I.F., Masdin, K.J., Perkins, M.N., Winter, J., 1993, Analogues of capsaicin with agonist activity as novel analgesic agents; structure-activity studies. 3. The hydrophobic side-chain "C-region". *J Med Chem* 36, 2381-2389.
- Wang, W., Li, C.-Y., Wen, X.-D., Li, P., Qi, L.-W., 2009a, Plasma pharmacokinetics, tissue distribution and excretion study of 6-gingerol in rat by liquid chromatography-electrospray ionization time-of-flight mass spectrometry. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 49, 1070-1074.

- Wang, W., Li, C.-Y., Wen, X.-D., Li, P., Qi, L.-W., 2009b, Simultaneous determination of 6-gingerol, 8-gingerol, 10-gingerol and 6-shogaol in rat plasma by liquid chromatography-mass spectrometry: Application to pharmacokinetics. *Journal of Chromatography B* 877, 671-679.
- White, B., 2007, Ginger: an overview. *Am. Fam. Physician* 75, 1689-1691.
- Whitehead, K.J., Smith, C.G., Delaney, S.A., Curnow, S.J., Salmon, M., Hughes, J.P., Chessell, I.P., 2010, Dynamic regulation of spinal pro-inflammatory cytokine release in the rat in vivo following peripheral nerve injury. *Brain. Behav. Immun.* 24, 569-576.
- Wiseman-Orr, M.L., Nolan, A.M., Reid, J., Scott, E.M., 2004, Development of a questionnaire to measure the effects of chronic pain on health-related quality of life in dogs. *Am. J. Vet. Res.* 65, 1077-1084.
- Wu, S.-L., Chen, J.-C., Li, C.-C., Lo, H.-Y., Ho, T.-Y., Hsiang, C.-Y., 2009, Vanillin Improves and Prevents Trinitrobenzene Sulfonic Acid-Induced Colitis in Mice. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 330, 370-376.
- Yagihashi, S., Miura, Y., Yagasaki, K., 2008, Inhibitory effect of gingerol on the proliferation and invasion of hepatoma cells in culture. *Cytotechnology* 57, 129-136.
- Yang, B.H., Piao, Z.G., Kim, Y.-B., Lee, C.-H., Lee, J.K., Park, K., Kim, J.S., Oh, S.B., 2003, Activation of Vanilloid Receptor 1 (VR1) by Eugenol. *J. Dent. Res.* 82, 781-785.
- Yang, C.S., Landau, J.M., Huang, M.T., Newmark, H.L., 2001, Inhibition of carcinogenesis by dietary polyphenolic compounds. *Annu. Rev. Nutr.* 21, 381-406.
- Young, H.-Y., Luo, Y.-L., Cheng, H.-Y., Hsieh, W.-C., Liao, J.-C., Peng, W.-H., 2005, Analgesic and anti-inflammatory activities of [6]-gingerol. *J. Ethnopharmacol.* 96, 207-210.
- Zick, S.M., Djuric, Z., Ruffin, M.T., Litzinger, A.J., Normolle, D.P., Alrawi, S., Feng, M.R., Brenner, D.E., 2008, Pharmacokinetics of 6-Gingerol, 8-Gingerol, 10-Gingerol, and 6-Shogaol and Conjugate Metabolites in Healthy Human Subjects. *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention* 17, 1930-1936.