

Université de Montréal

**Propriétés anesthésiques et analgésiques de l'eugénol chez la
grenouille (*Xenopus laevis*), le poisson (*Oncorhynchus mykiss*) et
le rat (*Rattus norvegicus*)**

par

Sarah Annie Guénette

Département de biomédecine vétérinaire

Faculté de médecine vétérinaire

Thèse présentée à la Faculté de médecine vétérinaire

en vue de l'obtention du grade

philosophae doctor (Ph.D.)

en sciences vétérinaires

juin, 2008

© Sarah Annie Guénette, 2008

Université de Montréal
Faculté de médecine vétérinaire

Thèse intitulée

**Propriétés anesthésiques et analgésiques de l'eugénol chez la grenouille
(*Xenopus laevis*), chez le poisson (*Oncorhynchus mykiss*) et chez le rat
(*Rattus norvegicus*)**

présentée par

Sarah Annie Guénette

Thèse évaluée par un jury composé des personnes suivantes

Éric Troncy, président-rapporteur

Pascal Vachon, directeur de recherche

Pierre Beaulieu, membre du jury

Patricia Turner, examinatrice externe

Mario Jacques, représentant du doyen de la FÉSP

Résumé

L'eugénol (2-methoxy-4-(2-propenyl) phénol), produit dérivé du clou de girofle (*Eugenia aromatica*), fut tout d'abord utilisé en application topique à des fins d'analgésie dentaire. Il produit également une anesthésie chirurgicale lorsque administré en immersion chez les poissons. L'eugénol agit sur les récepteurs vanilloïdes, sensibles à la chaleur, aux protons et à certaines molécules lipidiques. Ces récepteurs jouent un rôle important dans le mécanisme de l'inflammation et de l'hyperalgésie. L'eugénol pourrait également produire ses effets par antagonisme des récepteurs glutamaergiques (NMDA) et par son activation des récepteurs GABAergiques.

Considérant que l'eugénol produit des effets analgésiques et anesthésiques, des études de pharmacocinétique et de pharmacodynamie furent réalisées chez la grenouille (*Xenopus laevis*), le poisson (*Oncorhynchus mykiss*) et le rat (*Rattus norvegicus*).

Les résultats démontrent que l'eugénol administré par immersion à une dose efficace permet d'atteindre une anesthésie chirurgicale chez les grenouilles (350 mg/L) et les poissons (75 mg/L). Suite à des analyses plasmatiques par LC/MS/MS, la pharmacocinétique des grenouilles, des poissons et des rats montre que la drogue est éliminée et qu'il pourrait y avoir une recirculation entérohépatique plus importante chez la grenouille et le rat. La longue demi-vie chez le rat suggère aussi une accumulation dans les tissus après des administrations répétées.

Suite à l'administration intraveineuse d'une dose de 20 mg/kg chez le rat, l'eugénol induit une anesthésie chirurgicale pour une très courte période de temps variant autour de 167 s. Les résultats de sensibilité thermique confirment l'efficacité de l'eugénol pour réduire l'hyperalgésie induite chez des rats neuropathiques. L'effet pharmacologique de l'eugénol a démontré une

augmentation progressive constante de l'analgésie sur une période de cinq jours de traitements journaliers.

En conclusion, l'eugénol possède des propriétés analgésiques et anesthésiques chez la grenouille africaine à griffes (*Xenopus laevis*), le poisson (*Oncorhynchus mykiss*) et le rat (*Rattus norvegicus*).

Mots-clés : Eugénol, anesthésie, analgésie, pharmacocinétique, spectrométrie de masse, grenouille africaine à griffes, truite arc-en-ciel, rat, poisson.

Abstract

Eugenol (2-methoxy-4-(2-propenyl) phenol), derived from cloves, was first used as a topical agent for dental analgesia by dentistry practitioners, and subsequently to induce surgical anaesthesia by immersion in fish. Eugenol binds to vanilloid receptors, which are sensitive to heat, protons and certain lipid molecules. These receptors also play an important role in the mechanisms of inflammation, as well as hyperalgesia (Kanai 2005, and Crotright 2004). Eugenol could also produce its effects via its antagonistic interactions with glutamatergic receptors (NMDA), and agonistic interactions with GABAergic receptors.

Considering that eugenol has analgesic and anesthetic effects, pharmacokinetic and pharmacodynamic studies were performed in frogs (*Xenopus laevis*), fish (*Oncorhynchus mykiss*) and rats (*Rattus norvegicus*).

Results show that a surgical anesthetic dose was observed for frogs (350 mg/L) and fish (75 mg/L) with a eugenol solution. Pharmacokinetics were evaluated following LC/MS/MS plasma analysis of frogs, fish and rats. Results show that eugenol was eliminated in all species and that an enterohepatic recirculation was apparent for frogs and rats. The long half-life in rats suggests an accumulation in tissues following repeated administrations.

Following an intravenous administration 20 mg/kg of eugenol, a surgical anesthesia of approximately 167 sec was observed in rats. Hargreave's test results, evaluating hyperalgesia, show that eugenol reduced pain perception in a rat model of neuropathic pain. This pharmacological effect showed an increasing progression of the analgesia over the 5 days of daily treatments.

In conclusion, eugenol has analgesic and anesthetic properties in African clawed frogs (*Xenopus laevis*), trout (*Oncorhynchus mykiss*) and rats (*Rattus norvegicus*).

Keywords: Eugenol, anaesthesia, analgesia, pharmacokinetics, mass spectrometry, African clawed frog, trout, rat.

Table des matières

RESUME.....	III
ABSTRACT.....	V
TABLE DES MATIÈRES.....	VII
LISTE DES TABLEAUX.....	XII
LISTE DES FIGURES.....	XIV
LISTE DES ABREVIATIONS.....	XXIII
REMERCIEMENTS.....	XXIX
AVANT-PROPOS.....	XXXI
INTRODUCTION.....	1
CHAPITRE 1 : RECENSION DE LA LITTÉRATURE.....	2
1. INTRODUCTION.....	3
1.1 LA RECHERCHE ET LES ANIMAUX DE LABORATOIRE.....	3
2. LES SPECIFICITES NEURO-ANATOMIQUES SENSORIELLES CHEZ LES AMPHIBIENS, LES POISSONS ET LES MAMMIFERES.....	6
2.1 LES AMPHIBIENS.....	6
2.2 LES POISSONS.....	9
2.3 LES MAMMIFERES.....	12
3. HISTORIQUE DE L'ANESTHESIE ET DE L'ANALGESIE EN RECHERCHE.....	21
3.1 ANESTHESIE ET ANALGESIE DES GRENOUILLES : METHODES D'EVALUATION.....	21
3.2 ANESTHESIE ET ANALGESIE CHEZ LE POISSON : METHODES D'EVALUATION.....	22
3.3 ANESTHESIE ET ANALGESIE CHEZ LE RAT : METHODES D'EVALUATION.....	23
4. LA DOULEUR NEUROPATHIQUE.....	24
4.1 ALLODYNIE ET HYPERALGESIE.....	25
4.2 HYPERALGESIE PRIMAIRE ET SECONDAIRE.....	25
4.3 LES MODELES ANIMAUX DE DOULEUR NEUROPATHIQUE.....	35
4.4 LES METHODES D'EVALUATION DE LA DOULEUR NEUROPATHIQUE.....	38
5. HISTORIQUE DE L'UTILISATION DE L'EUGENOL ET SES EFFETS.....	40
5.1 GENERALITES.....	40
5.2 LA SOURCE ET SES DERIVES.....	41
5.3 UTILISATION DE L'EUGENOL EN MEDECINE VETERINAIRE.....	42
5.4 AUTRES PROPRIETES PHARMACOLOGIQUES RAPPORTEES.....	44
5.5 LES RECEPTEURS TRPV1.....	44
5.5.1 Caractérisation et localisation anatomique.....	44
5.5.2 Les mécanismes d'actions périphériques et centraux des récepteurs vanilloïdes	46
5.5.3 Les molécules agonistes et antagonistes.....	49
5.6 LE MARQUAGE DES RECEPTEURS TRPV1.....	50
5.7 LES RECEPTEURS GABA ET L'EUGENOL.....	52
5.8 LES RECEPTEURS DU GLUTAMATE ET L'EUGENOL.....	53
6. LA SPECTROMETRIE DE MASSE.....	54

6.1 GENERALITES	54
6.2 LES ETAPES PRELIMINAIRES A L'ANALYSE	56
6.2.1 Détermination des propriétés chimiques et physiques	56
6.2.2 Échantillonnage.....	58
6.2.3 Extraction	58
6.2.4 Dérivatisation	59
6.3 L'ANALYSE EN SPECTROMETRIE DE MASSE	62
6.3.1 Appareillage disponible et ses capacités	62
6.3.2 Composantes du système et ses fonctions propres	62
7. OBJECTIFS	71
8. HYPOTHÈSES BASÉES SUR DES ÉTUDES PHARMACOCINÉTIQUES	72
CHAPITRE 2: ARTICLES	73
ARTICLE 1 :	74
S.A. GUÉNETTE, P. HÉLIE, F. BEAUDRY AND P. VACHON. 2007. EUGENOL FOR ANAESTHESIA OF AFRICAN CLAWED FROGS (<i>XENOPUS LAEVIS</i>). JOURNAL OF VETERINARY ANESTHESIA AND ANALGESIA, 34: PP.164-170.....	74
1.1 ABSTRACT	74
1.2 INTRODUCTION	76
1.3 EXPERIMENTAL.....	77
1.3.1 Materials and Methods.....	77
1.3.1.1 Animals.....	77
1.3.1.2 Chemicals	77
1.3.1.3 Pharmacodynamic Study	77
1.3.1.4 Pharmacokinetic Study	79
1.3.1.5 Evaluation of the Surgical Level of Anesthesia	80
1.3.1.6 Histopathology	80
1.3.1.7 Statistics and Pharmacokinetics	80
1.4 RESULTS	81
1.5 DISCUSSION AND CONCLUSIONS.....	83
1.6 ACKNOWLEDGMENT	84
1.7 REFERENCE LIST	84
1.8 FIGURE LEGEND	86
TABLES	88
FIGURES.....	89
ARTICLE 2:	94
GUÉNETTE, S.A. F.C. UHLAND, P. HÉLIE, F. BEAUDRY ET P. VACHON. 2007. PHARMACOKINETICS OF EUGENOL IN RAINBOW TROUT (<i>ONCORHYNCHUS MYKISS</i>). AQUACULTURE, 266 (1-4), PP. 262-265.....	94
2.1 ABSTRACT	94
2.2 INTRODUCTION	95
2.3 MATERIALS AND METHODS.....	96
2.3.1 Animals and Captivity Conditions	96
2.3.2 Chemicals	96
2.3.3 Pharmacokinetics.....	97
2.3.4 Pharmacokinetic Study	97
2.4 RESULTS	98
2.5 DISCUSSION	98
2.6 CONCLUSIONS	100

2.7 REFERENCE LIST	100
2.8 FIGURE LEGEND	103
FIGURES.....	104
ARTICLE 3 :	105
GUÉNETTE, S.A., F. BEAUDRY, J.-F. MARIER ET P. VACHON. 2006. PHARMACOKINETICS AND ANESTHETIC ACTIVITY OF EUGENOL IN MALE SPRAGUE-DAWLEY RATS. JOURNAL OF VETERINARY PHARMACOLOGY AND THERAPEUTICS. 29: PP. 265-270.....	105
3.1 ABSTRACT	105
3.2 INTRODUCTION	106
3.3 MATERIALS AND METHODS.....	107
3.3.1 Study Design.....	107
3.3.2 Analytical Assay.....	108
3.3.3 Pharmacokinetics.....	110
3.4 RESULTS.....	111
3.4.1 Analytical Assay.....	111
3.4.2 Pharmacokinetics.....	112
3.4.3 Pharmacodynamics.....	112
3.5 DISCUSSION AND CONCLUSIONS.....	113
3.6 REFERENCE LIST	115
3.7 FIGURE LEGEND	117
TABLES.....	119
FIGURES.....	121
ARTICLE 4 :	125
GUÉNETTE, S.A., A. ROSS, J.-F. MARIER, F. BEAUDRY ET P. VACHON. 2007. PHARMACOKINETICS OF EUGENOL AND ITS EFFECTS ON THERMAL HYPERSENSITIVITY IN RATS. EUROPEAN JOURNAL OF PHARMACOLOGY. 562: PP. 60-67.	125
4.1 ABSTRACT	125
4.2 INTRODUCTION	127
4.3 MATERIALS AND METHODS.....	129
4.3.1 Animals.....	129
4.3.2 Pharmacokinetic Study	129
4.3.3 Analytical Assay.....	130
4.3.4 Pharmacodynamic Study	132
4.3.5 Pharmacokinetic and Pharmacodynamic Parameters	133
4.4 RESULTS.....	135
4.4.1 Quantitative Analysis	135
4.4.2 Pharmacokinetic Results.....	135
4.4.3 Pharmacodynamic Results.....	136
4.5 DISCUSSION AND CONCLUSIONS.....	137
4.6 REFERENCE LIST	140
4.7 FIGURE LEGEND	145
TABLES.....	146
FIGURES.....	149
CHAPITRE 3: DISCUSSION ET CONCLUSIONS GÉNÉRALES	153

1. DIFFÉRENCIATION ENTRE ANESTHÉSIE ET ANALGÉSIE	154
2. JUSTIFICATION DU MODÈLE DE DOULEUR NEUROPATHIQUE UTILISÉ DANS LE CADRE DE CETTE RECHERCHE.....	154
3. COMPARAISON ENTRE LE PROPOFOL, UNE AUTRE MOLÉCULE PHÉNOLIQUE ET L'EUGÉNOL.....	155
3.1 PROPRIÉTÉS CHIMIQUES.....	155
3.2 PROPRIÉTÉS PHARMACOLOGIQUES	156
3.3 PROPRIÉTÉS PHYSIOLOGIQUES (RÉCEPTEURS).....	157
4. DISCUSSION GÉNÉRALE DES RÉSULTATS.....	159
5. CONCLUSION GÉNÉRALE	165
6. CRITIQUE D'ARTICLE CONCERNANT LE TRAITEMENT DE DOULEURS ASSOCIÉES À UN OSTÉOSARCOME ET L'UTILISATION DE L'EUGÉNOL POUR LE TRAITEMENT DE LA DOULEUR DE CETTE PATHOLOGIE.	167
6.1 LES CONCEPTS GÉNÉRAUX ET LA MISE EN CONTEXTE	167
6.1.1 Le cancer osseux et la douleur	167
6.1.2 Modèle animal pour l'étude du cancer osseux et les souris transgéniques	167
6.1.3 L'innervation de l'os et les neurones afférents primaires	168
6.1.4 Les canaux, les récepteurs et les substances associées	169
6.1.5 Modulation phénotypique et réorganisation neurochimique du système nerveux central et périphérique.....	170
6.1.6 Le rôle de l'acidose	171
6.1.7 Les avenues de traitements	171
6.2 DESCRIPTION DES MATÉRIELS, MÉTHODES, RÉSULTATS ET CONCLUSIONS.....	172
6.2.1 Résumé des matériels et méthodes	172
6.2.2 Résumé des résultats.....	173
6.2.3 Résumé des conclusions.....	174
6.3 POINTS FORTS	174
6.4 POINTS À AMÉLIORER.....	175
6.5 LES RÉCEPTEURS TRPV1, UN AVENIR PROMETTEUR.....	177
6.6 HYPOTHÈSES :.....	179
6.7 OBJECTIF :	179
6.8 BIBLIOGRAPHIE	180
6.9 FIGURES	186
BIBLIOGRAPHIE.....	192
ANNEXE I ARTICLE COMME DEUXIÈME AUTEUR CONCERNANT LA TECHNIQUE DE DÉRIVATISATION DU PROPOFOL.....	XXXV
ABSTRACT.....	xxxvi
1. INTRODUCTION	xxxvii
2. EXPERIMENTAL.....	xxxviii
2.1. Reagents.....	xxxviii
2.2. Instrumentation	xxxix
2.3. Sample Preparation.....	xxxix
2.4. Chromatographic Conditions	xxxix
2.5. Mass Spectrometry Conditions.....	xl
2.6. In Vivo Study design.....	xl
3. RESULTS AND DISCUSSION	xlII
3.1. Sample preparation and extraction.....	xlii
3.2. Tandem mass spectrometry	xliii

3.3. Sensitivity and Selectivity.....	xliii
3.4. Calibration curve analysis.....	xliv
3.5. Precision and accuracy.....	xliv
3.6. Stability.....	xlv
3.7. In vivo study.....	xlv
4. CONCLUSION.....	XLVI
REFERENCES.....	XLVIII
FIGURES.....	L
TABLES.....	LV
ANNEXE II ARTICLE COMME DEUXIÈME AUTEUR CONCERNANT LA TECHNIQUE DE DÉRIVATISATION DE L'EUGÉNOL.....	LVIII
ABSTRACT.....	LIX
1. INTRODUCTION.....	LX
2. EXPERIMENTAL.....	LXII
2.1 Reagents.....	lxii
2.3 Instrumentation.....	lxii
2.4 Sample Preparation.....	lxii
2.5 Chromatographic Conditions.....	lxiii
2.6 Mass Spectrometry Conditions.....	lxiii
3. RESULTS AND DISCUSSION.....	LXIII
3.1 Sample preparation and extraction.....	lxiii
3.2 Tandem mass spectrometry.....	lxiv
3.3 Sensitivity and Selectivity.....	lxv
3.4 Calibration curve analysis.....	lxv
3.5 Precision and accuracy.....	lxv
3.6 Stability.....	lxvi
4. CONCLUSION.....	LXVII
REFERENCES.....	LXVIII
FIGURES.....	LXXI
TABLES.....	LXXV
ANNEXE III <i>CURRICULUM VITAE</i>	LXXVI

Liste des tableaux

Chapitre 1

Tableau 1: Structure moléculaire des différents agonistes et antagonistes des récepteurs TRPV1. p.50.

Chapitre 2

Article 1

Table 1: Comparison for the loss and return of different reflexes or behaviors using the mean time, standard variation and number of *Xenopus laevis* affected, subjected to an immersion bath of eugenol at 350mg/L. p.88.

Article 3

Table 1: Mean (CV%) pharmacokinetic parameters of eugenol in plasma and blood following a single intravenous dose of 20 mg/kg in male Sprague-Dawley rats (n = 6). P.119.

Table 2: Partition coefficient (Kp) of eugenol in blood following a single intravenous dose (20 mg/kg) in male Sprague-Dawley rats. p.120.

Article 4

Table 1: Summary of study design and procedures used in the experimental model of neuropathic pain in male Sprague Dawley rats. p.146.

Table 2: Mean (CV%) pharmacokinetic parameters of eugenol in plasma (n = 6) and blood (n = 6) following oral administration of eugenol (40 mg/kg) in male Sprague Dawley rats. p.147.

Table 3: Partition coefficient (Kp) of eugenol in blood following a single gavage administration of eugenol (40 mg/kg). p.148.

Annexe I

Table 1: Summary of inter-batch precision and accuracy data for propofol in plasma. p.liv.

Table 2: Mean \pm SD pharmacokinetic parameters of propofol in plasma and blood following a single intravenous dose (10 mg/kg) of a commercially available emulsion formulation in male Fisher rats. p.lv.

Table 3: Mean \pm SD partition coefficient (Kp) of propofol in blood following a single intravenous dose (10 mg/kg) of a commercially available emulsion formulation in male Fisher rats. p.lvi.

Annexe II

Table 1: Summary of inter-batch precision and accuracy data for eugenol in plasma. p.lxxiv.

Liste des figures

Chapitre 1

Figure 1: Photos de grenouilles *Xenopus laevis* (femelle à gauche et mâle à droite). p.4.

Figure 2: Diagramme des voies de transmission de la douleur chez la grenouille. Il est possible de constater les similitudes avec les voies sensorielles des mammifères au niveau périphérique et spinal. Peu d'information est présentement disponible chez cette espèce en ce qui concerne les relais supra-spinaux et les voies descendantes. p.7.

Figure 3: Section de la branche maxillaire du nerf trijumeau chez une truite Arc-en-ciel (*Oncorhynchus mykiss*) démontrant la présence de fibres A-alpha, A-beta, A-delta, C et de cellules de Schwann (X 1000, échelle = 2 µm). p. 10.

Figure 4: Schéma des voies de perception de la douleur. En provenance de la périphérie, le neurone primaire constitué de fibres A-delta et C fera contact avec le neurone secondaire (spécifique ou non spécifique). Ces fibres dites secondaires croisent dans la moelle épinière pour se diriger vers les différents noyaux du thalamus. La voie spinothalamique projette ses fibres nerveuses vers les noyaux latéraux du thalamus et la voie spinoréticulaire projette ses fibres vers certaines structures du tronc cérébral ou vers les noyaux médians du thalamus. Finalement, les neurones des noyaux latéraux continuent leur chemin vers les centres corticaux sensori-discriminatifs du cortex somatosensoriel et les neurones en provenance des noyaux médians projettent vers les centres corticaux motivo-affectifs du système limbique. NS : neurones nociceptifs spécifiques, WDR (*Wide Dynamic Range*): neurones ayant un spectre dynamique étendu. p.13.

Figure 5: Illustration des principales voies spino-médullo-thalamiques de la douleur chez le rat. En noir : les voies qui ont leur origine dans la lamina I de la moelle épinière et les noyaux du système nerveux central irrigués par ces dernières. En gris : les voies en provenance des laminae profondes de la moelle épinière et leurs projections vers les noyaux médullo-thalamiques. Abréviations : Po, CL, PC, CM, VPM, VL, VPL, ic, VM, mt, Ce, DM, VMH, opt, Me, CPu, BL, La, APT, ar, MG, PoT, Eth, PIL, SPF, ml, Pbil, PBl, LC, PBm, bc, Cu, Gr, SRD, LRt, IO, pyx, I, II, III, IV, V, VI et VII (voir liste des abréviations en début de thèse). p.16.

Figure 6: Illustration simplifiée des différentes projections à partir de la lamina I vers les zones émotionnelles du cerveau et les projections à partir de la lamina V vers le thalamus et le cortex qui sont à l'origine de la partie affective et

sensorielle de la douleur. Représentation des phénomènes de «*Wind-up*» et de potentialisation à long terme (*Long term potentiation*, LTP) qui potentialise l'information en provenance de la lamina V. Lors de l'apparition d'une douleur neuropathique (NP), on observe une augmentation de la facilitation descendante qui origine de la lamina I, qui fait relai dans la substance grise périacqueductale (PAG) et au niveau de la médulla rostroventrale (RVM) pour stimuler la relâche de sérotonine (5HT₃). Cette stimulation augmente l'activité ascendante en provenance de la corne dorsale. Cette illustration démontre une théorie de l'influence de l'état émotionnel sur la perception douloureuse. p. 18.

Figure 7: Mécanismes de l'hyperalgésie primaire par la sensibilisation des nocicepteurs par des substances proalgiques libérées suite à une lésion périphérique. Ces substances favorisent le passage d'une information nociceptive au niveau de la corne dorsale de la moelle épinière où la première synapse aura lieu. Abréviations : CGRP et ATP (voir la liste des abréviations en début de thèse). p.26.

Figure 8a: Mécanismes de l'hyperalgésie secondaire par une sensibilisation des neurones nociceptifs au niveau de la corne dorsale de la moelle épinière. Une activation soutenue des fibres nociceptives C stimulera la relâche de peptides comme la substance P et le CGRP ainsi que du glutamate. L'activation des récepteurs NK1 et NMDA induira des changements d'expression cellulaire dont l'activation de gènes à expression rapide. Ces modifications des terminaisons nerveuses modifieront la sensibilité du neurone secondaire en abaissant le seuil de dépolarisation suite à une stimulation douloureuse (hyperalgésie) ou non douloureuse (allodynie). p.28.

Figure 8b: Mécanisme cellulaire du wind-up présent au niveau des neurones de la corne dorsale. Abréviations : BDNF, G, Glu, IP3, mGluR, NK1, P, PKC, SP et trk B (voir liste des abréviations en début de thèse). p.29.

Figure 9: Illustration de l'induction de la phase précoce de la potentialisation à long terme. **Image du haut :** Suite à une stimulation de basse fréquence le glutamate est relâché et active les récepteurs NMDA et non-NMDA. Les récepteurs non-NMDA (AMPA) favorisent la conductance aux Na⁺ et K⁺. Les récepteurs NMDA par contre ne réagiront pas, dû au magnésium qui bloque l'ouverture du canal. **Image du bas :** Lors d'une stimulation de haute fréquence le magnésium est délogé et permet le fonctionnement des récepteurs NMDA. Ce délogement permet le mouvement de calcium par les récepteurs NMDA et donc une augmentation importante de la concentration intra cellulaire de calcium. Par la suite l'activation des kinases dépendantes du calcium et de la tyrosine kinase Fyn permettront l'établissement de la potentialisation à long terme (LTP). La calmoduline kinase calcique phosphoryle les récepteurs

AMPA et active des récepteurs silencieux. Une fois la LTP établie, les cellules post-synaptiques relâchent des messagers rétrogrades qui vont stimuler la membrane pré-synaptique afin de relâcher encore plus de glutamate ce qui contribue aussi à la LTP. p.30.

Figure 10: Illustration de la phase précoce et de la phase retardée de la potentialisation à long terme. L'établissement initial de la LTP grâce à l'activation des récepteurs NMDA et des messagers rétrogrades constitue la phase précoce. Par la suite le mouvement constant de calcium dans la membrane post-synaptique stimule l'adénylyl cyclase qui elle activera l'AMP cyclique kinase qui se trans-localisera au niveau du noyau où la transcription des protéines de la douleur débutera. p.34.

Figure 11: Schémas de quelques approches chirurgicales afin d'induire de la douleur neuropathique chez le rat. **En A :** Modèle de Bennett et Xie. Ligature lâche du nerf sciatique. **En B :** Modèle de Seltzer. Ligature partielle du nerf sciatique. **En C :** Modèle de Kim et Chung. Section et ligature des nerfs spinaux L5 et L6 près du ganglion de la racine dorsale. **En D :** Modèle de Decosterd et Woolf. Ligature et section du nerf tibial et de nerf péronier commun. p. 36.

Figure 12: Image de la procédure chirurgicale d'installation des nœuds sur le nerf sciatique chez un mâle Sprague Dawley. **Image du haut :** L'animal est sous anesthésie à l'isoflurane. **Image du milieu :** On peut noter la présence des 2 nœuds avec un fil de Cat-gut chromique 4-0 sur le nerf sciatique. **Image du bas :** Noter la présence de la gaine sur le nerf sciatique comme utilisé lors de nos expérimentations. p.37.

Figure 13: Évaluation comportementale des rats neuropathiques. **Image du haut :** Test de la nociception thermique au niveau de la face plantaire des membres postérieurs chez le rat mâle Sprague Dawley en utilisant l'unité lumineuse de Heargreaves. **Image du bas :** Image des fils de von Frey utilisé pour réaliser les tests de la sensibilité mécanique. p. 39.

Figure 14 : Image de la plante source de l'huile de clou de girofle (*Eugenia aromatica* ou *Syzygium aromaticum*). p. 41.

Figure 15 : Formule moléculaire de l'eugénol. p. 42.

Figure 16: Images présentant les graines du poivre rouge, *Capsicum frutescens*. p. 44.

Figure 17: Illustration représentant les terminaisons nerveuses périphériques sensibles aux vanilloïdes en prenant pour exemple l'inflammation neurogénique et les réactions d'hypersensibilité. Des stimulations exogènes et endogènes

peuvent induire les récepteurs vanilloïdes et ainsi ils libèrent certains neuropeptides proinflammatoires. Certaines de ces molécules ont leurs récepteurs propres, comme la bradykinine mais d'autres agissent par leurs interactions avec les récepteurs vanilloïdes. Les protons, la substance P, le CGRP et bien d'autres agissent sur les récepteurs vanilloïdes en influençant divers mécanismes de l'inflammation. p. 48.

Figure 18: Identification à l'aide de la résinifératoxine [^3H]RTX et visualisation grâce à l'autoradiographie des sites de liaison sur les neurones ayant des récepteurs vanilloïdes chez le rat. A noter la radio-opacité des récepteurs au niveau de la racine dorsale (figure b, échantillons du haut), le nerf trijumeau (figure b, échantillons du bas) et les ganglions nodose (ganglion inférieur caudal du 10^{ième} nerf cranien (vague) (figure c) contenant les corps cellulaires des neurones sensibles aux vanilloïdes. Les fibres du SNC au niveau des ganglions de la racine dorsale, du ganglion du nerf trijumeau et ganglion nodose se terminent au niveau de la corne dorsale de la moelle épinière (Figure a, petite tête de flèche), le noyau du nerf trijumeau de la medulla oblongata (Figure a, grosse tête de flèche) et la zone postrema/noyau de la voie solitaire (Figure a, tête de flèche vide). Les figures c et d représentent les axones périphériques du ganglion nodose et des ganglions de la racine dorsale traversant respectivement dans les nerfs sciatique et vague. p. 51.

Figure 19: Autoradiographies de coupes transversales de la moelle épinière à l'aide de la résinifératoxine [^3H]RTX chez le porc (Figure A et têtes de flèche) et chez l'humain (Figure B et têtes de flèche). A noter la présence de récepteurs au niveau de la corne dorsale de la moelle épinière. La figure C représente la spécificité de la liaison de la [^3H]RTX par l'absence totale de radioactivité suite au traitement de la tranche avec de la résinifératoxine non radioactive. p.52.

Figure 20: Structure moléculaire de l'eugénol. p. 58.

Figure 21 : Réaction de l'eugénol avec le chlorure de dansyl. p.61.

Figure 22: Représentation des trois étapes successives par lesquelles un échantillon doit passer pour être analysé en spectrométrie de masse. p. 62.

Figure 23a: Représentation des différentes phases suite à l'injection d'un échantillon dans une colonne de chromatographie liquide à haute performance (HPLC). Les formes géométriques représentent les différentes composantes présentes dans l'échantillon lors de l'injection. Ces molécules interagissent avec la phase solide de différentes façons, c'est l'interaction primaire. Ces interactions induisent des temps de rétention variable selon les différentes molécules, c'est l'élution. p.63.

Figure 23b: Suite à l'injection d'un échantillon dans le HPLC, il y aura séparation des molécules par différentes interactions avec la phase solide et la phase liquide présentes dans la colonne choisie. T_r ; temps de rétention, T_r' : temps relatif et T_0 : Temps au point zéro. p.64.

Figure 24a: Schéma représentant les différentes étapes menant à l'isolation ionique d'une molécule. Suite à l'injection de l'échantillon, il est soumis à une charge importante qui forcera la formation d'une gouttelette. L'évaporation réduira par la suite les dimensions de cette dernière jusqu'à ce qu'une explosion coulombique se produise. Cette explosion permettra l'isolation ionique de la molécule. p.65.

Figure 24b: Représentation d'un électrospray typique avec l'orientation des ions vers la plaque du spectromètre de masse (MS). p.66.

Figure 25 : Représentation des différentes sections constituant le spectromètre. Q0 : chambre 0, Q1 : chambre 2, Ar : argon, Q3 : chambre 3. p.66.

Figure 26 : Représentation d'une des sections du spectromètre où quatre tiges métalliques chargées induisent une oscillation ionique. **En bleu** nous retrouvons le parcours d'un ion présentant une oscillation atypique et qui sera donc éliminé. **En rouge**, l'ion dessine un parcours typique et sera donc sélectionné pour passer à la chambre suivante. p.67.

Figure 27: Quantification des molécules analysées. Un ion présentant une oscillation typique sera amené à frapper la plaque de Faraday et ainsi émettre des électrons. Ces électrons viendront par la suite en contact avec le multiplicateur d'électrons. Selon la quantité d'électron transmis, un courant sera créé. Ce courant sera par la suite caractérisé dans le but de produire un signal numérique interprétable. p.69.

Figure 28: Exemple de graphique d'analyse en spectrométrie de masse représentant l'isolation de l'eugénol (148 M/Z) et son principal fragment (163 M/Z). p.70.

Chapitre 2

Article 1

Figure 1. Lowest acetic acid concentration (%) inducing the wiping response to increasing concentrations of acetic acid following immersion in a eugenol solution (350mg/L) in *Xenopus laevis* frogs. The -15 min and 0 time points represent respectively control values prior to eugenol bath immersion and GAA concentrations inducing WRES responses immediately following the 15 min eugenol bath exposure. p.89.

Figure 2. Percentage of *Xenopus laevis* frogs presenting a righting behavior (clear histograms) and withdrawal reflex (dark histograms) following immersion in eugenol solution 350mg/L. The -15 min and 0 time points represent respectively control values prior to eugenol bath immersion and percentage of animals with RB and WR immediately following the 15 min eugenol bath exposure. p.90.

Figure 3. Mean (\pm SD) heart rate following immersion of *Xenopus laevis* frogs (n = 6) in a solution of eugenol (350mg/L). The -15 min and 0 time points represent respectively control values prior to eugenol bath immersion and heart rates immediately following the 15 min eugenol bath exposure. p.91.

Figure 4. Mean (\pm SD) respiratory frequency following immersion of *Xenopus laevis* frogs (n = 6) in a solution of eugenol (350mg/L). The -15 min and 0 time points represent respectively control values prior to eugenol bath immersion and respiratory frequency immediately following the 15 min eugenol bath exposure. p.92.

Figure 5. Semi-logarithmic presentation of the mean (\pm SD) of eugenol concentrations in blood at selected time points. *Xenopus laevis* frogs (n=3/time point) were immersed for 15 min in a 350 mg/L eugenol solution (total volume = 250mL). p.93.

Article 2

Figure 1. Semi-logarithmic and linear scale (top and bottom panels respectively) presentation of the means (\pm SD) of eugenol concentrations in blood at selected time points. Rainbow trouts (*Oncorhynchus mykiss*) (n = 6 per time point) were immersed for 15 min in a 75mg/L eugenol solution (total volume = 250mL). p.104.

Article 3

Figure 1. Product ion spectrum of eugenol in negative mode. p.121.

Figure 2. Identification of major metabolite excreted in rat urine. A: Full scan total ion chromatogram (M/Z 150 – 500). B: Product ion Scan of M/Z 243. C: Product ion scan of M/Z 339. p.122.

Figure 3. Semi-logarithmic and linear presentations of the mean (\pm SEM) eugenol concentrations in blood and plasma following serial jugular collections at selected time points. Male Sprague-Dawley rats (n=6) received a single iv dose of 20 mg/kg of eugenol diluted in a cremophor, saline and alcohol vehicle. p.123.

Figure 4. Mean (\pm SEM) return of the withdrawal reflex following increasing iv (0-60 mg/kg) dose levels of eugenol in male Sprague-Dawley rats. p.124.

Article 4

Figure 1. Mean (\pm S.E.M.) concentrations of eugenol in blood (full circles) (n = 6) and plasma (empty circles) (n = 6) following a single oral administration (40 mg/kg) in male Sprague-Dawley rats on semi-log and linear scale (top and bottom panels respectively). p.149.

Figure 2. Mean (\pm S.E.M.) thermal sensitivity (Hargreave's test) results during the behavioural period (Day 1-5) and the experimental phase of neuropathic pain (Day 8-12) in male Sprague Dawley rats prior to eugenol (n = 6) and saline treatments (n = 6). p.150.

Figure 3. Mean (\pm S.E.M.) thermal sensitivity results (Hargreave's test on cuff-implanted right hind paw) following repeated oral administrations of eugenol (40 mg/kg) (full circles) and saline (empty circles) in male Sprague Dawley rats (n = 6 per group). Day 0 corresponds to mean baseline values. On Day 5, $p < 0.01$. p.151.

Figure 4. Mean (\pm S.E.M.) mechanical sensitivity results (von Frey filaments test on cuff-implanted right hind paw) following repeated oral administrations of eugenol (40 mg/kg) (full circles) and saline (empty circles) in male Sprague Dawley rats (n = 6 per group). Day 0 corresponds to mean baseline values. p.152.

Chapitre 3

Figure 1 : Formule moléculaire du propofol. p. 156.

Critique d'article

Figure 1: A: Image radiographique du bassin et des membres postérieurs où l'on voit le fémur implanté avec les cellules ostéolytiques de sarcome et où l'on discerne l'amalgame de fermeture. B : Évolution radiographique du sarcome au temps 0, après 1, 2 et 3 semaines post-ensemencement. À noter les lésions d'ostéolyse et d'ostéoprolifération qui s'étendent jusqu'à la tête fémorale. p.186.

Figure 2: Image confocale en A et histophotomicrographie en B de la moelle osseuse d'un os normal. A : Coloration des fibres myélinisées en rouge (NF200) et en vert, les fibres non myélinisées (CGRP) qui en B sont concentrées le long des vaisseaux sanguins. C : Image graphique des structures innervées de l'os. p.187.

Figure 3: Représentation des substances relâchées par les cellules inflammatoires, par les ostéoclastes et par les cellules tumorales qui contribuent à la sensibilisation des fibres afférentes primaires. Cette information nociceptive voyage par les fibres afférentes et entre dans la moelle épinière par la corne dorsale et stimule la relâche de substances pro-algésiques comme la substance P et le glutamate. IL : interleukine, PG : prostaglandines, TNF- α : facteur de nécrose tumorale alpha, ET : Endotheline, + : protons extracellulaires. p.188.

Figure 4: Image cofocale d'une section de moelle épinière. A : Coloration des astrocytes en vert (GFAP : protéine gliale fibrillaire acide) à noter l'augmentation des astrocytes du côté ipsilatéral à la lésion. B : Grossissement de la zone encadrée où il est possible de voir l'hypertrophie astrocytaire (vert) sans changement du nombre de neurones en rouge (NeuN : Marqueur neuronale). C : Image confocale du ganglion de la racine dorsale du côté ipsilatéral en mauve qui indique la présence d'une lésion du nerf (ATF-3 : facteur d'activation de transcription 3). D : Image confocale des cellules de Schwann non myélinisées en vert (GFAP) et de l'infiltration par les macrophages en jaune (CD68). p.189.

Figure 5: Image confocale des nerfs sensitifs de l'os qui présentent des canaux TRPV1 dans un os normal et suite à l'invasion osseuse du néoplasme. A : Image normale où l'on peut voir l'association des fibres nerveuses qui démontrent des canaux TRPV1 associés aux vaisseaux sanguins. NM : moelle normale. B : Image où les cellules cancéreuses ont commencé à envahir la moelle osseuse (T : tumeur) et où les TRPV1 restent associés aux vaisseaux sanguins mais présentent une ramification moindre. C : Image où les cellules tumorales ont envahi plus amplement la moelle osseuse et où les canaux TRPV1 sont encore visibles mais plus fragmentés. p.190.

Figure 6: Image des fibres nerveuses dans le ganglion de la racine dorsale L2 contra et ipsilatérales à une lésion tumorale 14 jours après l'inoculation de l'os. A et B : En rouge, les fibres contra et ipsilatérales à la lésion qui expriment le récepteur TRPV1. C et D : En bleu, les nerfs affectés par la tumeur (colorés avec ATF-3) contra et ipsilatéraux à la lésion. E et F : Superposition des récepteurs TRPV1 et des nerfs affectés par la lésion démontre une concentration importante de ces récepteurs sur ces fibres nerveuses lésées. p.191.

Annexe I

Figure 1: Reaction scheme of propofol with dansyl chloride.p.l.

Figure 2: Product ion spectrum of the propofol-dansyl chloride derivative.p.li.

Figure 3A: Representative extracted LLOQ (20 ng/mL) chromatogram of propofol in rat plasma. p.lii.

Figure 3B: Representative chromatogram of an extracted control (blank) rat plasma.p.liii.

Figure 4: Mean propofol concentrations (ng/mL) in plasma, blood and RBC following a single intravenous dose (10 mg/kg) of a commercially available emulsion formulation of propofol in male Fisher rats (Linear (top) and semi-log scale (bottom)). P.liv.

Annexe II

Figure 1: Reaction scheme of eugenol with dansyl chloride. p.lxxi.

Figure 2: Product ion spectrum of the eugenol-dansyl chloride derivative.p.lxxii.

Figure 3: Representative extracted LOQ (100 ng/mL) chromatogram of eugenol in rat plasma. p.lxxiii.

Figure 4: Representative Calibration curve for eugenol in rat plasma. p.lxxiv.

Liste des abréviations

Unités de mesure :

°C : degré celsius

L : litre

mL : millilitre

μL : microlitre

cm : centimètre

cm² : centimètre carré

mm : millimètre

nM : nano molaire

mM : micro molaire

h : heure

min : minute

s : seconde

ms : milliseconde

kg : kilogramme

g : gramme

mg : milligramme

ng : nanogramme

pH : mesure de l'acidité d'une solution ($\text{pH} = -\log [\text{H}_3\text{O}^+]$)

V : volt

Da : Dalton

Statistique :

n : groupe test d'individus

SEM :

p : niveau significatif

CV : Coefficient de variabilité ($CV = \frac{\bar{x}}{\sigma_x}$)

Pharmacocinétique :

AUC_{0-inf} : aire sous la courbe du point zéro à l'infini

AUC_{0-t} : aire sous la courbe du point zéro au point t

CONC : concentration

CONC_{plasma} : concentration plasmatique

CONC_{RBC} : concentration dans les globules rouges

CL/F : clairance relative

C_{max} : concentration maximale

C_{last} : dernier point qui comporte une valeur sur une courbe d'élimination

C₀ : concentration prévue au temps 0

Kel : constante d'élimination

Kp : coefficient de partition

MRT : temps moyen de résidence
 $T_{1/2}$: temps de demi-vie
 V_{plasma} : volume plasmatique
 V_{blood} : volume sanguin
 V_{RBC} : volume de globules rouges
 V_{ss} : volume de distribution

Neuropathie :

A δ : fibre A delta
A β : fibre A beta
ADN : acide désoxyribonucléique
AMPA : acide α -amino-3-hydroxy-5-méthyl-4-isoxazole propionique (*α -amino-3-hydroxy-5-méthyl-4-isoxazole proprionic acid*)
AMP : adénosine monophosphate
ATP : adénosine triphosphate
BDNF : facteur neurotrophique dérivé du cerveau
CGRP : peptide reliée au gène de la calcitonine (*calcitonin-gene-related-protein*)
FAAH: enzyme acide gras amidohydrolase (*fatty acid amidohydrolase*)
FDA: *food and drug administration*
G : protéine G
GABA: acide gama-aminobutyrique
Glu : glutamate
 ^3H : tritium (radioactif)
5HT $_3$: récepteur sérotoninergique de type 3
IP3 : inositol triphosphate
mGluR : récepteur glutamatergique métabotrope
NK1: neurokinine type 1
P: phosphorylation
PGE $_2$: prostaglandine E $_2$
PKC: protéine kinase C
RTX-[^3H] : résinifératoxine tritié
RV : récepteurs vanilloïdes
Sub P: substance P
SP: substance P
SNC: système nerveux central
SRD: subreticularis dorsalis nucleus
SGPA: substance grise péri-aqueducule
TNF: facteur nécrosant des tumeurs (tumor necrosis factor)
TRPV1: récepteur vanilloïde de type 1 (*transient receptor potential vanilloid receptor subtype 1*)
TRPV4: récepteur vanilloïde de type 4 (*transient receptor potential vanilloid receptor subtype 4*)
trk B: récepteurs à la tyrosine kinase B

Neurophysiologie :

APT : noyau antérieur prétectal
 ar : radiation acoustique
 bc : *brachium conjunctivum*
 BL : noyau basolatéral amygdaloïde
 Ce : noyau central amygdaloïde
 CL : noyau centro-latéral du thalamus
 CPu : putamen caudale
 CM : noyau centro-médial du thalamus
 Cu : noyau cunéiforme
 DM : noyau dorso-médial de l'hypothalamus
 Eth : noyau de l'ethmoïde du thalamus
 Gr : noyau gracile
 ic : capsule interne
 IO: olive inférieure
 La : noyau latéral de l'amygdaloïde
 LC : locus ceruleus
 LRt: noyau réticulé latéral
 Me: noyau médial de l'amygdale
 MG: noyau genouillé latéral
 ml: lemnisque latéral
 mt: voie mammillothalamique
 Opt: voie optique
 Pbil : noyau interne parabrachial latéral
 PBl : noyau parabrachial latéral
 PBm: noyau parabrachial médial
 PC: noyau thalamique paracentral
 PIL: noyau intralaminaire postérieur du thalamus
 Po: groupe thalamique postérieur
 PoT: partie triangulaire du groupe thalamique postérieur
 pyx: décussation pyramidale
 RVM : médulla rostroventrale
 VL: noyau ventrolatéral du thalamus
 VM : noyau ventromédial du thalamus
 VMH: noyau ventromédial de l'hypothalamus
 VPL: noyau postérolatéral du thalamus
 VPM: noyau postéromédial du thalamus
 SRD : région subreticularis dorsalis
 I, II, III, IV, V, VI, VII : laminae de la moelle épinière

Spectrométrie :

Ar : argon
 CID : Dissociation induite par la collision (*Collision Induced Dissociation*)
 H⁺: ion hydrogène (proton)

LC/MS/MS: Chromatographie liquide en tandem / Spectrométrie de masse en tandem (*Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry*)

LC-ESI/MS/MS : Chromatographie liquide en tandem en électrospray/ Spectrométrie de masse en tandem (*Liquid Chromatography Electrospray Tandem Mass Spectrometry*)

LOQ: Limite de quantification

MS/MS : Spectrométrie de masse en tandem (*Tandem Mass Spectrometry*)

Q0 : chambre 0

Q2 : chambre 2

Q3 : chambre 3

Tr : temps de rétention

T'r: temps relatif

T0: temps au point zéro.

HPLC : Chromatographie liquide haute performance (*High Performance Liquid Chromatography*)

[M+H]⁺ : ion moléculaire protoné

m/z : masse divisée par la charge

NaOH : hydroxide de sodium

Autres :

IV ou iv : intraveineux

Per os : administré par gavage (par la bouche)

im : intramusculaire

MS-222 : tricaine méthanesulfonate

RBC : globules rouges

À mon grand amour, David.

«Il faut faire sentir la nécessité de l'expérience, de l'observation, c'est-à-dire la nécessité pour nous de sortir de nous-mêmes, pour nous mettre à l'école des choses, si nous voulons les connaître et les comprendre.»

E. Durkheim

«Rien de grand ne s'est accompli dans le monde sans passion.»

G. Hegel

Remerciements

Pour réaliser un *projet*, la motivation, l'énergie et la vision sont souvent nécessaires. Pour réaliser un *grand projet*, une équipe sera la prémisse de base à son plein accomplissement. Sans une équipe, je suis un individu, mais avec une équipe je suis un amalgame de compétences inaccessibles à un individu seul : c'est la synergie des forces individuelles. Au laboratoire du Docteur Vachon, à la Faculté de médecine vétérinaire Université de Montréal, nous étions une équipe et nous avons connu cette force et vécu des moments extraordinaires. Quand je parle de notre équipe, il m'apparaît important d'en présenter chacun des collaborateurs.

Au docteur Pascal Vachon, vétérinaire en charge de la section des animaux de laboratoire de la Faculté de médecine vétérinaire, certifié du collègue américain en médecine des animaux de laboratoire (ACLAM), neurophysiologiste, neuroanatomiste, kinésologue, chercheur assoiffé de connaissances, enseignant passionné et passionnant et...cycliste casse-cou! Merci Pascal pour ton temps, pour avoir cru en moi, en mes idées parfois saugrenues et...en mes grenouilles. Merci de m'avoir soutenue, motivée et accompagnée tout au long de ce périple que furent la maîtrise et le doctorat. Mais avant tout, merci d'avoir été pour moi et pour beaucoup d'étudiants une source de motivation et un exemple pour une nouvelle génération de vétérinaires passionnés pour le savoir, pour la découverte et pour la médecine de qualité tant pour les humains que pour les animaux! Merci.

Au docteur François Beaudry, chimiste adoré de notre équipe, collaborateur inégalé de techniques de dérivation et autres techniques d'isolement chimique, visionnaire, libre-penseur et utilisateur chevronné de Macintosh! Merci François de ton temps à m'expliquer la chimie, les phénols et tous les autres concepts de chimie que je n'aurais jamais pu intégrer seule. Merci.

A la future docteure, Andréanne Ross, étudiante de 5^{ième} année en médecine vétérinaire, passionnée de neurologie, étudiante exemplaire et très bonne amie. Merci pour ton aide à la collecte de données, ton support pendant des mois et même des étés. Merci pour les dîners passés à se vider le cœur! Tu seras une super neurologue, Andréanne!

Merci également à mon copain, David Rodrigue, qui est devenu époux au cours de ces études doctorales! Merci d'avoir été et d'être toujours là pour moi! Merci de me supporter, de m'écouter et de me seconder dans mes visions. Merci de rêver, de continuer à rêver et d'être parfois plus fou que moi! Merci mon David.

Sans oublier mes parents, inébranlable soutien. Ma mère Marielle Picard et mon père Luc Guénette qui sont pour moi l'exemple ultime d'une équipe qui a mis toutes ses forces et son courage pour l'accomplissement d'un but ultime et commun, la réalisation de leurs enfants! J'espère être un jour, pour mes enfants, le phare que vous avez été pour moi. Merci de tout cœur!

Enfin, je pourrais dire que le Petit Prince avait sa rose et que moi j'ai eu une équipe en pharmacologie à la Faculté de médecine vétérinaire de l'Université de Montréal. Cette équipe saura sûrement se prolonger dans un autre temps, dans un autre espace par des collaborations futures qui seront toutes plus passionnantes les unes que les autres!

Avant-propos

L'utilisation de molécules anesthésiantes et analgésiques chez les animaux, et chez les hommes, restera toujours un sujet d'actualité. Les animaux, étant souvent utilisés pour étudier des substances qui seront plus tard administrées aux humains, servent un grand dessein. En effet, la recherche effectuée en anesthésie et en analgésie sur les animaux de laboratoire sert non seulement aux humains mais également aux animaux. La recherche sur l'anesthésie des amphibiens et des poissons, considérés depuis longtemps comme des espèces insensibles à la douleur, a révélé des conclusions tout autres. Les amphibiens et les poissons ressentent la douleur et méritent donc la même attention antalgique lors de procédures invasives. Alors, une question persiste : quel agent allons-nous utiliser et de quelle façon allons-nous pouvoir suivre l'anesthésie d'animaux tels que les amphibiens et les poissons? L'eugénol, une molécule phénolique aux propriétés analgésiques, et même anesthésiques lorsque administré en intraveineuse, démontre un potentiel pour ces espèces.

Introduction

Principal constituant de l'huile de clou de girofle, l'eugénol, agit comme un antagoniste réversible du récepteur TRPV1 (*Transient Receptor Potential Vanilloid subtype 1*), récepteur clé dans plusieurs processus douloureux, dont la douleur neuropathique. De plus en plus de gens souffrent d'une façon indescriptible de douleurs dites chroniques et présentement, même les plus fortes doses de morphinique ne réussissent pas toujours à contrôler ces maux. L'eugénol agit également sur les récepteurs gabaergiques et pourrait par cette action être responsable de ses propriétés anesthésiques.

Notre expérimentation s'est organisée en quatre étapes principales, chacune comportant ses questionnements propres. Les deux premières étapes ont consisté en l'exploration et l'élaboration d'une dose d'eugénol afin d'induire une anesthésie chirurgicale chez la grenouille africaine à griffes (*Xenopus leavis*) et chez la truite arc-en-ciel (*Oncorhynchus mykiss*), et également d'établir la pharmacocinétique de cette molécule chez ces deux espèces. Par la suite, la pharmacocinétique suite à une administration intraveineuse et l'effet anesthésique de l'eugénol furent explorés chez le rat dans le but de trouver la dose produisant une anesthésie chirurgicale et établir les paramètres pharmacocinétiques chez un mammifère. Finalement, la pharmacocinétique suite à une administration par gavage et l'action analgésique de l'eugénol furent étudiées chez le rat. Une étude de pharmacodynamie a été réalisée chez des rats ayant une lésion induite au nerf sciatique causant des douleurs de type neuropathique.

L'ensemble de l'expérimentation nous a donc permis de découvrir non seulement un anesthésique sécuritaire pour les amphibiens et les poissons mais aussi un analgésique pour les douleurs chroniques ayant comme mécanisme de sensibilisation une augmentation de récepteurs vanilloïdes.

CHAPITRE 1 : RECENSION DE LA LITTÉRATURE

1. Introduction

1.1 La recherche et les animaux de laboratoire

Depuis les dernières décennies, les connaissances ayant trait à l'importance et aux diverses applications de l'analgésie et de l'anesthésie ne cessent de croître. Dans le domaine médical, le contrôle pré-chirurgical et post-chirurgical de la douleur et les douleurs découlant de diverses pathologies restent toujours un sujet d'actualité. Avec cette nécessité pour la connaissance sur la nociception, plusieurs projets de recherche furent mis au point dans le but d'élucider le fonctionnement de diverses sphères de la nociception. Par leurs systèmes souvent plus simples à étudier et leur accessibilité, les animaux de laboratoire furent donc soumis à diverses procédures plus ou moins invasives. Ces études animales ont servi à répondre à certaines questions et à compléter en partie les connaissances concernant les anesthésiques et analgésiques tant pour la médecine humaine que pour la médecine vétérinaire.

Les amphibiens et les poissons marquent une étape évolutive vers des systèmes plus complexes comme ceux des mammifères et par le fait même ils peuvent agir en tant que témoins de systèmes simplifiés. Pour cette raison, ces espèces constituent des modèles animaux intéressants pour la recherche fondamentale. Par exemple, l'étude des mécanismes pathologiques et physiologiques de certaines maladies ou processus, telle que la douleur peuvent être étudiés grâce à ces animaux. D'une façon générale, le niveau de perception de la douleur est relié à la complexité du système nerveux central (SNC), à la diversité des réactions éthologiques et finalement à la capacité de conserver une mémoire de l'évènement (Stevens, 1992). Il est donc possible que chaque phylum possède une capacité différente de percevoir la douleur allant d'une perception diffuse à une perception fine dans l'ordre phylogénétique allant des poissons et des amphibiens, aux reptiles, oiseaux, et finalement mammifères (Stevens, 1992). Alors, considérant que les mécanismes de base de perception de la douleur sont relativement semblables entre les différentes espèces

animales, et que les amphibiens et les poissons présentent un système nerveux simplifié, ces deux groupes d'animaux présentent donc un intérêt scientifique particulier en ce qui concerne la recherche fondamentale et appliquée sur les mécanismes de la nociception.

Plusieurs espèces d'amphibiens sont actuellement utilisées en recherche, mais la grenouille africaine à griffes (*Xenopus laevis*) est la plus couramment utilisée en recherche (Figure 1).

Figure 1 : Photos de grenouilles *Xenopus laevis* (femelle à gauche et mâle à droite).



Source : Laboratoire du Dr Vachon, Faculté de Médecine Vétérinaire, Université de Montréal.

Cette grenouille fut à l'origine utilisée pour la détection de la gestation chez l'humain (O'Rourke *et al.*, 2002). La grenouille léopard (*Rana pipiens*), le ouaouaron (*Rana catesbiana*), le necture tacheté (*Necturus maculosus*) et la forme néoténique de la salamandre tigrée du Mexique (*Ambystoma mexicanum*)

sont également des espèces fréquemment retrouvées dans les protocoles de recherche impliquant des amphibiens (O'Rourke *et al.*, 2002). En plus des études d'impacts environnementaux concernant la biologie, l'écologie, l'éthologie et la conservation de ces espèces, les amphibiens ont aussi contribué à diverses études fondamentales. Ces études concernent plusieurs champs d'intérêts en passant par la biologie du développement et l'étude de la cellule (Gurdon, 1996), la toxicologie du développement (effets tératogènes de certaines substances sur le cycle de développement d'un embryon (Burkhart *et al.*, 1998)), la biologie moléculaire (injection d'ADN dans un oocyte de grenouille car ces dernières permettent l'expression du matériel génétique injecté) (Sive *et al.*, 2000). Ces espèces constituent aussi une source d'information unique en ce qui concerne le développement des cellules pluripotentes et la régénération des membres (Necture tachetée (*Necturus maculosus*) et la forme néoténique de la Salamandre tigrée du Mexique (*Ambystoma mexicanum*)) (Brockes, 1994 ; Brockes, 1997). Finalement, certaines protéines isolées des œufs, et même des embryons d'amphibiens ont récemment démontré un intérêt pour la recherche sur le cancer grâce à des effets anti-néoplasiques (Rybak *et al.*, 1996). Toutes ces études et procédures nécessitent souvent des interventions plus ou moins invasives et donc un contrôle efficace des douleurs induites. Considérant leur utilisation grandissante dans divers axes de recherche fondamentale, une connaissance approfondie de la physiologie, de l'anatomie et des processus nociceptifs propres aux amphibiens est donc essentielle afin d'optimiser leur utilisation.

Les poissons sont aussi une classe d'animaux de recherche en pleine expansion (Stoskopf, 2002). La principale espèce retrouvée en laboratoire est le poisson zèbre (*Brachydanio rerio*). Ce poisson présente plusieurs avantages pour la recherche. Considérant sa petite taille, il peut être gardé en colonie de plusieurs individus. Aussi, le poisson présente une grande fécondité et une fertilisation externe ce qui facilite son utilisation pour différents protocoles de

recherche (Kahn, 1994). À l'heure actuelle, le poisson zèbre est principalement utilisé dans le cadre d'études reliées à la biologie du développement (Driever *et al.*, 1996).

Quant aux rongeurs, utilisés dans le cadre de plusieurs modèles de recherche, il reste le groupe de choix considérant le court temps de gestation et leur longévité réduite (Kohn *et al.*, 2002). De par certaines ressemblances avec les systèmes physiologiques humains, les rats, principalement *Rattus norvegicus* et *Rattus rattus*, sont utilisés dans le cadre d'études toxicologiques, pharmaceutiques, tératologiques, neurologiques et nutritionnelles (Kohn *et al.*, 2002). Différentes manipulations chirurgicales et chimiques chez le rat en font un modèle très important dans les études sur les mécanismes et le traitement de la douleur.

La recherche sur l'anesthésie et celle sur l'analgésie d'espèces telles que les grenouilles, les poissons et les petits mammifères restent des domaines à explorer. Les études réalisées dans les dernières années et l'avancée importante sur des sujets tels que l'emplacement anatomique de différents récepteurs à la douleur dans le système nerveux des rats (Willis *et al.*, 2004) ne sont que quelques exemples. Ces connaissances appliquées serviront non seulement à la médecine vétérinaire mais aussi à la médecine humaine en approfondissant la compréhension des causes et des effets de certaines interventions douloureuses et des maladies occasionnant des douleurs.

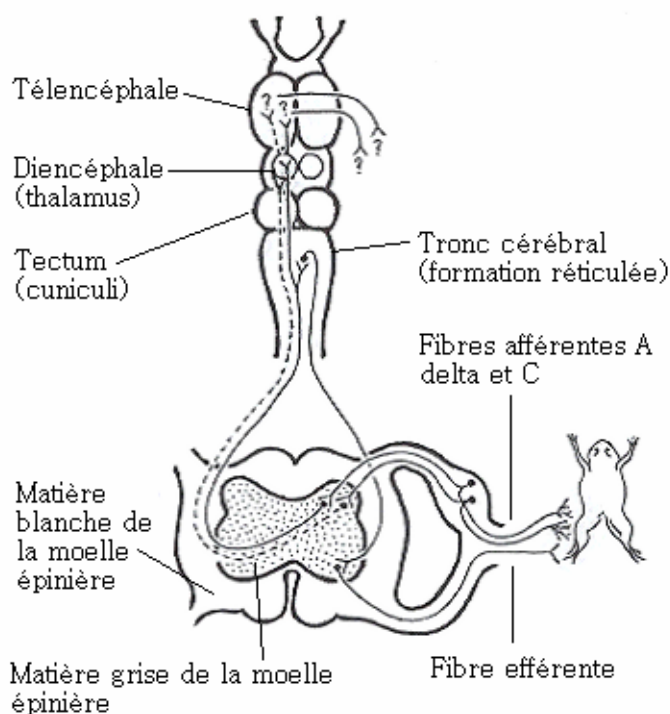
2. Les spécificités neuro-anatomiques sensorielles chez les amphibiens, les poissons et les mammifères

2.1 Les amphibiens

Le système nerveux des amphibiens peut être considéré comme une empreinte dans la chronologie de l'évolution de systèmes plus complexes tels que rencontrés chez les mammifères. Les voies de conduction de l'information semblent plus simples chez les amphibiens et l'étude de ces voies peut se révéler

très utile pour mieux comprendre les fonctions particulières tant du système nerveux central que périphérique. Par contre, encore beaucoup d'éléments restent à découvrir afin d'élucider les voies de conduction nerveuse supraspinales et les neurotransmetteurs impliqués dans la douleur chez ces animaux. La perception de la douleur débute chez les grenouilles comme chez les mammifères par des récepteurs périphériques ou nocicepteurs, qui sont principalement de deux types : (figure 2) des terminaisons libres simples et des terminaisons étendues (Spray, 1976).

Figure 2 : Diagramme des voies de transmission de la douleur chez la grenouille. Il est possible de constater les similitudes avec les voies sensorielles des mammifères au niveau périphérique et spinal. Peu d'information est présentement disponible chez cette espèce en ce qui concerne les relais supraspinaux et les voies descendantes.



Source : Dessin de Lynda Peatow, Biologiste.

Ces nocicepteurs conduisent l'information sensorielle par des fibres de type C (44% chez la grenouille) (fibres de petit diamètre, démyélinisées à conduction lente) et des fibres de type A δ (52% chez la grenouille) (fibres de plus grand diamètre, myélinisées à conduction rapide) (Stevens *et al.*, 2001; Hamamoto et Simone, 2003). Une fois la sensation douloureuse induite, l'information est transférée aux corps cellulaires des ganglions dorsaux et transmise par les fibres de conduction axonale vers la moelle épinière. Ces dernières entrent par la corne dorsale et établissent des contacts synaptiques dans la neuropile dorsale qui correspond à la substance gélatineuse chez les mammifères (Ebesson, 1976). À ce niveau une synapse de l'arc réflexe retourne par la corne ventrale vers la périphérie, circuit responsable du réflexe de retrait présent aussi chez la grenouille (Ebesson, 1976). Le relais de la moelle vers le cerveau croise immédiatement sur le côté opposé et compose les deux voies ascendantes de l'information douloureuse identifiées chez *Xenopus laevis* comme chez les autres espèces: soient la voie spino-thalamique et la voie spino-réticulaire. La voie spino-réticulée amène l'information sensorielle vers la formation réticulée dans le tronc cérébral qui permet une perception qualitative sans localisation précise de douleur. Par la suite, une voie descendante motrice, la voie réticulo-spinale excite les motoneurons de la corne ventrale de la section de la moelle épinière concernée afin de produire un mouvement, c'est la boucle de réflexe supraspinale (Ebesson, 1976). La deuxième voie ascendante fait un relais au niveau du thalamus dans une région qui correspondrait au noyau intralaminaire des mammifères. Par la suite, il fut déterminé que cette voie fait un relais vers le cortex cérébral sans description précise des zones ou noyaux innervés (Vesselkin *et al.*, 1971). Il pourrait alors s'agir de la voie de perception de la douleur. Des études histopathologiques suite à des lésions induites expérimentalement dans les noyaux thalamiques démontrent l'existence de cette voie thalamocorticale (Kicliter *et al.*, 1976). Chez la grenouille, le trajet de

retour de l'information algogène via les voies corticospinales n'a pas encore été élucidé. À la lumière de ces informations, nous pouvons cependant conclure que les voies nerveuses présentes chez les amphibiens comportent certaines similitudes avec celles des mammifères mais que l'utilisation de certaines de ces informations pour l'extrapolation aux mammifères demanderait encore des clarifications anatomiques et physiologiques.

2.2 Les poissons

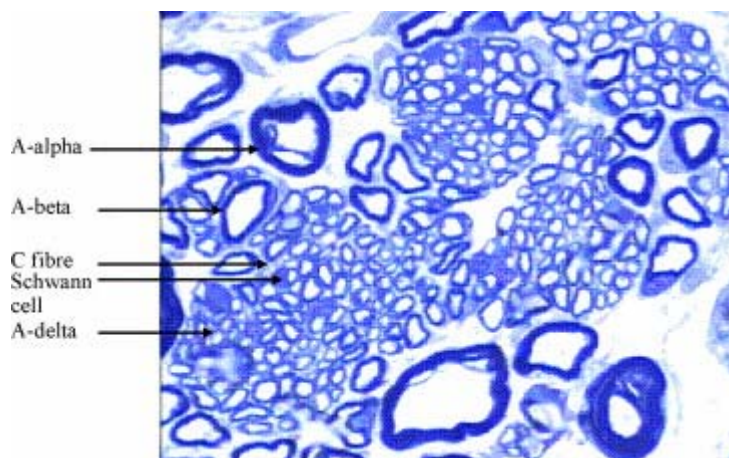
Depuis plusieurs décennies, un débat se déroule entre différents scientifiques certains affirmant que les poissons ne peuvent détecter la douleur (LeChat, 1996 ; Balon, 2000 ; Rose, 2002) tandis que d'autres suggèrent que les poissons sont capables de percevoir la douleur (Beukema, 1970a et b ; Ehensing *et al.*, 1982 ; Verheijen et Flight, 1997 ; Gregory, 1999 ; Sneddon, 2003a ; Sneddon, 2003b). En effet, de plus en plus d'évidences suggèrent que non seulement les poissons peuvent vivre une expérience douloureuse mais conservent une mémoire affective de cette expérience douloureuse (Beukema, 1970a et b ; Ehensing *et al.*, 1982 ; Sneddon, 2002 ; Sneddon et Gentle, 2002). Il devient alors important d'approfondir notre compréhension du système sensoriel de ces animaux.

La neuroanatomie comparée des poissons commence depuis peu à générer un intérêt scientifique dû au récent essor de l'utilisation de cette espèce en recherche. Très peu d'articles scientifiques sont donc présentement disponibles concernant ce sujet. Il est maintenant généralement accepté que les poissons possèdent un système nerveux capable de ressentir la douleur, possédant des récepteurs périphériques capables de générer des réflexes de retrait (Sneddon, 2002 ; Sneddon et Gentle, 2002 ; Chandroo *et al.*, 2004), de transmettre l'information nociceptive à des structures supra-spinales permettant la perception de la douleur (Sneddon, 2002 ; Sneddon, 2004) et même d'induire

un processus d'apprentissage ou de conditionnement (Beukema, 1970a et b ; Ehensing *et al.*, 1982 ; Davis et Klinger, 1994).

Une analyse comparative de la neuroanatomie des vertébrés primitifs aborde les niveaux de conduction de l'information douloureuse chez ces espèces (Sneddon, 2004). En effet, les poissons possèdent sur la surface de leur corps des nocicepteurs qui sont en majorité de type libre (Lynn, 1994) mais de structure comparable avec des fibres A δ et des fibres C. L'information nociceptive pourrait donc être véhiculée vers le système nerveux central par les mêmes deux grandes familles de fibres conductrices que l'on retrouve chez les mammifères (Lynn, 1994). Des études anatomiques sur les trois branches du nerf trijumeau de la truite arc-en-ciel (*Oncorhynchus mykiss*) démontrent la présence de fibres A δ et C (Figure 3) (Sneddon, 2002). Ces nocicepteurs sensoriels sont principalement des récepteurs à la chaleur intense et une majorité fut identifiée comme des récepteurs polymodaux (récepteurs sensibles à des stimulations de type chimique, thermique et mécanique) et une minorité comme des mécanorécepteurs (récepteurs uniquement sensibles à des stimulations mécaniques) (Sneddon, 2003b).

Figure 3 : Section de la branche maxillaire du nerf trijumeau chez une truite Arc-en-ciel (*Oncorhynchus mykiss*) démontrant la présence de fibres A-alpha, A-beta, A-delta, C et de cellules de Schwann (X 1000, échelle = 2 μ m).



Source : Sneddon, L.U. 2002. Anatomical and electrophysiological analysis of the trigeminal nerve in the rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Neuroscience Letters*. 319: pp. 167-171.

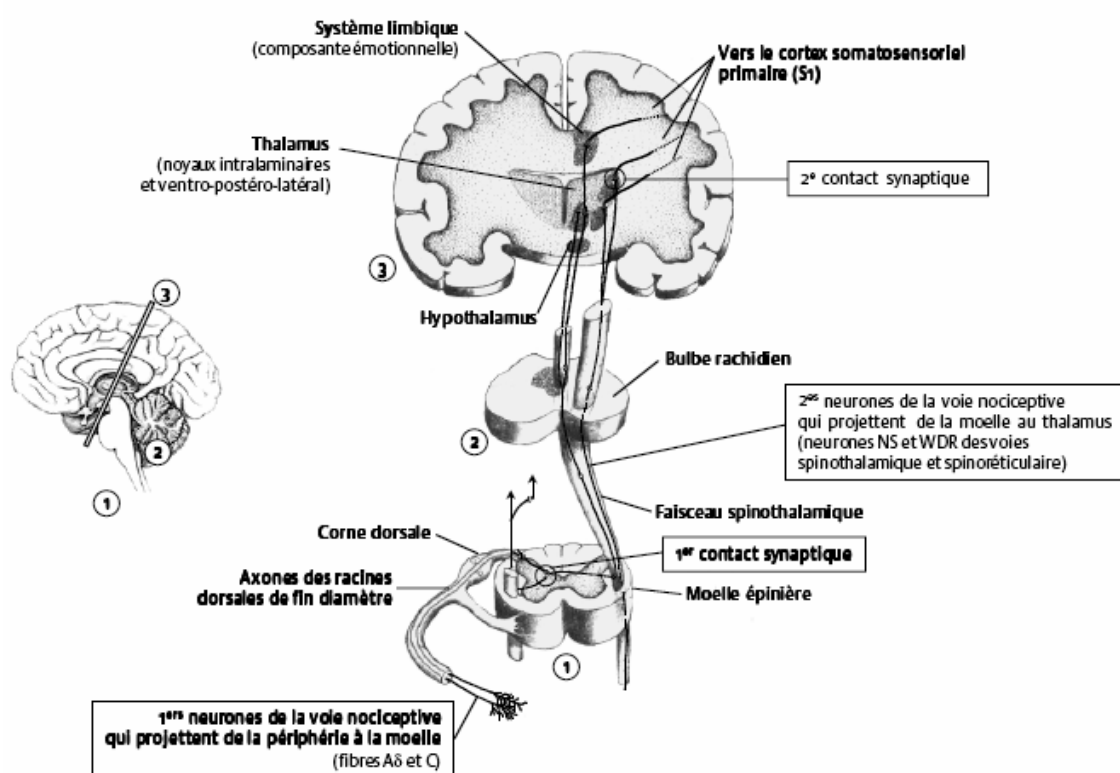
L'organisation anatomique de la moelle épinière des poissons fut principalement étudiée chez les élasmobranches (les raies) et démontre une division des cornes dorsales et ventrales en sept différentes laminae (Iwahori *et al.*, 1998). La lamina I occupe en grande partie la corne dorsale et correspond à la substance gélatineuse que l'on retrouve chez les mammifères, les oiseaux et les reptiles (Sneddon, 2004). Les fonctions et projections des autres laminae ne sont pas encore bien définies. Les voies ascendantes qui comportent plusieurs similarités avec les mammifères, peuvent être divisées en deux grands groupes. Premièrement, la voie du nerf trijumeau relaie l'information à partir de la tête et la voie spinothalamique amène l'information en provenance de tout le reste du corps (Sneddon, 2004). Il existe présentement certaines évidences de l'existence de voies descendantes mais des recherches plus approfondies seront nécessaires pour situer plus précisément l'emplacement des ces dernières (Sneddon, 2004). Les voies ascendantes des requins dormeurs (*Ginglymostoma cirratum*) atteignent la formation réticulée et possèdent également des projections vers la portion dorsale motrice du noyau vague, la moelle allongée, le tronc cérébral, le cortex cérébral, les noyaux et le cortex du cervelet, le noyau intercolliculaire, le tectum mésencéphalique et le thalamus (Ebbesson et Hodde, 1981). Le marquage immunoréactif des peptides de la douleur comme la sérotonine, la substance P, la somatostatine, le neuropeptide lié à la calcitonine (CGRP), le neuropeptide Y et la bombésine démontrent une distribution similaire à celle observée chez les mammifères (Ebbesson et Hodde, 1981). L'étude des structures cérébrales nous révèle la présence de zones nociceptives impliquées dans la perception de la douleur, entre autres au niveau du pont, de la moelle allongée et du thalamus. Chez les élasmobranches, la région télencéphalique possède un groupe de cellules bien différenciées qui reçoivent une innervation

bien circonscrite en provenance du thalamus (Northcutt, 1981). Il reste donc encore beaucoup de recherche à faire afin de mieux comprendre l'organisation du SNC des poissons en relation avec la perception de la douleur et les fonctions de chacune des régions impliquées.

2.3 Les mammifères

La neuroanatomie des mammifères diffère quelque peu d'une espèce à l'autre. D'une façon générale, les différences concernent principalement le stade de développement du cerveau, plus particulièrement du néocortex, et la présence ou l'absence de certains noyaux. L'organisation neurosensorielle des mammifères, peut se diviser en deux grandes subdivisions : le système neurosensoriel périphérique (de la périphérie jusqu'à l'entrée au niveau de la moelle épinière (neurones primaires)) et le SNC (de la moelle épinière jusqu'aux centres supérieurs d'interprétation en passant par tous les noyaux du tronc cérébral et des noyaux sous-corticaux (neurones secondaires) (Figure 4) (Marchand, 2005).

Figure 4 : Schéma des voies de perception de la douleur. En provenance de la périphérie, le neurone primaire constitué de fibres A-delta et C fera contact avec le neurone secondaire (spécifique ou non spécifique). Ces fibres dites secondaires croisent dans le moelle épinière pour se diriger vers les différents noyaux du thalamus. La voie spinothalamique projette ses fibres nerveuses vers les noyaux latéraux du thalamus et la voie spinoréticulaire projette ses fibres vers certaines structures du tronc cérébral ou vers les noyaux médians du thalamus. Finalement, les neurones des noyaux latéraux continuent leur chemin vers les centres corticaux sensori-discriminatifs du cortex somatosensoriel et les neurones en provenance des noyaux médians projettent vers les centres corticaux motivo-affectifs du système limbique. NS : neurones nociceptifs spécifiques, WDR (*Wide Dynamic Range*): neurones ayant un spectre dynamique étendu.



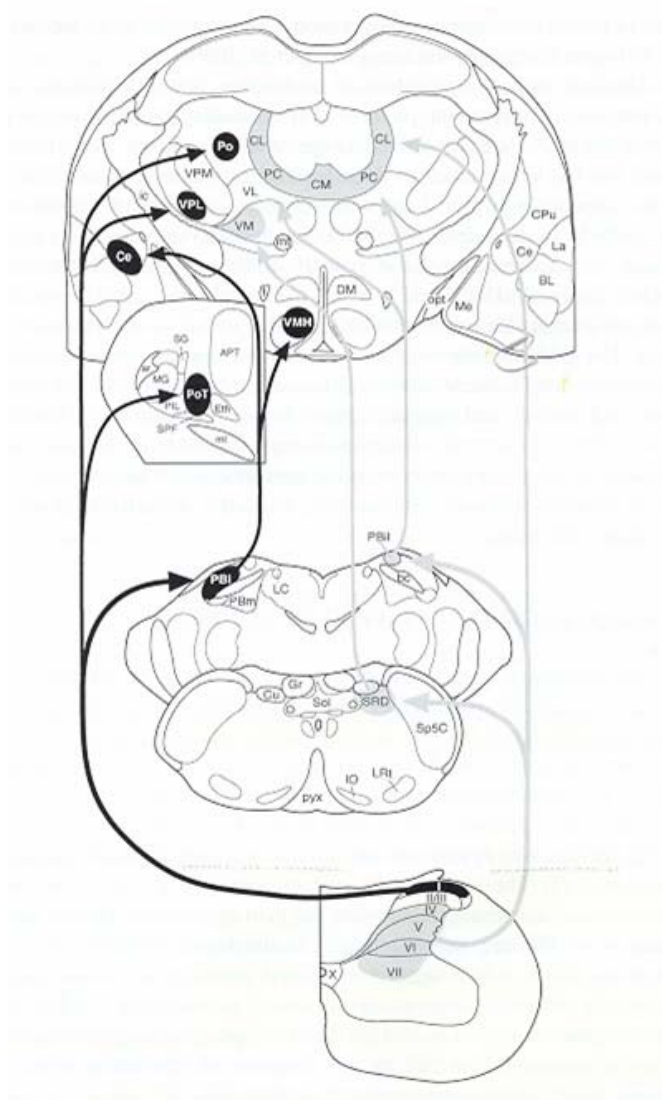
Source : Marchand, S. 2005. Neurophysiologie de la douleur. *In*: Pharmacologie de la douleur. P. Beaulieu. Les Presses de l'Université de Montréal, Québec, Canada. 593 p.

En périphérie, le trajet d'une stimulation sensorielle algogène débute par l'activation des récepteurs, aussi appelés nocicepteurs, qui sont en fait des terminaisons libres des fibres afférentes primaires sensorielles. Ces nocicepteurs sont situés sur toute la surface du corps (Marchand, 2005). Suite à la stimulation des terminaisons nerveuses, des fibres ou voies afférentes primaires transmettent cette information vers le SNC. Ces fibres appartiennent à deux grands groupes : premièrement les fibres A comprenant les $A\beta$ et $A\delta$ et deuxièmement les fibres C. Chaque groupe comporte des caractéristiques de vitesse de transmission de l'information et des types de stimulations. L'information est relayée premièrement vers la moelle épinière en passant des neurones dans le ganglion dorsal, par la corne dorsale puis elle remonte par les voies afférentes secondaires vers les zones d'interprétation supérieures. Ainsi, une stimulation douloureuse périphérique voyageant par ce réseau de conduction nerveuse aura pour effet d'induire la relâche de neurotransmetteurs et de neuromodulateurs aux différents niveaux de relais. Ces neurotransmetteurs et neuromodulateurs auront pour fonction de transmettre l'information douloureuse à différents niveaux du système nerveux. Cette cascade d'évènements est aussi responsable des phénomènes inflammatoires reliés à une stimulation nociceptive. Synthétisés par les corps cellulaires des fibres afférentes au niveau du ganglion dorsal, la substance P, le glutamate et le CGRP ont des effets vasodilatateurs autant au niveau périphérique qu'au niveau central (Guilbaud et Besson, 1997). Certains neurotransmetteurs comme la bradykinine, les prostaglandines, l'histamine, la sérotonine et l'adénosine triphosphate relâchés par les cellules sanguines et d'autres comme les interleukines, l'interféron et les facteurs de croissance

tumorale (TNF), quant à eux libérés par les macrophages ont également un rôle dans l'inflammation et la transmission neuronale de la douleur (Guilbaud et Besson, 1997).

Les voies ascendantes de la nociception sont regroupées en sous-groupes caractérisés par les différents noyaux ou les relais supraspinaux. Les voies ascendantes sont divisées en fonction de leur lamina d'origine, donc celles qui proviennent de la lamina I et celles des laminae profondes (Figure 5) (Bernard et Gauriau, 2004). Premièrement, la principale voie afférente de la douleur, la voie spinothalamique débute au niveau de la lamina I de la corne dorsale de la moelle épinière, croise sur le côté controlatéral et se divise en deux sous- groupes. La lamina I–parabranchiale (PB) rejoint l'amygdale et l'hypothalamus et cette voie permet l'apprentissage émotionnel et l'homéostasie. La lamina I–latéro-thalamique dont les fibres projettent vers la partie postérieure du thalamus et par la suite aux cortex somatosensoriels primaire (S1), secondaire (S2) et insulaire, permet une discrimination sensitive de la douleur (Bernard et Gauriau, 2004). Le second système prenant son origine des laminae profondes se termine dans les sous-noyaux réticulaires dorsaux, le noyau parabrachial interne et le noyau médial du thalamus et il joue un rôle dans la composante motrice et d'éveil émotionnel de la douleur par ses projections thalamiques vers les cortex moteur frontal, préfrontal-médian et cingulaire (Bernard et Gauriau, 2004).

Figure 5 : Illustration des principales voies spino-médullo-thalamiques de la douleur chez le rat. En noir : les voies qui ont leur origine dans la lamina I de la moelle épinière et les noyaux du système nerveux central irrigués par ces dernières. En gris : les voies en provenance des lamina profondes de la moelle épinière et leurs projections vers les noyaux médullo-thalamiques. Abréviations : Po, CL, PC, CM, VPM, VL, VPL, ic, VM, mt, Ce, DM, VMH, opt, Me, CPu, BL, La, APT, ar, MG, PoT, Eth, PIL, SPF, ml, Pbil, PBl, LC, PBm, bc, Cu, Gr, SRD, LRt, IO, pyx, I, II, III, IV, V, VI et VII (voir liste des abréviations en début de thèse).

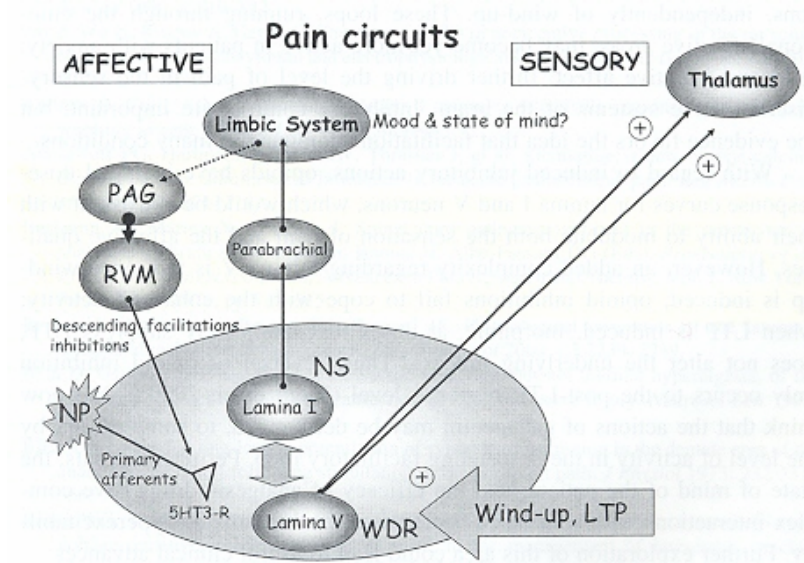


Source : Bernard, J.-F. et C. Gauriau. 2004. Brainstem and Pain: A Complementary Role with Regard to the Thalamus? *In: The pain system in normal and pathological states: a primer for clinicians.* Villanueva, L., A.H. Dickenson, H. Ollat. International Association for the Study of Pain, Seattle, Washinton, USA. 347 p.

Le noyau parabrachial joue aussi un rôle important dans le contrôle descendant de la transmission de la douleur au niveau de la moelle. Cette voie ajoute la composante motivo-affective à l'expérience douloureuse. De plus la voie parabrachiale affecte les processus d'homéostasie par la stimulation du système nerveux autonome (Figure 6) (Bernard et Gauriau, 2004). L'amygdale et l'hypothalamus, qui sont des structures du système limbique, permettent l'établissement de la mémoire de l'évènement douloureux, l'activation de l'homéostasie du système nerveux autonome et la motivation afin d'éviter une situation douloureuse par leurs projections vers le cortex cingulaire antérieur et l'aire insulaire (Bernard et Gauriau, 2004).

Finalement, le second système origine des laminae profondes de la moelle épinière, c'est-à-dire la voie spino-réticulo-thalamo-corticale et la voie spino-parabrachiale-thalamo-corticale sont toutes deux impliquées dans les composantes motrices, d'alerte et d'éveil reliées à l'expérience douloureuse par leurs projections thalamiques vers les cortex moteurs frontal, préfrontal-médian et cingulaire (Bernard et Gauriau, 2004). Toutes ces voies constituent donc les différentes routes que prend un influx douloureux et qui sont essentielles pour assurer une réponse et une adaptation d'évitement à la douleur. Ces mécanismes ont donc pour but de protéger le système des lésions mais aussi de prévoir et d'apprendre à éviter celles à venir.

Figure 6 : Illustration simplifiée des différentes projections à partir de la lamina I vers les zones émotionnelles du cerveau et les projections à partir de la lamina V vers le thalamus et le cortex qui sont à l'origine de la partie affective et sensorielle de la douleur. Représentation des phénomènes de «*Wind-up*» et de potentialisation à long terme (*Long term potentiation*, LTP) qui potentialise l'information en provenance de la lamina V. Lors de l'apparition d'une douleur neuropathique (NP), on observe une augmentation de la facilitation descendante qui origine de la lamina I, qui fait relai dans la substance grise périaqueducatale (PAG) et au niveau de la médulla rostroventrale (RVM) pour stimuler la relâche de sérotonine (5HT₃). Cette stimulation augmente l'activité ascendante en provenance de la corne dorsale. Cette illustration démontre une théorie de l'influence de l'état émotionnel sur la perception douloureuse.



Source : Dickenson, A.H., R. Suzuki, E.A. Matthews, W. Rahman, C. Urch, L. Seagrove et L. Rygh. 2004. Balancing Excitations and Inhibitions in Spinal Circuits. *In: The pain system in normal and pathological states: a primer for clinicians.* Villanueva, L., A.H. Dickenson, H. Ollat. International Association for the Study of Pain, Seattle, Waschinton, USA. 347 p.

Qu'un organisme soit capable de se protéger et se défendre est incontestablement une prémisse à la survie. Par contre, il peut aussi contrôler l'amplitude de la réponse douloureuse afin qu'elle ne devienne pas chronique jusqu'au point d'interférer avec son mode de vie. Ce mécanisme de protection se nomme système de contrôle endogène de la douleur. En effet, l'organisme possède tout un réseau de contrôles des afférences nociceptives spinales et supra-spinales (Marchand, 1998). Des contrôles inhibiteurs existent autant au niveau spinal que supra-spinal et influencent ces derniers via les voies descendantes (Marchand, 1998). Le contrôle spinal s'effectue par l'action des interneurons inhibiteurs de la substance gélatineuse de la moelle épinière (Melzack et Wall, 1965). On retrouve également plusieurs récepteurs (opioïdes, GABA, adénosine) qui jouent des rôles inhibiteurs et d'autres récepteurs qui, lorsque inhibés, contrôlent aussi la douleur (NMDA, NK1 ou TRPV1) (Marchand, 2005).

Les voies descendantes de la douleur jouent un rôle clé dans cette inhibition des influx nociceptifs. Des neurones provenant du *subnucleus reticularis dorsalis* (SRD) semblent contrôler simultanément les influx excitateurs et inhibiteurs des neurones spinaux profonds (Bouhassira *et al.*, 1992 et Dugast *et al.*, 2003). Suite à une stimulation douloureuse, les neurones sérotoninergiques de la substance grise périaqueducatale ventrale (SPAG) et les neurones noradrénergiques de la zone rostrale ventromédiale de la moelle allongée (RVM) produisent une action antinociceptive. Leurs effets inhibiteurs sur les voies afférentes douloureuses se traduisent par l'activation d'interneurones enképhalinergiques tant au niveau superficiel que profond des neurones de la corne dorsale de la moelle épinière (Oliveras et Besson, 1988). À la suite d'une activation nociceptive des récepteurs de la douleur, toute une gamme de réactions se met en place, transmettant l'information au cortex et à certains noyaux du tronc cérébral induisant ainsi un rétrocontrôle sur la moelle épinière et donc, une réaction d'évitement. Ce concept de contrôle systémique

de la douleur a été identifié comme un contrôle inhibiteur diffus de la nociception (CIDN) proposé par Le Bars (1979a et b). Cette théorie propose qu'une stimulation nociceptive, en plus d'envoyer des influx vers le thalamus et les centres supérieurs, envoie aussi des informations nociceptives vers le tronc cérébral comprenant la SGPA et les noyaux du raphé induisant une inhibition de la transmission de la douleur au niveau de la moelle épinière et ainsi produira un contrôle diffus de la douleur (Le Bars *et al.*, 1979a ; Le Bars *et al.*, 1979b). Certaines études plus récentes suggèrent que la SGPA n'aurait qu'un rôle restreint dans cette inhibition descendante et que ce serait les structures du bulbe rachidien caudal qui seraient principalement impliquées (Gall *et al.*, 1998).

Finalement, les zones de contrôle supraspinales telles que les différentes aires corticales (cortex cingulaire antérieur et cortex insulaire) influencent la perception douloureuse. L'effet placebo, démontré aussi chez les animaux (Niemi *et al.*, 2006), est expliqué en partie par l'influence de ces centres qui induisent une action opioïdergique endogène (Levine *et al.*, 1978). Aussi, il est intéressant de noter l'effet d'atténuation de la perception de la douleur par la suggestion hypnotique (Rainville *et al.*, 1997).

La perception et la modulation de la douleur impliquant des mécanismes spinaux et supra-spinaux qui eux emploient plusieurs types de neuromodulateurs et neurotransmetteurs, rendent le traitement de ces conditions souvent complexes.

3. Historique de l'anesthésie et de l'analgésie en recherche

3.1 Anesthésie et analgésie des grenouilles : méthodes d'évaluation

Depuis quelques années, la chirurgie, la médecine et la recherche réalisées chez les amphibiens ont amené l'exploration de nouvelles molécules ayant des propriétés anesthésiques et analgésiques. Historiquement, la tricaine méthane sulfonate (MS-222) fut la substance la plus utilisée pour induire une anesthésie chez la grenouille (Mader, 1996). Par contre, cette molécule présente des effets néfastes potentiellement dangereux pour les animaux et les humains. Un contact direct avec le MS-222 démontra un potentiel d'induction de dommages rétiniens chez les amphibiens, les poissons et l'homme (Bernstein *et al.*, 1997). Au cours des années, différentes molécules et différentes voies d'administration ont été utilisées chez les amphibiens pour induire une anesthésie. Les voies sous-cutanées, intramusculaire, intracoelomique et intraveineuse sont les voies d'administration les plus répandues. Quelques exemples d'anesthésiques utilisés chez les amphibiens sont la kétamine (par injection systémique) (Green, 1979) et d'autres cyclohexanones, comme la tilétamine combinée avec le zolazépam (Letcher et Durante 1995), le méthoxyflurane et l'isoflurane administrés topiquement ou par immersion dans l'eau (Wass et Kaplan 1974; Wright 1996; Smith et Stump 2000), le propofol par administration intraveineuse, la médétomidine et les barbituriques par administration intracoelomique (Von Esse et Wright 1974; Green 1979; Lafortune *et al.*, 2001). Par contre, tous ces produits ont démontré des effets très variables, au sein et entre les différentes espèces. Cette variabilité peut être expliquée par un certain nombre de facteurs tels que la variation du poids corporel, les différentes posologies des agents anesthésiques, les voies d'administration et le sexe des animaux (Lafortune *et al.*, 2001).

L'étude de l'anesthésie et de l'analgésie chez les amphibiens requiert différents tests qui permettent de déterminer le niveau de conscience et le niveau algique de l'animal. L'anesthésie des vertébrés primitifs, comme les

amphibiens, est encore au centre d'une controverse en ce qui concerne la définition d'un état anesthésique profond ou chirurgical. Certaines molécules anesthésiantes, et les techniques d'évaluation de la profondeur anesthésique chez les amphibiens, nous ont permis de procéder à des interventions plus sécuritaires. Il est maintenant accepté que la perte du réflexe de retournement et du réflexe de retrait sont le reflet d'une anesthésie profonde (Wright, 1996). Cinq différentes techniques d'évaluation ont été utilisées chez les amphibiens pour définir l'état anesthésique de ces animaux : le test de l'acide acétique (Stevens *et al.*, 2001), le réflexe de retrait, le réflexe de retournement, la fréquence cardiaque et la fréquence respiratoire. Nous sommes donc en mesure d'évaluer sommairement la profondeur et la durée de l'anesthésie chez les amphibiens en relation avec le dosage et les voies d'administration de nouveaux agents anesthésiants.

3.2 Anesthésie et analgésie chez le poisson : méthodes d'évaluation

L'anesthésie et l'analgésie des poissons sont au centre de plusieurs débats concernant leur nécessité, leurs techniques d'application et leurs évaluations physiologiques (Rose, 2002; Sneddon, 2003a; Chandroo *et al.*, 2004; Sneddon, 2004). Différentes études éthologiques ont révélé que les poissons peuvent ressentir de la douleur, de la peur et du stress associés avec une expérience douloureuse et que ces expériences douloureuses ont des effets sur le métabolisme des poissons (Chandroo *et al.*, 2004; Sneddon, 2004; Dunlop et Laming, 2005). Puisqu'il existe très peu d'études sur la pharmacologie des anesthésiques et des analgésiques chez les poissons, il est essentiel de poursuivre les recherches dans le domaine (Pirhonen et Scheck, 2003). Parmi les molécules utilisées pour induire une anesthésie chez les poissons, on retrouve le MS-222 (Brown, 1993), la benzocaïne (Brown, 1993) et la quinaldine (2-méthylquinoline) (Davis *et al.*, 1982). Par contre, ces substances ont révélé des

effets très variables en ce qui a trait au niveau d'anesthésie atteint (Marking et Meyer, 1985; Bernstein *et al.*, 1997; Pirhonen et Scheck, 2003).

L'évaluation du niveau d'anesthésie chez les poissons inclut le test du réflexe de retrait (suite à l'écrasement de la nageoire dorsale avec une pince hémostatique, le poisson bouge et cherche à éviter la source douloureuse) et le test du réflexe de retournement modifié (perte ou rétablissement de la position sternale du poisson dans l'eau). Ces différentes techniques d'évaluation nous permettent donc d'estimer l'état d'anesthésie du poisson et donc, de modifier le type d'interventions réalisées sur l'animal en fonction de son niveau de conscience. Puisque les poissons perçoivent la douleur, qu'ils démontrent des processus d'apprentissage, de peur et d'évitement d'une source douloureuse, il devient alors justifié lors du processus d'élaboration d'un projet de recherche de minimiser l'établissement cette douleur pour le bien-être de ses derniers et pour la qualité éthique des projets de recherche.

3.3 Anesthésie et analgésie chez le rat : méthodes d'évaluation

Chez les mammifères, l'anesthésie et l'analgésie sont pratiquées depuis des centaines d'années. Les animaux de laboratoire, plus particulièrement les rats et les souris, ont servi pour la recherche et l'avancement des connaissances de façon significative (Swindle *et al.*, 2002). L'anesthésie par injection chez les rongeurs utilise les grandes familles de molécules telles que : les barbituriques, plus particulièrement le pentobarbital sodique (Lovell, 1986a,b et c), les agents dissociatifs, comme la kétamine et la tilétamine (Silverman *et al.*, 1983; Wilson *et al.*, 1992 et 1993), le propofol (Brammer *et al.*, 1993), les neuroleptanalgésiques (les opioïdes combinés à un tranquillisant comme les benzodiazépines) (Flecknell et Mitchell, 1984), les agonistes α_2 -adrénergiques, comme la xylazine et la médétomidine combinées avec la kétamine constituent les anesthésiques les plus utilisés chez les rongeurs (Wixson *et al.*, 1987). L'anesthésie se fait aussi souvent grâce aux substances volatiles comme

l'isoflurane et le sévoflurane (Koblin, 1992). Une anesthésie dite multimodale inclura des injectables comme une combinaison de kétamine, de xylazine et de benzodiazépines (diazépam et le midazolam) et un maintien avec des agents volatils. En ce qui concerne l'analgésie, elle sera couverte par l'utilisation de molécules comme les opioïdes (Swindle *et al.*, 2002), les anti-inflammatoires non stéroïdiens et la kétamine.

Chez le rat, le contrôle de la profondeur de l'anesthésie peut se faire entre autre avec le test du réflexe de retrait et le test du réflexe palpébral (Whelan et Flecknell, 1992). La fréquence cardiaque, la saturation en oxygène du sang et la température peuvent aussi être suivies grâce à une sonde anale. En effet cette dernière donne l'information des paramètres cardiaques et de saturation par un oxymètre de pouls et la température par un thermomètre tous deux inclus dans la sonde (Swindle *et al.*, 2002). D'autres méthodes de suivi anesthésique sont aussi disponibles, tout dépendant des besoins requis lors de la procédure.

4. La douleur neuropathique

La douleur peut se diviser en deux grandes familles : les douleurs aiguës de courte durée qui peuvent être intenses mais qui ne se prolongent pas dans le temps et les douleurs chroniques qui peuvent être de faible ou de forte intensité et qui se prolongent dans le temps (Marchand, 2005). Quand un événement algique se répète, se prolonge ou sensibilise des terminaisons nerveuses, les effets de la douleur chronique commencent à se manifester. La douleur dite neuropathique se définit comme une conséquence d'une atteinte d'un nerf ou d'une terminaison nerveuse ou d'un fonctionnement anormal du système nerveux périphérique ou central (SNC). Cette douleur peut être la conséquence d'une amputation, d'un traumatisme, d'une maladie métabolique (ex. diabète), d'une maladie infectieuse (ex. atteinte par le virus de l'herpès), d'un néoplasme ou de déficiences alimentaires (GEDN, 2004).

4.1 Allodynie et hyperalgésie

La douleur neuropathique peut être caractérisée par la présence d'allodynie et d'hyperalgésie. L'hyperalgésie consiste en une augmentation de la perception du niveau algique suite à une stimulation douloureuse et l'allodynie est une perception douloureuse à la suite d'une stimulation non douloureuse (Nichols *et al.*, 1999). Ces deux concepts algiques sont souvent reliés et en constante évolution dynamique. En effet, il n'est pas rare qu'une douleur stimulée par l'un ou l'autre des ces mécanismes va se transformer au cours du temps, que l'hyperalgésie et l'allodynie peuvent co-exister ou s'exprimer de façon indépendante (Nichols *et al.*, 1999). Ces douleurs neuropathiques peuvent s'étendre sur l'hémicorps et même parfois atteindre le côté controlatéral du corps (GEDN, 2004). Donc, les champs récepteurs sensibilisés peuvent rester relativement confinés ou s'étendre à différentes parties du corps. De plus, ce type de douleur présente une forte résistance aux médicaments analgésiques traditionnellement utilisés en médecine, comprenant entre autres les opioïdes (GEDN, 2004).

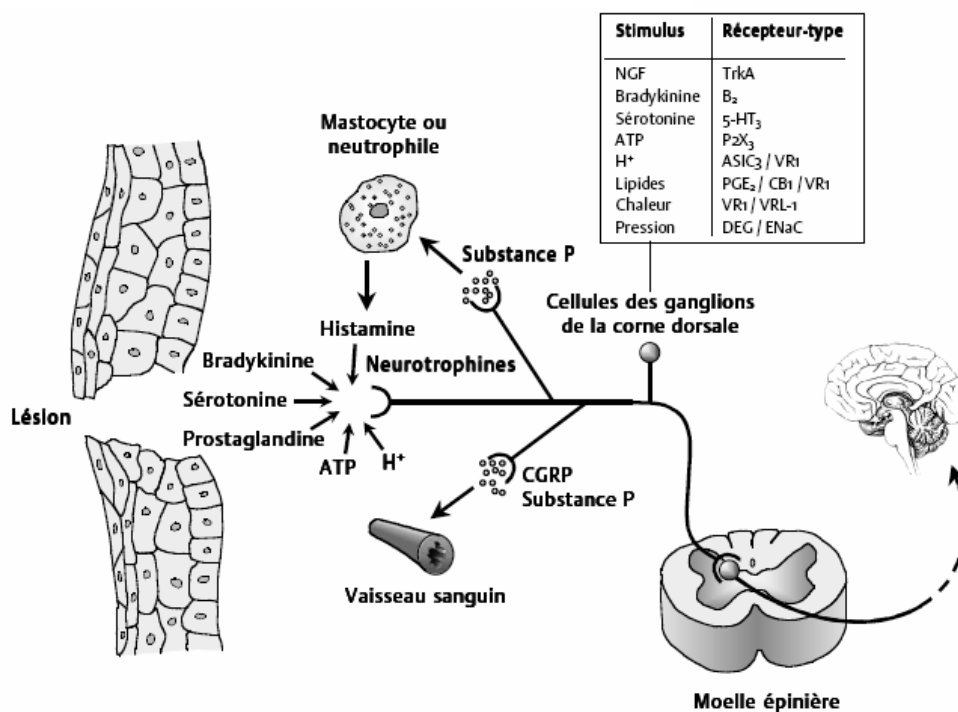
Cette douleur chronique dérive de l'activation de nocicepteurs et de la libération de neuropeptides neuromodulateurs autant localement (nerfs périphériques) qu'au niveau central (Nichols *et al.*, 1999). Il est nécessaire d'explorer de nouvelles avenues thérapeutiques de la douleur neuropathique puisque le traitement des patients neuropathiques est souvent infructueux en utilisant les drogues présentement disponibles.

4.2 Hyperalgésie primaire et secondaire

Le mécanisme d'établissement d'une perception anormalement douloureuse suite à une stimulation douloureuse se produit en deux temps. Le processus débute par une atteinte des nocicepteurs, ou directement du nerf conducteur. Une foule de neuromédiateurs, majoritairement des neuropeptides et

des acides aminés, seront relâchés autant localement qu'au niveau central (Figure 7).

Figure 7 : Mécanismes de l'hyperalgésie primaire par la sensibilisation des nocicepteurs par des substances proalgiques libérées suite à une lésion périphérique. Ces substances favorisent le passage d'une information nociceptive au niveau de la corne dorsale de la moelle épinière où la première synapse aura lieu. Abréviations : CGRP et ATP (voir la liste des abréviations en début de thèse).

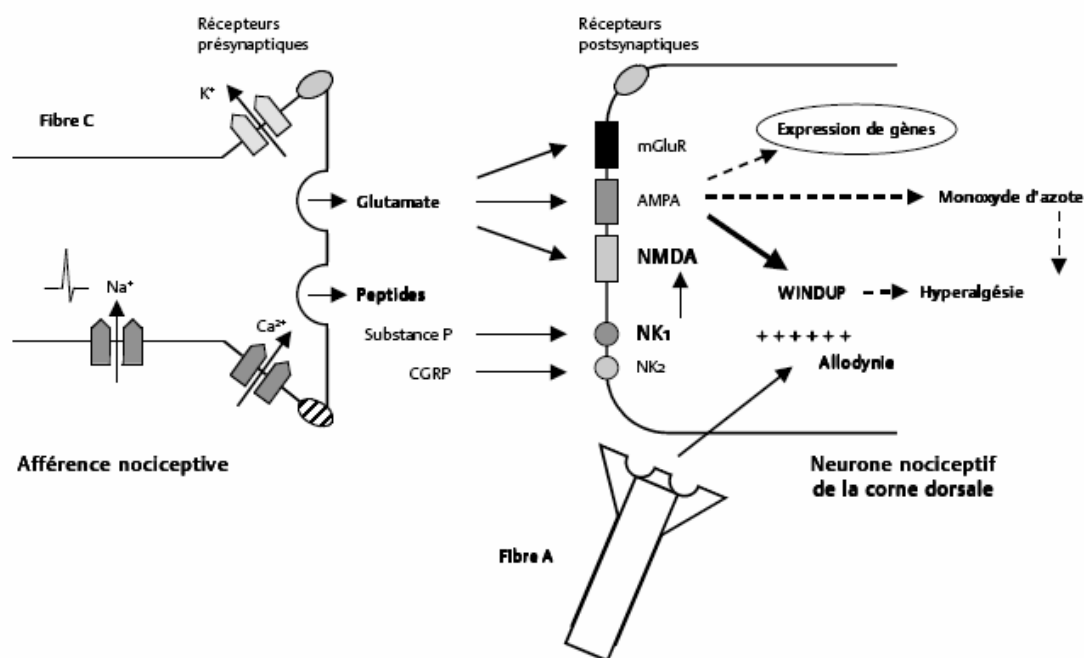


Source : Marchand, S. 2005. Neurophysiologie de la douleur. *In*: Pharmacologie de la douleur. P. Beaulieu. Les Presses de l'Université de Montréal, Québec, Canada. 593 p.

En périphérie, on retrouvera la sérotonine, les prostaglandines dont la PGE₂, l'adénosine triphosphate (ATP), les ions H⁺, le potassium, la bradykinine et l'histamine en provenance des mastocytes et des neutrophiles. Cette libération locale de molécules algiques et pro-inflammatoires est le résultat de la relâche de substances P (SP) et de protéines liées à la calcitonine (CGRP) en provenance des neurones du ganglion de la corne dorsale. Ces deux substances jouent un rôle primordial dans l'établissement et le maintien de la douleur neuropathique. En effet, en périphérie ces deux peptides agissent au niveau des cellules inflammatoires et des vaisseaux sanguins et stimulent la libération de molécules dites pro-inflammatoires. Ces molécules proalgiques vont, à leur tour, sensibiliser les récepteurs périphériques et centraux (Fields, 1987; Fields, 1989). Par la suite l'information voyagera vers la moelle épinière grâce aux fibres C et A δ , entrera au niveau de la corne dorsale et fera le relais avec les fibres afférentes secondaires dans la substance gélatineuse puis se dirigera vers les centres supérieurs pour l'interprétation et la modulation de l'influx (Marchand, 2005).

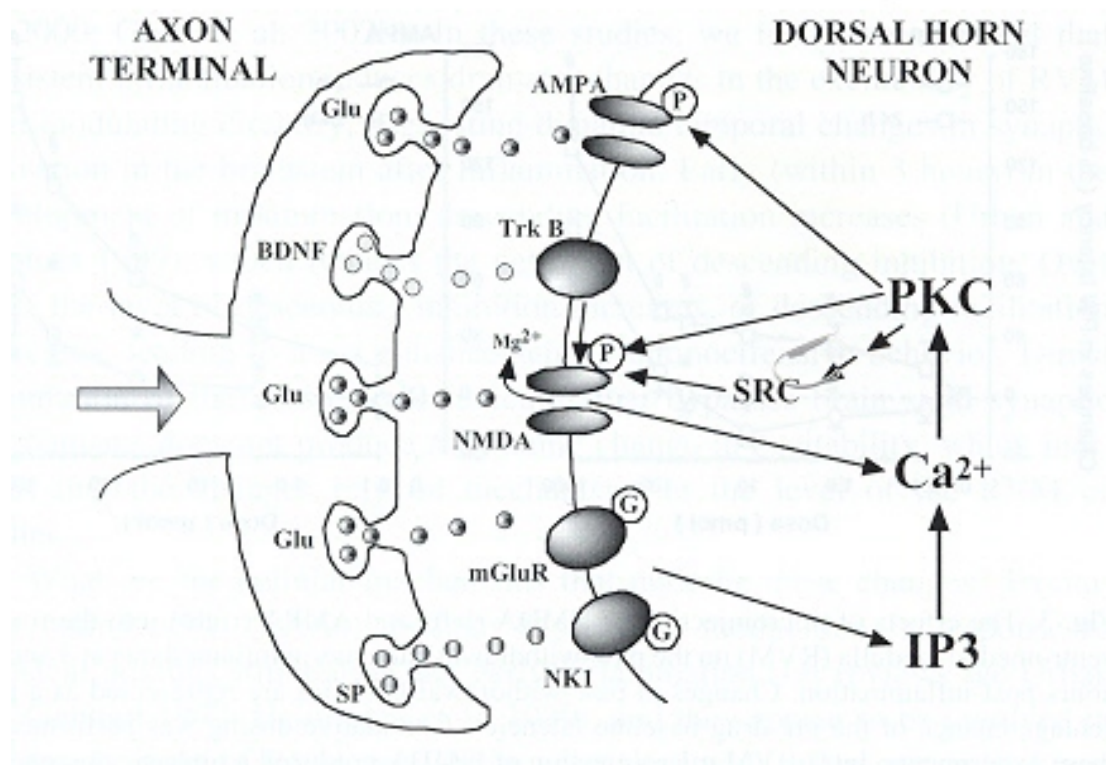
L'hyperalgésie secondaire s'installe dans un deuxième temps suite à l'excitation des fibres afférentes nociceptives de type C (Figure 8a et 8b).

Figure 8a : Mécanismes de l'hyperalgésie secondaire par une sensibilisation des neurones nociceptifs au niveau de la corne dorsale de la moelle épinière. Une activation soutenue des fibres nociceptives C stimulera la relâche de peptides comme la substance P et le CGRP ainsi que du glutamate. L'activation des récepteurs NK1 et NMDA induira des changements d'expression cellulaire dont l'activation de gènes à expression rapide. Ces modifications des terminaisons nerveuses modifieront la sensibilité du neurone secondaire en abaissant le seuil de dépolarisation suite à une stimulation douloureuse (hyperalgésie) ou non douloureuse (allodynie).



Source : Marchand, S. 2005. Neurophysiologie de la douleur. *In*: Pharmacologie de la douleur. P. Beaulieu. Les Presses de l'Université de Montréal, Québec, Canada. 593 p.

Figure 8b : Mécanisme cellulaire du wind-up présent au niveau des neurones de la corne dorsale. Abréviations : BDNF, G, Glu, IP3, mGluR, NK1, P, PKC, SP et trk B (voir liste des abréviations en début de thèse).



Source : Dubner, R. et K. Ren. 2004. Brainstem modulation of Pain after Inflammation. *In: The pain system in normal and pathological states: a primer for clinicians.* Villanueva, L., A.H. Dickenson, H. Ollat. International Association for the Study of Pain, Seattle, Waschinton, USA. 347 p.

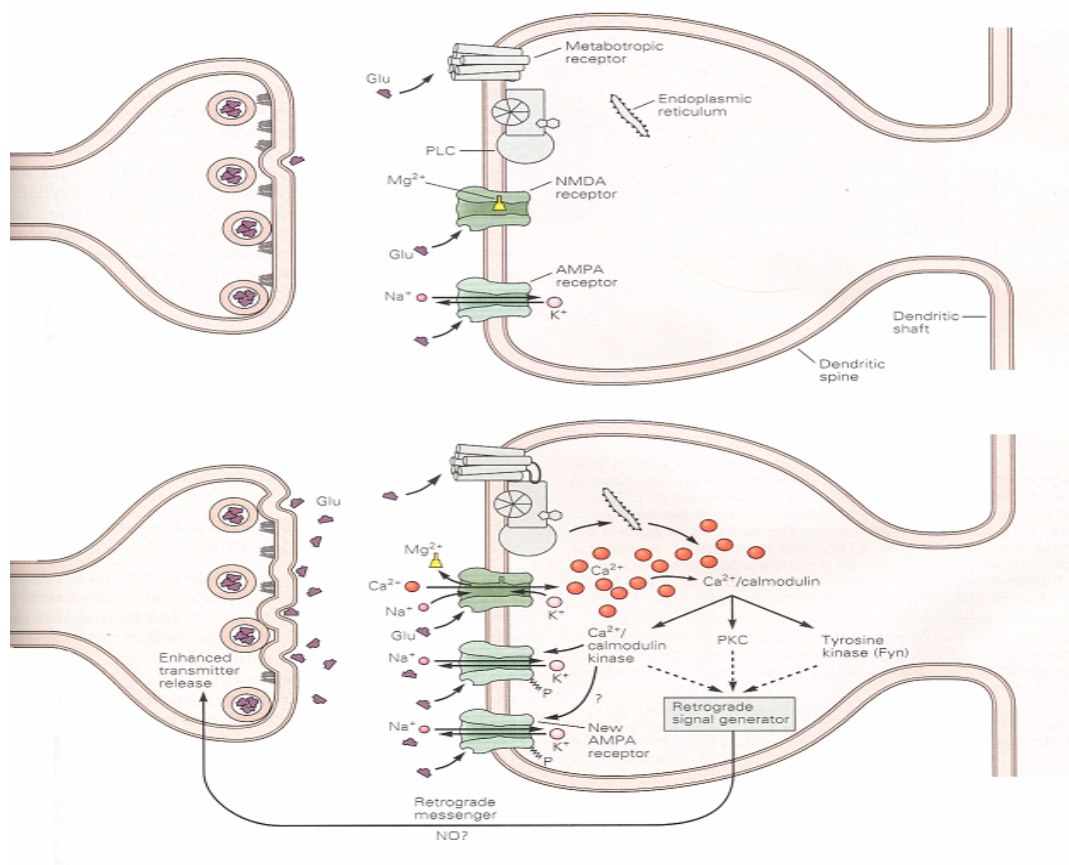
Cette excitation induira au niveau de la terminaison nerveuse des échanges ioniques, telle que l'entrée de sodium et de calcium et une sortie de potassium. Ces modifications électrolytiques conduiront à la libération de neuropeptides et de neurotransmetteurs excitateurs clés dans l'hyperalgésie secondaire comme la substance P, le CGRP et le glutamate. Ce type d'hyperalgésie, aussi appelé

«wind-up» et phase précoce de la potentialisation à long terme, constitue la première phase dans l'établissement de la douleur chronique.

Le mode de fonctionnement des différents récepteurs impliqués dans ces processus est critique pour l'établissement de l'hyperalgésie et de l'allodynie. Les récepteurs du glutamate jouent un rôle clé dans ce mécanisme. On retrouve deux grandes sous-catégories de récepteurs du glutamate; c'est-à-dire les récepteurs ionotropiques et les récepteurs métabotropiques. Les récepteurs ionotropiques peuvent être subdivisés en deux autres types : les récepteurs AMPA (α -amino-3-hydroxy-5-méthyl-4-isoxazole) et kaïnate perméables au sodium et au potassium et les récepteurs NMDA (N-méthyl-D-aspartate) possédant un ion magnésium dans son canal et perméables au calcium, sodium, potassium. Le glutamate interagit aussi avec les récepteurs métabotropiques (mGluR) qui sont couplés à une protéine G et comporte un second messenger, la phospholipase C (PLC) (Figure 9) (Kandel *et al.*, 2000). Lors de l'activation de la terminaison nerveuse glutamergique de grandes quantités de glutamate sont libérées dans l'espace synaptique, et se lient aux récepteurs mGluR, AMPA et NMDA. L'interaction du glutamate avec les récepteurs NMDA aura pour effet d'induire des mouvements ioniques et donc, une augmentation de la concentration de calcium dans le bouton post-synaptique. Cette entrée massive de calcium activera quatre types de protéines kinases : la protéine kinase Ca^{2+} /calmoduline, la protéine kinase C (PKC), la protéine kinase A (PKA) et la tyrosine protéine kinase (fyn).

Figure 9: Illustration de l'induction de la phase précoce de la potentialisation à long terme. **Image du haut :** Suite à une stimulation de basse fréquence le glutamate est relâché et active les récepteurs NMDA et non-NMDA. Les récepteurs non-NMDA (AMPA) favorisent la conductance aux Na^+ et K^+ . Les récepteurs NMDA par contre ne réagiront pas, dû au magnésium qui bloque l'ouverture du canal. **Image du bas :** Lors d'une stimulation de haute fréquence

le magnésium est délogé et permet le fonctionnement des récepteurs NMDA. Ce délogement permet le mouvement de calcium par les récepteurs NMDA et donc une augmentation importante de la concentration intra cellulaire de calcium. Par la suite, l'activation des kinases dépendantes du calcium et de la tyrosine kinase Fyn permettront l'établissement de la potentialisation à long terme (LTP). La calmoduline kinase calcique phosphoryle les récepteurs AMPA et active des récepteurs silencieux. Une fois la LTP établie, les cellules post-synaptiques relâchent des messagers rétrogrades qui vont stimuler la membrane pré-synaptique afin de relâcher encore plus de glutamate ce qui contribue aussi à la LTP.

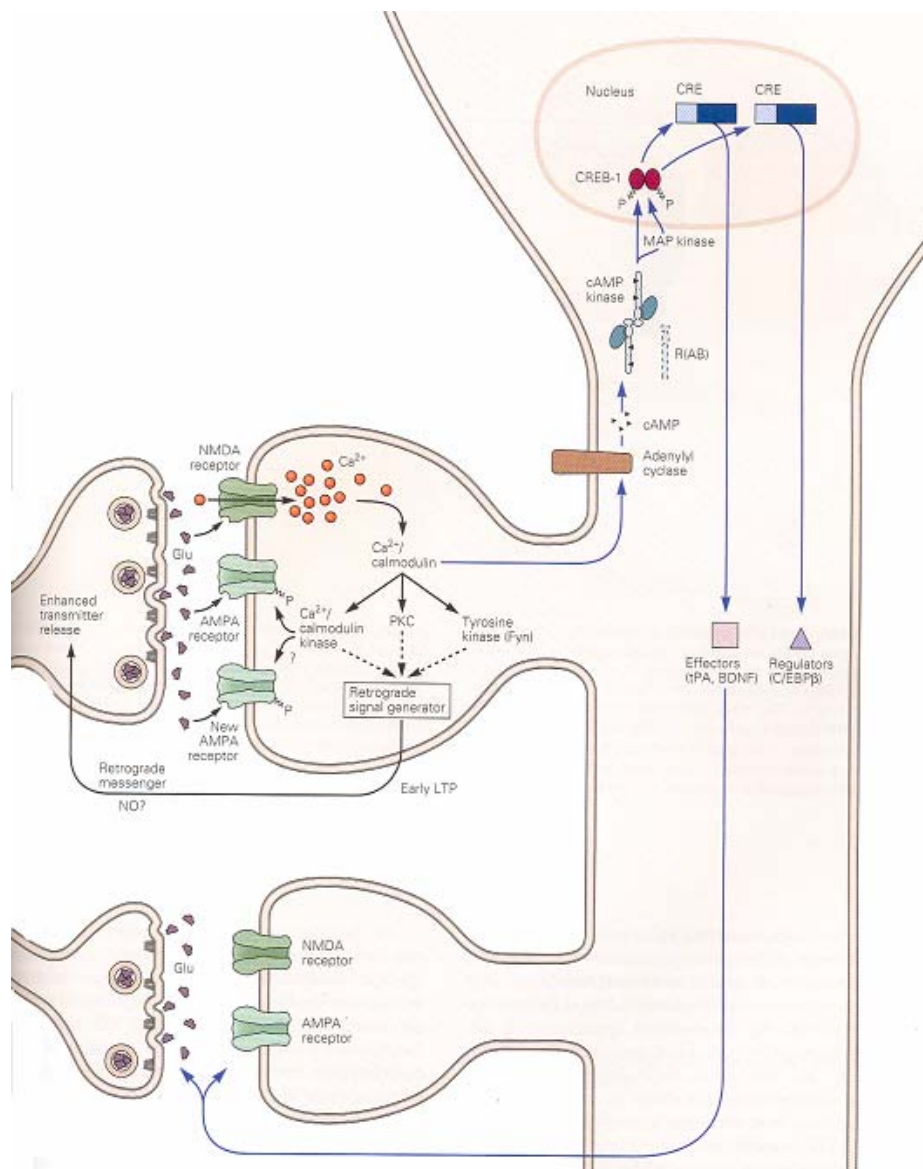


Source : Kandel, E.R., J.H. Schwartz et T.M.Jessell. 2000. *Principle of Neural Science*. Elsevier/North-Holland, New York. 1414 p.

Cette augmentation de calcium agira donc comme point de départ d'une cascade d'évènements qui mèneront à l'établissement de la douleur chronique. En effet, la potentialisation à long terme dépend de quatre grands facteurs : la dépolarisation post-synaptique, l'activation des récepteurs NMDA, l'influx de calcium dans le bouton post-synaptique et l'activation par le calcium de plusieurs seconds messagers. L'entrée de calcium activera non seulement les récepteurs NMDA mais augmentera aussi la sensibilité et le nombre de récepteurs AMPA post-synaptiques. L'activation des récepteurs mGluR par le glutamate met en place toute une cascade d'évènements dont l'activation des seconds messagers et l'induction du réticulum endoplasmique qui augmentera la production de calmoduline. D'autre part, la calmoduline se liera avec le calcium et formera la Ca^{2+} /calmoduline activant la Ca^{2+} /calmoduline protéine kinase qui pourra alors phosphoryler les récepteurs AMPA (augmentation du nombre de récepteurs AMPA et augmentation de leur sensibilité), d'activer la protéine kinase C (PKC) et la tyrosine kinase (fyn). Les évènements décrits ci-haut (Figure 8a et b et Figure 9) montrent que l'établissement de la phase précoce de la potentialisation à long terme, où il y aura activation de certains gènes algiques qui affecteront le fonctionnement de la synapse. La potentialisation à long terme se caractérise aussi par la production et la relâche d'un messager rétrograde vers le bouton pré-synaptique. Cette stimulation rétrograde est mise en place suite à l'activation de la PKC, de la fyn et de la Ca^{2+} /calmoduline protéine kinase et utilise probablement le monoxyde d'azote comme messager. Le messager rétrograde passant du bouton post-synaptique vers le bouton pré-synaptique induit une relâche encore plus importante de glutamate créant un cycle d'amplification. Finalement, la potentialisation à long terme comporte aussi une phase dite tardive qui consiste en la modification de la transcription de protéines dans le noyau de la cellule suite à la liaison du calcium avec la

calmoduline. Cette modulation de transcription passe par l'activation de l'adénylcyclase et par l'adénosine monophosphate (AMP) cyclase. Il en résultera la production de protéines pro-inflammatoires qui affecteront de nouvelles synapses (Figure 10) (Kandel, 2000). Les notions d'hyperalgésie primaire et secondaire, de «wind-up» et de potentialisation à long terme viennent définir une séquence d'évènements qui conduira à la sensibilisation du système nerveux algogène. Individuellement ces concepts n'expliquent pas l'établissement de douleur chronique mais ensemble ils suggèrent l'organisation de processus complexes et reliés menant à l'établissement de la douleur neuropathique.

Figure 10: Illustration de la phase précoce et de la phase retardée de la potentialisation à long terme. L'établissement initial de la LTP grâce à l'activation des récepteurs NMDA et des messagers rétrogrades constitue la phase précoce. Par la suite le mouvement constant de calcium dans la membrane post-synaptique stimule l'adénylyl cyclase qui elle activera l'AMP cyclique kinase qui se trans-localisera au niveau du noyau où la transcription des protéines de la douleur débutera.

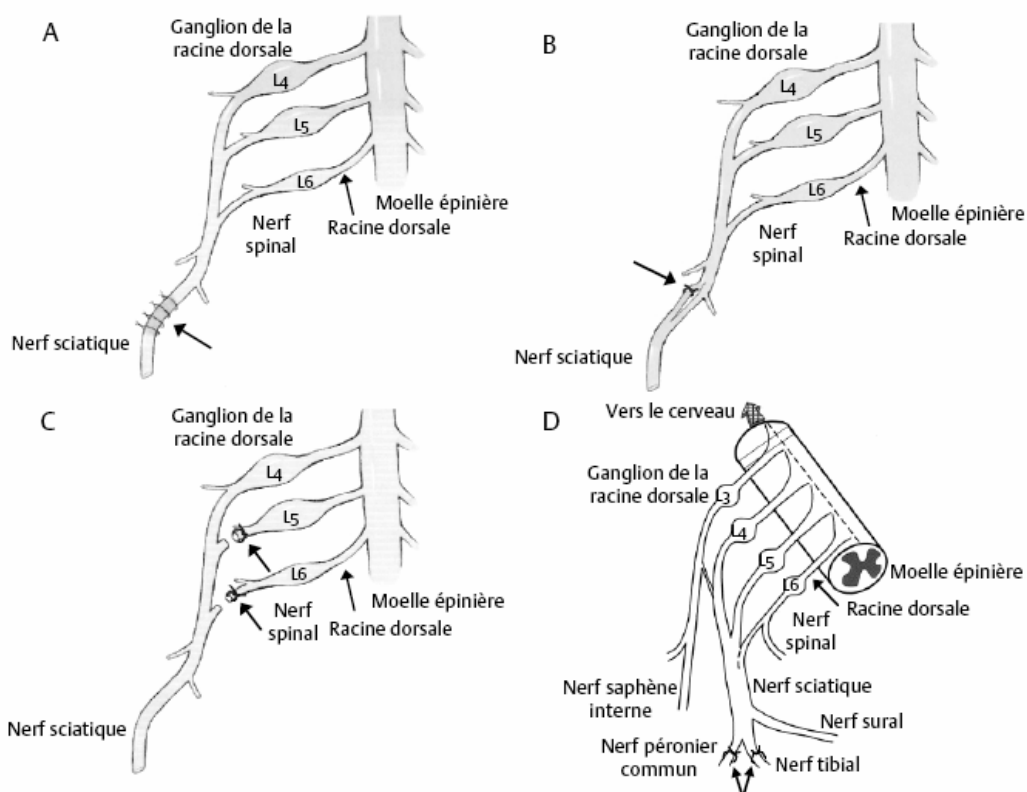


Source : Kandel, E.R., J.H. Schwartz et T.M.Jessell. 2000. *Principle of Neural Science*. Elsevier/North-Holland, New York. 1414 p.

4.3 Les modèles animaux de douleur neuropathique

Grâce aux témoignages de patients neuropathiques, et à la recherche utilisant des modèles animaux, la médecine a pu faire de grands pas dans la compréhension de la physiopathologie et de l'exploration des avenues de traitement de ce type de douleur. La reproduction des processus pathologiques chez les animaux de laboratoire a permis l'étude des processus pathologiques de la douleur neuropathique. Plusieurs approches furent établies afin de reproduire ce type de douleur. L'hémisection spinale (Bennett *et al.*, 2000a et b), la toxicité spinale (Laughlin *et al.*, 1997), la production d'un névrome (Hogan, 2002), l'injection de capsaïcine dans la région faciale (Pelissier *et al.*, 2002), la névrite (Bennett *et al.*, 2000a et b), la neuropathie diabétique (Fox *et al.*, 1999) sont tous des exemples d'interventions dont le but est d'induire une douleur neuropathique chez des animaux. De plus, cinq différentes approches chirurgicales ont été utilisées comme modèle animal. La constriction chronique du nerf sciatique (CCNS) (Bennett et Xie, 1988), la ligature partielle du nerf sciatique (Seltzer *et al.*, 1990), la ligature des nerfs spinaux L5 et L6 (Kim et Chung, 1992), la ligature et la section des nerfs tibial et péronier commun (Decosterd et Woolf, 2000) et la constriction chronique du nerf saphène (Walczak *et al.*, 2006) sont d'autres exemples d'interventions chirurgicales qui induisent une perte sensitive et/ou motrice accompagnée d'une douleur neuropathique (Figure 11).

Figure 11 : Schémas de quelques approches chirurgicales afin d'induire de la douleur neuropathique chez le rat. **En A** : Modèle de Bennett et Xie. Ligature lâche du nerf sciatique. **En B** : Modèle de Seltzer. Ligature partielle du nerf sciatique. **En C** : Modèle de Kim et Chung. Section et ligature des nerfs spinaux L5 et L6 près du ganglion de la racine dorsale. **En D** : Modèle de Decosterd et Woolf. Ligature et section du nerf tibial et de nerf péronier commun.



Source : Héon, H. 2005. Modèles animaux de douleur. *In*: Pharmacologie de la douleur. P. Beaulieu. Les Presses de l'Université de Montréal, Québec, Canada. 593 p.

La CCNS fut d'abord mise au point par Bennett et Xie (1988). Elle consiste en la mise en place de quatre nœuds (fil chromique catgut 4-0) directement sur le nerf sciatique (Figure 12). Cette intervention induit la

formation d'un bouton de régénération axonale de chaque côté de la zone de constriction. Une autre technique similaire de constriction du nerf sciatique fut démontrée par Pitcher *et al.* (1999). Cette approche utilise une gouttière de polyéthylène (PE-90) de 4-5 mm de longueur, installée autour du nerf sciatique. Une caractérisation des neurones primaires affectés par la constriction fut réalisée grâce à une étude des salves électriques extracellulaires. Le modèle CCNS affecte davantage les fibres conduisant l'information douloureuse d'origine mécanique que celles conduisant l'information douloureuse d'origine thermique et les fibres myélinisées (fibres A) sont affectées (Pitcher et Henry, 2000). La majorité des fibres sensibilisées appartiennent au groupe des fibres C et ceci suggère l'implication prédominante des fibres C dans l'établissement et le maintien de la douleur neuropathique.

Figure 12 : Image de la procédure chirurgicale d'installation des nœuds sur le nerf sciatique chez un mâle Sprague Dawley. **Image du haut :** L'animal est sous anesthésie à l'isoflurane. **Image du milieu :** On peut noter la présence des 2 nœuds avec un fil de Cat-gut chromique 4-0 sur le nerf sciatique. **Image du bas :** Noter la présence de la gaine sur le nerf sciatique comme utilisé lors de nos expérimentations.



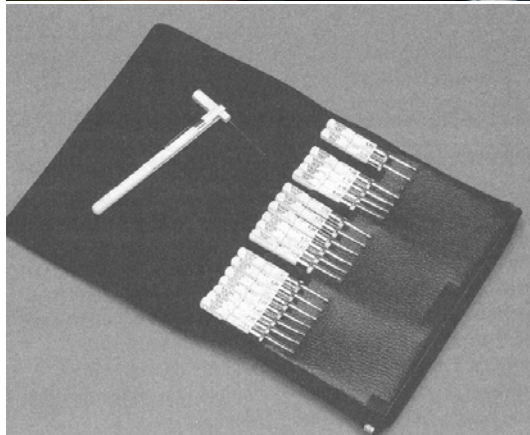


Source : Photographies du laboratoire du Dr Vachon, Faculté de Médecine Vétérinaire, Université de Montréal.

4.4 Les méthodes d'évaluation de la douleur neuropathique

L'évaluation de l'intensité et du type de douleur neuropathique induits par un modèle animal est une étape primordiale dans la réalisation d'une étude algique. Différentes techniques furent élaborées dans le but de caractériser la douleur induite et de mieux comprendre les processus de développement de la douleur neuropathique. D'une façon générale, il existe trois grandes catégories de douleur: la douleur thermique suite à une stimulation au chaud et au froid, la douleur chimique et la douleur mécanique. Chaque type de douleur correspond à une interprétation spécifique du système nerveux. Les différents tests comportementaux permettant de caractériser la nociception incluent le test de déplacement de la queue (sensibilité thermique) (D'Amour et Smith, 1941), le test de la plaque chauffante (sensibilité thermique) (Mogil *et al.*, 1999), le test de retrait de la patte de Hargreaves (rayon chauffant sous plantaire; sensibilité thermique) (Le Bars *et al.*, 2001), le test à la capsaïcine (injection dans la queue; sensibilité chimique) (Dougherty, *et al.*, 1998), le test au formol (injection intraplantaire; sensibilité chimique) (Dubuisson et Dennis, 1977), le test des filaments de Von Frey (sensibilité mécanique) (Chaplan *et al.*, 1994) et le test de la pression sur la patte de Randall-Sellito (test mécanique) (Le Bars *et al.*, 2001) (Figure 13).

Figure 13 : Évaluation comportementale des rats neuropathiques. **Image du haut :** Test de la nociception thermique au niveau de la face plantaire des membres postérieurs chez le rat mâle Sprague Dawley en utilisant l'unité lumineuse de Hargreaves. **Image du bas :** Image des fils de von Frey utilisé pour réaliser les tests de la sensibilité mécanique.



Source : Photographies du laboratoire du Dr Vachon, Faculté de Médecine Vétérinaire, Université de Montréal.

5. Historique de l'utilisation de l'eugénol et ses effets

5.1 Généralités

Le clou de girofle est utilisé depuis des centaines d'années comme épice alimentaire et son huile comme analgésique et anesthésique topique. Couramment utilisée pour l'anesthésie des poissons, cette substance est devenue au cours des années la principale alternative à l'utilisation de la tricaine méthane sulfonate aux États-Unis et au Japon (Endo *et al.*, 1972; Hikasa *et al.*, 1986; Munday et Wilson, 1997; Sladky *et al.*, 2001 ; Pirhonen et Scheck 2003). Des études *in vitro* ont démontré une action de l'eugénol sur les récepteurs vanilloïdes. Ainsi, les effets analgésiques de l'eugénol seraient principalement expliqués par le blocage réversible des récepteurs vanilloïdes en inhibant la transmission douloureuse (Yang *et al.*, 2003). De plus, l'eugénol pourrait aussi moduler la perception douloureuse grâce à son effet agoniste sur les récepteurs GABAergiques et son effet antagoniste sur les récepteurs du glutamate (NMDA) (Aoshima et Hamamoto, 1999; Yang *et al.*, 2003). Étant le principal neurotransmetteur inhibiteur du SNC, le GABA joue un rôle lors de l'anesthésie. Selon la dose d'eugénol, administrée, un effet de sédation allant jusqu'à l'anesthésie pourrait se produire expliquant par son action agoniste sur les récepteurs GABA.

5.2 La source et ses dérivés

Le clou de girofle, graine d'une plante retrouvée en Asie (*Eugenia aromatica* ou *Syzygium aromaticum*), a longtemps été utilisé pour calmer les douleurs associées à la pousse de dents ou autres douleurs gingivales (Figure 14).

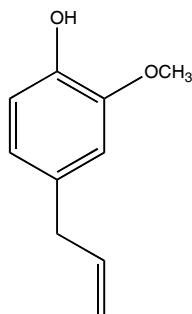
Figure 14 : Image de la plante source de l'huile de clou de girofle (*Eugénia aromatica* ou *Syzygium aromaticum*).



Source : Image du haut : www.allayurveda.com. Image du bas : www.avicenna.cz

En plaçant un clou de girofle entre la gencive et la lèvre, un picotement se fait sentir, puis les sensations douloureuses deviennent tolérables. L'huile est constituée d'un ensemble de produits parmi lesquels nous retrouvons l'eugénol, à 95%, et d'autres composantes telles que l'isoeugénol, le méthyleugénol et l'isométhyleugénol qui constituent 5% de l'huile (Sell et Carlini, 1996). La fraction appelée eugénol est en fait un phénol simple (Figure 15) appartenant à la famille des vanilloïdes. Par ses propriétés analgésiques, il est utilisé en médecine dentaire pour soulager la douleur associée à l'installation de certaines prothèses (Garibaldi *et al.*, 1995).

Figure 15 : Formule moléculaire de l'eugénol.



5.3 Utilisation de l'eugénol en médecine vétérinaire

L'eugénol et l'huile de clou de girofle sont utilisés chez les poissons (Hikasa *et al.*, 1986; Endo *et al.*, 1972; Soto et Burhanuddin, 1995; Anderson *et al.*, 1997 ; Munday et Wilson, 1997 ; Sladky *et al.*, 2001; Pirhonen et Scheck, 2003) et les amphibiens pour induire différents niveaux d'anesthésie. Chez le Pacu rouge (*Piaractus brachypomus*), l'effet anesthésique et les changements physiologiques varient suivant la durée de l'immersion dans une solution d'huile de clou de girofle (Sladky *et al.*, 2001). Suite à une exposition à l'eugénol (dose de 50mg/L), les poissons atteignent un niveau d'anesthésie chirurgicale plus rapidement mais présentent un réveil prolongé en comparaison d'une immersion avec le MS-222 (Sladky *et al.*, 2001). L'anesthésie induite par

l'administration d'huile de clou de girofle en immersion a aussi été étudiée chez les grenouilles Léopard du Nord (*Rana pipiens*) en comparaison avec le propofol et la médétomidine (Lafortune *et al.*, 2001). L'immersion des grenouilles dans une solution d'huile de clou de girofle (310 - 318 mg/L) pendant 15 min induit une anesthésie d'une durée approximative d'une heure, tandis que l'injection périvasculaire de propofol (10mg/kg) ne produit aucune anesthésie. L'eugénol peut donc induire un niveau anesthésique chez les poissons et chez les amphibiens. Par contre peu d'études ont été réalisées pour évaluer les propriétés anesthésiques de l'eugénol chez les mammifères.

L'huile de clou de girofle est utilisée chez les poissons sous forme de bain anesthésique pour induire une analgésie et une sédation allant jusqu'à l'anesthésie (Hikasa *et al.*, 1986; Anderson *et al.*, 1997; Keene *et al.*, 1998; Peake, 1998; Taylor et Roberts, 1999 ; Stetter, 2001). Cet agent produit une induction rapide et une anesthésie comparable, ou même supérieure, à d'autres agents avec un temps de réveil relativement lent (Munday et Wilson, 1997; Keene *et al.*, 1998; Sladky *et al.*, 2001).

Chez les rats et les souris, le méthyleugénol présente des caractéristiques anesthésiques intéressantes comme un temps d'induction réduit, un plan chirurgical profond, une cyanose des tissus réduite en comparaison avec d'autres drogues et produit un réveil de qualité supérieure (Sell et Carlini, 1996). Chez les rongeurs, il fut aussi démontré que le méthyleugénol n'était pas toxique à la suite d'une injection intrapéritonéale et que l'efficacité du produit était supérieure en injections répétées (Sell et Carlini, 1996). Des études *in vitro* ont suggéré une toxicité hépatique après une exposition directe de deux à trois heures avec de l'eugénol à 1 mM. Ces effets toxiques seraient expliqués par la formation d'un produit intermédiaire, une quinone (Thompson *et al.*, 1991).

L'eugénol offre donc une option intéressante pour induire une anesthésie et de l'analgésie chez les amphibiens et chez les poissons et pourrait présenter des avantages intéressants chez les rats et les souris.

5.4 Autres propriétés pharmacologiques rapportées

L'eugénol présente également des effets anti-inflammatoires (Reddy *et al.*, 1994) et une action antibactérienne (Laekeman *et al.*, 1990), des effets inhibiteurs sur la biosynthèse de la thomboxane (Laekeman *et al.*, 1990) et d'autres propriétés pharmacologiques telles qu'une neuroprotection (Wie *et al.*, 1997), des effets anticancéreux (Atsusane, 1991), anti-ischémiques (Atsusane, 1991), anti-histaminiques (Nishijima *et al.*, 1998) et anti-anaphylactiques (Jadhav *et al.*, 2004). Donc, l'eugénol offre d'autres avenues potentielles de traitement.

5.5 Les récepteurs TRPV1

5.5.1 Caractérisation et localisation anatomique

Les récepteurs vanilloïdes ont été découverts en association avec la perception douloureuse associée avec la consommation de piment fort. (Figure 16)

Figure 16 : Images présentant les graines du poivre rouge, *Capsicum frutescens*.



Source : Image du haut : idbio.unice.fr. Image du bas : madableu.free.fr

Thesh isola en 1846 la substance active présente dans le piment fort, soit la capsaïcine, responsable de la sensation douloureuse de picotement associée à sa consommation. La structure moléculaire de la capsaïcine montre qu'elle comporte des similitudes avec une autre épice, la vanille (Nelson, 1919 ; Spath et Darling, 1930). Les récepteurs à la capsaïcine furent nommés récepteurs vanilloïdes (RV). Après plusieurs années de recherche et de caractérisation des RV, les paramètres physico-chimiques de ces récepteurs furent élucidés et de nouveaux récepteurs furent identifiés. Quatre sous-classes (TRPV1, TRPV2, TRPV3 et TRPV4) différencient les sous-types de récepteurs vanilloïdes basés sur la caractérisation de leur activité (Szallasi et Blumberg, 1999 ; Davis *et al.*, 2000; Caterina et Julius, 2001). Le récepteur TRPV1 est un canal à cation non sélectif qui fonctionne comme un intégrateur de sensations douloureuses chimiques et physiques activé par la chaleur et l'acidité. Les antagonistes TRPV1 ont démontré des effets analgésiques autant contre la douleur découlant de l'inflammation que contre la douleur neuropathique (Caterina *et al.*, 1997; Ohkubo et Shibata, 1997; Tominaga *et al.*, 1998). Cette catégorie de récepteurs présente un haut seuil d'excitabilité à la chaleur (>48°C), une sensibilité à l'acide et non pas une sensibilité propre à la capsaïcine. La capsaïcine en combinaison avec d'autres protons, induirait plutôt une diminution du seuil d'activation des récepteurs vanilloïdes augmentant la fréquence de dépolarisation des neurones (Szallasi et Blumberg, 1999).

Présents à plusieurs niveaux dans le système nerveux des mammifères, les RV se retrouvent tant dans les cellules du système nerveux central et périphérique (Holzer, 1991). Plus particulièrement, on retrouve ces récepteurs dans les ganglions dorsaux et la substance gélatineuse de la corne dorsale (Tominaga *et al.*, 1998), dans les ganglions du nerf trijumeau (Ács et Blumberg, 1994), dans les ganglions des neurones nodoses (ganglion inférieur caudal du 10^{ième} nerf cranien (vague)) (Ács et Blumberg, 1994; Szallasi, 1995), dans l'hypothalamus (Jancso-Gabor *et al.*, 1970; Szolcsanyi *et al.*, 1971), dans la

formation réticulée (Ács *et al.*, 1996) et dans les noyaux gris de la base (Sasamura *et al.*, 1998). Au niveau des structures corticales, on retrouve dans un ordre décroissant l'hypothalamus et le cervelet, le striatum (noyaux basaux), le mésencéphale, les bulbes olfactifs, le pont, l'hippocampe et le thalamus (Sasamura *et al.*, 1998). Constituant une découverte relativement récente, les RV suscitent beaucoup d'intérêt mais les fonctions associées aux différentes structures corticales ne sont, pour la plupart, pas encore définies.

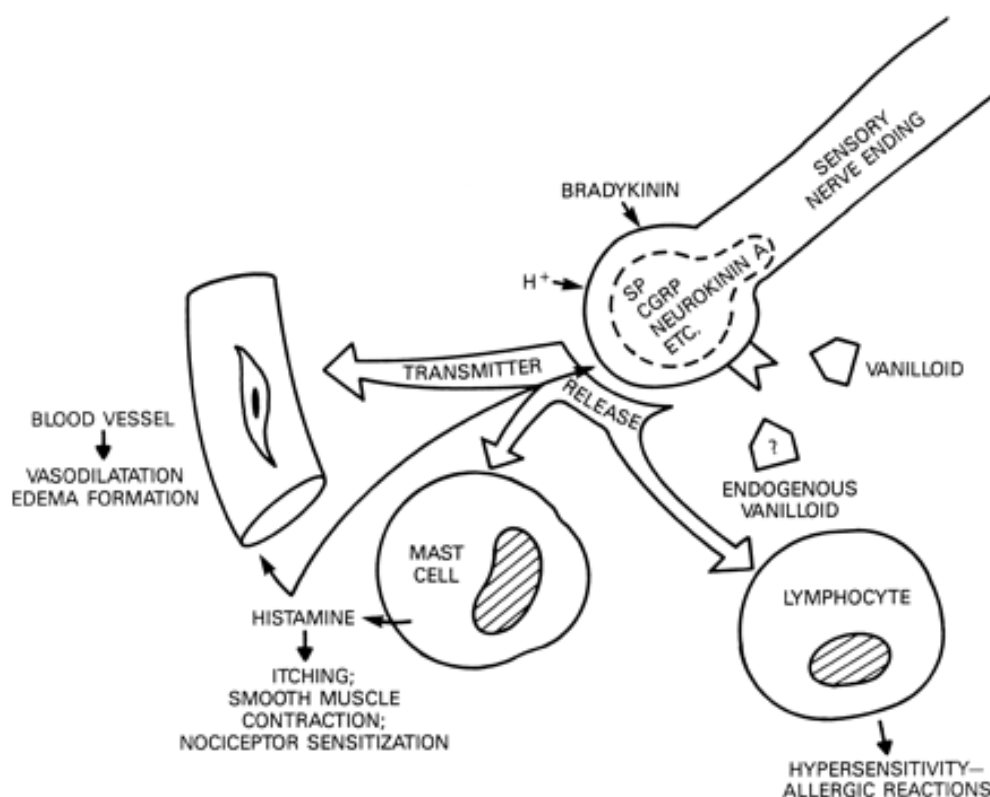
5.5.2 Les mécanismes d'actions périphériques et centraux des récepteurs vanilloïdes

Les neurones sensibles aux molécules de la famille des vanilloïdes sont majoritairement peptidergiques et de type C non myélinisé. Par contre, il existe aussi d'autres populations de neurones ayant des fibres de larges diamètres présentant aussi une sensibilité aux vanilloïdes, ce sont principalement des fibres de type A δ . Les fibres des RV de petit diamètre sont sensibles polymodales alors que celles de grand diamètre présentent des nocicepteurs sensibles à la chaleur et à la déformation mécanique (Meyer *et al.*, 1994). Il existe donc une grande diversité des neurones sensibles aux vanilloïdes.

Les RV présentent une morphologie hétérogène et une neurochimie particulière (Szallasi et Blumberg, 1999). Le nombre de nocicepteurs sensibles aux vanilloïdes peut être modulé suite aux diverses interactions caractéristiques d'une réaction inflammatoire. Un exemple de ce concept peut être illustré par la mention d'une des fonctions des RV où, suite à la stimulation d'un récepteur, une réaction d'allergie-hypersensibilité est induite et stimule la libération de substances dites proinflammatoires tels que la bradykinine, la substance P, l'histamine et les protons (H⁺). La bradykinine, par exemple, est capable de recruter des neurones (diamètre intermédiaire) normalement insensibles à la capsaïcine, en modifiant leur seuil d'excitabilité. Elle peut augmenter le nombre de récepteurs sensibles aux vanilloïdes et donc d'augmenter d'une façon

significative le nombre de nocicepteurs activés. La capsaïcine induit une réaction inflammatoire locale par la libération de peptides tels que la SP, la somatostatine et la calcitonine. La capsaïcine induira également un potentiel d'action par le déplacement vers l'espace intracellulaire d'ion calcium. Ce mouvement ionique vers l'intérieur de la synapse établit un stade dit réfractaire réversible qui explique la phase de désensibilisation. Ceci est produit en outre par l'imposition d'un changement de conformation du récepteur et induira une fermeture des canaux empêchant la propagation de tout autre potentiel d'action (Szallasi et Blumberg, 1999). Cette désactivation du récepteur explique l'arrêt de la libération périphérique de neuropeptides (Gamse *et al.*, 1982; Miller *et al.*, 1982; Taylor *et al.*, 1984). En conséquence, sachant que la substance P joue un rôle primordial dans la transmission de la douleur au niveau du SNC, la modulation des récepteurs vanilloïdes centraux, induit un stade réfractaire réversible qui affectera la transmission de la douleur à ce niveau. Puisque les neurones sensibles aux vanilloïdes peuvent aussi relâcher du glutamate, leur désactivation diminuera l'état d'excitabilité des cellules (Sakurada *et al.*, 1998). Ainsi, suite à une modification des récepteurs centraux par la liaison de la capsaïcine, il y aura diminution de la relâche de glutamate ce qui aura un effet analgésique (Figure 17).

Figure 17 : Illustration représentant les terminaisons nerveuses périphériques sensibles aux vanilloïdes en prenant pour exemple l'inflammation neurogénique et les réactions d'hypersensibilité. Des stimulations exogènes et endogènes peuvent induire les récepteurs vanilloïdes et ainsi ils libèrent certains neuropeptides proinflammatoires. Certaines de ces molécules ont leurs récepteurs propres, comme la bradykinine mais d'autres agissent par leurs interactions avec les récepteurs vanilloïdes. Les protons, la substance P, le CGRP et bien d'autres agissent sur les récepteurs vanilloïdes en influençant divers mécanismes de l'inflammation.



Source : Szallasi, A. et P. Blumberg. 1999. Vanilloid (Capsaicin) Receptors and Mechanisms. *Pharmacological Review*. 51(2): pp.159-212.

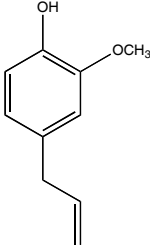
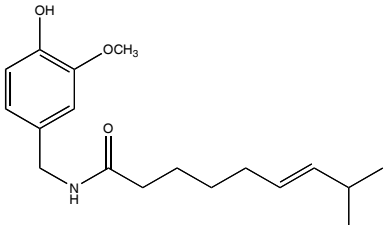
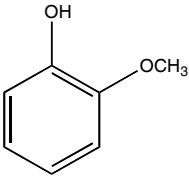
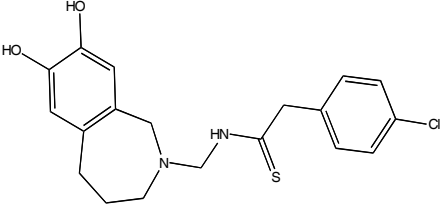
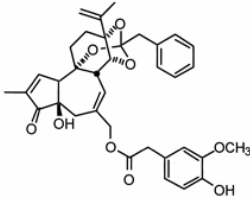
L'activation des RV peut également se faire par un mécanisme métabotrope. Cortright et Szallasi (2004) montrent que les TRPV1 sont

soumis à de multiples voies de contrôle. Ces voies de contrôle s'organisent en quatre grandes familles, qui sont : la phosphorylation réversible (catalysée par des kinases intrinsèques et par des phosphatases), la formation d'hétéromères du récepteur TRPV1 (différents domaines), la compartimentalisation au niveau du réticulum endoplasmique (IP3 dépendant et IP3 non dépendant) et de la membrane cellulaire, finalement le contrôle de l'expression génomique (Cortright et Szallasi, 2004). Les RV sont donc en partie régulés par des mécanismes impliquant des seconds messagers. Différents types de systèmes ont été identifiés, soient, le système utilisant l'AMP cyclique et les protéines kinases A, le système utilisant le phosphatidyl inositol et les protéines kinases C et finalement le système utilisant l'acide arachidonique et les lipo-oxygénases et les cyclo-oxygénases (Di Marzo *et al.*, 2002). La troisième voie met en place la complexité du fonctionnement de ces récepteurs qui se retrouvent non seulement sur la membrane cellulaire où ils agissent comme des canaux calciques non-sélectifs mais aussi sur le réticulum endoplasmique (Liu *et al.*, 2003 et Marshall *et al.*, 2003).

5.5.3 Les molécules agonistes et antagonistes

Quelques substances ont démontré un effet antagoniste sur les récepteurs vanilloïdes. Parmi ceux-ci, nous retrouvons le guaiacol (Ohkubo, 1997), la zingérone (Liu et Simon, 1996), le scutigéral (Szallasi et Blumberg, 1999), l'olvanil (Lawand *et al.*, 1997), la trialkylglycine (Garcia-Martinez *et al.*, 2002) et l'eugénol (Szallasi et Blumberg, 1999). La capsaïcine et la résinifératoxine démontrent des effets agonistes spécifiques et non réversibles de ces récepteurs (Szallasi et Blumberg, 1993 ; 1999). La capsazépine possède un effet sélectif antagoniste et compétitif en annulant l'analgésie induite (Ohkubo, 1997). Yang *et al* (2003) démontrent que l'eugénol agit sur les récepteurs TRPV1.

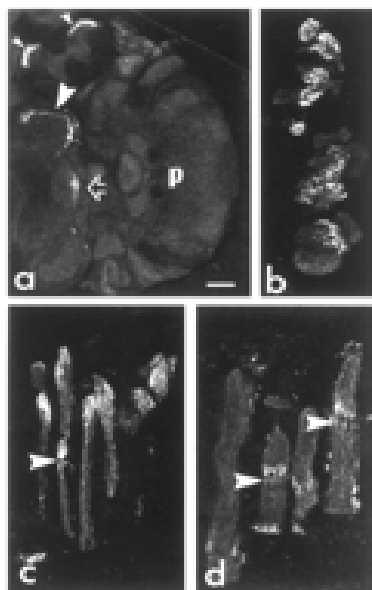
Tableau I : Structure moléculaire des différents agonistes et antagonistes des récepteurs TRPV1

Molécules antagonistes	Molécules agonistes
<p>Eugénol:</p> 	<p>Capsaïcine:</p> 
<p>Guaiacol:</p> 	<p>Capsazépine:</p> 
	<p>Résinifératoxine:</p> 

5.6 Le marquage des récepteurs TRPV1

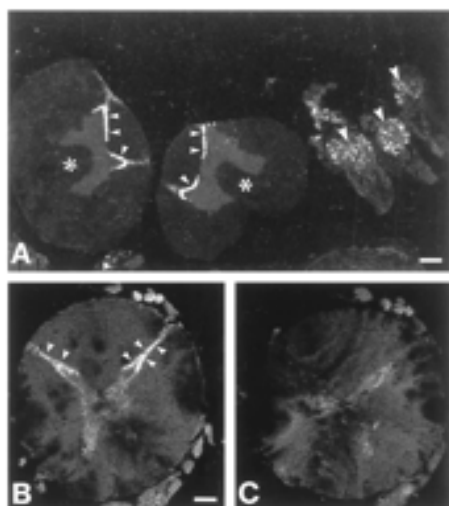
En se liant de façon irréversible et spécifique aux récepteurs vanilloïdes, la résinifératoxine tritiée (RTX- ^3H) permet d'identifier la localisation de ces récepteurs. Des images autoradiographiques de coupes du système nerveux sont réalisées et ces images montrent des zones fluorescentes où la résinifératoxine se lie aux RV (Szallasi *et al.*, 1994) (Figure 18 et 19). On retrouve entre autres des récepteurs vanilloïdes dans la corne dorsale de la moelle épinière au niveau des couches 1 et 2 (zone supramarginale et substance gélatineuse).

Figure 18 : Identification à l'aide de la résinifératoxine [^3H]RTX et visualisation grâce à l'autoradiographie des sites de liaison sur les neurones ayant des récepteurs vanilloïdes chez le rat. A noter la radio-opacité des récepteurs au niveau de la racine dorsale (figure b, échantillons du haut), le nerf trijumeau (figure b, échantillons du bas) et les ganglions nodose (ganglion inférieur caudal du 10^{ième} nerf crânien (vague)) (figure c) contenant les corps cellulaires des neurones sensibles aux vanilloïdes. Les fibres du SNC au niveau des ganglions de la racine dorsale, du ganglion du nerf trijumeau et ganglion nodose se terminent au niveau de la corne dorsale de la moelle épinière (Figure a, petite tête de flèche), le noyau du nerf trijumeau de la medulla oblongata (Figure a, grosse tête de flèche) et la zone postrema/noyau de la voie solitaire (Figure a, tête de flèche vide). Les figures c et d représentent les axones périphériques du ganglion nodose et des ganglions de la racine dorsale traversant respectivement dans les nerfs sciatique et vague.



Source : Szallasi, A. et P. Blumberg. 1999. Vanilloid (Capsaicin) Receptors and Mechanisms. *Pharmacological Review*. 51(2): pp.159-212.

Figure 19: Autoradiographies de coupes transversales de la moelle épinière à l'aide de la résinifératoxine [^3H]RTX chez le porc (Figure A et têtes de flèche) et chez l'humain (Figure B et têtes de flèche). A noter la présence de récepteurs au niveau de la corne dorsale de la moelle épinière. La figure C représente la spécificité de la liaison de la [^3H]RTX par l'absence totale de radioactivité suite au traitement de la tranche avec de la résinifératoxine non radioactive.



Source : Szallasi, A., P.M. Blumberg, S. Nilsson, T. Hökfelt et J.M. Lundberg. 1994. Visualization by [^3H]resiniferatoxin autoradiography of capsaicin-sensitive neurons in the rat, pig and man. *European Journal of Pharmacology*. 264: pp.217-221.

5.7 Les récepteurs GABA et l'eugénol

Les récepteurs GABA constituent la catégorie de récepteurs inhibiteurs la plus répandue dans le SNC des mammifères (Cooper *et al.*, 1996). Les récepteurs GABA peuvent être retrouvés autant sur la membrane pré-synaptique que post-synaptique. Ces derniers sont activés par la liaison d'une molécule agoniste et, par l'intermédiaire d'un second messager, stimulent un mouvement d'ions transmembranaires vers l'intérieur de la cellule. Ces changements de perméabilité aux ions (Cl^- et K^+) hyperpolarisent (post-synaptique) ou

dépolarisent (pré-synaptique) la membrane neuronale (Cooper *et al.*, 1996). Les récepteurs GABA sont divisés en sous-groupes en fonction de différentes caractéristiques spécifiques. En considérant leur localisation au niveau du SNC, les seconds messagers utilisés et leurs effets pharmacologiques, il a été possible de subdiviser les récepteurs GABA en sous-types A et B. Les récepteurs GABA_A sont les plus répandus dans le système nerveux des mammifères (Cooper *et al.*, 1996) et des amphibiens (Davidoff, 1972). Ces récepteurs, activés par les benzodiazépines, sont étudiés puisqu'ils sont associés au traitement de maladies neurogéniques. En se liant aux récepteurs GABA_A, les benzodiazépines induisent l'ouverture des canaux ioniques transmembranaires au chlore et créent un mouvement vers l'intérieur de la cellule produisant une hyperpolarisation de la cellule, inhibant son activité. Ces récepteurs inhibiteurs antagonisent l'excitation neuronale hyperpolarisant la membrane jusqu'au potentiel d'équilibre du chlore, c'est-à-dire entre -60 et -80 mV (Aoshima et Hamamoto, 1999). Cette hyperpolarisation induite par les benzodiazépines explique leurs effets de dépression sur le SNC, d'anxiolytiques, d'anticonvulsivants et de sédatifs. Davidoff (1972) démontra que les récepteurs GABA_A sont aussi présents en grande quantité dans le système nerveux central des amphibiens. Aoshima et Hamamoto (1999) ont démontré aussi que plusieurs autres substances présentent des effets agonistes des récepteurs GABA_A. Les parfums, les huiles essentielles et les phytonides comme par exemple l'hinokitiol, le pinène, la citronnelle et l'eugénol sont quelques exemples de substances qui démontrent aussi des effets GABAergiques. L'eugénol peut donc produire un effet sédatif chez les amphibiens et les mammifères par l'activation des récepteurs GABA_A.

5.8 Les récepteurs du glutamate et l'eugénol

Au niveau de la corne dorsale de la moelle épinière, des récepteurs NMDA jouent un rôle dans la transmission de la douleur (Szallasi et Blumberg,

1999). Lors d'une stimulation douloureuse, les terminaisons nerveuses centrales sensibles aux vanilloïdes relâcheront plusieurs substances dont le glutamate (Sakurada *et al.*, 1998). En se liant aux récepteurs NMDA, le glutamate diminue le seuil d'excitabilité des RV (Sakurada *et al.*, 1998). L'eugénol pourrait également diminuer la quantité de calcium transporté via les récepteurs NMDA. Cela expliquerait également l'effet antihyperalgésique de l'eugénol (Wie *et al.*, 1997).

6. La spectrométrie de masse

6.1 Généralités

L'isolation, la caractérisation et la détermination de la concentration d'une molécule ou d'un ensemble de molécules constituent la base d'une étude pharmacocinétique. Suite à l'administration par gavage ou par voie intraveineuse de la molécule étudiée, le médicament et les métabolites peuvent ainsi être identifiés et quantifiés précisément par une technique analytique nommée spectrométrie de masse. La caractérisation par spectrométrie de masse des médicaments et des métabolites est basée sur les caractéristiques moléculaires uniques de chaque produit (masse moléculaire et structure). Chacune des molécules étudiées est constituée d'amalgame de groupements et fonctionnalités formant sa structure lui conférant des propriétés chimiques et physiques distinctes permettant son identification. Plusieurs types de spectromètre de masse existent sur le marché. Pour les fins de nos études, nous avons choisi de travailler avec un spectromètre de masse en tandem de type quadropole équipé d'une source électrospray (Sciex API 3⁺ (MS/MS)) pour ses caractéristiques de grande sensibilité, de linéarité et de sélectivité pour la détection de molécules dans des matrices complexes.

Afin d'étudier la pharmacocinétique d'une molécule comme l'eugénol, différentes techniques analytiques ont été décrites dans la littérature utilisant principalement des systèmes HPLC liés avec un détecteur ultraviolet (UV) qui

présente une sélectivité et une sensibilité limitées (Fischer et Dengler, 1990). Différentes alternatives analytiques ont été suggérées où la caractérisation et la quantification de l'eugénol furent développées et validées en utilisant un spectromètre de masse de type trappe ionique et quadrupole en tandem (Beaudry *et al.*, 2006). Au cours des dernières années, l'utilisation de spectromètres de masse de type trappe ionique et quadrupole en tandem fut la technique de choix pour l'identification et l'élucidation de structure ainsi que la quantification précise des médicaments dans les matrices biologiques. Au cours des quinze dernières années, coïncidant avec le développement de source ionique compatible avec l'introduction de liquide, la spectrométrie de masse couplée à la chromatographie liquide à haute performance (HPLC), sont devenues la méthode de choix pour la bioanalyse (Jemal, 2000). Les méthodes développées ont démontré une précision, une sensibilité et une spécificité améliorées. De plus, elles ont procuré de l'information sur la structure moléculaire des produits analysés.

En ce qui concerne l'eugénol, l'analyse et la détection comportent des obstacles importants dus, à la nature très liposoluble, à l'absence de groupements ionisables et à un pH compatible avec les méthodes HPLC (pH < 8). La structure moléculaire de l'eugénol suggère une efficacité à être ionisée en milieu aqueux limité (pH opérationnel de 3 à 8 sur colonne HPLC), ce qui a pour conséquence de limiter la détection en utilisant une source électrospray comme interface au spectromètre de masse. Il était alors important de mettre en place une stratégie qui améliore l'efficacité d'ionisation de l'eugénol. Elle augmente ainsi la sensibilité de l'instrument et réduit la limite de détection afin de mieux caractériser le profil pharmacocinétique. La stratégie retenue, développée et validée, inclut la dérivation (modification chimique d'une molécule dans le but de produire un dérivé présentant des propriétés chimiques différentes de la molécule initiale et permettant la quantification de cette dernière (wikipedia)) de l'eugénol avec le chlorure de dansyl afin d'introduire

une amine tertiaire sur la molécule et ainsi augmenter l'efficacité d'ionisation en milieu aqueux.

6.2 Les étapes préliminaires à l'analyse

Avant de débiter une analyse en spectrométrie de masse toute une série de considérations doivent d'abord être étudiées dans le but de choisir et de régler les différentes étapes de l'analyse de la molécule considérée. L'identification des propriétés chimiques et physiques des molécules à analyser permet de développer une stratégie de développement pour l'extraction et la chromatographie ainsi que l'optimisation des conditions d'ionisation pour l'introduction dans le spectromètre de masse.

6.2.1 Détermination des propriétés chimiques et physiques

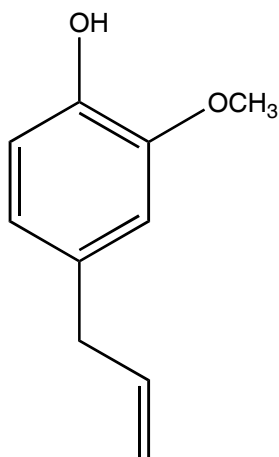
La première étape du développement d'une méthode d'analyse basée sur la chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse est de rassembler les informations moléculaires pertinentes des médicaments et des métabolites à analyser (masse moléculaire, groupement fonctionnel, pKa, log P). Initialement, il est important d'étudier la structure moléculaire du médicament et d'évaluer ses caractéristiques propres. Le pKa d'une molécule est fonction des différents groupements fonctionnels. L'évaluation du pKa est importante afin de déterminer l'état de la molécule dans un milieu aqueux (forme ionisée ou non). Cette évaluation peut être faite visuellement par l'identification des groupements acides et basiques présents sur la molécule. Les molécules utilisées à des fins thérapeutiques contiennent souvent des groupements fonctionnels tels que des amides, amines, esters, sulfates, phosphates, acides carboxyliques, phénols et bien d'autres. Ces différents groupements ont des propriétés chimiques distinctes qui influencent l'acidité relative estimée par les valeurs de pKa servant à définir la solubilité de la molécule en milieu aqueux. Il est essentiel d'identifier les propriétés chimiques dérivées des groupements fonctionnels afin

de développer et optimiser les conditions d'extraction, de chromatographie, d'ionisation et d'isolation par le spectre de masse.

Les analyses par spectrométrie de masse requièrent une étape d'ionisation car un spectre de masse manipule et sépare des ions en phase gazeuse. La principale source d'ionisation utilisée pour coupler un chromatographe en phase liquide et un spectre de masse est l'électrospray. Cette technique est très intéressante car les ions observés seront directement reliés à la chimie des molécules en phases aqueuses. Par contre, c'est une limitation importante de cette technique car les molécules à analyser doivent être sous forme ionique en solution pour être observées. Les molécules compatibles avec l'ionisation par électrospray doivent contenir un ou des groupements acides ou basiques afin d'observer les ions $[M+nH]^{n+}$ ou $[M-nH]^{n-}$ respectivement en mode positif ou négatif.

L'eugénol est classé dans la catégorie des phénols (Figure 20). Il se présente donc comme un acide faible ($pK_a = 9$ à 10), qui est très peu soluble dans l'eau mais soluble dans un solvant organique à faible polarité. Donc en milieu totalement aqueux, l'eugénol est sous sa forme ionisée $[M-H]^-$ à un pH de 11 à 12 ce qui est un pH non recommandé pour la chromatographie liquide sur colonne à base de silice en phase renversée. De plus, afin de faciliter l'évaporation de la phase mobile à l'interface du spectre de masse et ainsi maximiser l'efficacité d'introduction des ions, nous utilisons des phases mobiles contenant un ratio de solvant organique miscible dans l'eau supérieur à 50% en général ce qui a pour conséquence de réduire considérablement la mobilité réduisant de beaucoup la concentration des ions $[M-H]^-$ en solution.

Figure 20 : Structure moléculaire de l'eugénol.



6.2.2 Échantillonnage

Cette étape consiste en la collecte des échantillons sanguins ou métaboliques (urinaires) qui seront soumis par la suite à l'analyse. Cette collecte doit présenter toutes les caractéristiques de rigueur d'une étude scientifique. En vue de l'analyse, les échantillons doivent, dépendant du type d'étude, subir quelques modifications comme par exemple la centrifugation (3200 tours/min, 4°C pendant 10 min), la congélation (-80 °C), la préservation dans des substances types comme l'EDTA. Il est important dans cette étape de bien définir les caractères chimiques de la molécule à étudier car certaines manipulations peuvent modifier de façon importante et permanente la structure moléculaire du produit à être étudié et ainsi modifier sa détection. Par exemple, la préservation des échantillons dans une solution d'EDTA va lier le calcium présent dans l'échantillon. Il est donc important, dans une situation similaire, de déterminer à l'avance si le calcium est un facteur essentiel à l'analyse.

6.2.3 Extraction

L'isolation du médicament et de ses métabolites requiert une extraction. Plusieurs approches d'extraction existent dans le but d'isoler différents types de molécules. Il y a trois types différents d'extraction normalement utilisés en

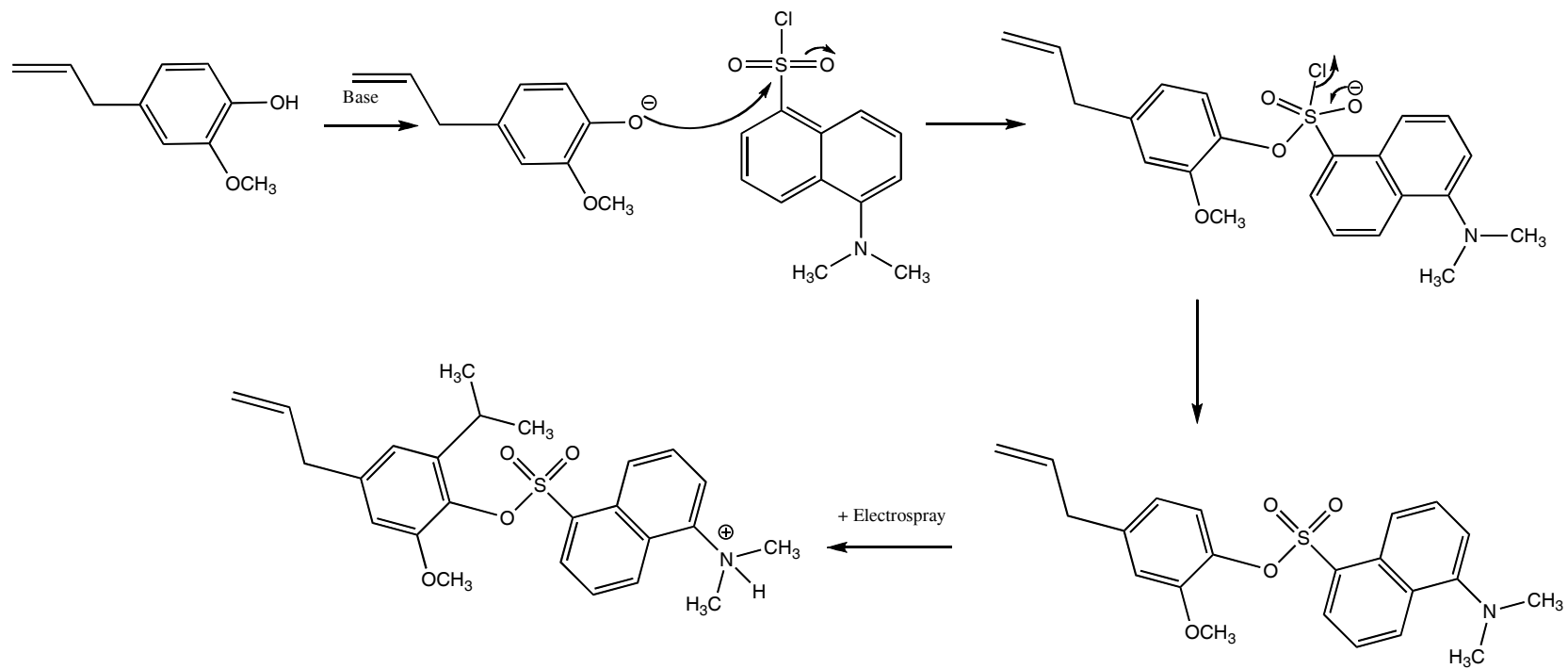
bioanalyse. L'extraction liquide-liquide est utilisée principalement pour l'analyse de produit présent en très faible concentration. L'extraction sur phase solide est surtout utilisée couplée avec des systèmes robotiques et dont la chimie est comparable à la chromatographie liquide. Elle est une alternative aux méthodes liquide-liquide mais beaucoup plus coûteuse. La dernière technique, très utilisée de par sa simplicité, consiste en l'extraction par précipitation des protéines. Elle présente plusieurs avantages dont la rapidité d'exécution, les frais réduits liés à la procédure, nécessite peu de matériel et généralement le recouvrement est élevé (> 90%). L'extraction de l'eugénol des matrices biologiques a été développée en utilisant une méthode d'extraction par précipitation des protéines utilisant l'acétone comme solvant organique. Cette méthode est aussi compatible avec la procédure de dérivation. Le solvant organique changera et brisera la conformation des complexes [protéines-(H₂O)_n]. Il brisera les liens de Van der Waals entre les protéines et la molécule à étudier. La précipitation des protéines sera induite par la dénaturation des complexes protéiques ce qui les rend insolubles dans le solvant organique. Par la suite, une simple centrifugation de l'échantillon permettra la séparation physique du solvant d'extraction et les protéines précipitées. La méthode optimisée d'extraction de l'eugénol utilise l'acétone comme agent de précipitation à un ratio 1 : 5 (solvant organique miscible avec l'eau en une phase).

6.2.4 Dérivation

Tel que mentionné précédemment, l'eugénol n'est pas sous sa forme ionisée dans les conditions normales de chromatographie liquide compatible avec l'ionisation par électrospray. Plusieurs stratégies ont été évaluées pour améliorer l'efficacité d'ionisation, mais la dérivation fut la plus prometteuse. L'évaluation initiale de la limite de quantification sans l'utilisation d'agent de dérivation, ne nous permettait pas de quantifier l'eugénol à des

concentrations inférieures à 1000 ng/mL ce qui aurait eu pour effet de limiter notre capacité à bien caractériser la phase d'élimination de l'eugénol. En dérivant l'eugénol avec le chlorure de dansyl, nous avons été en mesure d'abaisser la limite de quantification à 20 ng/mL. Le gain de sensibilité observé était de 100 à 200 ce qui nous permettait théoriquement d'abaisser la limite de quantification à 5 ou 10 ng/mL ce qui n'était pas possible car la limite supérieure était de 20 000 ng/mL et la linéarité est limitée à trois ordres de magnitude pour cette méthode d'analyse. Le phénol présent sur l'eugénol peut réagir avec le chlorure de dansyl (figure 21). Cette dérivatisation est efficace avec les peptides et phénols (Rhys *et al.*, 1982) et permet l'introduction d'une amine tertiaire basique ($pK_a \approx 11$) sur l'eugénol ce qui rend le dérivé ionique à pH inférieur à 9. La dérivatisation avec le chlorure de dansyl a été utilisée dans le passé dans le but d'augmenter l'intensité du signal pour des analyses de peptides et d'acides aminés par électrospray (ESI) (Quirke *et al.*, 1994). Plus récemment, on a démontré que l'analyse d'une autre molécule analogue au phénol, le propofol, est significativement améliorée par l'utilisation de cette méthode de dérivatisation (Beaudry *et al.*, 2005).

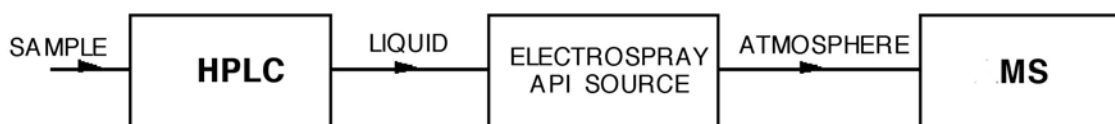
Figure 21 : Réaction de l'eugénol avec le chlorure de dansyl.



6.3 L'analyse en spectrométrie de masse

L'identification précise des différentes molécules se fait grâce à l'appareil LC-MS/MS. Le type d'analyse effectué est caractérisé par les fonctions du spectre de masse utilisé. L'échantillonneur automatique injecte un aliquot de l'échantillon extrait qui est chromatographié en phase liquide pour être ensuite ionisé et évaporé par la source ionique. Les ions produits à pression atmosphérique sont ensuite transportés par un champ électrique intense vers l'orifice du spectre de masse (Figure 22).

Figure 22 : Représentation des trois étapes successives par lesquelles un échantillon doit passer pour être analysé en spectrométrie de masse.



6.3.1 Appareillage disponible et ses capacités

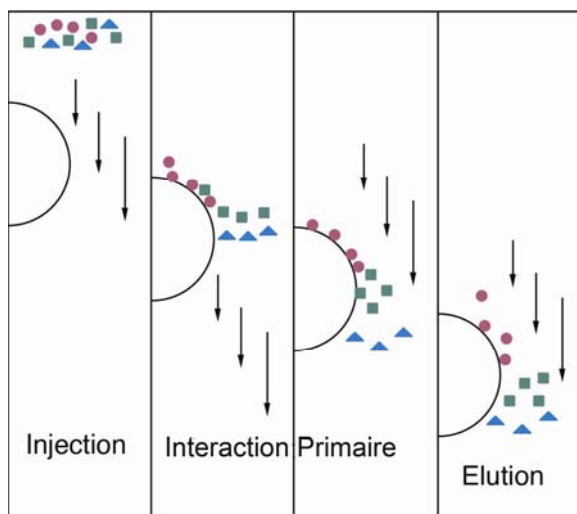
Les analyses ont été effectuées avec un spectromètre de masse en tandem de type quadropole utilisant une cellule de collision à haute pression (Sciex API 3⁺ (MS/MS)). Nous avons utilisé cet appareil pour identifier et quantifier les médicaments primaires et leurs métabolites par leurs masses et leurs fragments respectifs spécifiques à leurs structures moléculaires.

6.3.2 Composantes du système et ses fonctions propres

Suite à la préparation de l'échantillon par le procédé de précipitation des protéines décrit plus tôt, l'échantillon est injecté dans le système de chromatographie liquide à haute performance (HPLC). Les analytes sont introduits dans la phase mobile et entrent en interaction avec la phase stationnaire solide de la colonne. Les molécules sont chromatographiées en

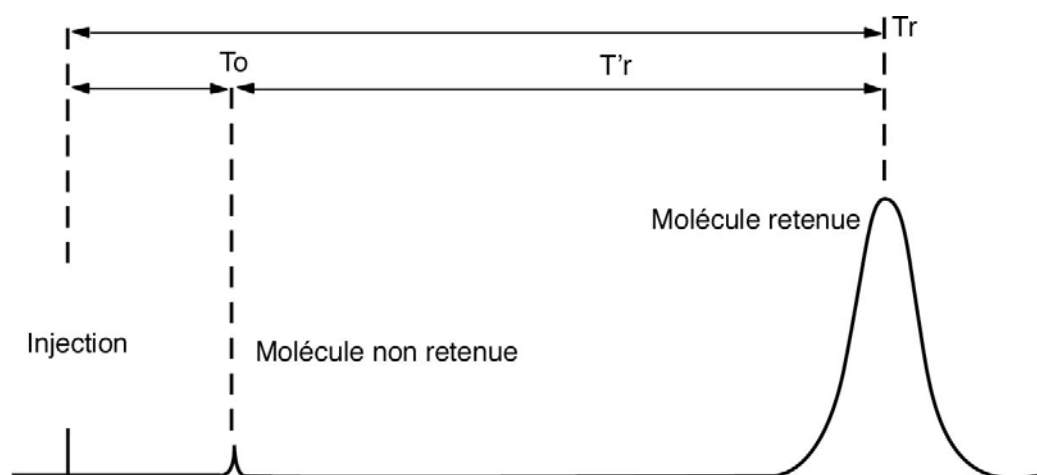
fonction de leur affinité spécifique pour la phase stationnaire et mobile sélectionnée. La force et le type des interactions avec la phase stationnaire (solide) définiront le degré de rétention d'une molécule. Plus une molécule est lipophile, plus les interactions de van der Waals seront importantes sur des colonnes de phase inversée (phase mobile polaire, phase stationnaire non polaire). L'eugénol est chromatographié avec une colonne de type C₈ (octyl (approximativement 12 % de carbone sur la structure)). La phase mobile utilisée est composée d'acétonitrile et d'une solution d'acide formique. Les interactions primaires avec la colonne seront de type van der Waals, mais il y aura aussi des interactions secondaires (ioniques) entre la surface de silice et l'eugénol dérivé (Figure 23a).

Figure 23a : Représentation des différentes phases suite à l'injection d'un échantillon dans une colonne de chromatographie liquide à haute performance (HPLC). Les formes géométriques représentent les différentes composantes présentes dans l'échantillon lors de l'injection. Ces molécules interagissent avec la phase solide de différentes façons, c'est l'interaction primaire. Ces interactions induiront des temps de rétention variable selon les différentes molécules, c'est l'élution.



Le temps de rétention observé est caractéristique des forces d'interaction entre la molécule et la colonne ainsi que la solubilité de l'analyte dans la phase mobile (Figure 23b).

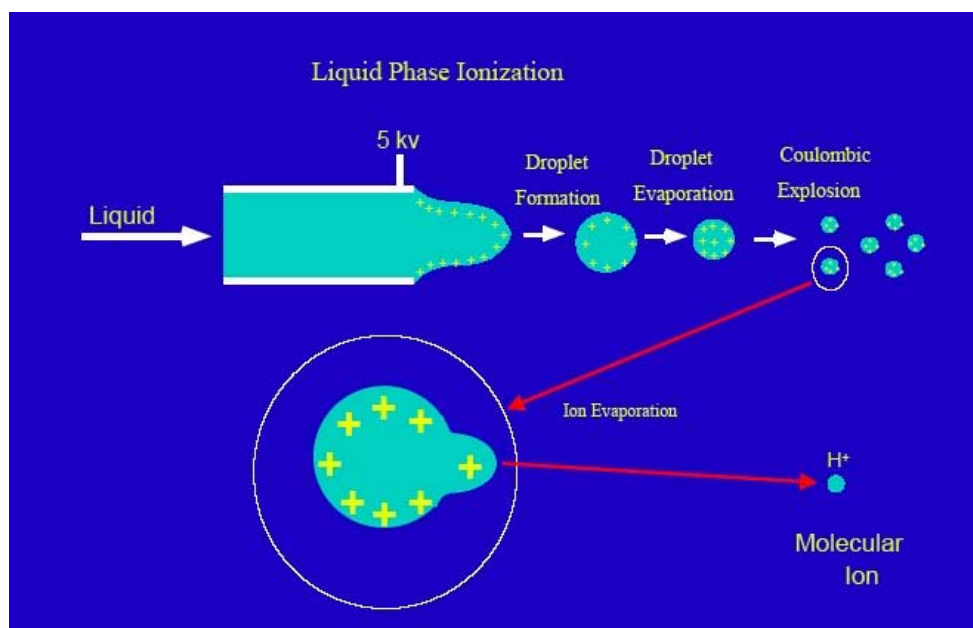
Figure 23b : Suite à l'injection d'un échantillon dans le HPLC, il y aura séparation des molécules par différentes interactions avec la phase solide et la phase liquide présentes dans la colonne choisie. T_r ; temps de rétention, T'_r : temps relatif et T_0 : Temps au point zéro.



L'ionisation de l'analyte, la nébulisation de la phase mobile et le transport des ions sont nécessaires afin d'introduire les molécules dans le spectre de masse et manipuler les ions. Un aliquot de l'effluent de la colonne analytique variant de 10 à 50 $\mu\text{L}/\text{min}$ est généralement introduit dans une électrode de 100 μm de diamètre soumis à un voltage de 3000 à 5000 V. L'application d'un tel voltage sur un liquide ayant une conductivité électrique génère un phénomène appelé cône de Taylor. Le cône de Taylor est partiellement oscillatoire et se brise pour former des gouttelettes de diamètre allant de 100 nm à 50 μm selon le type de phase mobile (tension de surface), le voltage, la température et l'interface. Ces gouttelettes produiront par la suite des ions gazeux par un

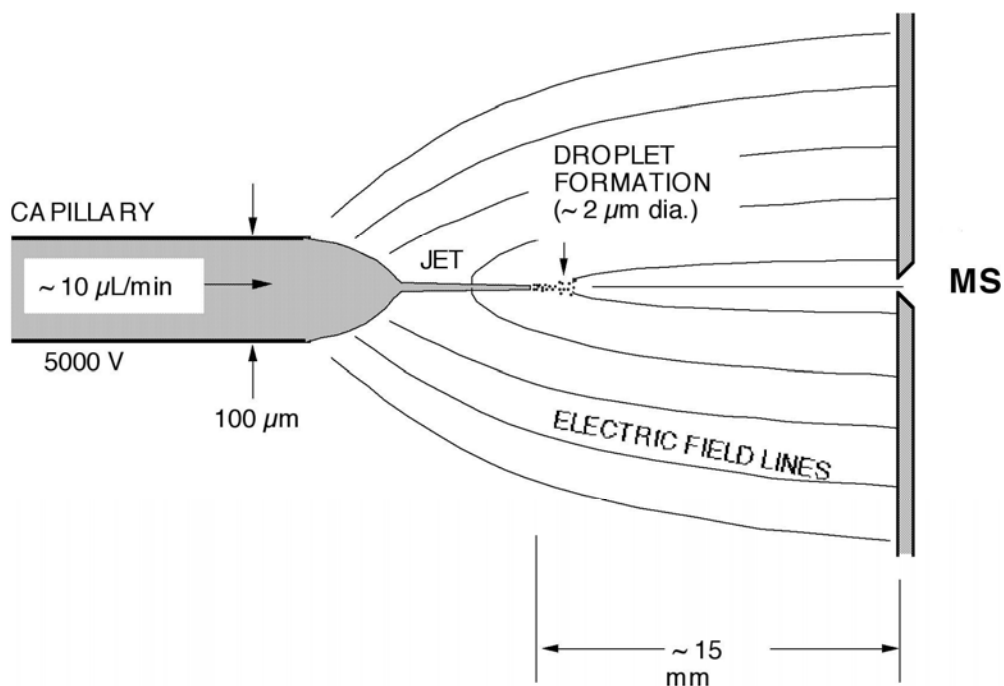
processus d'évaporation jusqu'à l'atteinte de la limite de Raleigh. À la limite de Raleigh, on observe une explosion coulombique générant des ions gazeux qui sont alors transportés vers l'orifice du spectre de masse par le champ électrique intense produit par la source ionique (Figure 24a).

Figure 24a : Schéma représentant les différentes étapes menant à l'isolation ionique d'une molécule. Suite à l'injection de l'échantillon, il est soumis à une charge importante qui forcera la formation d'une gouttelette. L'évaporation réduira par la suite les dimensions de cette dernière jusqu'à ce qu'une explosion coulombique se produise. Cette explosion permettra l'isolation ionique de la molécule.



Cette réaction se produit dans une chambre soumise à un intense champ électrique entre les électrodes d'injection et la plaque du spectromètre. Ainsi, par ce champ électrique, les ions + sont attirés vers l'entrée du spectromètre pour y être analysés (Figure 24b).

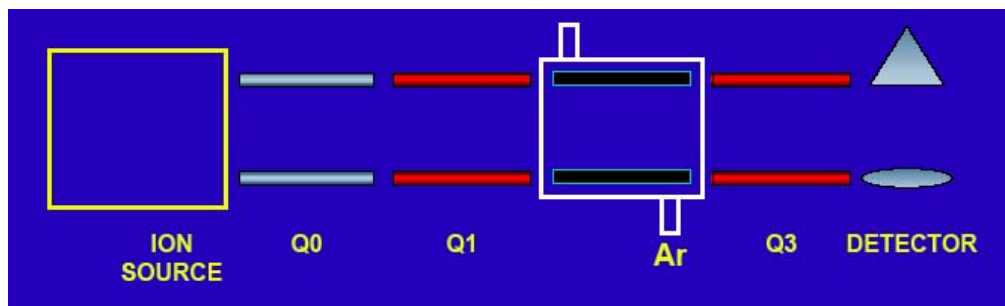
Figure 24b : Représentation d'un électrospray typique avec l'orientation des ions vers la plaque du spectromètre de masse (MS).



Source : Beaudry, F. et P. Vachon. 2006. Electrospray ionisation suppression, a physical or chemical phenomenon? *Biomedical chromatography*. 20: pp.200-205.

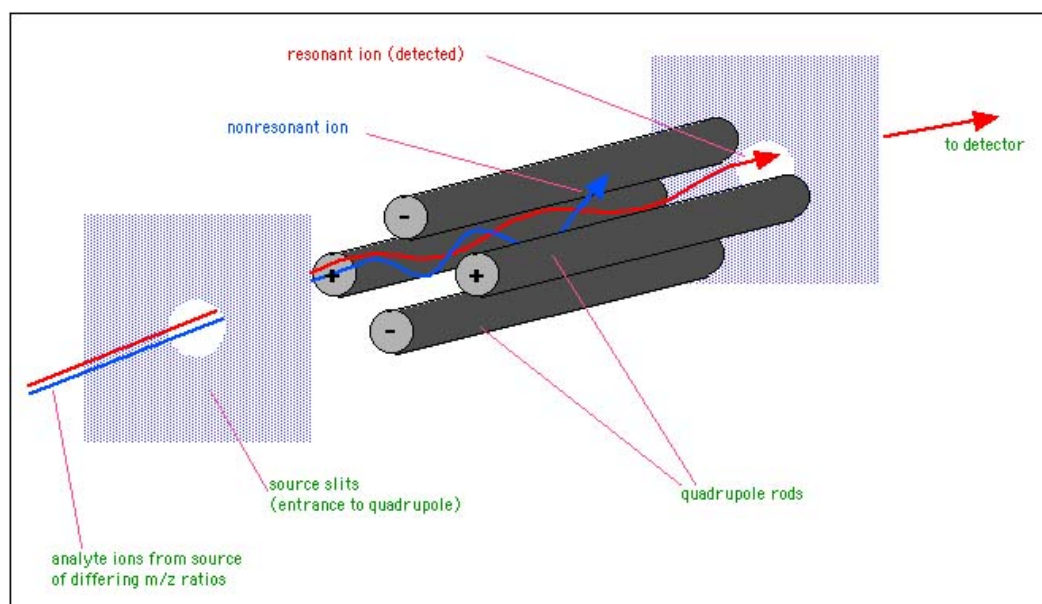
Le spectromètre de masse est divisé en plusieurs sections appelées Q0, Q1, Q2 et Q3 (Figure 25).

Figure 25 : Représentation des différentes sections constituantes du spectromètre. Q0 : chambre 0, Q1 : chambre 2, Ar : argon, Q3 : chambre 3.



Chacune des sections contient des quadropoles constitués de quatre cylindres métalliques entre lesquels les ions oscillent. Les ions parcourent une trajectoire stable en fonction du ratio masse / charge et les voltages appliqués seront transmis dû à une différence de potentiel entre les quadropoles jusqu'à la prochaine section de l'instrument. Tous les autres ions présentant des oscillations atypiques seront, par le fait même, éjectés de la trajectoire et donc éliminés (Figure 26).

Figure 26 : Représentation d'une des sections du spectromètre où quatre tiges métalliques chargées induisent une oscillation ionique. **En bleu** nous retrouvons le parcours d'un ion présentant une oscillation atypique et qui sera donc éliminé. **En rouge**, l'ion dessine un parcours typique et sera donc sélectionné pour passer à la chambre suivante.



Le spectre de masse opère à une pression de 2×10^{-5} Torr et l'introduction des ions génère une dispersion importante créant un Mach disque. Le premier quadropole (Q0) présent immédiatement après l'entrée sert essentiellement à la

focalisation et la transmission des ions vers le second quadrupole (Q1) des ions. La deuxième section comprend un quadrupole (Q1) dont une combinaison de voltage AC et DC sert pour une première sélection des ions basée sur le ratio masse / charge ($\pm 0,5$ Da) selon un parcours d'oscillation spécifique. Les ions sont alors transportés dans la chambre de collision (Q2) à une vitesse prédéterminée et fonction de la différence de potentiel entre Q1 et Q2. Les ions entrent en collision avec des atomes d'argon et une fragmentation est induite. Les fragments observés sont caractéristiques de la structure moléculaire des analytes introduits et fonction de l'énergie de collision. Les fragments sont ensuite transmis vers une quatrième section composée d'un autre quadrupole (Q3) dont une combinaison de voltage AC et DC sert pour une seconde sélection des ions basée sur le ratio masse / charge ($\pm 0,5$ Da) selon un parcours d'oscillation spécifique. Finalement, les fragments sélectionnés entrent en contact avec une plaque de Faraday, transmettant les électrons vers un cône enduit d'or plaqué servant à la multiplication du signal transmis de façon proportionnelle à la quantité d'électrons qui la frappent (Figure 27). En d'autres termes, plus la quantité d'électrons frappant la plaque est grande, plus le signal transmis sera intense. Le signal observé sera alors proportionnel à la concentration des analytes introduits dans le spectre de masse. Ce signal peut se lire sur un écran d'ordinateur et dessine des pics de hauteur proportionnel à la concentration des électrons. Pour chaque molécule (une masse/charge spécifique), un pic sera lu sur l'ordinateur. La figure 28 en donne un exemple.

Figure 27 : Quantification des molécules analysées. Un ion présentant une oscillation typique sera amené à frapper la plaque de Faraday et ainsi émettre des électrons. Ces électrons viendront par la suite en contact avec le multiplicateur d'électrons. Selon la quantité d'électron transmis, un courant sera créé. Ce courant sera par la suite caractérisé dans le but de produire un signal numérique interprétable.

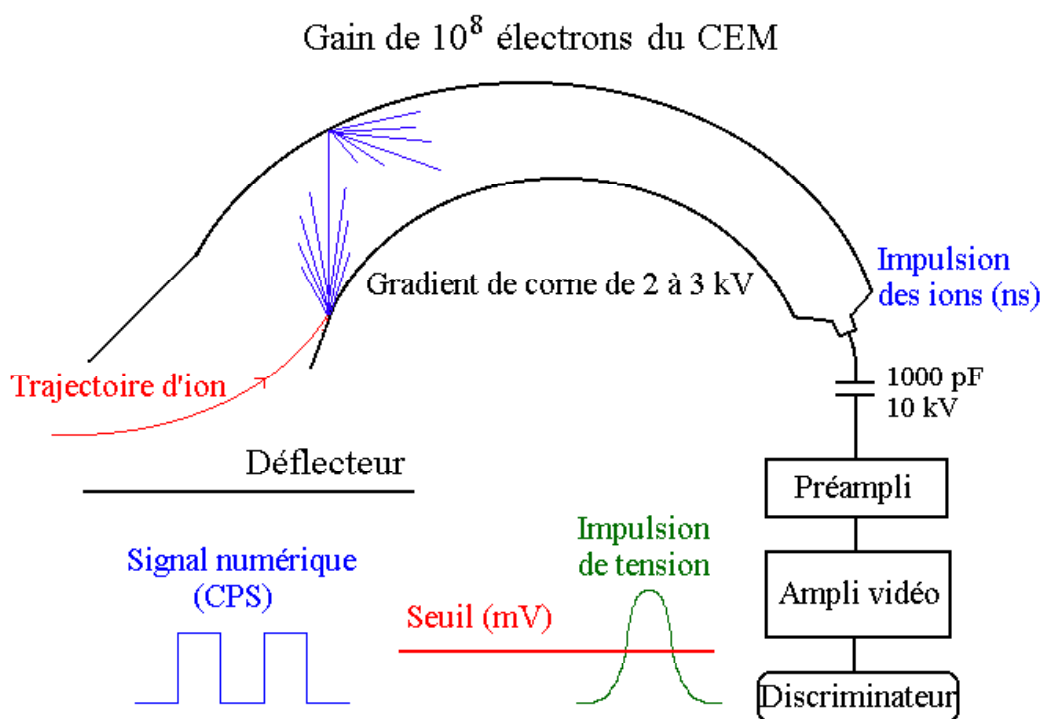
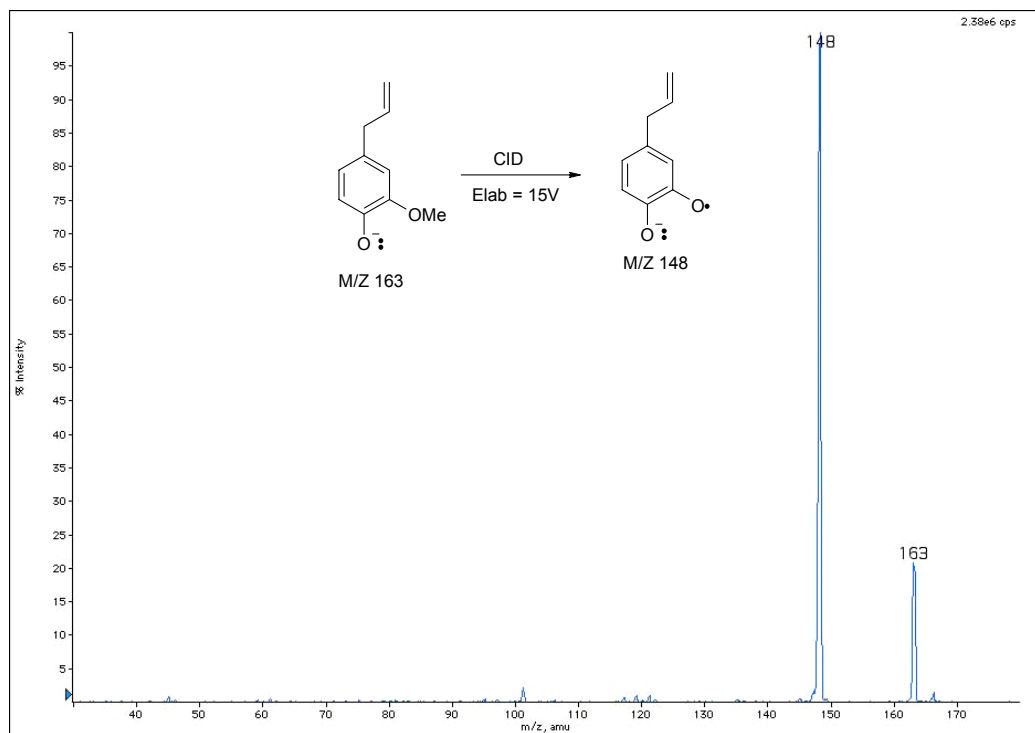


Figure 28 : Exemple de graphique d'analyse en spectrométrie de masse représentant l'isolation de l'eugénol (148 M/Z) et son principal fragment (163 M/Z).



Source : Guénette, S.A., F. Beaudry, J.-F. Marier et P. Vachon. 2006. Pharmacokinetics and anesthetic activity of eugenol in male Sprague-Dawley rats. *Journal of Veterinary Pharmacologic Therapy*. 29: pp.265-270.

7. Objectifs

Considérant la structure moléculaire de l'eugénol qui s'apparente à celle du propofol et étant donné les études antérieures qui démontrent le potentiel analgésique et anesthésique de cette molécule, des études de pharmacocinétique et de pharmacodynamie furent réalisées chez la grenouille (*Xenopus laevis*), le poisson (*Oncorhynchus mykiss*) et le rat (*Rattus norvegicus*). Nous voulions donc dans un premier temps déterminer si l'eugénol est un anesthésique efficace chez ces espèces en évaluant la durée et la profondeur de l'anesthésie induite. Ensuite, nous avons étudié le potentiel analgésique de l'eugénol chez le rat Sprague-Dawley. Le métabolisme et la pharmacocinétique de cette substance chez ces trois espèces ont également été étudiés.

Cette expérimentation s'est donc divisée en quatre volets:

- 1) déterminer la dose efficace pour atteindre une anesthésie chirurgicale suite à l'immersion de grenouilles dans une solution d'eugénol (évaluation des réflexes cornéens, de retrait aux douleurs superficielles et profondes, de détermination des fréquences cardiaques et respiratoires durant l'anesthésie);
- 2) utiliser la concentration déterminée dans le premier volet, évaluer le métabolisme et la pharmacocinétique de la substance par LC/MS/MS dans le sang des grenouilles et des poissons;
- 3) déterminer la pharmacocinétique *iv* et *per os* chez le rat Sprague-Dawley;
- 4) évaluer la pharmacodynamie de l'eugénol chez le rat sous deux paramètres : l'anesthésie suite à l'administration *iv* de l'eugénol et l'analgésie suite à l'administration *per os* sur la douleur neuropathique induite par constriction chronique du nerf sciatique (modèle de Henry) en utilisant les tests de Von Frey et de Hargreaves.

8. Hypothèses basées sur des études pharmacocinétiques

- 1) l'eugénol induit une anesthésie par immersion chez la grenouille et le poisson ;
- 2) l'eugénol induit une anesthésie chirurgicale de courte durée en administration *iv* chez le rat;
- 3) l'eugénol diminue la douleur neuropathique.

CHAPITRE 2: ARTICLES

Article 1 :

S.A. Guénette, P. Hélie, F. Beaudry and P. Vachon. 2007. Eugenol for Anaesthesia of African clawed Frogs (*Xenopus laevis*). Journal of Veterinary Anesthesia and Analgesia, 34: pp.164-170.

Reprinted from Publication, Copyright Owner, Copyright (2007), with permission from Blackwell.

1.1 Abstract

Objective: To determine the level of anaesthesia attained in *Xenopus laevis* frogs with eugenol at different doses and by different routes of administration.

Animals: Sixty *Xenopus laevis* non breeding female frogs (*Xenopus laevis*) with body weights ranging between 90 and 140 g.

Materials and Methods: Three different routes of administration were tested; subcutaneous injections into the dorsal lymph sacs, topical administration using a gauze patch, and immersion bath. Following the determination of the best administration route, the acetic acid test, the withdrawal reflex, righting behavior, heart rate, and respiratory frequency were used to evaluate CNS depression following the eugenol bath administration. In an additional group, the level of anaesthesia following a surgical incision of the abdominal wall and the pharmacokinetics were evaluated following bath immersion administration. A pharmacokinetic study was also performed and PK parameters were calculated following blood concentration determination by tandem liquid chromatography mass spectrometry analyses.

Results: Low levels of CNS depression were obtained with subcutaneous and patch administration, independent of the eugenol dose administered. The immersion bath was the only efficacious route for anaesthesia inducing deep anaesthesia for at least 30 minutes with prolonged post-operative analgesia. Histopathology of selected tissues (heart, lung, liver, kidneys, eyes) showed no evidence of lesions 24 hours following the bath immersion. The half life ($T_{1/2}$)

is 4 hours which is relatively long and suggests drug accumulation with repeated daily administrations.

Conclusions: When administered as a single bath immersion (dose 350 mg L⁻¹) for 15 minutes, eugenol may serve as a safe and effective anesthetic in *Xenopus laevis* frogs for short surgical procedures.

Key words: *Xenopus laevis*, frogs, anaesthesia, surgery, eugenol.

1.2 Introduction

Amphibian medicine and surgery are of increasing interest in veterinary practice. Historically, tricaine methanesulfonate (MS-222) was the most commonly used agent for inducing anaesthesia in frogs (Mader 1996) however it is presently considered by the US Food and Drug Administration (FDA) as a potentially dangerous drug; direct contact with MS-222 has been shown to induce retinal damage in amphibians, fishes and humans (Bernstein *et al.*, 1997). Many drugs have been used as anaesthetics in amphibians using different routes of administration such as subcutaneous, intramuscular, intracoelomic and intravenous. Some examples are systemic injections of ketamine and other cyclohexamines such as tiletamine combined with zolazepam (Letcher & Durante 1995), anaesthetic gases such as methoxyflurane and isoflurane administered topically or via a water bath (Smith & Stump 2000; Wass & Kaplan 1994; Wright 1996), intravenous injections of propofol, intracoelomic injections of medetomidine or barbiturates (Von Esse & Wright 1974; Green 1979; Lafortune *et al.* 2001). All these anaesthetic drugs produced highly variable levels and durations of anaesthesia with differences seen both within and between species, between sexes, with animal weight and with different routes of administration (Lafortune *et al.* 2001). Clove oil has been used to anaesthetize *Rana pipiens* frogs with some success (Lafortune *et al.* 2001). Eugenol is one of the main constituents of clove oil extracted from *Eugenia caryophyllata*. It is a phenol compound commonly used in dentistry (Garibaldi *et al.* 1995; Jadhav *et al.* 2004) for its analgesic properties and it has recently been shown to have anaesthetic properties in rats (Guénette *et al.* 2006).

The primary goal of these experiments was to determine the anaesthetic effects of eugenol in *Xenopus laevis* frogs at different doses via different routes of administration.

1.3 Experimental

1.3.1 Materials and Methods

1.3.1.1 Animals

A total of 60 *Xenopus laevis* frogs (non breeding females *Xenopus laevis*, Xenopus I, Dexter, MI, USA) with body weights ranging between 90 and 140 g were used. Frogs were housed in water filled (> 4 L/frog) polycarbonate cages (40 cm x 20 cm x 15 cm; Ancare, Bellmore, NY, USA). The purified water was obtained from the university water treated (filtering through activated charcoal and UV treatment) reservoirs. Water and room temperatures were kept at $21 \pm 2^{\circ}\text{C}$ at all times. Every two days water was changed and the containers were cleaned. Animals were fed every other day with commercial blood worms (Bloodworms Tropical Fish Food, Hayward, CA, USA). 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 it is in accordance with the guidelines of the Canadian Council on Animal Care.

1.3.1.2 Chemicals

Eugenol (purity: 99%) was purchased from Sigma Inc. (St-Louis, MO, USA). Propylene glycol was purchased from Assurance BDH Inc. (Toronto, ON, Canada).

1.3.1.3 Pharmacodynamic Study

Four groups of 6 frogs were used for this study. One group of animals was used for each route (subcutaneous, transcutaneous patch and immersion bath) administration studies and a fourth group was used for the evaluation of the physiological parameters (heart rate and respiratory frequency) and behavioral reflexes following drug administration by the immersion bath only. Eugenol was administered subcutaneously in the dorsal lymph sac area,

transcutaneously using a gauze patch and by placing the frogs in an immersion bath. For all experiments, frogs were placed individually into a polycarbonate cage with an adjusted depth of purified water in order to keep the nostrils out of the water (approximately 1-2 cm) following eugenol administration. During experimentations, animals were regularly sprayed with the purified water insuring optimal gas exchange (Hutchison *et al*, 1968; Jorgensen 2000; Jahdavi *et al*, 2004).

For subcutaneous and transcutaneous administrations, eugenol was administered at increasing doses (0, 1, 5, 10, 20, 40, 60 and 100 mg/kg) to determine doses that produced analgesia and anaesthesia. A wash out period of 1 week was allowed between each eugenol concentration tested. The subcutaneous injection was administered within, or peripheral to, one of the dorsal lymph sacs. The total dosing volume was 0,1 mL. Topical administrations were applied on the dorsum of the animals and the different solutions constituted of eugenol mixed in 40 % propylene glycol and 60% sterile saline (0.9%) (controls received the vehicle only). Frogs were taken out of the water and restrained manually on a wet towel while a gauze (3 x 3 cm) soaked with the eugenol solution was kept in place for 5 min.

For the immersion bath, a 350 mg/L eugenol solution was used (Lafortune *et al*, 2001). Eugenol was added to purified water and the solution was placed on stirrer plate for 15 min prior to use. Approximately 250 mL of this preparation was then placed into a metal container (15 cm diameter/13cm depth). The animal was immersed into this solution for 15 min and the container was covered so that the frog was in full darkness.

Different behavioral tests were used to evaluate the CNS depression anesthetic depth. Frogs were assessed using the acetic acid test (AAT) (Stevens 1992). This test consists of the application of single drops of incrementally increasing concentrations (1.3-75%) of glacial acetic acid (GAA) to the dorsum of the frog's thigh or leg. We used 10 different GAA dilutions to test the frog's

pain sensitivity (0, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 40, 80 and 100%). Volume was controlled with an automatic pipette to deliver 20 μ L. A contact time of 5 seconds was allowed before thoroughly rinsing the tested skin area with purified water. The test was considered positive if the frog exhibited the wiping response (WRES) consisting of a motor reflex where the frog dislodged the drop using its other leg. If no reaction was observed the next concentration level was applied alternating between right and left legs and thighs. Animals were retested at 0, 15, 30 minutes and 1, 2 and 4 hours post-eugenol if necessary. The anesthesia level was rated as the lowest GAA concentration level at which a WRES occurred (Stevens 1992).

Following the evaluation of the 3 administration routes, it was decided to evaluate cardiac and respiratory frequencies, as well as the righting behavior (RB) and withdrawal reflex (WR) in a separate group of frogs receiving eugenol via the bath immersion. The cardiac frequency was evaluated using Ultrasonic Doppler (Model 811-B Doppler Ultrasonic Flow Detector, 8.1 mHz, Parks Medical Electronics (Aloha, OR) with the probe covered with acoustic gel. Frogs were placed on the Doppler probe insuring that the probe contacted the skin over the sternum. Abdominal or nare movements were counted for respiratory frequency. The RB and WR were noted at the same time points as for the AAT. RB was evaluated by the animal's ability to turn on its ventrum when placed on its back. The WR was tested by pinching one phalangeal articulation of the pelvic limb.

1.3.1.4 Pharmacokinetic Study

A total of 27 frogs ($n = 3/\text{time point}$) were used for this study. They were individually placed in immersion bath containing eugenol at 350 mg/L. Intracardiac blood samples (0,3mL) were collected at 0, 15, 30 minutes and at 1, 2, 4, 6, 12, and 24 hours post-dose administration. When insufficiently anesthetised to perform intracardiac blood sampling, a rapid anesthesia with

MS-222 was performed (Mader 1996) . Analysis of eugenol whole blood content was analysed by tandem liquid - mass spectrometry with a PESCiex API 3⁺ (*Applied Biosystem/MDS Sciex*, Concord, ON, Canada) using previously published methods (Guénette *et al*, 2006).

1.3.1.5 Evaluation of the Surgical Level of Anesthesia

One group of 9 frogs (3 frogs/time point) was used to evaluate the surgical level of anesthesia following eugenol administration with an immersion bath. To test for surgical anesthesia, skin and abdominal muscle incisions were performed at 15, 30 and 60 minutes following the bath immersion. This evaluation was done following the results obtained from the pharmacodynamic study.

1.3.1.6 Histopathology

Frogs tested with the eugenol bath were sacrificed 24 hours following the experiments. Selected tissues (heart, lungs, kidneys, liver and skin) were placed in 10% formalin. The eyes were placed into Davidson's fixative solution for 24 hours (Georger 2002), then cleaned and transferred to 70 % ethanol solution for another 24 hours. The ophthalmic globes and other tissues were subsequently processed routinely for histopathology (paraffin embedding). Five micron-thick sections were stained with hematoxylin-eosin-saffron for microscopic observations.

1.3.1.7 Statistics and Pharmacokinetics

Statistical analysis were performed with SAS, version 8.2 (SAS Institute, Cary, N.C.). Statistical significance level was set *a priori* at $p < 0.05$. Comparison of the different routes of administration, breathing and respiratory frequencies were performed using the repeated measured linear model with time as a within subject factor. Analysis of the variation of righting behavior and the withdrawal reflex with time after induction of anesthesia was performed using the Cochran-Mantel-Haenszel model.

Pharmacokinetic parameters of eugenol in blood were calculated using noncompartmental methods (Rowland and Towzer, 2005). The area under the curve from time 0 to the last measurable concentration values (AUC_{0-t}) was calculated using the linear trapezoidal rule. A terminal rate constant of elimination (k_{el}) was calculated using a minimum of three measurable plasma concentrations and a terminal elimination half-life ($T_{1/2}$) was calculated using $0.693/k_{el}$. The area under the curve extrapolated to infinity (AUC_{inf}) was calculated using $AUC_{0-t} + C_{last}/k_{el}$ where C_{last} was the last measurable plasma concentration.

1.4 Results

Following subcutaneous injections of different doses of eugenol, no significant differences were observed with time or between treatments regarding the AAT ($P > 0.05$). Presence of voluntary movements were seen throughout the observation phase. The AAT was therefore seen in this group even after 100 mg/kg of eugenol. The application of a eugenol patch on the dorsum of the animals produced low levels of anaesthesia ($P > 0.05$) incompatible with its clinical use. Skin necrosis was observed microscopically with 60 and 100 mg/mL on the following day (Ross *et al*, 2006).

Figure 1 presents the WRES results following the immersion bath. Induction of a deep anaesthesia level (severe muscle relaxation, loss of pain, no reflexes) was observed for at least one hour in most frogs following immersion. These animals showed dark skin color and loss of muscle tone. One hour after induction, a significant ($p < 0.0001$) increase in the number of animals showing signs of a light plane of anaesthesia were observed. No animal showed signs of ill health at 24 hours post-anaesthesia except for vomiting presented by 3 frogs (with food expulsion) and abdominal contractions during contact and recovery times.

The effect of eugenol following the bath immersion on the RB ($p < 0.01$) and the WR ($p < 0.005$) (Figure 2) is consistent with the almost near absence of both behaviors in anaesthetized frogs. Comparison of loss and return times for RB, WR, WRES and normal breathing frequency are presented in Table 1. One individual was not anaesthetized following eugenol administration. Other animals returned to normal 3 hours after induction. In general, induction time was 15 minutes with only one individual that needed 30 minutes to attain anaesthesia

Cardiac and respiratory frequencies following the eugenol immersion bath are presented in Figures 3 and 4 respectively. Eugenol did not show any significant effects on cardiac frequency (mean baseline, minimum and maximum heart rate being respectively 27 ± 10 , 36 and 40 beats/minute) ($P > 0.05$). On the other hand, eugenol did induce respiratory depression in 4 of the 6 animals evaluated ($p < 0.02$). The mean respiratory frequency significantly decreased from baseline (28 breaths/minute) to an average of 4 ± 4.4 breaths/minute within 15 min post-induction and returned to 28 ± 11.3 breath/minute at 2 h 15 min post-induction.

The pharmacokinetics were calculated from blood concentrations only. Results are presented in Figure 5. Maximal blood concentration (C_{\max}) is 20,01 ng/mL at 15 min, the area under the curve calculated with the last blood concentration value (AUC_{last}) is 55.72 $\mu\text{g}/\text{minute}/\text{mL}$ and the AUC to infinity (AUC_{inf}) 56.05 $\mu\text{g}/\text{minute}/\text{mL}$. The half life ($T_{1/2}$) is 4 hours which is relatively long and suggests drug accumulation with daily administrations.

Fifteen and 30 minutes after the end immersion administration, no movement occurred following skin and abdominal incision suggesting that the frogs were in a deep plane of anaesthesia, however by 60 minutes they reacted to skin incision.

Histopathology revealed a normal appearance (Wiechmann & Wirsig-Wiechmann 2003) of all selected tissues in animals receiving eugenol via the bath immersion.

1.5 Discussion and Conclusions

Eugenol produces a deep level of anesthesia in *Xenopus laevis* frogs when administered by immersion in a concentration of 350 mg/L; it has insufficient effect at the doses tested when subcutaneous or transcutaneous routes are used. The behavioral tests revealed that anaesthesia duration ranged between 60 and 180 minutes with a majority of animals anaesthetized for a total of 1 hour, however with the abdominal incision test, deep anaesthesia appears to be only 30 minutes. In a previous study, *Rana pipiens* were tested with 3 different drugs: medetomidine/atipamezole, propofol and clove oil (Lafortune *et al.* 2001). Medetomidine/atipamezole failed to induce sedation and it was suggested that it may be excluded from the potential analgesic drugs in amphibians. Propofol induced sedation but anaesthesia was present in only 58% of the tested population without achieving surgical anaesthesia. Clove oil produced anaesthesia in all animals; however some frogs had periods of apnea. Compared to our study, Lafortune *et al* (2001) used a similar eugenol dose (315 mg/L) and the parameters evaluated by loss of righting behavior, withdrawal reflex and the incidence of apnea revealed similar results to our study. With clove oil, gastric prolapse was seen following the bath immersion however in our experiment only vomiting was noticed in some animals. No adverse reactions were seen at 24 hours following eugenol bath administrations. The histology of selected tissues were normal in frogs that immersed in the eugenol bath solution. Eugenol anaesthesia therefore appears relatively safe and efficacious in *Xenopus* frogs.

Isoflurane has been administered in frogs via different routes of administration comparing isoflurane bubbled in water or in a water solution,

intracoelomic, subcutaneous, intramuscular and finally topical administrations (Smith & Stump 2000). Bubbling and intramuscular administration of isoflurane did not induce sedation. Intracoelomic and subcutaneous routes of administration of isoflurane led to death of some individuals. Therefore this anesthetic approach is not considered appropriate. Finally, topical application of isoflurane on the dorsum of animals induced short durations of anaesthesia (10 - 30 minutes) in a small portion of tested animals. Barbiturates in amphibians should be used with caution considering the low efficacy level of these drugs (Wright 2001). Intramuscular injections of ketamine or tiletamine with zolazepam fails to induce anaesthesia in amphibians (Letcher & Durante 1995) leading to unacceptable mortalities in *Rana pipiens*. Lower dosages only lead to tranquilization and light sedation. In addition, anaesthesia with a mixture of tiletamine and zolazepam produces important intraspecies and interspecies variations in response. Compared with results of other published studies, eugenol administered via an immersion bath is an interesting alternative approach for inducing anaesthesia in *Xenopus laevis* frogs and may be a relatively safe and effective anesthetic. The pharmacokinetic study revealed a half-life of 4 hours which suggests a cumulative effect with repeated administrations and caution should be used if used daily in frogs.

1.6 Acknowledgment

Authors would like to thank Guy Beauchamp from the Faculty of Veterinary Medicine of the University of Montreal for the statistical analyses.

1.7 Reference List

Bernstein PS, Digre KB, Creel DJ (1997) Retinal toxicity associated with occupational exposure to the fish anaesthetic MS-222. *Am J Ophthalmol* 124,843-844.

Food and Drug Administration: Center for Veterinary Medicine (2002) Guidance number 150 for industry, status of clove oil and eugenol for anaesthesia of fish. U.S. Department of Health and Human Services.

Garibaldi JA, Greenlaw J, Choi J *et al.* (1995) Treatment of post-operative pain. *J Calif Dent Ass* 23, 71-72.

Georger M (2002) Concepts in the routine preparation of eye specimens. *Histol Rev* 35, 34-36.

Guénette SA, Beaudry F, Marier JF, Vachon P (2006) Pharmacokinetics and anesthetic activity of eugenol in male Sprague-Dawley rats. Accepted for publication in *J Vet Pharmacol Therap*

Green CJ (1979) Classes amphibia, reptilia and aves. In *Animal Anaesthesia, Laboratory animal handbook 8*. Green CJ (ed.). Laboratory Animals, London, UK, pp 111-113.

Hutchison V, Whitford W, Kohl M (1968). Relation of body size and surface area to gas exchange in anurans. *Physiol Zool* 41,65-85.

Jadhav BK, Khandelwal KR, Ketkar AR *et al.* (2004) Formulation and evaluation of mucoadhesive tablets containing eugenol for the treatment of periodontal disease. *Drug Dev Ind Pharm* 30, 195-203.

Jørgensen CB (2000) Amphibian respiration and olfaction and their relationships: from Robert Townson (1794) to the present. *Biol Rev Camb Philos Soc* 75, 297-345.

Mader DR (1996) Amphibian husbandry and medicine. *In Reptile medicine and surgery*. Mader DR (ed). WB Saunders Comp, Philadelphia, PA, pp 436-459.

Lafortune M, Mitchell MA, Smith JA (2001) Evaluation of medetomidine, clove oil and propofol for anaesthesia of leopard frogs, *Rana pipiens*. *J Herpet Med Surg* 11,13-18.

Letcher J., Durante R (1995). Evaluation of use of tiletamine/zolazepam for anaesthesia of bullfrogs and leopard frogs. *J Am Vet Ass* 207, 80-82.

O'Rourke DP, Schultz TW (2002) Biology and diseases of amphibians. In: *Laboratory Animal Medicine*. (2nd edn) Fox JG, Anderson LC, Franklin ML, Quimby FW (eds.). Elsevier Science (USA), New York, pp 793-826.

Ross A, Guénette SA, Hélie H, Vachon P (2006) Cas de nécrose cutanée chez des grenouilles africaines à griffes *Xenopus laevis* suite à une application topique d'eugénol. Accepted for publication Can Vet J.

Smith JM, Stump KC (2000) Isoflurane anaesthesia in the African Clawed frog (*Xenopus laevis*). Contemp Top Lab Anim Sci 39, 39-42.

Stevens CW, Maciver DN, Newman LC (2001) Testing and comparison of non-opioid analgesics in amphibians. Contemp Top Lab Anim. Sci 40, 23-27.

Stevens CW (1992) Alternative to the use of mammals for pain research. Life Sci 50, 901-912.

Von Esse F.V, Wright KM (1974) Effect of intracoelomic propofol in white's tree frogs, *Pelodytes caerulea*. Bull Assoc Reptil Amphib Vet. 9, 7-8.

Wass JA, Kaplan HM (1974) Methoxyflurane anaesthesia for *Rana pipiens*. Lab Anim Sci 24, 669-671.

Wiechmann AF, Wirsig-Wiechmann CR (2003) Atlas of *Xenopus laevis* histology. Kluwer Academic, Norwell.

Wright KM (1996) Amphibian husbandry and medicine, In: Reptile Medicine and Surgery. MaderDR (ed). WB Saunders Co, Philadelphia, PA, pp 436-458.

Wright KM (2001) Restraint techniques and euthanasia. In: Amphibian Medicine and Captive Husbandry. Wright KM, Whitaker BR (eds.). Krieger Publishing Company, Malabar, Fl, pp.111-122.

1.8 Figure Legend

Figure 1. Lowest acid acetic concentration (%) inducing the wiping response to increasing concentrations of acetic acid following immersion in a eugenol solution (350mg/L) in *Xenopus laevis* frogs. The -15 min and 0 time points represent respectively control values prior to eugenol bath immersion and GAA concentrations inducing WRES responses immediately following the 15 min eugenol bath exposure.

Figure 2. Percentage of *Xenopus laevis* frogs presenting a righting behavior (clear histograms) and withdrawal reflex (dark histograms) following immersion

in eugenol solution 350mg/L. The -15 min and 0 time points represent respectively control values prior to eugenol bath immersion and percentage of animals with RB and WR immediately following the 15 min eugenol bath exposure.

Figure 3. Mean (\pm SD) heart rate following immersion of *Xenopus laevis* frogs (n = 6) in a solution of eugenol (350mg/L). The -15 min and 0 time points represent respectively control values prior to eugenol bath immersion and heart rates immediately following the 15 min eugenol bath exposure.

Figure 4. Mean (\pm SD) respiratory frequency following immersion of *Xenopus laevis* frogs (n = 6) in a solution of eugenol (350mg/L). The -15 min and 0 time points represent respectively control values prior to eugenol bath immersion and respiratory frequency immediately following the 15 min eugenol bath exposure.

Figure 5. Semi-logarithmic presentation of the mean (\pm SD) of eugenol concentrations in blood at selected time points. *Xenopus laevis* frogs (n=3/time point) were immersed for 15 min in a 350 mg/L eugenol solution (total volume = 250mL).

Tables

Table 1: Comparison for the loss and return of different reflexes or behaviors using the mean time, standard variation and number of *Xenopus laevis* affected, subjected to an immersion bath of eugenol at 350mg/L.

	Lost				Return			
	RB	WR	AAT	Breathing	RB	WR	AAT	Breathing
Number of individuals affected	6/6	5/6	6/6	5/6	6/6	5/6	6/6	5/6
Mean time (minutes)	0	0*	0	3*	70	102*	117	66*
SD	0	0*	0	6,1*	44,2	47,1*	45,7	39,6*
Time Range (minutes)	0	0*	0	0-15*	15-120	75-120*	30-180	15-120*

*** Excludes non-anesthetized animal**

AAT = acetic acid test; RR = righting reflex; WR = withdrawal reflex; SD = standard deviation

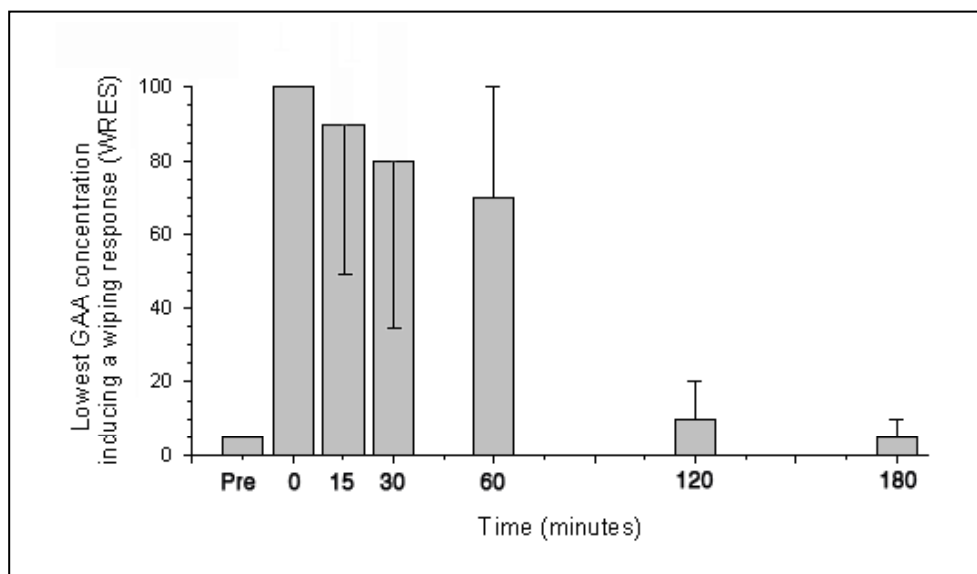
Figures**Figure 1**

Figure 2

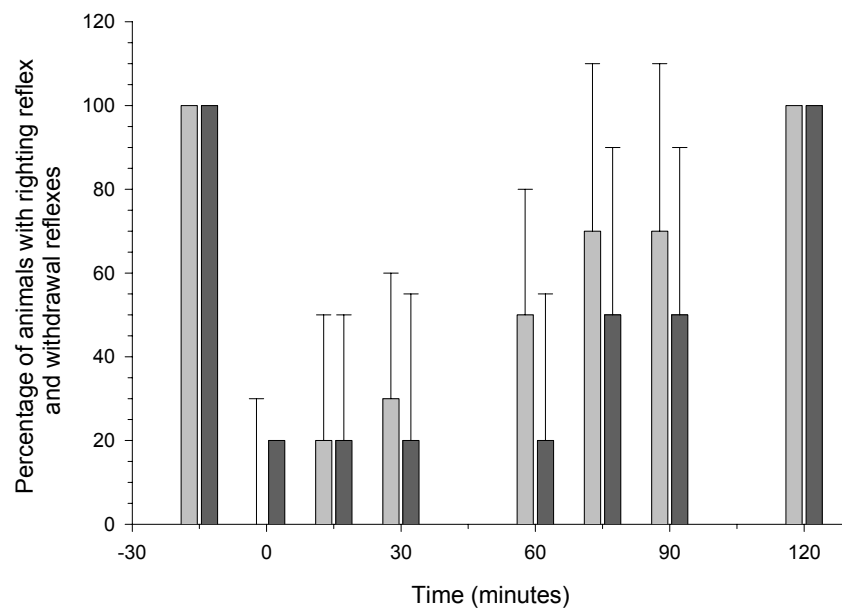


Figure 3

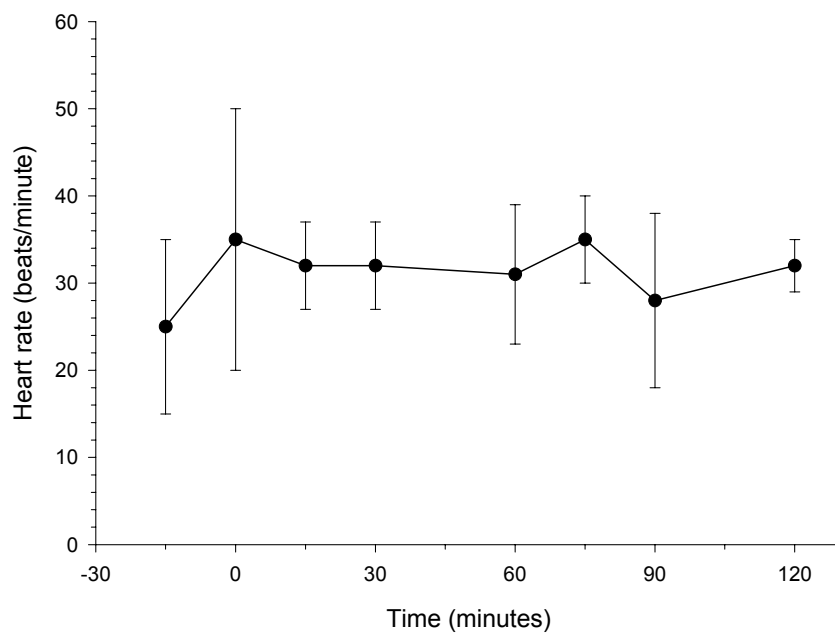


Figure 4

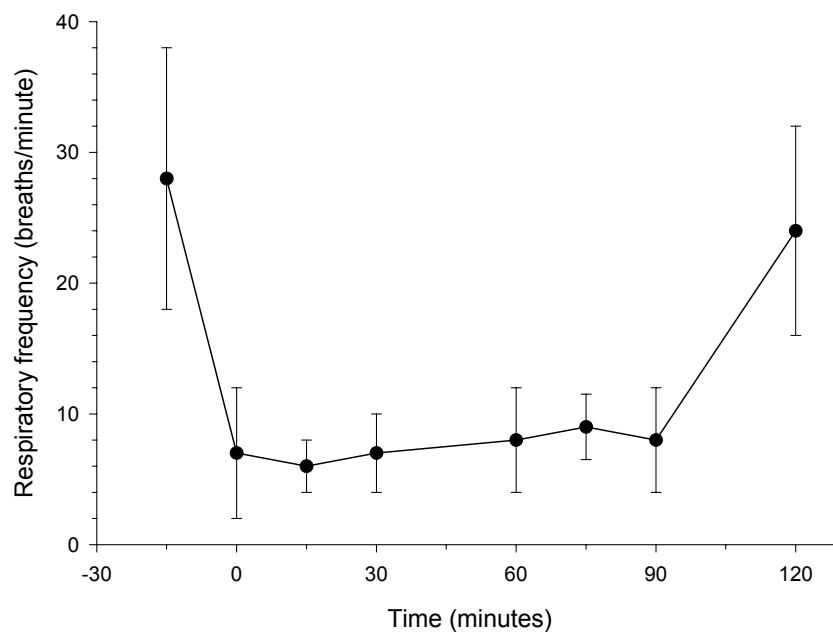
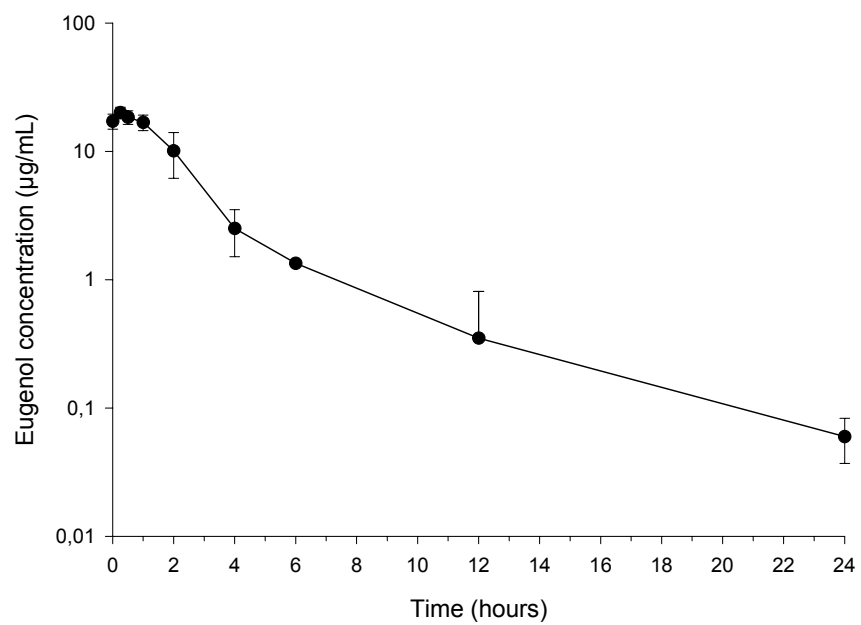


Figure 5



Article 2:

Guénette, S.A. F.C. Uhland, P. Hélie, F. Beaudry et P. Vachon. 2007. Pharmacokinetics of Eugenol in Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture*, 266 (1-4), pp. 262-265.

Reprinted from Publication, Copyright Owner, Copyright (2007), with permission from Elsevier.

2.1 Abstract

Clove oil, eugenol being its main constituent, has been used to anaesthetise fishes for the last decade however no pharmacokinetic study of this drug has been yet realised in fish. The objective of the present study was to determine the pharmacokinetic parameters following immersion of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) in a eugenol solution. A total of 30 fishes (n = 3 per time point) of similar length and weight were immersed in a solution of 75 mg/L of eugenol for 15 min. After thorough rinsing, individuals were placed in a recuperation tank in oxygenated conditioned water. Blood samples were collected at selected time points (at predose and at 0.25, 0.5, 1, 2, 4, 6, 8, 24 and 48 h) post-exposition. The samples were then submitted to mass spectrometry analysis using dansyl-chloride derivatisation. Pharmacokinetic results obtained are a C_{max} of 10.53 $\mu\text{g}/\text{mL}$, a AUC_{0-t} 16.55 $\mu\text{g}\cdot\text{h}/\text{mL}$, AUC_{0-inf} 17.04 $\mu\text{g}\cdot\text{h}/\text{mL}$ and a half life of 12.14 h. These results indicate that eugenol is well absorbed and eliminated using a bath immersion at 4°C. The long half life suggests that eugenol may accumulate in trout following repeated administrations.

Key words: Eugenol, pharmacokinetics, rainbow trout, anaesthesia.

2.2 Introduction

In recent years, fish anaesthesia and analgesia have been the focus of an ongoing debate regarding its necessity, its techniques and its physiological evaluation (Rose, 2002; Sneddon, 2003; Chandroo *et al.*, 2004; Sneddon, 2004). Different studies have in fact revealed significant evidence that fish can experience pain, fear and stress with important influences on their general metabolism (Chandroo *et al.*, 2004; Sneddon, 2004; Dunlop and Laming, 2005). In this regard, it becomes important to study and compare different anaesthetics and immobilising drugs on fish and relate these results to physiological parameters (Pirhonen and Schreck, 2003). A variety of drugs have been used to achieve anaesthesia in fish such as tricaine methanesulfonate (MS-222) (Brown, 1993), benzocaine (Brown, 1993) and quinaldine (2-methylquinoline) (Davis *et al.*, 1982). However, these molecules revealed highly variable anaesthetic efficiency and for some, important adverse effects in humans (Marking and Meyer, 1985; Bernstein *et al.* 1997; Pirhonen and Schreck, 2003). The need to discover new anaesthetic molecules presenting a high safety level and better predictable outcome has stimulated the investigation for other avenues. A clove oil (*Eugenia aromatica*) derivative, eugenol (2-methoxy-4-(2-propenyl) phenol), has been used by aquaculturists (Hikasa *et al.*, 1986; Endo *et al.*, 1972; Anderson *et al.*, 1997; Munday and Wilson, 1997; Soto and Burhanuddin, 1995; Sladky *et al.*, 2001; Pirhonen and Schreck, 2003) and by denturologists (Garibaldi *et al.*, 1995; Kozam, 1997; Ohkubo and Shibata, 1997) to induce different levels of anaesthesia and analgesia with interesting results. Unfortunately, the research on the anaesthetic properties of eugenol in fish has mainly looked at behavioural or physiological effects without determining its bioavailability. The main objective of this study was to investigate the pharmacokinetic parameters of eugenol following immersion of rainbow trout in a eugenol solution.

2.3 Materials and Methods

2.3.1 Animals and Captivity Conditions

Rainbow trouts (n = 30) (*Oncorhynchus mykiss*) were acquired from a private fish farm (Pisciculture St-Lucien, St-Lucien, Qc, Ca) and were kept in a 210 L polyethylene tank (44 cm X 80 cm X 40 cm, Ancare, Bellmore, NY, USA). Tap water was conditioned initially with Aquaplus (Hagen Inc., Montréal, Qc, Ca), and a Fluval MSF-204, multistage filter (Hagen Inc. Montréal, Qc, Ca) was used to provide mechanical and activated carbon filtration continuously throughout the experiment. Water quality tests (Portable water test kit, Hach Co, Loveland, Colorado, USA) were performed each of the first two days of the acclimation period insuring stable and appropriate water quality parameters. An oxygen pump and air stones provided continuous aeration of the water. Water and ambient temperatures were maintained at 4 °C. Animals were allowed five days of acclimation in the tank prior to experimentation. During experimentation, fishes were kept separately in polycarbonate cages (40 cm x 20 cm x 15 cm; Ancare, Bellmore, NY, USA) filled with 10 L of water taken from the main tank and equipped with individual oxygenation pumps (Elite 800, Hagen Inc., Montréal, Qc, Ca). Following experimentation, fish were euthanized using an overdose of tricaine methanesulfonate and organs were submitted for histopathologic examination. 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 was in accordance with the guidelines of the Canadian Council on Animal Care.

2.3.2 Chemicals

Eugenol (purity: 99%) was purchased from Sigma Inc. (St-Louis, MO, USA). Tricaine methanesulfonate (MS-222) used to sedate fish for blood collection was purchased from Syndel International Inc. (Vancouver, BC, Ca).

2.3.3 Pharmacokinetics

Pharmacokinetic parameters of eugenol in whole blood were calculated using noncompartmental methods (Rowland and Tozer, 2005). The area under the curve from time 0 to the last measurable concentration values (AUC_{0-t}) was calculated using the linear trapezoidal rule. A terminal rate constant of elimination (k_{el}) was calculated using a minimum of three measurable plasma concentrations and a terminal elimination half-life ($T_{1/2}$) was calculated using $0.693/k_{el}$. The area under the curve extrapolated to infinity (AUC_{inf}) was calculated using $AUC_{0-t} + C_{last}/k_{el}$ where C_{last} was the last measurable plasma concentration.

2.3.4 Pharmacokinetic Study

After five days of acclimation in a controlled environment, rainbow trouts ($n = 30$) were fasted for 24 h before the beginning of experimentation. Animals were then divided in ten sub-groups of three animals each with mean a body weight of 63.7 ± 14.4 g and an average body length of 18.7 ± 1.7 cm. Animals were then immersed individually in a solution of 75 mg/L of eugenol for a period of 15 min. Fish were then rinsed thoroughly with purified distilled water and placed in small polycarbonate tank (40 cm x 20 cm x 15 cm) with 10 L of water. The dose administered was chosen from a preliminary study where 50 mg/L eugenol provided short duration anaesthesia (less than 5 min) whereas 100 mg/mL caused some deaths. Blood samples were collected at the different time points (at predose and at 0.25, 0.5, 1, 2, 4, 6, 8, 24, 48 h) following the eugenol bath immersion. Following the immersion bath the caudal peduncle was pinched every 5 min to evaluate sensory perception.

For blood collections, fish were anesthetized with MS-222 (80 mg/L buffered with $NaHCO_3$ at 160 mg/L (Pirhonen and Schreck, 2003). Blood samples (0.2 to 0.3 mL) were collected from the dorsal aorta (caudal peduncle)

caudal to the dorsal fin and samples were frozen at -80°C pending mass spectrometry analysis. Eugenol whole blood content was analysed by tandem liquid - mass spectrometry with a PESCiex API 3⁺ (Applied Biosystem/MDS Sciex, Concord, ON, Canada) using previously published methods (Beaudry *et al.*, 2006). All animals recovered from anaesthesia and no animal loss occurred. Tissues from selected organs (liver, kidneys, heart, lungs) were taken from animals from the 48 h group and submitted for histology (hematoxylin-eosin staining) following formaldehyde fixation (10% solution).

2.4 Results

Histology did not reveal any tissue anomalies and animals showed no ill effects following the administration of eugenol. All fish reacted to a caudal peduncle pinch at 15 min following eugenol contact.

Spectrometric analysis of the blood samples revealed a biphasic elimination curve (Figure 1). Examination of the data revealed a rapid decrease, more than 50 % of the total concentration of eugenol blood concentration in the first hour, with concentrations falling under $10\ \mu\text{g}/\text{mL}$ after about 15 min. Pharmacokinetic parameters presented a maximal blood concentration of $10.53\ \mu\text{g}/\text{mL}$, an AUC_{0-t} of $16.55\ \mu\text{g}\cdot\text{h}/\text{mL}$, an $\text{AUC}_{0-\infty}$ of $17.04\ \mu\text{g}\cdot\text{h}/\text{mL}$ and a half life of 12.14 h. Because transcutaneous absorption of eugenol cannot be evaluated, it is impossible to determine the dosage and therefore, the calculation of other pharmacokinetic parameters such as clearance was not possible.

2.5 Discussion

Immersion administration of eugenol at a concentration of 75 mg/L in rainbow trouts kept in conditioned, oxygenated water at 4°C showed that drug was well absorbed and eliminated. Pharmacokinetic results show a long half life (12.14 h) in blood which suggests an accumulation in the organism with repeated administrations. Eugenol half life has been reported for other species

including frogs (4 h) and rats (18.3 h) (Guénette *et al.*, 2006; Guénette *et al.*, 2007). If repeated eugenol administrations were performed, a wash out period of approximately 28 h for frogs, 85 h for trout, and 128 h for rats would have to be respected to allow total elimination of the drug. The biphasic curve suggesting enterohepatic circulation (see Figure 1) has also been encountered following eugenol administration in rats. This recirculation is characteristic of phenol compounds undergoing conjugation (Marier *et al.*, 2002) which contributes to the long elimination time of eugenol in fish. Sladky *et al.* (2001) reported that fish mortality can be encountered when using eugenol if the exposure time or the dosage is higher than the safety margin. Hikasa *et al.* (1986) also reported that warmer water induces a longer recuperation period and potentially decreases the safety margin. It would therefore be crucial to give special attention to water temperature which may influence the metabolism of anaesthetic drugs in fish. This study used water temperatures which are consistent with those encountered in salmonid culture, and the results show that eugenol anaesthesia was of short duration.

Clove oil has been used as a food spice for countless years and recently has revealed interesting anaesthetic properties. Now considered as a commonly used fish anaesthetic, it has become the principle alternative substance to tricaine methanesulfonate in United States and in Japan (Hikasa *et al.*, 1986; Munday and Wilson, 1997). More recently, additional properties of eugenol have been demonstrated such as anti-inflammatory, anti-bacterial and neuroprotective effects (Laekeman *et al.*, 1990; Reddy and Lokesh, 1994; Wie *et al.*, 1997; Guénette *et al.*, 2006). Although the exact mechanism of action of its neuroprotective properties is still under study, *in vitro* research has shown an interaction of eugenol with vanilloid receptors with a potential inhibition of pain transmission by blocking this receptor (Yang *et al.*, 2003). In addition, eugenol appears to interact with neurotransmitters involved in pain sensitivity, with an agonist effect on GABA and an antagonist effect on glutamate (NMDA)

(Aoshima and Hamamoto, 1999; Yang *et al.*, 2003) which both play an important role in pain transmission. GABA is the main inhibitory neurotransmitter of the central nervous system causing CNS depression and anaesthesia. Eugenol's agonist activity on GABA receptors could therefore be responsible for its anaesthetic effects. Proven to be effective in many species of fishes, eugenol has been used by many aquaculturists and researchers to induce different levels of anaesthesia with success (Hikasa *et al.*, 1986; Endo *et al.*, 1972; Munday and Wilson 1997; Sladky *et al.*, 2001; Pirhonen and Schreck 2003).

2.6 Conclusions

Immersion administration of eugenol at a concentration of 75 mg/L in fish kept in conditioned, oxygenated water at 4°C showed that drug was well absorbed and eliminated. Pharmacokinetic parameters calculated revealed a long half life of 12 h which suggests a possible accumulation of the molecule in the organism following repeated administrations.

2.7 Reference List

Anderson, W.G., McKinley, R.S., Colavecchia, M., 1997. The use of clove oil as an anesthetic for rainbow trout and its effects on swimming performance. *N. Am. J. Fish. Mgmt.* 17, 301-307.

Aoshima, H., Hamamoto, K., 1999. Potentiation of GABA A receptors expressed in *Xenopus* oocytes by perfumes and phytoncid. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 63, 743-748.

Beaudry F., Guénette, S.A., Vachon, P., 2006. Determination of eugenol in rat plasma by liquid chromatography-quadrupole ion trap mass spectrometry using a simple off-line dansyl chloride derivatization reaction to enhance signal intensity. *Biomed. Chromatogr.* 20, 1216-1222.

Bernstein, P., Digre, K., Creel, D., 1997. Retinal toxicity associated with occupational exposure to the fish anesthetic MS-222. *Am. J. Ophthalmol.* 124, 843-844.

Brown, L.A., 1993. Anaesthesia and restraint. In: Stoskopf, M.K. (Eds.), *Fish Medicine*. W.B. Saunders Company, Harcourt Brace Jovanovich Inc., Philadelphia, USA, pp. 79-90.

Chandroo, K.P., Duncan, I.J.H., Moccia, R.D., 2004. Can fish suffer?: perspectives on sentience, pain, fear and stress. *Appl. Anim. Behav. Sci.* 86, 225-250.

Davis, K.B., Parker, N.C., Suttle, M.A., 1982. Plasma corticosteroids and chlorides in striped bass exposed to tricaine methanesulfonate, quinaldine, etomidate, and salt. *Prog. Fish-Cult.* 44, 205-207.

Dunlop, R., Laming, P., 2005. Mechanoreceptive and nociceptive responses in the central nervous system of goldfish (*Carassius auratus*) and trout (*Oncorhynchus mykiss*). *J. of Pain* 6, 561-568.

Endo, T., Ogishima, K., Tanaka, H., Ohshima, S., 1972. Studies on the anesthetic effects of eugenol in some fresh water fishes. *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish.* 38, 761-767.

Garibaldi, J.A., Greenlaw, J., Choi, J., Fotovatjah, M., 1995. Treatment of post-operative pain. *J. Calif. Dent. Ass.* 23, 71-72.

Guénette, S.A., Beaudry, F., Marier, J.F., Vachon, P., 2006. Pharmacokinetics and anesthetic activity of eugenol in male Sprague–Dawley rats. *J. Vet. Pharmacol. Therap.* 29, 265–270.

Guénette, S.A., Ross, A., Beaudry, F., Marier, J.F., Vachon, P. Submitted for publication. Pharmacokinetics of eugenol and its effects on thermal hypersensitivity in rats. *Eur. J. Pharmacol.*

Hikasa, Y., Takase, K., Ogasawara, T., Ogasawara, S., 1986. Anesthesia and recovery with tricaine methanesulfonate, eugenol and thiopental sodium in the carp, *Cyprinus carpio*. *Jpn. J. Vet. Sci.* 48, 341-351.

Kozam, G., 1977. The effect of eugenol on nerve transmission. *Oral Surg.* 44, 799.

Laekeman, S.M., Hoof, V.L., Haemers, A., Berghe, V.A.D., Herman, A.G., Vlietink, A.K., 1990. Eugenol A valuable compound for in-vitro experimental research and worthwhile for further in-vivo investigation. *Phytother. Res.* 4, 90-96.

Marier, J.-F., Vachon, P., Gritsas, A., Zhang, J., Moreau, J.-P., Ducharme, M.P., 2002. Metabolism and disposition of resveratrol in rats: extent of absorption, glucuronidation, and enterohepatic recirculation evidenced by a linked-rat model. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 302, 369-373.

Marking, L.L., Meyer, F.P., 1985. Are better anesthetics needed in fisheries? *Fisheries* 10, 2-5.

Munday, P.L., Wilson, S.K., 1997. Comparative efficacy of clove oil and other chemicals in anaesthetization of *Pomacentrus amboinensis*, a coral reef fish. *J. Fish. Biol.* 51, 931-938.

Ohkubo, T., Shibata, M., 1997. The selective capsaicin antagonist capsazepine abolishes the antinociceptive action of eugenol and guaiacol. *J. Dent. Res.* 76, 848-851.

Pirhonen, J., Schreck, C.B., 2003. Effects of anesthesia with MS-222, clove oil and CO₂ on feed intake and plasma cortisol in steelhead trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture* 220, 507-514.

Reddy, A.C., Lokesh, B.R., 1994. Studies on anti-inflammatory activity of spice principles and dietary n-3 polyunsaturated fatty acids on carrageenan-induced inflammation in rats. *Ann. Nutrition. Metab.* 38, 349-358.

Rose, J.D., 2002. The neurobehavioral nature of fishes and the question of awareness and pain. *Rev. Fish. Sci.* 10, 1-38.

Rowland, M., Tozer, T.N., 1995. *Clinical Pharmacokinetics: Concepts and Applications*. third edition. Lippincott, Williams & Wilkins, Media, PA, USA, 661 p.

Sladky, K.K., Swanson, C.R., Stoskopf, M.K., Loomis, M.R., Lewbart, G.A., 2001. Comparative efficacy of tricaine methanesulfonate and clove oil for use as anesthetics in red pacu (*Piaractus brachypterus*). *Am. J. Vet. Res.* 62, 337-342.

Sneddon, L.U., 2003. The evidence for pain in fish: The use of morphine as an analgesic. *Appl. Anim. Behv. Sci.* 83, 153-162.

Sneddon, L.U., 2004. Evolution of nociception in vertebrate: comparative analysis of lower vertebrates. *Brain Res. Rev.* 46, 123-130.

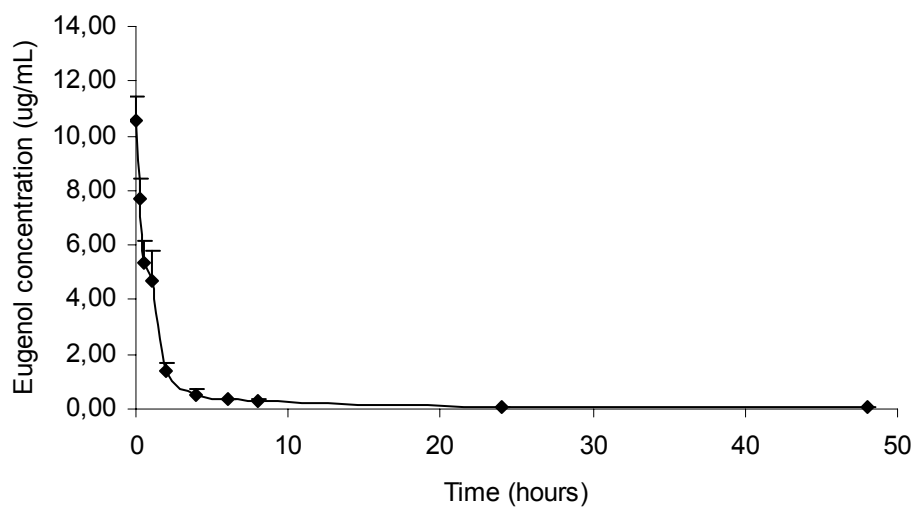
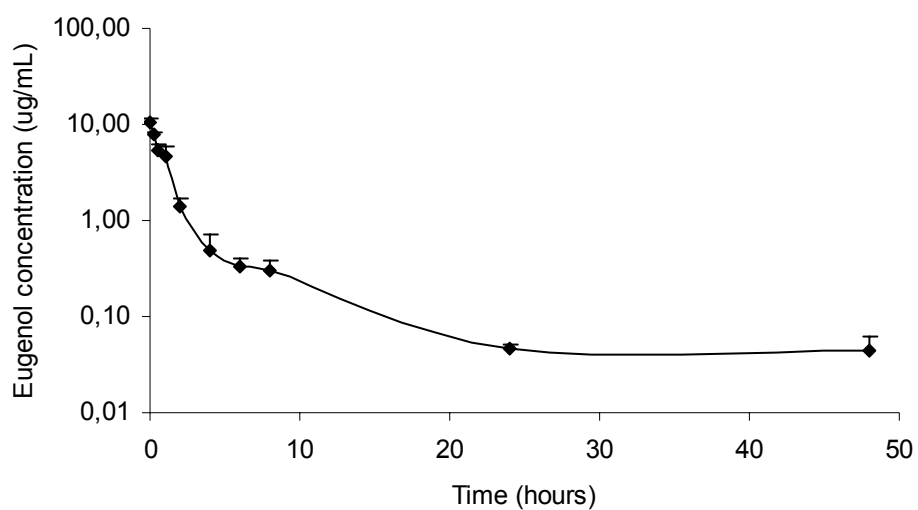
Soto, C.G., Burhanuddin, C.G., 1995. Clove oil as a fish anaesthetic for measuring length and weight of rabbitfish (*Siganus lineatus*). *Aquaculture* 135, 149-152.

Wie, M.B., Won, M.H., Lee, K.H., Shin, J.H., Lee, J.C., Suh, H.W., Song, D.K., Kim, Y.H., 1997. Eugenol protects neuronal cells from excitotoxic and oxidative injury in primary cortical cultures. *Neurosci. Lett.* 225, 93-96.

Yang, B.H., Piao, Z.G., Kim, Y.B., Lee, C.H., Park, K., Kim, J.S., Oh, S.B., 2003. Activation of vanilloid receptor 1 (VR1) by eugenol. *J. Dent. Res.* 82, 781-785.

2.8 Figure Legend

Figure 1. Semi-logarithmic and linear scale (top and bottom panels respectively) presentation of the means (\pm SD) of eugenol concentrations in blood at selected time points. Rainbow trouts (*Oncorhynchus mykiss*) (n = 6 per time point) were immersed for 15 min in a 75mg/L eugenol solution (total volume = 250mL).

Figures**Figure 1**

Article 3 :

Guénette, S.A., F. Beaudry, J.-F. Marier et P. Vachon. 2006. Pharmacokinetics and Anesthetic Activity of Eugenol in Male Sprague-Dawley Rats. Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics. 29: pp. 265-270.

Reprinted from Publication, Copyright Owner, Copyright (2006), with permission from Blackwell.

3.1 Abstract

Eugenol, the principle chemical constituent of clove oil, has recently been evaluated for its anesthetic and analgesic properties in fishes and amphibians. The objective of this study was to determine the pharmacokinetic (PK) and anesthetic activity of eugenol in rats. Male Sprague-Dawley rats received single intravenous (IV) doses of eugenol (0, 5, 10, 20, 40, and 60 mg/kg) and anesthesia level was evaluated with the withdrawal reflex. For the 20 mg/kg dose level, blood and urinary samples were collected over 1 h for the PK assessment. Plasma and blood concentrations of eugenol, as well as metabolite identification in urine, were determined using a novel dansyl-chloride derivatization method with LC/MS/MS. PK parameters were calculated using noncompartmental methods. Eugenol induced loss of consciousness in a dose-dependent manner, with mean (\pm SEM) recovery in reflex time of 167 ± 42 sec observed at the highest dose level. Mean systemic clearance (CL) in plasma and blood were 157 and 204 mL/min/kg, respectively. Glucuronide and sulphate conjugates were identified in urine. Overall, eugenol produced a reversible, dose-dependent anesthesia in male Sprague-Dawley rats.

Key words: eugenol, dansyl chloride, mass spectrometry, quadrupole ion trap, HPLC, blood, plasma, rats

3.2 Introduction

Eugenol (2-methoxy-4-(2-propenyl) phenol), the principle chemical constituent of clove oil (*Eugenia aromatica*), has been used for decades in dentistry for its important analgesic properties (Ohkubo & Shibata., 1997). Incorporated in different dental treatments, eugenol was reported to display anti-inflammatory (Reddy *et al.*, 1994), and anti-bacterial activities (Laekeman *et al.*, 1990). In addition, eugenol was reported to inhibit thromboxane biosynthesis (Laekeman *et al.*, 1990) and to display other pharmacological properties such as neuroprotective (Wie *et al.*, 1997), anticancer (Atsusane, 1991), anti-ischemic (Atsusane, 1991), anti-histaminic (Nishijima *et al.*, 1998) and anti-anaphylactic (Jadhav *et al.*, 2004) effects.

Eugenol had also revealed interesting anesthesia and analgesia activities in fishes (Hikasa *et al.*, 1986; Sladky *et al.*, 2001). The anesthetic activity and physiologic changes following immersion in eugenol and tricaine methanesulfonate were previously assessed in red pacu fish (Sladky *et al.*, 2001). In fishes exposed to eugenol, anesthesia was reached more rapid and recovery was more prolonged as compared to those exposed to tricaine methanesulfonate (Sladky *et al.*, 2001). The anesthetic efficacy between eugenol and propofol were also assessed in leopard frogs (Lafortune *et al.*, 2001). Under controlled laboratory conditions, immersion in eugenol at concentrations of 310 - 318 mg/L for 15 min induced anesthesia for up to 65 minutes in all frogs, whereas propofol at the same dose level failed to induce anesthesia (Lafortune *et al.*, 2001). The exact mechanism of action responsible for the anesthesia and analgesia activity of eugenol are still under major studies but recently, interesting advances had been made in this particular field. It was hypothesized that the analgesia properties of eugenol may be mediated by an antagonist effect at the vanilloid receptor 1, since the phenol-like structure of eugenol is similar to the main constituent of hot pepper, capsaicin (Szallasi & Blumberg, 1999; Yang *et al.*, 2003). In addition, eugenol also demonstrated affinity with GABA and

NMDA (glutamate) receptors, which are both involved in pain sensitivity and anesthesia (Wie *et al.*, 1997; Aoshima & Hamamoto, 1999).

In this study, we propose to assess the pharmacokinetics (PK) and anesthetic effects of eugenol following intravenous (iv) administrations of increasing dose levels in male Sprague-Dawley rats. Pain sensation was tested using the withdrawal reflex by pinching the posterior hind paw with fine forceps. A novel analytical method for eugenol was developed using a dansyl-chloride derivative step with tandem liquid chromatography mass spectrometry (LC/MS/MS). This method was validated for the routine analysis of plasma, blood and urine concentrations of eugenol as well as metabolite identification.

3.3 Materials and Methods

3.3.1 Study Design

Forty-two male Sprague-Dawley rats (weight range: 300 - 325 g) were acquired from the Charles River company (Canada, St-Constant, QC, Canada). They were housed in polycarbonate cages (Ancare, Bellmore, NY, U.S.A) on hardwood ship bedding (Beta chip, Northeastern Products Co., Warrenburg, NY, USA) and acclimated for at least 3 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*. Rats were placed in metabolic polycarbonate cages for urine collections. All experiments were conducted in accordance with guidelines from the Canadian Council on Animal Care and use of laboratory animals.

For the pharmacokinetic study, rats (n = 6/group) received an iv dose of 20 mg/kg of eugenol (solution of 50 mg/mL; 0.5 mL of eugenol, 0.5 mL of cremophor, 1 mL of ethanol (99%) and 8 mL of saline 9%) via the jugular vein under isoflurane (gaseous administration of 2% isoflurane) anesthesia. Eugenol was purchased from Sigma-Aldrich (St-Louis, MO, USA). Blood samples (0,4 mL) were collected at 0, 1, 3, 5, 7, 15, 30 and 60 min post-dose from the

controlateral jugular vein from the injection site for the PK assessment. Urine samples were also collected over 24 h for metabolite identification. A portion of blood samples was frozen (-80°C) pending analytical assays whereas the second portion was centrifuged at 3200 g over 10 min (4°C) and the collected plasma was frozen (-80°C) pending analytical assays.

In order to determine the anesthetic activity of eugenol, male Sprague-Dawley rats (n = 6/group/dose) received increasing iv doses of eugenol (0 (vehicle), 5, 10, 20, 40 and 60 mg/kg) via the jugular vein under isoflurane anesthesia (2%). Prior to the injection of eugenol, isoflurane administration was stopped to minimize interactions between the two products. The withdrawal reflex was then tested every 5 sec, and when the animals reacted to toe pinch (time zero), the vehicle or eugenol solutions were injected. The anesthesia level was determined using the withdrawal reflex by pinching phalangeal articulations with hemostatic forceps (Zahn *et al.*, 1998) every 30 s until the return of a positive response.

3.3.2 Analytical Assay

Instrumentation. The HPLC system consisted of an autosampler Varian 9100 (Palo Alto, CA, USA) and a Water 625 pump (Milford, MA, USA). The LC-MS/MS system used was a PSciex API 3⁺ (Applied Biosystem/MDS Sciex, Concord, ON, Canada). Data was acquired on an AppleTM Macintosh[®] (Silicon Valley, CA, USA) equipped with operation system 7.4. Data acquisition and analysis were performed using MassChrom 1.0 (Concord, ON, Canada). Calibration curves were calculated from the equation $y = ax + b$, as determined by weighted (1/x) linear regression of the calibration line constructed from the peak-area ratios of the drug and the internal standard.

Sample Preparation. Using a simple protein precipitation, eugenol was extracted from rat plasma and blood. A total of 50 µL of sample was mixed with 250 µL of internal standard solution (250 ng/mL of propofol in acetone) in a 1.5

mL centrifuge tube. The sample was then vortexed vigorously and the samples were allowed to rest 10 min at room temperature prior centrifugation. Samples were centrifuged at approximately 12000 g for 10 min and 250 μ L of the supernatant was transferred into a 650 μ L injection vial. One hundred μ L of dansyl chloride solution (1 mg/mL in acetone) and 20 μ L of 100 mM NaOH solution were added to injection vials and the sample was heated at 60°C for 10 min. The vial was vortex briefly and transferred to an autosampler for analysis. The derivatization agent dansyl chloride was purchased from Sigma-Aldrich. Other chemicals, including acetonitrile, methanol, sodium hydroxide and formic acid were purchased from J.T. Baker (Phillipsburg, NJ, USA).

Chromatographic Conditions. An isocratic mobile phase was used with a Keystone Scientific (Thermo) BDS Hypersil C8 50 x 2 mm with a particle size of 5 μ m column. The mobile phase consisted of acetonitrile and 0.5% formic acid in water at a ratio of 80:20, respectively. The flow rate was fixed at 0.55 mL a minute and eugenol eluted at 0.9 min and the internal standard (propofol) at 1.25 min. The eluent was split 1:10 prior introduction into the electrospray source. Ten μ L of the extracted sample was injected and the total run time was set to 2 min.

Mass Spectrometry Conditions. The mass spectrometer was interfaced with the HPLC system using a pneumatic assisted electrospray ion source. The N₂ pressure of the nebulizer gas was set at 40 psi and the ESI electrode was set to 4000V. The declustering potential was set to 15 V and the collision energy (E_{lab}) to 25 V. The collision gas used was argon at 2.5×10^{14} molecules/cm². The SRM transition were m/z 398 \rightarrow 171 and 412 \rightarrow 171 for eugenol and propofol, respectively. The dwell time was set to 150 msec and the pause time at 5 msec.

Metabolite Identification. LC-MS and LC-MS/MS analyses were conducted on a Perkin-Elmer SCIEX API III triple-stage quadrupole instrument equipped with an ion spray interface. The separation was achieved onto a Water

symmetry 150 x 2.1 mm C18 analytical column using a step gradient elution. The mobile phase was composed of acetonitrile (A) and 20 mM ammonium acetate solution adjusted at pH 9 (B). From 0 to 2.5 min, the mobile phase consisted of 10:90 (A:B), from 2.5 to 5 min it was adjusted to 50:50 (A:B) and from 5 to 10 min the mobile phase ratio was 90:10 (A:B). The ion spray interface was operated at -3000 V, and the mass spectrometer was operated in the negative mode. CID studies were performed using argon gas at collision energy (E_{lab}) of 15 V and a collision gas thickness of 2.5×10^{14} molecules/cm². Initial survey scan (full-scan MS) were performed from m/z 150 to 500. The ion chromatograms were screened according to predicted gains and/or losses in molecular masses of the metabolites compared with molecular mass of the parent drug. The corresponding peak detected in full-scan resulting in potential metabolite ions were then selected in first quadrupole (Q1) and subjected to collision induced fragmentation (CID) in the collision cell (Q2) to produce a product ion spectrum.

3.3.3 Pharmacokinetics

Pharmacokinetic parameters of eugenol in blood and plasma were calculated using noncompartmental methods (Rowland and Towzer, 1995). The area under the curve from time 0 to the last measurable concentration values (AUC_{0-t}) was calculated using the linear trapezoidal rule. A terminal rate constant of elimination (k_{el}) was calculated using a minimum of three measurable plasma concentrations and a terminal elimination half-life ($T_{1/2}$) was calculated using $0.693/k_{el}$. The area under the curve extrapolated to infinity (AUC_{inf}) was calculated using $AUC_{0-t} + C_{last}/k_{el}$ where C_{last} was the last measurable plasma concentration. The predicted concentration at time 0 (C_0) was calculated following intravenous administration of eugenol. The systemic clearance (CL) was calculated by dividing the dose by the AUC_{inf} . The mean residence time (MRT) was obtained by dividing the area under the first moment-

time curve (AUMC_{inf}) by the AUC_{inf} after intravenous administration. The total volume of distribution (V_{ss}) was calculated using CL x MRT. Since eugenol is a highly lipophilic drug and possesses similar chemical properties to propofol, the partition coefficient between blood and plasma was calculated (Rowland & Towzer, 1995).

3.4 Results

3.4.1 Analytical Assay

The full scan spectra of the dansyl chloride derivative of eugenol and propofol contained intense signal for the protonated molecular ion ($[M+H]^+$) at m/z 398 and 412, respectively. The reactions as predicted, led to a mass increase of 233 Da for each compound. The mass transition in selected reaction monitoring mode was set for best sensitivity at 398 → 171 and 412 → 171 for eugenol and propofol, respectively. The protein precipitation approach was the simplest method available for preparation and the observed recovery was > 90%. A linear regression (weighted 1/concentration) produced the best fit for the concentration-detector relationship. The analytical range was set from 20 to 20 000 ng/mL. The precision of the method was evaluated and the %CV observed range from 7.1 to 12.1 % and the accuracy observed range from 89.1 to 107.8% of the nominal concentration.

Results from the full scan ion chromatogram (m/z 150 – 500) are presented in Figure 1. Several peaks were observed from the full scan spectra collected for the rat urine samples. Only two peaks of interest corresponding to the metabolic reactions with sulfate (m/z 243, +80Da) and glucuronide (m/z 339, +176Da) were observed (Figure 2) in the urine samples. Phase 1 metabolites were not detected. However, the sensitivity in the full-scan MS mode using triple quadrupole instrument may not provide ideal conditions for low concentration of metabolites.

3.4.2 Pharmacokinetics

Mean plasma and blood concentration (ng/mL) values of eugenol following single iv doses of 20 mg/kg in male Sprague-Dawley rats are presented in Figure 3. Overall, mean plasma and blood concentrations of eugenol decreased rapidly over the first hour. Mean pharmacokinetic parameters of eugenol in plasma and blood are presented in Table 1. Mean systemic clearance (CL) in plasma and blood were 204 and 157 mL/min/kg, respectively. Mean terminal elimination half-life (T_{1/2}) in plasma and blood were 12.6 and 7.05 min, respectively. Total volume of distribution (V_{ss}) of eugenol in plasma and blood (1960 and 1096 mL/kg) corresponded to greater plasma and blood volumes in rats (Davies & Morris, 1993). Partition coefficient (K_p) between RBC and plasma at each time points are presented in Table 2. The RBC:plasma partition coefficient peaked at 7 min and then decreased over time, suggesting a re-distribution of eugenol from red blood cells to plasma.

3.4.3 Pharmacodynamics

A summary of pharmacodynamic results are presented in Figure 4. Following iv administration of 0.1 mL of the vehicle solution (0.5 mL of cremophor, 1 mL of ethanol (99%) and 8.5 mL of 0.9% saline), mean time of the reflex response was 0 s since all 6 rats responded immediately to pinch. A dose-effect relationship in antinociceptive activity was observed, with mean (\pm SEM) maximum values of 167 ± 42 s observed at the highest dose level. All animals did reach recumbency (sternal position) within 2 to 5 min after the iv eugenol administrations. Overall, all dose levels of eugenol were well tolerated since no ill side effects were observed 24 h following the administration of eugenol.

3.5 Discussion and Conclusions

Eugenol is the principle chemical constituent of clove oil (*Eugenia aromatica*) and nutmeg (*Myristica fragrans*) that has been extensively used in clinical dentistry as zinc oxide complex (Ohkubo & Shibata., 1997; Bennett, *et al.* 1988). When applied to a dentinal cavity, small quantities of eugenol were reported to diffuse through the dentin to the pulp where it would exert its anti-inflammatory and local analgesic effects (Markowitz *et al.*, 1992). The anesthesia activity of eugenol was previously studied in amphibians and its activity appeared to be markedly superior to many other anesthetic drugs (Sladky *et al.*, 2001). The exact mechanism of action responsible for the anesthesia and analgesia effects of eugenol are still not completely understood but interesting advances has been made in this particular field. It was hypothesized that the anesthesia and analgesia properties of eugenol may be mediated by an antagonist effect at VR1 (Szallasi, & Blumberg, 1999; Yang *et al.*, 2003). In addition, eugenol also demonstrated affinity with GABA and NMDA (glutamate) receptors, which are both involved in pain sensitivity and anesthesia (Wie *et al.*, 1997; Aoshima & Hamamoto, 1999).

In this study, we proposed to assess the PK and anesthetic effects of eugenol following iv administration in male Sprague-Dawley rats. In order to characterize the biodisposition of eugenol in rats, a novel analytical method for the routine analysis of eugenol in plasma and blood was developed using dansyl-chloride as a derivatizing agent. A similar method was previously developed in our laboratory to improve the analytical performance of propofol assay in plasma and blood (Beaudry *et al.*, 2005). The derivatization product showed a signal improvement of approximately 200-fold. Although the novel analytical method requires an additional step (ie., the derivatization reaction), eugenol is practically not detectable using electrospray ionization technique. The derivatization step improved significantly the sensitivity and the reproducibility of the method. The precision and accuracy of the method was proven to be

within acceptable criteria for the analysis of plasma and blood concentrations of eugenol.

Metabolites of eugenol were identified in urine with LC-ESI/MS/MS techniques. Using a contour plot feature, the full scan spectra of rat urine was examined but only two peaks of interest related to the metabolism of eugenol were found and further MS/MS investigation confirmed the presence of conjugated metabolites (i.e. sulfate and glucuronide). No other metabolite was found in rat urine.

The biodisposition of eugenol was characterized in plasma and blood. The highest concentrations of eugenol measured in plasma (ie., 14 000 ng/mL) and blood (11 000 ng/mL) were approximately 700- and 550-fold higher than the LOQ values. These results suggest that the novel analytical method was appropriate to characterize the *in vivo* biodisposition of eugenol in rats. As far as we know, this is the first time the *in vivo* biodisposition of eugenol is characterized in animals. Overall, plasma and blood concentrations of eugenol declined rapidly over the first hour of the kinetic study with mean $T_{1/2}$ of 12.6 and 7.05 min, respectively. Mean systemic clearance (CL) of eugenol in blood (157 mL/min/kg) was markedly higher than liver blood flow (55 mL/min/kg), suggesting that 1) other pathways such as renal and/or biliary elimination may contribute to the overall *in vivo* biodisposition of eugenol (Davies & Morris, 1993) or 2) the observed clearance may be due to a rapid distribution of eugenol to peripheral tissues. The latter hypothesis is probably most likely since the total volume of distribution (V_{ss}) of eugenol in blood (1096 mL/kg) was much higher than the actual blood volume in rats (ie., 54 mL/kg). This extravascular distribution may be consistent with the lipophilic properties of eugenol (Merck Index, 1996). This will be confirmed in future studies, where blood samples will be collected over a longer period of time.

Anesthetic activity of eugenol was assessed after iv administration of 0, 5, 10, 20, 40, and 60 mg/kg of eugenol. Level of consciousness was evaluated at

the hind paw using the withdrawal reflex by pinching the phalanges with forceps. Following iv administration of the vehicle solution (control animals), the pedal reflex was observed immediately after pinching the paws and the rats stayed in a sternal position immediately following the isoflurane removal, suggesting that the preliminary treatments with isoflurane did not affect nociception. Dose-dependent anesthetic activities were observed, with a mean prolongation of 167 s in the recovery of reflex observed at the highest dose level. These results suggest that eugenol could be used as anesthetic for short duration procedures or as a continuous iv infusion similarly to propofol.

Eugenol has been shown to possess an antagonistic activity on the vanilloid receptor TRPV1 (transient receptor potential vanilloid) (Szallasi, & Blumberg, 1999; Yang *et al.*, 2003) which would be associated with its analgesic properties. The anesthetic activities of eugenol may be mediated by GABAergic and glutamergic (NMDA) mechanisms, both receptors being also involved in pain sensitivity (Wie *et al.*, 1997; Aoshima & Hamamoto, 1999). Further studies would be needed to clarify the exact interaction of eugenol in regards to its analgesic and anesthetic properties.

In conclusion, a novel analytical method for the routine analysis of eugenol in plasma and blood was developed using a derivatization method with dansyl-chloride. This novel method improved the limit of detection and allowed an adequate characterization of the *in vivo* biodisposition of eugenol in rats for the first time. Eugenol administered intravenously produced reversible, dose-dependent anesthetic activity in male Sprague-Dawley rats. These results warrant further research on the anesthetic properties of eugenol in other animal species.

3.6 Reference List

Aoshima, H. & Hamamoto, K. (1999). Potentiation of GABA A receptors expressed in *Xenopus* oocytes by perfume and phytoncid. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 63, 743-748.

Atsusane, T. (1991) Clove oil or dehydroeugenol for controlling oxygen in the human body. *Japan Kokai Tokkyo Koho* 227: 6.

Beaudry, F., Guénette, S.A., Winterborn, A., Marier, J.F., & Vachon, P. (2005) Development of a rapid and sensitive LC-ESI/MS/MS assay for the quantification of propofol using a simple off-line dansyl chloride derivatization reaction to enhance signal intensity. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 39, 411-417.

Davies, B., & Morris, T. (1993) Physiological parameters in laboratory animals and humans. *Pharmaceutical Research*, 10, 1093-1095.

Ohkubo, T., & Shibata, M. (1997) The selective capsaicin antagonist capsazepine abolishes the antinociceptive action of eugenol and guaiacol. *Journal of Dentistry Research*, 76, 848-851.

Hikasa, Y., Takase, K., Ogasawara, T. & Ogasawara, S. (1986) Anesthesia and recovery with tricaine methanesulfonate, eugenol and thiopental sodium in the carp, *Cyprinus carpio*. *Nippon Juigaku Zasshi*, 48, 341-351.

Jadhav, B.K., Khandelwal, K.R., Ketkar, A.R. & Pisal, S.S. (2004) Formulation and evaluation of mucoadhesive tablets containing eugenol for the treatment of periodontal diseases. *Drug Dev Ind Pharm*, 30, 195-203.

Laekeman, G.M., Hoof, V.L., Haemers, A., Berghe, V.A.D., Herman, A.G. & Vlietink, A.K. (1990) Eugenol, a valuable compound for in vitro experimental research and worthwhile for further in vivo investigation. *Phytotherapy Research*, 4, 90-96.

Lafortune, M., Mitchell, M.A., & Smith, J.A. (2001) Evaluation of medetomidine, Clove Oil and Propofol for Anesthesia of Leopard Frogs, *Rana pipiens*. *The Journal of Herpetological Medicine and Surgery*, 11, 13-18.

Markowitz, K., Moynihan, M., Liu, M., & Kim, S. (1992) Biologic properties of eugenol and zinc oxide-eugenol. A clinically oriented review. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol*. 73, 729-737.

Merck Index, An Encyclopedia of Chemicals, Drugs, and Biologicals, Twelfth Edition (1996) . pp 3947. Merck & Co., Whitehouse Station, NJ.

Nishijima, H., Uchida, R., Kawakami, N., Shimamura, K., & Kitamura, K. (1998) Role of endothelium and adventitia on eugenol-induced relaxation of

rabbit ear artery precontracted by histamine. *Journal of Smooth Muscle Research*, 34,123-137.

Ohkubo, T., & Shibata, M. (1997) The selective capsaicin antagonist capsazepine abolishes the antinociceptive action of eugenol and guaiacol. *Journal of Dentistry Research*, 76, 848-851.

Reddy, A.C.P., & Lokesh, B.R. (1994) Studies on anti-inflammatory activity of spice principles and dietary N-2 polyunsaturated acids on carrageenan-induced inflammation in rats. *Annals of Nutrition and Metabolism*, 38, 349–358.

Rowland, M. & Towzer, T.N. (1995) *Clinical Pharmacokinetics: Concepts and Application*, 3rd ed. Chapter 21, Lippincott Williams & Wilkins, Media, PA.

Sladky, K.K., Swanson, C.R., Stoskopf, M.K., Loomis, M.R., & Lewbart, G.A. (2001) Comparative efficacy of tricaine methanesulfonate and clove oil for use as anesthetics in red pacu (*Piaractus brachyomus*). *American Journal of Veterinary Research*, 62, 337-342.

Szallasi, A., & Blumberg, P.M. (1999) Vanilloid (Capsaicin) receptors and mechanisms. *Pharmacological Review*, 51, 159-212.

Wie, M.B., Won, M.H., Lee, K.H., Shin, J.H., Lee, J.C., Suh, H.W., Song, D.K. & Kim, Y.H. (1997) Eugenol protects neuronal cells from excitotoxic and oxidative injury in primary cortical cultures. *Neuroscience Letters*, 225, 93-96.

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. *Journal of Dentistry Research*, 82, 781-785.

Zahn, P.K., Umali, E., & Brennan, T.J. (1998) Intrathecal non-NMDA excitatory amino acid receptor antagonists inhibit pain behaviors in a rat model of postoperative pain. *Pain*, 74, 213-23

3.7 Figure Legend

Figure 1. Product ion spectrum of eugenol in negative mode.

Figure 2. Identification of major metabolite excreted in rat urine. A: Full scan total ion chromatogram (M/Z 150 – 500). B: Product ion Scan of M/Z 243. C: Product ion scan of M/Z 339.

Figure 3. Semi-logarithmic and linear presentations of the mean (\pm SEM) eugenol concentrations in blood and plasma following serial jugular collections at selected time points. Male Sprague-Dawley rats (n=6) received a single iv dose of 20 mg/kg of eugenol diluted in a cremophor, saline and alcohol vehicle.

Figure 4. Mean (\pm SEM) return of the withdrawal reflex following increasing iv (0-60 mg/kg) dose levels of eugenol in male Sprague-Dawley rats.

Tables

Table 1. Mean (CV%) pharmacokinetic parameters of eugenol in plasma and blood following a single intravenous dose of 20 mg/kg in male Sprague-Dawley rats (n = 6).

Parameters	Plasma	Blood
AUC _{0-t} (µg.min/mL)	116 (39.6%)	165 (45.9%)
AUC _{inf} (µg.min/mL)	119 (40.6%)	166 (45.9%)
C ₀ (µg/mL)	27.9 (54.6%)	30.5 (58.8%)
CL (mL/min/kg)	204 (55.3%)	157 (61.7%)
T _{1/2} (min)	12.6 (18.9%)	7.05 (24.4%)
V _{ss} (mL/kg)	1960 (25.1%)	1096 (29.8%)

AUC_{0-t}, area under the curve from time 0 to the last measurable concentration value; AUC_{inf}, area under the curve extrapolated to infinity; C₀, predicted concentrations at time 0; CL, systemic clearance; T_{1/2}, terminal elimination half-life; V_{ss}, total volume of distribution.

Table 2. Partition coefficient (K_p) of eugenol in blood following a single intravenous dose (20 mg/kg) in male Sprague-Dawley rats.

Time (min)	Mean K_p (RBC:Plasma)
1	0.06
2	0.67
5	0.73
7	1.55
15	0.79
30	0.7
60	-0.8

Figures

Figure 1

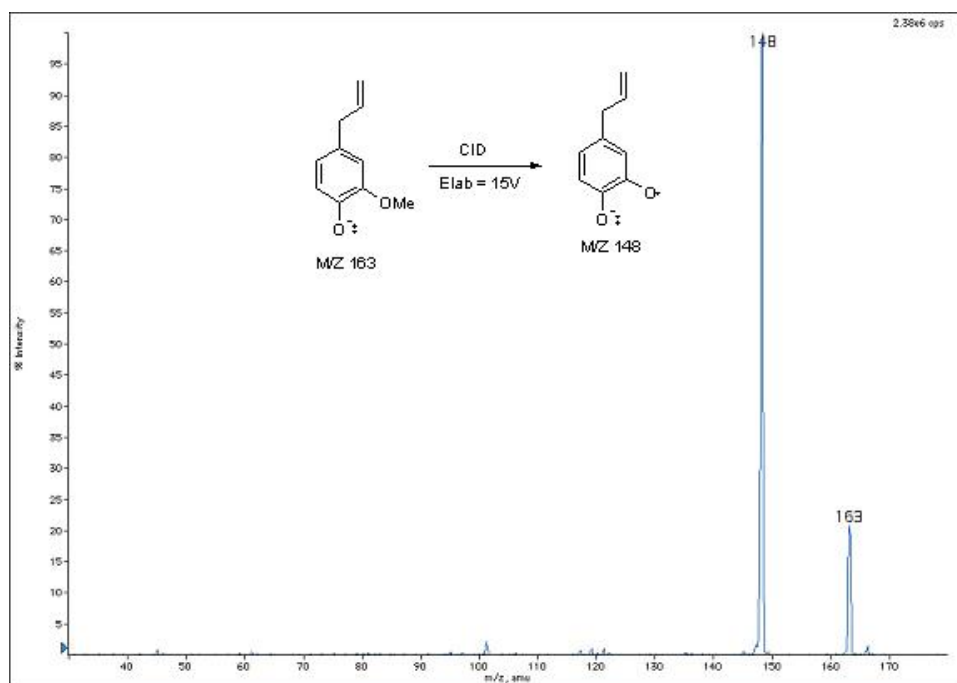


Figure 2

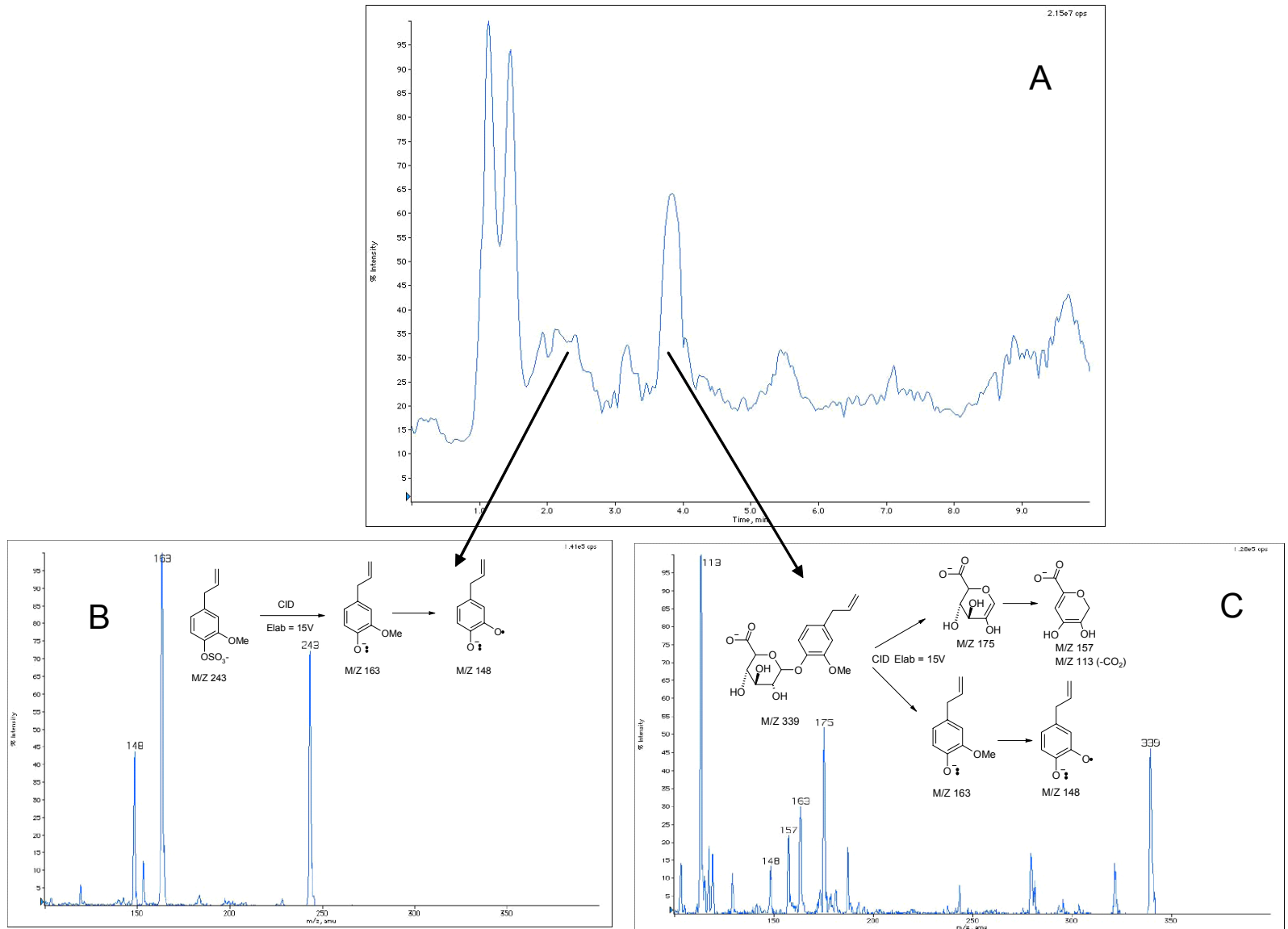


Figure 3

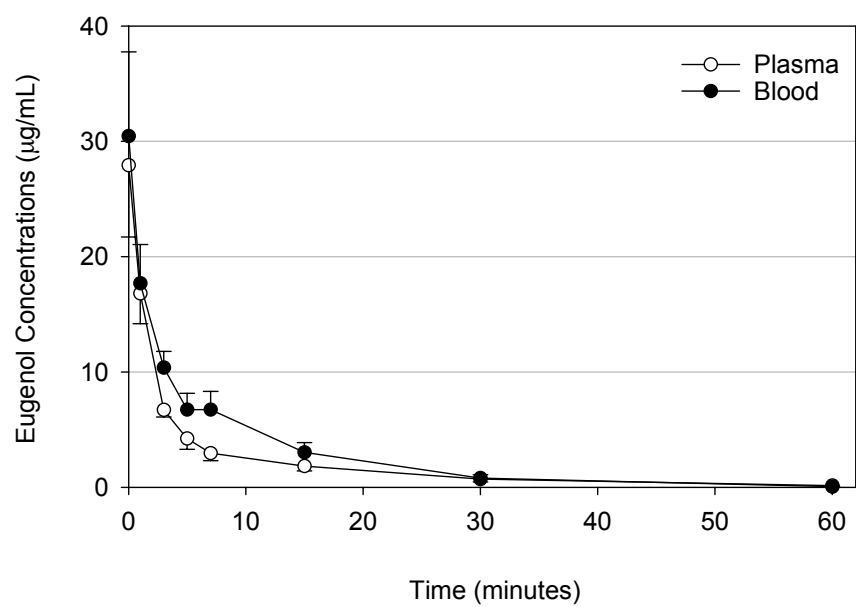
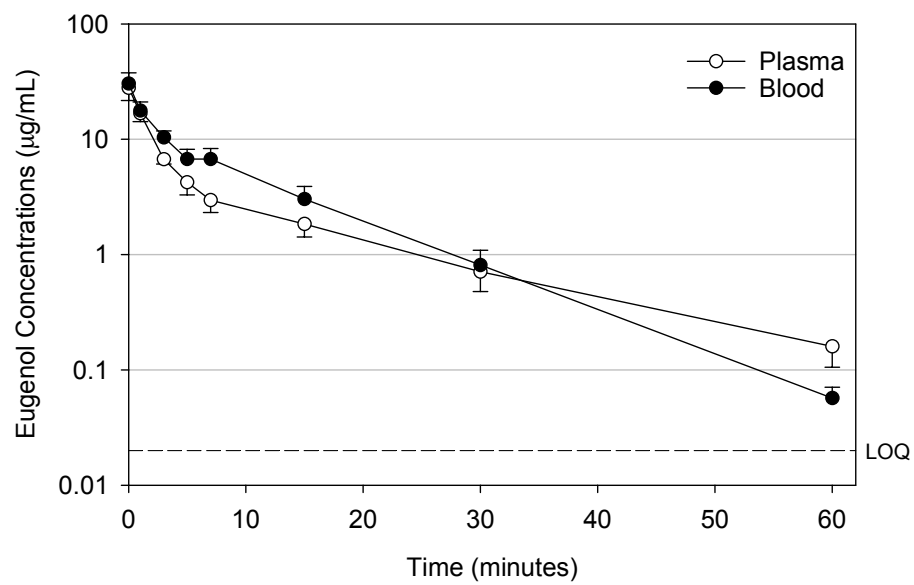
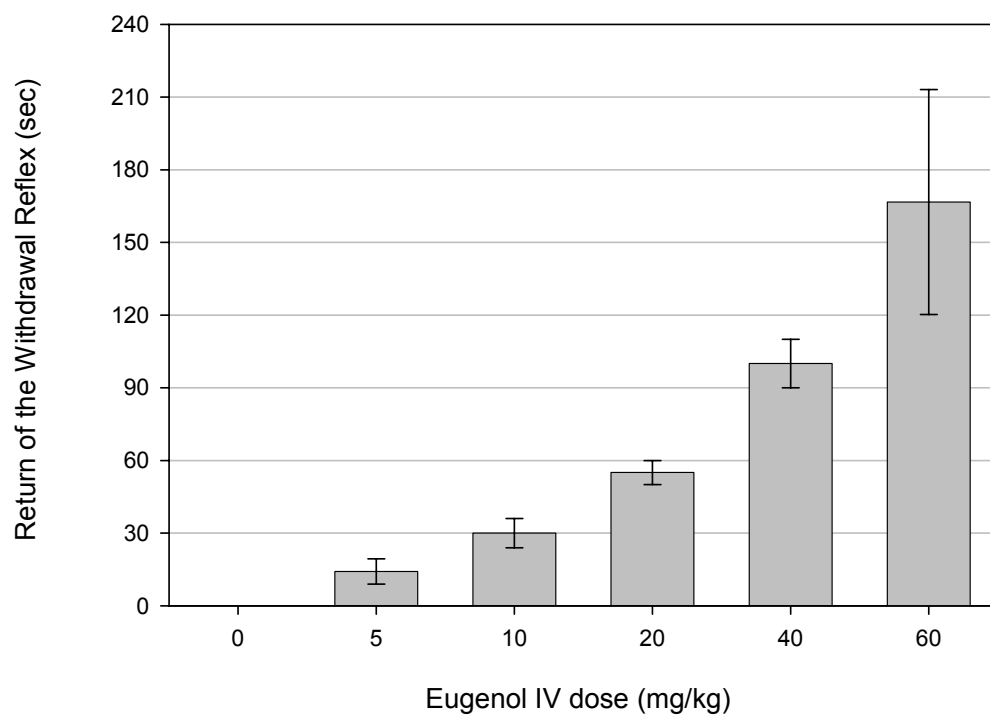


Figure 4

Article 4 :

Guénette, S.A., A. Ross, J.-F. Marier, F. Beaudry et P. Vachon. 2007. Pharmacokinetics of Eugenol and its Effects on Thermal Hypersensitivity in Rats. *European Journal of Pharmacology*. 562: pp. 60-67.

Reprinted from Publication, Copyright Owner, Copyright (2007), with permission from Elsevier.

4.1 Abstract

Neuropathic pain is a type of chronic pain following central or peripheral nervous system lesions that cause allodynia (pain initiated by a non-painful stimulus) and hyperalgesia (increased pain sensation following a painful stimulus). The first objective of the study was to evaluate the pharmacokinetics of eugenol, the principle chemical constituent of clove oil, following a gavage administration (40 mg/kg) in male Sprague-Dawley rats. The second objective was to evaluate the effect of repeated oral administrations of eugenol on hyperalgesia and allodynia using an experimental model of neuropathic pain in rats. Thermal and mechanical sensitivity (Hargreave's test and von Frey filaments) were determined in sciatic nerve cuff-implanted rats. Sensitivities were assessed following repeated oral administrations of 40 mg/kg of eugenol or saline for 5 days (n = 6 per group). Pharmacokinetic parameters were calculated using noncompartmental methods. Serial blood samples were collected over 24 h. Concentrations of eugenol in blood and plasma peaked rapidly following oral administration. Mean $T_{1/2}$ values of eugenol in plasma and blood were long (14.0 and 18.3 h, respectively), suggesting a potential accumulation of the drug following repeated administrations. Reaction time to thermal stimuli appeared to increase constantly following repeated administrations of eugenol. On the last day of treatment, eugenol treatments resulted in a statistically significant prolongation of the reaction time to thermal stimuli in rats compared to the saline group (Mean \pm S.E.M.: 11.4 ± 1.23 vs. 6.1 ± 0.53 s, $P < 0.01$). These results support the hypothesis that eugenol may alleviate neuropathic pain and

that the cumulative effect of the drug may be in part responsible for this effect following repeated daily administrations.

Key words: eugenol, neuropathic pain, hyperalgesia and allodynia, Sprague-Dawley rats.

4.2 Introduction

Eugenol (2-methoxy-4-(2-propenyl) phenol), the principle chemical constituent of clove oil (*Eugenia aromatica*), has been used for decades in dentistry as an analgesic (Kozam, 1997; Ohkybo and Shibata, 1997). More recently, additional pharmacological properties of eugenol were demonstrated including anti-inflammatory, anti-bacterial, anesthetic and neuroprotective effects (Laekeman *et al.*, 1990; Reddy and Lokesh, 1994; Wie *et al.*, 1997; Guenette *et al.*, 2007b). Although the exact mechanism of action of its neuroprotective properties is still under study, *in vitro* research has shown an interaction of eugenol with vanilloid receptors with a potential inhibition of pain transmission by blocking this receptor (Yang *et al.*, 2003). In addition, eugenol appears to interact with neurotransmitters involved in pain sensitivity, with an agonist effect on γ -aminobutyric acid (GABA) and an antagonist effect on NMDA (N-methyl-D-aspartate) glutamate receptors (Aoshima and Hamamoto, 1999; Yang *et al.*, 2003), both of which play important roles in pain transmission.

Vanilloid receptors were first discovered by Thresh (1846) following a study on hot pepper burning sensation induced by capsaicine. Capsaicine burning sensation was induced by its specific interaction with a new kind of pain receptor, the capsaicine receptor, later named as the vanilloid receptor due to its structural similarity with vanilla (Nelson, 1919; Spath and Darling, 1930; Thresh, 1946). More recent work has proven the importance of vanilloid receptors in nociception. Four subclasses (TRPV1, TRPV2, TRPV3 and TRPV4) of vanilloid TRP (transient receptor potential) channels have been established based on their specific activities (Szallasi and Blumberg, 1999; Davis *et al.*, 2000; Caterina and Julius, 2001). TRPV1 is a non-selective cation channel receptor that functions as an integrator of painful chemical and physical stimuli including noxious heat and low pH. TRPV1 antagonists were shown to have analgesic effects on both inflammatory and neuropathic pain (Caterina *et*

al., 1997; Ohkubo and Shibata, 1997; Tominaga *et al.*, 1998). Only a limited number of substances have shown antagonistic activity for vanilloid receptors. Amongst these, capsaicin (Szallasi and Blumberg, 1999), resiniferatoxin (Szallasi and Blumberg, 1993), zingerone (Liu and Simon, 1996), scutigeral (Szallasi *et al.*, 1999), olvanil (Lawand *et al.*, 1997) and trialkylglycine (Garcia-Martinez *et al.*, 2002) have been shown to be therapeutic candidates for treatment of neuropathic pain.

Neuropathic pain can be divided in two different pain types: hyperalgesia, which is an increase pain perception following painful stimuli, and allodynia which occurs secondary to an innocuous stimulus (Nichols *et al.*, 1999). The resulting pain sensation is triggered by one or the other of these mechanisms, and can also switch from one to the other over time (Nichols *et al.*, 1999). Persistent pain will usually evolve over time and spread to the contralateral parts of the body (GEDN, 2004). Neuropathic pain can be broadly defined as a result of nerve injury or malfunction in the peripheral or central nervous system (CNS) and is thought to arise via different origins such as amputation, trauma, metabolic pathologies, infectious pathologies, neoplasm and nutritional deficiencies (GEDN, 2004). Traditional pain killers (opioid analgesics) are usually ineffective against neuropathic pain (GEDN, 2004). This persistent chronic pain is characterised by the activation of specific receptors and the liberation of neuropeptides both locally (peripheral nerves) and centrally (Nichols *et al.*, 1999). New therapeutic targets should therefore be evaluated for the treatment of this condition.

Due to its interaction with vanilloid receptors, and possibly other neurotransmitters involved in pain transmission, we propose to characterise the biodisposition *in vivo* of eugenol and its effects on pain sensitivity. The first objective of the study was to evaluate the pharmacokinetics of eugenol following a gavage administration in rats. The second objective was to evaluate the effect of repeated oral administrations of eugenol on hyperalgesia and

allodynia using an experimental model of neuropathic pain in male Sprague-Dawley rats.

4.3 Materials and Methods

4.3.1 Animals

A total of 24 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, U.S.A) on hardwood sawdust bedding (Beta chip, Northeastern Products Co., Warrenburg, NY, USA) and acclimated for 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.

4.3.2 Pharmacokinetic Study

The pharmacokinetics of eugenol was assessed in plasma (n = 6 rats) and red blood cells (n = 6 rats) of intact rats. Following oral administration of eugenol (40 mg/kg), serial blood samples were collected from the jugular vein at predose, and at 0.25, 0.5, 1, 2, 4, 6, 8 and 24 h postdose. For blood collections, animals were anesthetised with isoflurane (2%) for a short duration (approx. 1 minute) prior to each blood collection. Plasma was collected following blood centrifugation for 10 min at 3200 g. Plasma and blood were stored at -80°C pending the LC/MS/MS assay.

Eugenol mass balance between blood, plasma and RBC can be described by the following equation:

$$\text{CONC}_{\text{BLOOD}} \times V_{\text{BLOOD}} = \text{CONC}_{\text{PLASMA}} \times V_{\text{PLASMA}} + \text{CONC}_{\text{RBC}} \times V_{\text{RBC}}$$

(1)

where $\text{CONC}_{\text{BLOOD}}$, $\text{CONC}_{\text{PLASMA}}$ and CONC_{RBC} represent the concentrations of eugenol in blood, plasma, and RBC, respectively and V_{BLOOD} , V_{PLASMA} and V_{RBC} represent the volume of blood, plasma, and RBC, respectively. The volume occupied by RBC and plasma are related to hematocrit (H) and blood volume by the following equations:

$$V_{\text{RBC}} = H \times V_{\text{BLOOD}}$$

(2)

$$V_{\text{PLASMA}} = (1 - H) \times V_{\text{BLOOD}}$$

(3)

By substituting equations 2 and 3 in equation 1, eugenol concentrations in RBC were calculated with the following equation:

$$\text{CONC}_{\text{RBC}} = [(\text{CONC}_{\text{BLOOD}} - (\text{CONC}_{\text{PLASMA}} \times (1 - H)))] / H$$

(4)

In this study, the hematocrit was fixed to a nominal value of 0.45 based on results found in the literature for male Sprague-Dawley rats (Matsuzawa *et al.*, 1993).

4.3.3 Analytical Assay

The analytical assay of eugenol in plasma and blood was performed according to methods previously published using dansyl chloride as a derivatizing agent (Beaudry *et al.*, 2005). Briefly, eugenol and dansyl chloride were purchased from Sigma-Aldrich (St-Louis, MO, USA). Other chemicals, including acetonitrile, methanol, sodium hydroxide and formic acid were purchased from J.T. Baker (Phillipsburg, NJ, USA). The HPLC system consisted of an autosampler Varian 9100 (Palo Alto, CA, USA) and a Water 625 pump (Milford, MA, USA). The LC-MS/MS system used was a PESCiex API 3⁺

(Applied Biosystem/MDS Sciex, Concord, ON, Canada). Data was acquired on an AppleTM Macintosh[®] (Silicon Valley, CA, USA) equipped with operation system 7.4. Data acquisition and analysis were performed using MassChrom 1.0 (Concord, ON, Canada). Calibration curves were calculated from the equation $y = ax + b$, as determined by weighted ($1/x$) linear regression of the calibration line constructed from the peak-area ratios of the drug and the internal standard. A linear regression (weighted $1/\text{concentration}$) was judged to produce the best fit for the concentration-detector relationship (Beaudry, 1999). The regression model used was determined using the sum of the squares of the deviation. By convention, the regression line is considered to properly fit the calibration set when the sum of squares of the deviation is minimized.

Eugenol was extracted from rat plasma or blood using protein precipitation. A total of 50 μL of sample was mixed with 250 μL of internal standard solution (250 ng/mL thymol in acetone) in a 1.5 mL centrifuge tube. The sample was then vortexed vigorously and the samples were allowed to rest 10 min at room temperature prior to centrifugation. Samples were centrifuged at approximately 12000 g for 10 min and 250 μL of the supernatant was transferred into a 650 μL injection vial. One hundred μL of dansyl chloride solution (1 mg/mL in acetone) and 20 μL of 100 mM NaOH solution were added to injection vials and the sample was heated at 60°C for 10 min. The vial was vortex briefly and transferred to an autosampler for analysis. An isocratic mobile phase was used with a Keystone Scientific (Thermo) BDS Hypersil C8 50 x 2 mm column with a particle size of 5 μm . The mobile phase consisted of acetonitrile and 0.5% formic acid in water at a ratio of 80:20, respectively. The flow rate was fixed at 0.55 mL/min and eugenol eluted after 0.9 min and the internal standard (thymol) after 1.1 min. The eluent was split 1:10 prior to introduction into the electrospray source. Ten μL of the extracted sample was injected and the total run time was set to 2 min. The mass spectrometer was interfaced with the HPLC system using a pneumatic assisted electrospray ion

source. The N₂ pressure of the nebuliser gas was set at 40 psi and the ESI electrode was set to 4000 V. The declustering potential was set to 15 V and the collision energy (E_{lab}) to 25 V. The collision gas used was argon at 2.5×10^{14} molecules/cm². The SRM transition were m/z 398 → 171 and 384 → 171 for eugenol and thymol, respectively. The dwell time was set to 150 ms and the pause time at 5 ms.

4.3.4 Pharmacodynamic Study

A summary of the study design using the experimental model of neuropathic pain in male Sprague-Dawley rats is presented in Table 1. Twelve rats were used for the pharmacodynamic study. Following 5 days of behavioural testing to obtain baseline values of thermal and mechanical sensitivity from intact animals, rats were implanted with a cuff around the right sciatic nerve to induce neuropathic pain. Aseptic surgical procedures were used in sciatic nerve cuff-implanted rats (Pitcher *et al.*, 1999). Briefly, following anesthesia with isoflurane (AErrane; Baxter, Mississauga, ON, Canada), the right common sciatic nerve was exposed via blunt dissection at the level of the thigh (biceps femoris). A 2 mm PE-90 polyethylene cuff (Fischer Scientific Canada Inc., Nepean, ON, Canada) was placed around the nerve following its isolation using ball-tipped glass probes. The muscle was sutured with 3.0 vicryl suture and the skin was closed with a 2.0 silk suture.

Following a 2-day recovery period from surgery, thermal and mechanical sensitivities of the left (unoperated) and right (cuff-implanted) hind paws were determined using the Hargreave's test and von Frey filaments for the next 5 consecutive days to assess the efficacy of the experimental model to induce neuropathic pain. Briefly, a progressive light intensity, inducing heat, was applied on the left and right hind paws and animals were allowed to voluntarily retract their hind paw from the light source upon reaching the threshold of intolerable pain sensation (Hargreave's test). The maximum duration over which

the hind paw was exposed was set to 20 s. Mechanical sensitivity was also evaluated on the left (unoperated) and right (cuff-implanted) hind paws using von Frey filaments based on a previously published method (Vachon *et al.*, 2004). For the von Frey test, paw withdrawal thresholds were evaluated on the plantar surface of the right hind paw following surgery using von Frey monofilaments (0.4 g – 50 g; Stoelting, Wood Dale, IL, USA). Monofilament application was to the central region of the plantar surface and the hairs were applied until buckling occurred. Values reported are the threshold force (g) necessary to elicit the mechanical withdrawal of the hind paw. The threshold was taken as the lowest force that caused at least 3 withdrawals out of 5 consecutive stimuli.

Rats were then distributed in two groups to receive either daily oral doses (40 mg/kg) of eugenol (n = 6) or a saline solution (n = 6) for the next 5 consecutive days. To avoid bias, rats were distributed in two groups in order to obtain similar mean thermal sensitivity levels (Hargreave's test) prior to treatment administration. The eugenol solution (50 mg/mL) consisted of 0.5 mL eugenol, 0.5 mL cremophor, 1 mL ethanol (99%) and 8 mL saline 0.9%. For the next 5 consecutive days, thermal hyperalgesia and allodynia tests were performed within 30 min following oral gavage of eugenol or the saline solution.

4.3.5 Pharmacokinetic and Pharmacodynamic Parameters

The following pharmacokinetic parameters were calculated in intact animals: area under the curve from time zero to the last detectable concentration (AUC_{0-t}) using the linear trapezoidal rule; area under the curve extrapolated to infinity (AUC_{0-inf}); maximum observed concentration (C_{max}); time of maximum concentration (T_{max}); apparent first-order terminal elimination rate constant (Kel); the terminal elimination half-life ($T_{1/2}$ calculated as $0.693/kel$); and the apparent oral clearance (CL/F, calculated as $Dose/AUC_{0-inf}$) (Rowland and

Tozer, 1995). Descriptive statistics were calculated for all pharmacokinetic parameters. All pharmacokinetic parameters were calculated using Kinetica[®] Version 4.1.1 (InnaPhase Corporation). Statistical analyses were performed using SYSTAT 8.0 for Windows (SPSS Inc.).

In order to evaluate the efficacy of the experimental model to induce neuropathic pain, thermal sensitivity results measured during the behavioral test period (Day 1-5) were compared to those observed during the neuropathic pain period (Day 8-12). Individual values of thermal sensitivities were measured in the morning of Day 1-5 and Day 8-12. Paired t-test analysis were performed between the pooled data collected during the behavioral test period (Day 1-5) and during the neuropathic pain evaluation period (Day 8-12). Individual values of thermal and mechanical sensitivities measured over the last 3 days of the neuropathic pain evaluation period (Day 10-12) were used to calculate mean baseline results of thermal and mechanical sensitivities for each rat. Following oral administration of eugenol or saline on Day 13 to 17, thermal and mechanical sensitivities were evaluated at 20 and 30 min postdose and values were averaged in each rat. Individual changes from baseline were calculated by subtracting the baseline value of thermal and mechanical sensitivity to the values measured over 5 days of treatment for each rat. Results of hyperalgesia and allodynia (raw measurements and change from baseline) following eugenol treatments were compared to those from the saline group every day using a two-sample t-test.

For the statistical comparison with the placebo group, homogeneity of variance in hyperalgesia and allodynia results was assumed considering the small number of animals used. Since comparisons between treatments were performed every day, the level of statistical significance was adjusted for the multiplicity of comparisons (Bonferroni correction). As a result, the level of significance was set to 0.01 (i.e., $0.05/5$) considering that a total of 5

comparisons were performed. Statistical analyses were performed with SYSTAT, version 8.2.

4.4 Results

4.4.1 Quantitative Analysis

The full scan spectra of the dansyl chloride derivative of eugenol and the internal standard thymol displayed intense signals for the protonated molecular ion ($[M+H]^+$) at m/z of 398 and 384, respectively. As expected, the reactions resulted in a mass increase of 233 Da for each product. The mass transition in selected reaction monitoring mode was set for best sensitivity at $398 \rightarrow 171$ and $384 \rightarrow 171$ for eugenol and thymol, respectively. The protein precipitation approach was the simplest method available for preparation and resulted in a recovery $> 90\%$. A linear regression (weighted $1/\text{concentration}$) was judged to produce the best fit for the concentration-detector relationship. The analytical range was set from 20 to 20000 ng/mL. The precision of the method was evaluated: the observed CV% range was from 7.1 to 12.1 % and the observed accuracy range was from 89.1 to 107.8 % of the nominal concentration.

4.4.2 Pharmacokinetic Results

The pharmacokinetic profiles of eugenol in plasma and red blood cells were assessed in intact animals over 24 h. Mean concentration profiles are presented in Figure 1. Overall, the mean plasma concentration profile of eugenol displayed double peaks at approximately 0.25 and 4 h and then declined very slowly over the 24 h kinetic study. Following an initial rapid decline, blood concentrations of eugenol also declined very slowly. Mean pharmacokinetic parameters of eugenol in plasma and blood are presented in Table 2. Mean $AUC_{0-\text{inf}}$ values in blood and plasma were close to the AUC_{0-t} , suggesting that the extrapolated area of the curve was small relative to the calculated $AUC_{0-\text{inf}}$. Mean oral clearance values in plasma and blood were 86.7 and 86.8 L/h/kg,

respectively. Mean $T_{1/2}$ values in plasma and blood were 14.0 and 18.3 h, respectively.

Partition coefficient (K_p) between RBC and plasma at all timepoints are presented in Table 3. Since a different group of animals was used for the determination of blood and plasma concentrations, the K_p was calculated using mean concentrations at each time point as an indication of the partition coefficient of eugenol *in vivo*. The RBC: plasma partition coefficient decreased over time, suggesting a re-distribution of eugenol from red blood cells to plasma. At early time points (15 and 30 min), the eugenol fraction in RBC is greater than plasma as suggested by its lipophilic properties.

4.4.3 Pharmacodynamic Results

Results of the Hargreave's test on the plantar heat sensitivity in male Sprague-Dawley rats before surgery (Day 1-5) and during evaluation of the experimental model of neuropathic pain (Day 8-12) are presented in Figure 2. A statistically significant difference in plantar sensitivity was observed before and after the sciatic nerve cuff implantation ($P = 0.03$) for the right paw thermal sensitivity testing.

Thermal sensitivity at baseline and following repeated oral administrations of eugenol and saline, as well as change from baseline values are depicted in Figure 3. Overall, thermal sensitivity in rats receiving eugenol decreased constantly following repeated oral administrations of the drug. In sharp contrast to the eugenol group, thermal sensitivity in rats receiving the saline solution remained relatively stable over the 5 treatment days, with mean values ranging from 5.3 to 6.9 s. On the last day of treatment, mean (\pm SE) reflex time of thermal sensitivity following eugenol and saline treatments were 11.4 ± 1.23 and 6.1 ± 0.53 s, respectively ($P < 0.01$). Similarly, mean (\pm S.E.M.) change from baseline in thermal sensitivity following eugenol and saline treatments were $+5.30 \pm 1.05$ and $+0.74 \pm 0.68$ s, respectively ($P < 0.01$).

Thermal sensitivity results are presented for the right hind paw (cuff-implanted) only as no change was observed for the unoperated left hind paw (results not shown). Mechanical sensitivity at baseline and following repeated oral administrations of eugenol and saline as well as change from baseline values are depicted in Figure 4. Overall, mechanical sensitivity in rats receiving eugenol and saline treatments overlapped each other. No statistically significant differences were observed for right hind paws on any of the treatment days. Mechanical sensitivity results for the right hind paw were similar to those observed for the unoperated left hind paw (results not shown). No conclusion can be drawn for mechanical sensitivity since no allodynia was present in cuff-implanted animals and we have no explanation for this occurrence.

4.5 Discussion and Conclusions

The pharmacokinetics of eugenol was characterised in rats using a sensitive LC/MS/MS assay. Following the initial rapid decline in plasma concentrations of eugenol, a secondary peak occurred at approximately 4 h postdose. Since glucuronide and sulfate conjugates of eugenol were recently identified in urine of rats (Guenette *et al.*, 2006), it is possible that the sudden increase in plasma concentration may be associated to enterohepatic recirculation of the drug such as previously reported for other phenolic compounds undergoing conjugation (Marier *et al.*, 2002). Compartmental methods were not used in the current study since additional experimentations involving bile-cannulated rats would be required for the development of a pharmacokinetics model involving enterohepatic recirculation of eugenol. Mean elimination half-life of eugenol in plasma and blood were 14.0 and 18.3 h, respectively. These elimination half-life values of eugenol are markedly longer than those recently reported in a preliminary biodisposition study, where the metabolic fate of eugenol in plasma and urine was only characterised over a limited timeframe (Guénette *et al.*, 2006). Due to the long elimination half-life

of eugenol, some level of accumulation is expected following repeated oral administrations in rats.

The analgesic properties of eugenol were determined using the sciatic nerve cuff-implanted rat model inducing neuropathic pain (Pitcher *et al*, 1999). Results of the Hargreave's test confirmed the efficacy of the experimental model to induce neuropathic pain since sensitivity in male Sprague-Dawley rats was markedly reduced following sciatic nerve cuff implantation in the right hind paw of rats. Pain sensitivity was then assessed at baseline and following repeated oral administrations of 40 mg/kg of eugenol relative to a saline solution for 5 days. Although statistical significance between the eugenol and the saline group was only observed on Day 5, the pharmacological effect of eugenol appeared to increase in a constant manner over the 5 consecutive days of treatment. Thermal sensitivity results were reported for the right (cuff-implanted) hind paw only as no change from baseline was observed for the unoperated left hind paw (results not shown). Interestingly, these results suggest that eugenol did not affect the motor component of the reaction time in the Hargreave's test. No adverse clinical signs were observed in rats following oral administration of eugenol for 5 consecutive days.

These results suggest that eugenol may be used as a therapy for the treatment of neuropathic pain. Since eugenol appears to have a relatively long elimination half-life in plasma and red blood cells and since repeated daily oral administrations may result to a certain degree of accumulation of the drug, results of the current study suggest a long lasting blocking effect of eugenol on TRVP1 which resulted in a gradual decrease of pain sensitivity after 5 days of treatment. Other mechanisms may contribute to the alleviation of pain. Kanai *et al*. (2005) have shown that TRPV1 receptors may be up regulated in the sciatic nerve constriction model in rats. Eugenol may therefore show a greater effectiveness over time with a greater number of TRPV1 cell receptors in the development of neuropathic pain. This up regulation was observed in the dorsal

horn of the lumbar spinal cord. We therefore cannot exclude that eugenol may modulate central as well as peripheral receptors (Ueda, 2006) in the development of neuropathic pain.

Eugenol is a reversible vanilloid agonist which is an antagonist for vanilloid receptors. Results from the current *in vivo* study are consistent with the previously published *in vitro* results showing that eugenol has capsaicine-like activity specific to the TRPV1 receptor, thereby confirming its potential role in neuropathic pain. Peripheral hypersensitised pain nerve endings and specific central nervous system loci including the dorsal horn of the spinal cord, the thalamus, the hypothalamus and the reticular formation (without any specific binding in the somatosensory cortex), showed specific interactions with eugenol (Jancso-Gabor *et al.*, 1970; Szolsanyi *et al.*, 1971; Szallasi and Blumberg, 1993; Acs and Blumberg, 1994; Acs *et al.*, 1996; Guo *et al.*, 1999; Yang *et al.*, 2003). Therefore other central targets apart from the dorsal horn of the spinal cord may be implicated in vanilloid mechanisms in neuropathic pain. In our study, the effects of eugenol on mechanical sensitivity were inconclusive since rats did not show allodynia. The effects of eugenol on this behavior need to be investigated since we have no evidence at the present time on mechanical desensitization with this drug. This will be the focus of our future studies. Other vanilloid receptors, such as TRPV4 (Suzuki *et al.*, 2003), are implicated mechanical allodynia associated with neuropathic pain and there is no evidence at the present time to suggest binding of eugenol to other TRPV1 receptors. Other natural molecules may prove to be more potent than eugenol binding to other types.

Nociceptive information is relayed to spinal cord neurons of the dorsal horn, particularly in laminae I-II and V-VII (Todd *et al.*, 2002). Lamina I neurons relay to different areas of the brain concerned with discrimination, affect, motor and autonomic regulations (Craig, 2002). These neurons receive inputs from A δ and C nociceptive fibers responding to noxious thermal and

mechanical stimulation (Bester *et al.*, 2000; Lawson, 2002). The majority of small A δ and C nociceptive fibers are sensitive to vanilloid products and play a pivotal role in the control of pain sensitivity (Ikeda *et al.*, 1997; Nichols *et al.*, 1999). Capsaicin and resiniferatoxin are two non-reversible ligands of the vanilloid family used for the treatment of neuropathic pain (Szallasi and Blumberg, 1999). Autoradiography with [3 H] resiniferatoxin shows clear binding in laminae I and II of the dorsal horn of different mammalian species underlining the presence of RV in these anatomical levels (Szallasi *et al.*, 1994). Also [3 H] resiniferatoxin interactions in dorsal root ganglions of rats induced currents that persist even after the removal of the initial agonist and therefore create a continuing effect on ganglion cells thus suggesting its potential for a prolonged and additive action (Baccaglini and Hogan, 1983; Heyman and Rang, 1985; Forbes and Bevan, 1988; Winter *et al.*, 1990; Vlachova and Vyklicky, 1993). These results strongly suggest that eugenol may also act by inducing a block in pain transmission.

Overall, our results support the hypothesis that eugenol may alleviate neuropathic pain. Only the cuff model in rats was used for these experiments and to establish its efficacy eugenol should be tested using other neuropathic pain models related sensitization by TRPV1 receptors. Further work is also necessary to evaluate the dose effect relationship of eugenol as well as central and peripheral contributions.

4.6 Reference List

Acs, G., Blumberg P.M., 1994. [3 H]Resiniferatoxin binding to pig dorsal horn membranes displays positive cooperativity, *Life Sci.* 55, 337-346.

Acs, G., Palkovits, M., Blumberg, P.M., 1996. Specific binding of [3 H]resiniferatoxin by human and rat preoptic area, locus ceruleus, medial hypothalamus, reticular formation and ventral thalamus membrane preparations. *Life Sci.* 59, 1899-1908.

Aoshima, H., Hamamoto, K., 1999. Potentiation of GABA A receptors expressed in *Xenopus* oocytes by perfumes and phytoncid. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 63, 743-748.

Baccaglini, P.J., Hogan, P.G., 1983. Some rat sensory neurons in culture express characteristics of differentiated pain sensory cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80, 594-598.

Beaudry, F., 1999. Statistical evaluation of linearity and non linearity of LC/MS/MS quantitation analysis. *Pharm Sci.* 1, (S1) 2437.

Beaudry, F., Guénette, S.A., Winterborn, A., Marier, J.-F., Vachon, P., 2005. Development of a rapid and sensitive LC-ESI/MS/MS assay for the quantification of propofol using a simple off-line dansyl chloride derivatization reaction to enhance signal intensity. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 39, 411-417.

Bester, H., Chapman, V., Besson, J.M., Bernard, J.F., 2000. *J. Neurophysiol.* 83, 2239-2259.

Caterina, M.J., Julius, D., 2001. The vanilloid receptor: a molecular gateway to the pain pathway. *Ann. Rev. Neurosci.* 24, 487-517.

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.

Craig, A.D., 2002. How do you feel? Interoception: the sense of the physiological condition of the body. *Natl. Rev. Neurosci.* 3, 655-66.

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., Sheardown, S.A., 2000. Vanilloid receptor-1 is essential for inflammatory thermal hyperalgesia, *Nature* 405, 183-187.

Forbes, C.A., Bevan, S.J., 1988. Properties of single capsaicin-activated channels. *Soc. Neurosci. Abstr.* 14, 642.

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., Pérez-Paya, E., Belmore, C., Messeguer, A., Ferrer-Montiel, A., 2002. Attenuation of thermal nociception and hyperalgesia by VR1 blockers. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99, 2374-2379.

Groupe d'Experts Douleurs Neuropathiques (GEDN), 2004. Thoughts on the definition of postherpetic pain: the time criterion adds nothing. *Rev. Neurol. (Paris)* 160, 721-725.

Guénette, S.A., Beaudry, F., Marier, J.F., Vachon, P. 2006. Pharmacokinetics and anesthetic activity of eugenol in male Sprague–Dawley rats *J. Vet. Pharmacol. Therap.* 29, 265–270.

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.

Heyman, I., Rang, H.P., 1985. Depolarizing responses to capsaicin in a subpopulation of rat dorsal root ganglion cells. *Neurosci. Lett.* 56, 69-75.

Ikeda, H., Tokita, Y., Suda, H., 1997. Capsaicin-sensitive A delta fibres in cat tooth pulp. *J. Dent. Res.* 76,1341-1349.

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

Kanai, Y., Nakazato, E., Fujiuchi, A., Hara, T., Imai, A., 2005, Involvement of an increased spinal TRPV1 sensitization through its up-regulation in mechanical allodynia of CCI rats. *Neuropharmacol.* 49: 977-984.

Kozam, G., 1977. The effect of eugenol on nerve transmission. *Oral Surg.* 44, 799.

Laekeman, S.M., Hoof, V.L., Haemers, A., Berghe, V.A.D., Herman, A.G., Vlietink, A.K., 1990. Eugenol A valuable compound for in-vitro experimental research and worthwhile for further in-vivo investigation. *Phytother. Res.* 4, 90-96.

Lawand, N.B., Willis, W.D., Westlund, K.N., 1997. Excitatory amino acid receptor involvement in periferal nociceptive transmission in rats. *Eur. J. Pharm.* 324, 169-177.

Lawson, S.N., 2002. Phenotype and function of somatic primary afferent nociceptive neurones with C-, A delta- or A alpha/beta-fibres. *Exp. Physiol.* 87, 239-244.

Liu, L., Simon, S.A., 1996. Similarities and differences in the currents activated by capsaicin, piperine and zingerone in rat trigeminal ganglion cells. *J. Neurophysiol.* 76, 1858-1869.

Marier, J.-F., Vachon, P., Gritsas, A., Zhang, J., Moreau, J.-P., Ducharme, M.P., 2002. Metabolism and disposition of resveratrol in rats: extent of absorption, glucuronidation, and enterohepatic recirculation evidenced by a linked-rat model. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 302, 369-373.

Matsuzawa, T., Nomura M., Unno, T., 1993. Clinical pathology reference ranges of laboratory animals. Working Group II, Nonclinical Safety Evaluation Subcommittee of the Japan Pharmaceutical Manufacturers Association. *J. Vet. Med. Sci.* 55:351-362.

Nelson, E.K., 1919. The constitution of capsaicin—the pungent principle of capsicum, *J. Am. Chem. Soc.* 41, 1115-1117.

Nichols, M.L., Allen, B.J., Rogers, S.D., Ghilardi, J.R., Honore, P., Luger, N.M., Finke, M.P., Li, J., Lappi, D.A., Simone, D.A., Mantyh, P.W., 1999. Transmission of chronic nociception by spinal neurons expressing the substance P receptor. *Science* 286, 1558-1561.

Ohkubo, Y., Shibata, M., 1997. The selective capsaicin antagonist capsazepine abolishes the antinociceptive action of eugenol and guaiacol. *J. Dent. Res.* 76, 848-851.

Pitcher, G.M., Ritchie, J., Henry, J.L., 1999. Nerve constriction in the rat: model of neuropathic, surgical and central pain. *Pain* 83, 37-46.

Reddy, A.C., Lokesh, B.R., 1994. Studies on anti-inflammatory activity of spice principles and dietary n-3 polyunsaturated fatty acids on carrageenan-induced inflammation in rats. *Ann. Nutrition Metab.* 38, 349–358.

Spath, E., Darling, S.F., 1930. Synthesis of capsaicin. *Ber. Chem. Ges.* 63B, 737-740.

Suzuki, M., Mizuno, A., Kodaira, K., Imai, M., 2003. Impaired pressure sensation in mice lacking TRPV4. *J. Biol. Chem.* 278, 22664-22668.

Szallasi, A., Biro, T., Szabo, T., Modarres, S., Petersen, M., Klusch, A., Blumberg, P.M., Krause, J.E., Sterner, O., 1999. A non-pungent triprenyl phenol

of fungal origin, scutiger, stimulates rat dorsal root ganglion neurons via interaction at vanilloid receptors. *Br. J. Pharm.* 126, 1351-1358.

Szallasi, A., Blumberg, P.M., 1993. [³H]resiniferatoxin binding by the vanilloid receptor: species-related differences, effects of temperature and sulfhydryl reagents. *Naunyn Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 347, 84-91.

Szallasi, A., Blumberg, P.M., 1999. Vanilloid (capsaicin) receptors and mechanisms. *Pharm. 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.

Thresh, L.T., 1846. Isolation of capsaicin. *Pharm. J.* 6, 941.

Todd, A.J., Puskar, Z., Spike, R.C., Hughes, C., Watt, C., Forrest, L., 2002. Projection neurons in lamina I of rat spinal cord with the neurokinin 1 receptor are selectively innervated by substance P-containing afferents and respond to noxious stimulation. *J. Neurosci.* 22, 4103-4113.

Tominaga, M., Caterina, M.J., Malmberg, A.B., Rosen, T.A., Gilbert, H., Skinner, K., Raumann, B.E., Basbaum, A.I., Julius, D., 1998. The cloned capsaicin receptor integrates multiple pain-producing stimuli. *Neuron* 21, 531-543.

Ueda, H., 2006. Molecular mechanisms of neuropathic pain-phenotypic switch and initiation mechanisms. *Pharmacol. Ther.* 109, 57-77.

Vachon, P., Massé, R., Gibbs, B., 2004. Substance P and neurotensin are up-regulated in the lumbar spinal cord of neuropathic animals. *Can. J. Vet. Res.* 69, 86-92.

Vlachova, V., Vyklicky, L., 1993. Capsaicin-induced membrane currents in cultured sensory neurons of the rat. *Physiol. Res.* 42, 301-311.

Wie, M.B., Won, M.H., Lee, K.H., Shin, J.H., Lee, J.C., Suh, H.W., Song, D.K., Kim, Y.H., 1997. Eugenol protects neuronal cells from excitotoxic and oxidative injury in primary cortical cultures. *Neurosci. Lett.* 225, 93-96.

Winter, J., Dray, A., Wood, J.N., Yeats, J.C., Bevan, S., 1990. Cellular mechanism of action of resiniferatoxin: A potent sensory neuron excitotoxin. *Brain Res.* 520, 131-140.

Yang, B.H., Piao, Z.G., Kim, Y.B., Lee, C.H., Park, K., Kim, J.S., Oh, S.B., 2003. Activation of vanilloid receptor 1 (VR1) by eugenol. *J. Dent. Res.* 82, 781-785.

4.7 Figure Legend

Figure 1. Mean (\pm S.E.M.) concentrations of eugenol in blood (full circles) ($n = 6$) and plasma (empty circles) ($n = 6$) following a single oral administration (40 mg/kg) in male Sprague-Dawley rats on semi-log and linear scale (top and bottom panels respectively).

Figure 2. Mean (\pm S.E.M.) thermal sensitivity (Hargreave's test) results during the behavioural period (Day 1-5) and the experimental phase of neuropathic pain (Day 8-12) in male Sprague Dawley rats prior to eugenol ($n = 6$) and saline treatments ($n = 6$).

Figure 3. Mean (\pm S.E.M.) thermal sensitivity results (Hargreave's test on cuff-implanted right hind paw) following repeated oral administrations of eugenol (40 mg/kg) (full circles) and saline (empty circles) in male Sprague Dawley rats ($n = 6$ per group). Day 0 corresponds to mean baseline values. On Day 5, $p < 0.01$.

Figure 4. Mean (\pm S.E.M.) mechanical sensitivity results (von Frey filaments test on cuff-implanted right hind paw) following repeated oral administrations of eugenol (40 mg/kg) (full circles) and saline (empty circles) in male Sprague Dawley rats ($n = 6$ per group). Day 0 corresponds to mean baseline values.

Tables

Table 1. Summary of study design and procedures used in the experimental model of neuropathic pain in male Sprague Dawley rats.

Days	Procedures
1 – 5	Behavioural Testing – Intact animals
5	Surgical Procedures – Cuff implantation in right hind paw
6-7	Recovery Period
8	Neuropathic pain model evaluation ^a
9	Neuropathic pain model evaluation ^a
10	Neuropathic pain model evaluation ^a – Baseline 1
11	Neuropathic pain model evaluation ^a – Baseline 2
12	Neuropathic pain model evaluation ^a – Baseline 3
13	Treatments and sensitivity assessment ^a - Day 1
14	Treatments and sensitivity assessment ^a - Day 2
15	Treatments and sensitivity assessment ^a - Day 3
16	Treatments and sensitivity assessment ^a - Day 4
17	Treatments and sensitivity assessment ^a - Day 5

^a Thermal and mechanical sensitivity according to Hargreave's test and von Frey filaments, respectively.

Table 2. Mean (CV%) pharmacokinetic parameters of eugenol in plasma (n = 6) and blood (n = 6) following oral administration of eugenol (40 mg/kg) in male Sprague Dawley rats.

PK parameters	Plasma	Blood
AUC _{0-t} (µg.h/mL)	0.384 (42.4%)	0.342 (31.0%)
AUC _{0-inf} (µg.h/mL)	0.577 (51.0%)	0.518 (38.8%)
C _{max} (µg/mL)	0.123 (25.7%)	0.270 (80.5%)
T _{max} (h)*	2.13 (0.25 – 4.00)	0.25 (0.25 – 0.50)
T _½ (h)	14.0 (58.3%)	18.3 (37.3%)
CL/F (L/h/kg)	86.7 (50.0%)	86.8 (34.9%)

AUC_{0-t}: area under curve from time zero to the last measurable concentration, AUC_{0-inf}: area under curve extrapolated to infinity, C_{max}: maximum plasma concentration, T_{max}: time to maximum plasma concentration, T_½: terminal elimination half-life, CL/F: apparent oral clearance. * Median (Minimum - Maximum)

Table 3. Partition coefficient (K_p) of eugenol in blood following a single gavage administration of eugenol (40 mg/kg).

Time (h)	K_p (RBC:Plasma)
0,25	1,8
0,5	2,8
1	0,4
2	0,5
4	0,9
6	0,6
8	0,1
24	0,2

Figures

Figure 1

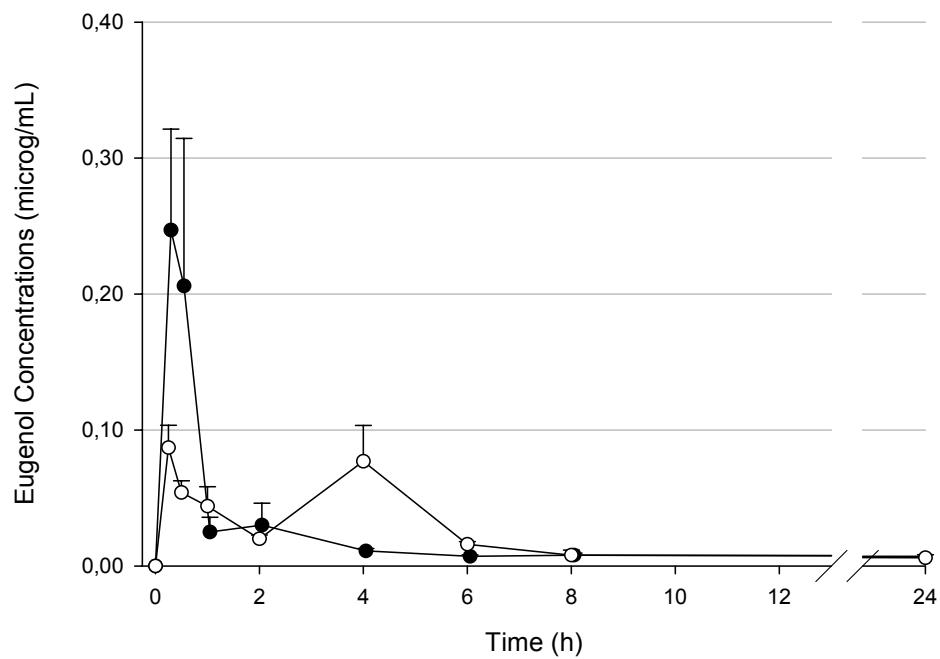
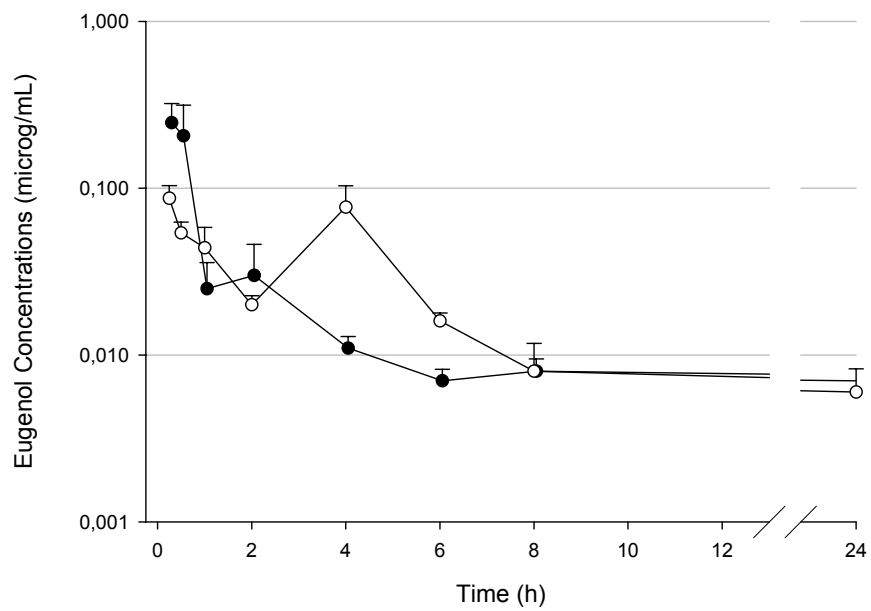


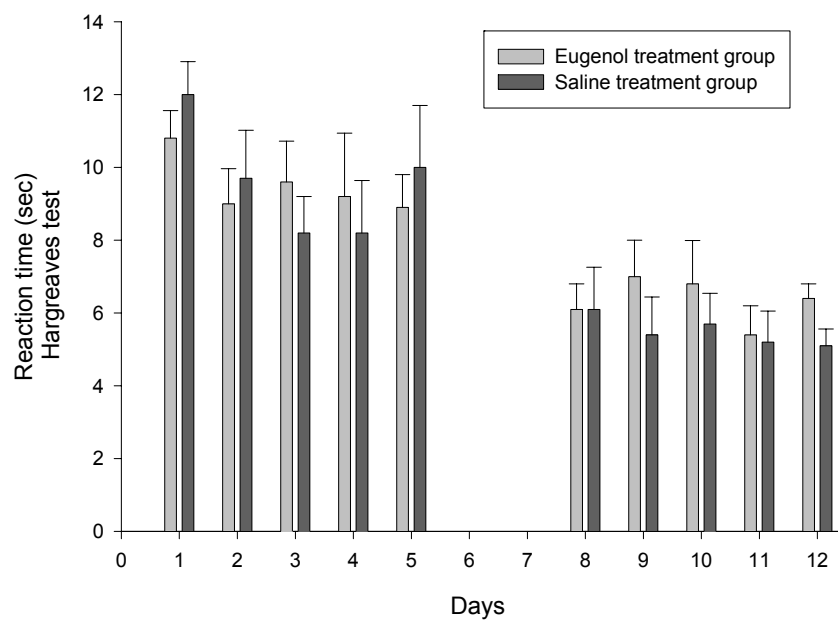
Figure 2

Figure 3

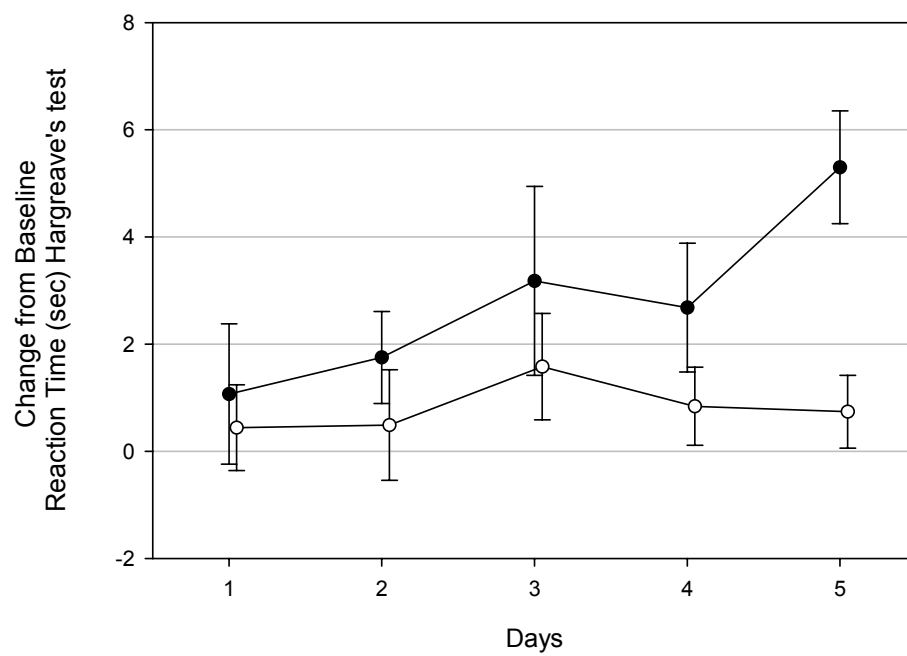
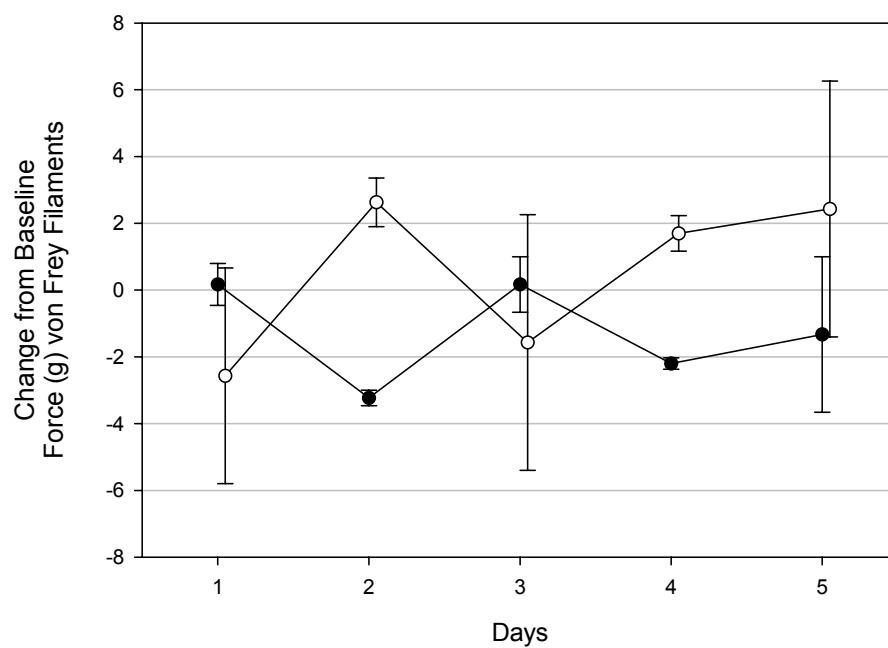
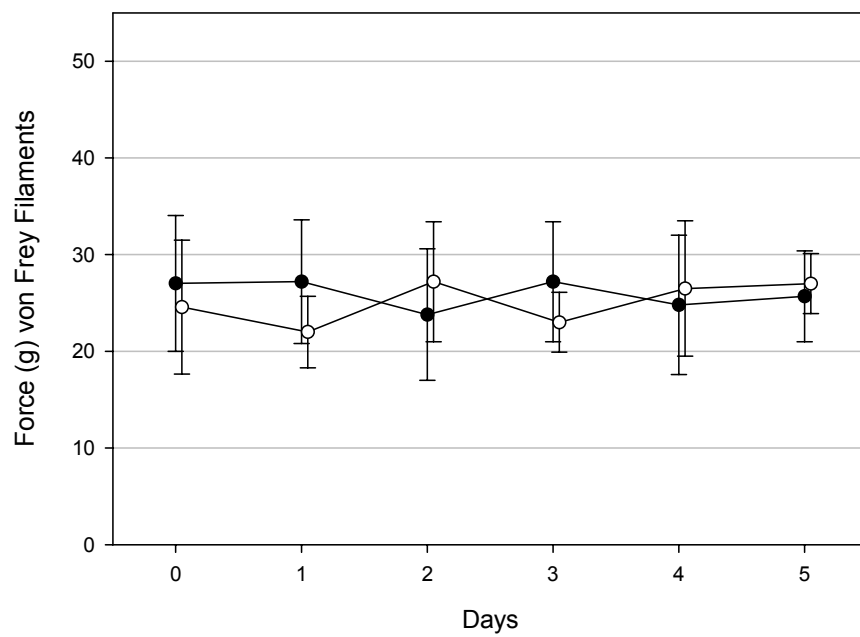


Figure 4



CHAPITRE 3: DISCUSSION ET CONCLUSIONS GÉNÉRALES

1. Différenciation entre anesthésie et analgésie

Nous pouvons retrouver différents types d'anesthésie et d'analgésie. Tout d'abord, l'anesthésie se divise en trois grandes familles, soit l'anesthésie régionale ou loco-régionale et l'anesthésie générale. Les deux premières impliquent l'utilisation d'une substance en injection locale ou l'application d'une gelée visant l'élimination de la perception sensorielle dans une partie bien précise du corps. L'anesthésie locale vise une partie spécifique du corps tandis que la loco-régionale a quant à elle pour objectif un territoire desservi par un nerf ou un groupe de nerfs. L'anesthésie générale implique l'utilisation de substances en injection intraveineuse ou l'administration de substances par inhalation gazeuse causant une perte de conscience. Ces substances ne présentent pas nécessairement d'effets contre la douleur induite et travaillent même dans certains cas seulement au niveau de la conscience. Il est donc primordial d'utiliser une conjonction de produits qui engendreront également une perte de sensation douloureuse. L'analgésie interrompt quant à elle la transmission du signal neuronal de douleur depuis la zone lésée, en souffrance, vers le système nerveux central. Il s'ensuit donc une perte de la sensation douloureuse sans qu'il n'y ait nécessairement perte de sensation mécanique ou de conscience. Peu de molécules présentent des effets simultanés d'anesthésie et d'analgésie. A titre d'exemple, la kétamine peut induire une perte de conscience (anesthésie générale), mais agit aussi comme analgésiant par inhibition des récepteurs NMDA lorsqu'utilisée à plus petites doses (Marchand, 2005). Un autre exemple de cet effet concomitant est l'eugénol qui a aussi, lorsqu'utilisé en injection intraveineuse, prouvé son effet à la fois anesthésiant et analgésiant par son inactivation des récepteurs TRPV1.

2. Justification du modèle de douleur neuropathique utilisé dans le cadre de cette recherche.

La constriction du nerf sciatique (CCNS) fut d'abord mise au point par Bennett et Xie (1988) chez le rat. Elle consiste en la mise en place de quatre nœuds (fil chromique catgut 4-0) directement sur le nerf sciatique (Figure 12). Une autre technique similaire de constriction du nerf sciatique fut démontrée par Pitcher *et al.* (1999). Cette approche utilise une gouttière de polyéthylène (PE-90) de 4-5 mm de longueur, installée autour du nerf sciatique. Le modèle CCNS affecte davantage les fibres conduisant l'information douloureuse d'origine mécanique que celles conduisant l'information douloureuse d'origine thermique. Les fibres myélinisées (fibres A) sont également affectées (Pitcher et Henry, 2000). La majorité des fibres sensibilisées appartiennent au groupe des fibres C, ce qui suggère l'implication prédominante des fibres C dans l'établissement et le maintien de la douleur neuropathique. Ces deux modèles étant les plus répandus dans les études de douleur neuropathiques chez le rat, il fut possible de comparer nos résultats à des études similaires. Par contre, considérant le double rôle du nerf sciatique, les composantes sensorielles et motrices sont affectées par une constriction de ce nerf. Une étude des effets de l'eugénol au niveau de la moelle épinière bénéficierait d'un modèle de douleur neuropathique utilisant un nerf à composante exclusivement sensorielle comme le modèle de ligature partielle du nerf saphène (Walczak, *et al.*, 2005). Ce nouveau modèle permettrait une différenciation au niveau central des effets moteurs par rapport aux effets sensoriels de l'eugénol.

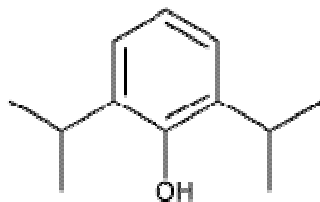
3. Comparaison entre le propofol, une autre molécule phénolique et l'eugénol.

3.1 Propriétés chimiques

Molécules non polaires, le propofol et l'eugénol, présentent une absence de groupement ionisable, un groupement phénolique et il s'agit d'acides faibles ($pK_a = 9$ à 10) qui sont très peu solubles dans l'eau, mais qui sont solubles dans

un solvant organique à faible polarité (Beaudry, *et al.*, 2005; Beaudry, Guénette *et al.*, 2006 ; Monographie Propofol) (Figure 29).

Figure 1 : Formule moléculaire du propofol



Considérant leur faible potentiel ionisable sous forme aqueuse, les deux molécules présentent un défi en regard d'une étude de chromatographie liquide compatible avec l'ionisation par électrospray. En effet, le propofol et l'eugénol nécessitent une dérivation dans le but d'une quantification. La dérivation avec le chlorure de dansyl fut étudiée avec les deux molécules et présente donc une avenue intéressante qui augmente significativement le niveau de détection de ces molécules (ANNEXE I et II).

3.2 Propriétés pharmacologiques

Chez le rat, une anesthésie est induite suite à l'administration intraveineuse de l'eugénol et du propofol (Guénette, *et al.*, 2006; Monographie propofol). L'administration *per os* de l'eugénol engendre aussi une analgésie chez les rats mâles Sprague-Dawley (Guénette, Ross, *et al.*, 2007). En immersion, le propofol n'induit pas d'anesthésie chez la grenouille *Rana pipiens*, tandis que l'eugénol induit une anesthésie chez la grenouille *Xenopus laevis* et chez la truite arc-en-ciel (*Oncorhynchus mykiss*), aussi en immersion (Lafortune *et al.*, 2001; Guénette, Hélie *et al.*, 2007; Guénette, Uhland *et al.*, 2007).

Le délai d'action du propofol (10mg/kg) chez le rat mâle Sprague-Dawley suite à une administration intraveineuse est de quelques secondes et induit une anesthésie d'une durée de 6.1 à 7.9 min (Monographie propofol).

Une administration intraveineuse d'eugénol (60 mg/kg) chez la même espèce agit en quelques secondes et persiste pour une durée de 2 à 3.5 min (Guénette *et al.*, 2006).

Le propofol est principalement métabolisé par le foie par conjugaison, produisant des métabolites inactifs qui se retrouvent en grande partie dans l'urine (entre 72 et 88%) et dans les selles (2%). Les principaux métabolites du propofol sont le glucuronate (50%) en position 1- et 4-glucuronate, puis, on retrouve le 4-sulfate de 2,6-diisopropyl-1,4-quinol (Monographie propofol). L'eugénol partage l'ensemble des caractéristiques mentionnées précédemment pour le propofol, étant principalement métabolisé par conjugaison au foie et présentant des glucuronates et des sulfates comme principaux métabolites (Guénette, *et al.*, 2006).

3.3 Propriétés physiologiques (récepteurs)

L'eugénol et le propofol actualisent une partie de leurs effets par des interactions avec les mêmes deux grandes familles de récepteurs. En effet, l'anesthésie et l'analgésie induites par l'eugénol et l'anesthésie induite par le propofol passent entre autre par une activation des récepteurs GABA, plus particulièrement du sous-type A, ainsi que par une inhibition des récepteurs du glutamate. D'autres récepteurs sont aussi impliqués dans le fonctionnement respectif de ces deux substances.

L'ouverture des canaux ioniques transmembranaires au chlore des récepteurs GABA_A, crée un mouvement vers l'intérieur de la cellule produisant une hyperpolarisation de la cellule qui inhibe son activité. Cette hyperpolarisation explique les effets de dépression sur le SNC, d'anxiolytiques, d'anticonvulsivants et de sédatifs. Aoshima et Hamamoto (1999) ont démontré que plusieurs substances présentent des effets agonistes des récepteurs GABA_A comme par exemple l'eugénol. Williams et Akabas (2002) confirment l'action

du propofol sur ces mêmes récepteurs, expliquant en partie leurs effets d'anesthésiant général.

Au niveau de la corne dorsale de la moelle épinière, les récepteurs NMDA et AMPA jouent un rôle dans la transmission de la douleur (Engelman, *et al.*, 1999 ; Szallasi et Blumberg, 1999). Lors d'une stimulation douloureuse, les terminaisons nerveuses centrales relâchent plusieurs substances pro-algiques, dont le glutamate (Sakurada *et al.*, 1998). En se liant aux récepteurs NMDA et aux récepteurs AMPA, le glutamate diminue le seuil d'excitabilité de ces récepteurs (Sakurada *et al.*, 1998). Les récepteurs ionotropiques du SNC sont en effet un des sites visé par les molécules induisant une anesthésie générale. La phosphorylation des protéines propres de ces récepteurs est responsable d'une partie de l'action du propofol et de l'eugénol (Szallasi et Blumberg, 1999 ; Haines, *et al.*, 2008). L'eugénol induit la phosphorylation et diminue la quantité de glutamate se fixant au récepteur NMDA, ce qui explique en partie les effets anesthésiques et analgésiques qu'il exerce. L'eugénol pourrait également diminuer la quantité de calcium transporté *via* les récepteurs NMDA, ce qui expliquerait également son effet antihyperalgésique (Wie *et al.*, 1997). Quant au propofol, il agit par phosphorylation sur les récepteurs AMPA du glutamate. Plus particulièrement, la sous-unité GluR1 du récepteur AMPA constitue l'une des cibles moléculaires expliquant l'anesthésie générale induite par le propofol (Haines, *et al.*, 2008).

Les effets analgésiques de l'eugénol s'expliquent également par son action sur les récepteurs TRPV1. La liaison de l'eugénol induit donc un potentiel d'action par le déplacement vers l'espace intracellulaire d'ion calcium. Ce mouvement ionique vers l'intérieur de la synapse établit un stade dit réfractaire réversible qui explique la phase de désensibilisation. L'imposition d'un changement de conformation du récepteur induit donc une fermeture des

canaux ioniques qui empêche la propagation de tout autre potentiel d'action (Szallasi et Blumberg, 1999). Cette désactivation du récepteur explique l'arrêt de la libération périphérique de neuropeptides (Gamse *et al.*, 1982; Miller *et al.*, 1982; Taylor *et al.*, 1984). En conséquence, sachant que la substance P joue un rôle primordial dans la transmission de la douleur au niveau du SNC, on observe que la modulation des récepteurs vanilloïdes centraux induit un stade réfractaire réversible qui affecte la transmission de la douleur. Puisque les neurones sensibles aux vanilloïdes peuvent également relâcher du glutamate, leur désactivation réduira l'état d'excitabilité des cellules (Sakurada *et al.*, 1998). Ainsi, suite à une modification des récepteurs centraux par la liaison de l'eugénol, une diminution de la relâche de glutamate produira un effet analgésique.

De récentes études discutent également de la contribution probable des récepteurs cannabinoïdes dans une action analgésique du propofol par son action inhibitrice sur l'enzyme acide gras amidohydrolase (FAAH) (Fowler, 2004). Le propofol agirait non seulement comme anesthésiant mais semble démontrer un potentiel analgésiant. L'action de l'eugénol sur les récepteurs cannabinoïdes n'a pas été démontrée mais considérant leurs similarités structurales on pourrait s'attendre à une activité semblable au propofol sur ces récepteurs.

4. Discussion générale des résultats

L'ensemble des recherches effectuées dans le cadre de cette thèse sont inscrites dans une démarche de compréhension des propriétés de l'eugénol comme analgésique et anesthésique chez différentes espèces animales.

Dans un premier temps, il a été établi chez la grenouille africaine à griffes (*Xenopus leavis*) que l'administration topique ou l'injection sous-cutanée

d'eugénol n'induit pas d'anesthésie. Par contre, l'administration en immersion (350 mg/L) induit un niveau d'anesthésie suffisamment profond pour permettre d'effectuer des procédures chirurgicales, due à l'absence de réponses nociceptives, pour une durée variant entre une heure et une heure et demie. L'étude pharmacocinétique de l'eugénol chez la grenouille révèle qu'elle est bien absorbée et présente une demi-vie de 4 heures ce qui suggère un effet cumulatif peu important lorsque la substance était administrée de façon répétée. L'eugénol peut donc être utilisé de façon sécuritaire pour des interventions chirurgicales mineures et majeures.

D'autres molécules telles que l'isoflurane, la kétamine et la tilétamine et les barbituriques ont été utilisées comme anesthésiques chez les amphibiens (Smith et Stump, 2000; Wright, 2001; Letcher et Durante, 1995). Chez des grenouilles *Rana pipiens*, le potentiel anesthésique de médétomidine/atipamézole, du propofol et de l'huile de clou de girofle a été évalué (Lafortune *et al.* 2001). Le mélange médétomidine/atipamézole n'a pas induit une sédation ou une analgésie. Le propofol a un effet sédatif mais seulement pour 60% des animaux, et cette anesthésie n'atteint pas un niveau chirurgical. Par contre l'huile de clou de girofle produit une anesthésie chirurgicale chez tous les animaux. Dans le cadre de la présente étude, une dose d'eugénol semblable à celle retrouvée dans l'article du Docteur Lafortune *et al.* (2001) fut utilisée (315 mg/L). Son efficacité est démontrée par la perte du comportement de retournement, le réflexe de retrait et le retrait suite à l'application topique d'acide acétique. Avec l'utilisation de l'huile de clou de girofle, des prolapses gastriques ont été notés suite aux bains d'immersion ce qui ne fut pas le cas avec l'eugénol. Par contre, certains individus ont eu des vomissements suite à l'administration d'eugénol.

L'eugénol fut ensuite évalué chez la truite arc-en-ciel (*Oncorhynchus mykiss*). L'immersion (75 mg/L) de jeunes truites a produit une anesthésie profonde et le temps de demi-vie (12 h) est moyen entre celui des grenouilles

Xenopus laevis ($T_{1/2} = 4$ h) et le rat ($T_{1/2} = 18$ h) (Guénette *et al.*, 2006; Guénette *et al.*, 2007). Ce temps de demi-vie suggère une accumulation dans l'organisme suite à des administrations répétées. La courbe d'élimination de forme biphasique de l'eugénol chez le poisson suggère une recirculation entérohépatique. Ce type de métabolisme des molécules phénolées, aussi observé chez le rat (Marier *et al.*, 2002), pourrait expliquer le long temps d'élimination de l'eugénol. L'eugénol constitue donc un choix anesthésique intéressant chez le poisson.

L'évaluation de l'eugénol pour l'anesthésie et l'analgésie chez le rat a donné des résultats intéressants. Aucune étude descriptive de pharmacocinétique et de pharmacodynamie de l'anesthésie, ainsi que de la douleur chronique, n'étaient disponibles chez les mammifères. Nous avons donc décidé de faire ces études chez le rat Sprague-Dawley puisque c'est une espèce couramment utilisée en recherche.

Dans un premier temps, une étude pharmacocinétique de l'eugénol suite à une administration intraveineuse et une étude des effets anesthésiques a été réalisée. Suite à l'administration intraveineuse d'une dose de 20 mg/kg, l'eugénol a induit une anesthésie chirurgicale pour une très courte période de temps variant autour de 167 s. Le mécanisme d'action de l'eugénol n'est pas clairement élucidé mais des études suggèrent qu'il agit sur les récepteurs vanilloïdes (TRPV1) et les récepteurs GABAergiques et glutamaergiques (Wie *et al.*, 1997; Aoshima et Hamamoto, 1999; Szallasi et Blumberg, 1999; Yang *et al.*, 2003). Pour l'étude de pharmacocinétique la dérivation de l'eugénol à l'aide du chlorure de dansyl a augmenté la sensibilité de détection sur le spectromètre de masse, (Beaudry *et al.*, 2006). Les principaux métabolites de l'eugénol dans l'urine des rats, après une administration d'eugénol, sont des sulfates et des glucuronides conjugués. La concentration dans le plasma et dans le sang déclina très rapidement au cours de la première heure post administration avec des $T_{1/2}$ respectivement de 12.6 et 7.05 min. La clairance systémique

moyenne de l'eugénol dans le sang (204 mL/min/kg) était de beaucoup plus importante que le débit sanguin hépatique (55 mL/min/kg) ce qui suggère deux hypothèses : i) que d'autres voies d'élimination, rénale et/ou biliaire contribuent à la biodisposition totale de l'eugénol (Davies et Morris, 1993) ou ii) la clairance observée peut être expliquée par une redistribution rapide vers les tissus périphériques. En fait, la deuxième hypothèse semble la plus probable considérant le volume de distribution total (V_{ss}) de l'eugénol dans le sang (1096 mL/kg) qui est beaucoup plus important que le volume de sang actuel chez le rat (54 mL/kg). Cette distribution extravasculaire de l'eugénol est aussi conforme avec ses propriétés lipophiles (Merck Index, 1996). Ces résultats suggèrent que l'eugénol pourrait être utilisé comme anesthésique de courte durée suite à une injection unique ou de longue durée suite à une infusion continue, comme c'est le cas pour le propofol.

Dans un deuxième temps, deux études ont été réalisées : une première étude pharmacocinétique de l'eugénol à la suite d'une administration par gavage chez des rats normaux et une seconde étude pour l'évaluation des effets analgésiques chez des rats neuropathiques. Les antagonistes TRPV1 sont une cible pour le traitement de la douleur chronique de type inflammatoire (Szallasi et Blumberg, 1999; Yang *et al.*, 2003) et l'eugénol agissant sur ces récepteurs pourrait être un traitement de cette condition. Suivant le déclin initial rapide de la concentration plasmatique de l'eugénol apparaît un pic secondaire approximativement 4 h après l'administration de l'eugénol. Il est probable que cette hausse de concentration plasmatique peut être associée à la recirculation entérohépatique (Marier *et al.*, 2002). La méthode compartimentale n'a pas été utilisée dans la présente étude. Des expérimentations additionnelles de canulation biliaire chez le rat auraient été nécessaires pour le développement d'un modèle de pharmacocinétique concernant la recirculation entérohépatique de l'eugénol. La demi-vie d'élimination de l'eugénol dans le plasma et dans le sang est de 14.0 et 18.3 h, respectivement. Cette longue demi-vie d'élimination

suggère une accumulation de l'eugénol suivant des administrations orales répétées.

Les propriétés analgésiques de l'eugénol furent étudiées grâce à un modèle de douleur neuropathique murin (Pitcher *et al.*, 1999). Les résultats de sensibilité thermique confirment l'efficacité de l'eugénol à réduire la douleur. L'effet pharmacologique de l'eugénol a démontré une augmentation progressive constante de l'analgésie sur la période des 5 jours de traitements. Aucune modification du temps de réaction à la sensibilité thermique n'a été notée au niveau du membre postérieur gauche (membre intacte) ce qui suggère que la dose administrée ne semble pas avoir affecté la composante motrice du temps de réaction chez ses animaux. Ces résultats suggèrent que l'eugénol peut être utilisé comme thérapie contre la douleur neuropathique. Puisque l'eugénol a une demi-vie d'élimination relativement longue, un effet à long terme sur les récepteurs TRVP1 est possible. D'autres mécanismes pourraient contribuer au contrôle de la douleur induit par l'administration de l'eugénol. Kanai *et al.* (2005) ont démontré que les récepteurs TRPV1 peuvent être synthétisés à la hausse chez les rats neuropathiques. L'eugénol pourrait alors avoir un effet anti-algique croissant avec le temps en relation avec le nombre de récepteurs TRPV1 augmenté suite à une lésion induisant une douleur neuropathique. Cette régulation à la hausse des récepteurs TRPV1 fut observée au niveau de la corne dorsale de la moelle épinière lombaire ce qui suggère que l'effet de l'eugénol pourrait non seulement moduler les récepteurs périphériques mais aussi les récepteurs centraux (Ueda, 2006).

La majorité des petites fibres nociceptives A δ et C sont sensibles aux molécules de la famille des vanilloïdes et jouent un rôle dans le contrôle de la sensibilité douloureuse (Ikeda *et al.*, 1997; Nichols *et al.*, 1999). La capsaïcine et la résinifératoxine sont deux ligands des récepteurs vanilloïdes utilisés dans le traitement contre la douleur neuropathique (Szallasi et Blumberg, 1999). L'autoradiographie avec la [3 H] résinifératoxine démontre des sites de liaison

dans les couches I et II de la corne dorsale chez différentes espèces de mammifères (Szallasi *et al.*, 1994). Aussi, l'interaction de la [³H] résinifératoxine avec les RV au niveau du ganglion de la racine dorsale chez le rat induit des courants électriques qui semblent persister même après le retrait de l'agoniste initial et induit de cette façon une action continue sur les cellules ganglionnaires (Baccaglioni et Hogan, 1983; Heyman et Rang, 1985; Forbes et Bevan, 1988; Winter *et al.*, 1990; Vlachova et Vyklicky, 1993). Ces résultats suggèrent fortement qu'une partie de l'action de l'eugénol s'explique sur son action au niveau périphérique et central.

Certaines autres structures du SNC incluant le thalamus, l'hypothalamus et la formation réticulée ont tous des récepteurs vanilloïdes (Jancso-Gabor *et al.*, 1970; Szolsanyi *et al.*, 1971; Szallasi et Blumberg, 1993; Acs et Blumberg, 1994; Acs *et al.*, 1996; Guo *et al.*, 1999; Yang *et al.*, 2003) sur lesquels l'eugénol pourrait agir. Donc, il est raisonnable de croire que d'autres cibles du SNC pourraient être impliquées dans le mécanisme des vanilloïdes impliqués dans la douleur neuropathique. Il reste donc à démontrer les effets de l'eugénol sur les autres récepteurs vanilloïdes ainsi que les différentes structures du SNC possédant des récepteurs vanilloïdes traitant les informations de la douleur.

5. Conclusion générale

La douleur et son traitement, ainsi que l'anesthésie, sont des sujets d'actualité dans nos sociétés modernes. En ce moment même, des centaines de nouvelles molécules aux effets divers sont en phase d'expérimentation et de commercialisation. Le tout consiste à élaborer une liste d'options de traitements qui pourront, selon les cas, être utilisés en combinaison ou seuls pour induire différents niveaux d'analgésie et même d'anesthésie. Il existe dans la pharmacopée ancestrale toute une gamme de molécules qui jusqu'à maintenant étaient considérées comme des produits inefficaces et d'utilisation folklorique. Certains de ces produits ont démontré, au cours des années et par la recherche réalisée sur ces molécules, des effets intéressants autant pour l'analgésie que pour l'anesthésie. Quelques-unes de ces molécules sont la morphine, le cannabis, la pénicilline et de nombreuses autres. L'eugénol, produit dérivé du clou de girofle, ne fait pas exception à cette règle. Il a été utilisé dans la culture indienne depuis des siècles pour traiter non seulement les douleurs parodontales mais aussi comme antibiotique et anti-inflammatoire. Sans retourner aussi loin dans l'histoire le clou de girofle était utilisé couramment en Amérique par nos ancêtres lors de douleurs gingivales ou parodontales. Au cours des années, ces connaissances ancestrales reprises par la médecine dentaire et ont été utilisées pour la fabrication de ciment de remplissage lors d'extraction dentaire. Les effets analgésiques et antibiotiques de l'eugénol en application topique sur les gencives sont encore reconnus de nos jours. D'autres études par la suite ont démontré que la partie active du clou de girofle résidait dans son principal constituant : l'eugénol. Cette molécule fut utilisée non seulement en denturologie (Garibaldi *et al.*, 1995; Kozam, 1997; Ohkubo et Shibata, 1997) mais aussi en aquaculture (Endo *et al.*, 1972; Hikasa *et al.*, 1986; Soto et Burhanuddin, 1995; Anderson *et al.*, 1997; Munday et Wilson, 1997; Sladky *et al.*, 2001; Pirhonen et Scheck, 2003).

Ces études sur l'eugénol démontrent le potentiel anesthésique de l'eugénol chez les grenouilles, les poissons et les mammifères. Elles révèlent également son potentiel analgésique sur la douleur neuropathique des mammifères, plus particulièrement dans un modèle murin de constriction du nerf sciatique. Les résultats de la pharmacocinétique, chez ces différentes espèces, nous montrent que la demi-vie est relativement courte lorsque la substance est utilisée à des fins anesthésiques. Par contre lorsqu'elle est administrée par gavage aux rats cette demi-vie est relativement longue et on pourrait espérer un effet thérapeutique à long terme. Beaucoup de travail reste encore à réaliser sur l'eugénol. Mais, il est déjà possible d'entrevoir le potentiel de cette molécule pour le traitement de la douleur neuropathique jusqu'à date bien souvent insensible aux traitements traditionnels. Il serait pertinent d'étudier et de caractériser ses effets analgésiques sur d'autres types de pathologies douloureuses tels que l'arthrite et l'osteoarthrose ainsi que lors d'atteinte du système musculosquelettique tel que l'ostéosarcome.

6. Critique d'article concernant le traitement de douleurs associées à un ostéosarcome et l'utilisation de l'eugénol pour le traitement de la douleur de cette pathologie.

6.1 Les concepts généraux et la mise en contexte

6.1.1 Le cancer osseux et la douleur

La douleur découlant de l'invasion osseuse par des cellules cancéreuses est souvent le premier symptôme ressenti par les patients atteints par ces néoplasmes osseux (Portenoy *et al.*, 1999). L'atteinte osseuse peut provenir d'un cancer osseux primaire mais le plus souvent, elle est expliquée par la dispersion de métastases, suite à une atteinte tumorale de la prostate, des glandes mammaires, des poumons ou bien d'un myélome (Coleman, 2001). Ce type de douleur, appelée douleur de cancer osseux (DCO), se caractérise la plupart du temps par une évolution temporelle parallèle à l'évolution de la tumeur (Pecherstorfer *et al.*, 2000). La DCO peut être divisée en deux composantes principales : la douleur lancinante et la douleur évoquée par le mouvement qui comprend la douleur ambulatoire et la douleur induite par la palpation (Mercadante, 1997). Malheureusement, la pathophysiologie de ce type de douleur reste encore à ce jour très obscure et peu de molécules ont démontré une efficacité intéressante et une innocuité raisonnable pour son traitement (Pecherstorfer *et al.*, 2000).

6.1.2 Modèle animal pour l'étude du cancer osseux et les souris transgéniques

Dans le but d'élucider autant les options de traitements que les mécanismes cellulaires de ces métastases osseuses, un modèle animal fut mis au point par l'équipe du Dr Patrick W. Mantyh (Mantyh, 2004). Dans ce modèle, la souris C3H/HeJ (Jackson Laboratories, Bar Harbor, ME) mâle est utilisée. Grâce à une intervention chirurgicale, des cellules ostéolytiques de sarcome transfectées avec une protéine fluorescente verte (GFP), permettant de suivre

l'évolution de la tumeur, sont injectées dans l'espace intra médullaire du fémur de la souris. L'ouverture, ainsi créée, est refermée avec un amalgame dentaire pour assurer que l'articulation ne soit pasensemencée lors de l'intervention (Sabino *et al.*, 2002). Ce modèle recrée donc une invasion osseuse très agressive qui, à l'intérieur de 14 jours, montre des signes radiographiques d'ostéolyse et d'ostéoprolifération qui s'étendent jusqu'à la tête fémorale (Portenoy *et al.*, 1999). (Figure 1 en annexe)

L'étude rapportée dans l'article du Dr J.R. Ghilardi (2005) présente une autre tactique mise de l'avant pour permettre l'étude d'un récepteur bien particulier dans les cas de DCO, les récepteurs vanilloïdes de la famille des Transient Receptor Potential Channel 1 (TRPV1) (le rôle des récepteurs TRPV1 sera couvert plus loin). Il s'agit donc de la production d'une souris transgénique qui présente une absence du gène codant pour ce type de récepteur (TRPV1^{-/-}). L'utilisation de ce type de modèle transgénique permet de faire une double vérification des fonctions propres du type de récepteur identifié.

6.1.3 L'innervation de l'os et les neurones afférents primaires

Les neurones afférents primaires (NAP) sont les voies par lesquelles l'information sensorielle est transmise des récepteurs périphériques vers les centres supérieurs, la moelle épinière et le cerveau. Ces fibres, qui logent leurs corps cellulaires dans les ganglions de la racine dorsale (GRD) ou dans le trijumeau, pénètrent la moelle par la corne dorsale, décussent et partent vers les noyaux et aires du tronc cérébral et du cortex (Kandel, 2000). Deux principales catégories de NAP sont décrites : soit les fibres myélinisées A et les fibres non myélinisées C. Plus particulièrement, les fibres C et A δ sont spécialisées dans la transmission des informations douloureuses (Djouhi *et al.*, 1998). À la lumière de ces informations, l'os n'échappe pas à cette innervation sensorielle et ceci explique donc, en partie, les douleurs ressenties suite à l'invasion osseuse par des métastases. En effet, récemment il a été démontré qu'autant la moelle

osseuse que la partie minéralisée et le périoste comportent une innervation sensorielle et sympathique (Mach *et al.*, 2002 et Marieb *et al.*, 1997). (Figure 2 en annexe)

6.1.4 Les canaux, les récepteurs et les substances associées

Au cours des dernières années, plusieurs recherches ont contribué à éclaircir les catégories de molécules et de récepteurs utilisées par les nocicepteurs pour détecter, identifier et caractériser les influx nociceptifs. De ces derniers, les récepteurs à la capsaïcine, les TRPV1, semblent jouer un rôle clé dans la perception de la douleur osseuse. En effet, le récepteur TRPV1, exprimé par la majorité des nocicepteurs qui innervent l'os (Guo *et al.*, 1999), se révèle sensible à la chaleur qui découle, entre autres, de l'inflammation, (Kirschstein *et al.*, 1999), aux protons extracellulaires (pH 5) (Caterina *et al.*, 2001) et aux molécules lipidiques comme la capsaïcine ou l'eugénol (Tominaga, 1998 et Yang, 2003). De plus, les nocicepteurs expriment des récepteurs à la stimulation mécanique (récepteurs purinergiques à ATP) ou chimique excités par des molécules pro-inflammatoires comme les protons (Bevan *et al.*, 1994 et Caterina *et al.*, 2000), les endothélines (Nelson *et al.*, 2000), les prostaglandines (Alvarez *et al.*, 2000), la bradykinine (Alvarez *et al.*, 2000) et les facteurs de croissance neuronale (McMahon, 1996). L'identification, autant des molécules pro-algésiques que des récepteurs jouant un rôle dans la nociception, constitue une étape importante vers la découverte de molécules analgésiques pour ce type de douleur.

D'une façon plus particulière, les cellules tumorales et les cellules associées aux tumeurs influencent aussi leur environnement en sécrétant une gamme de substances qui sont en tout ou en partie responsables de la DCO. De celles-ci, il est important de mentionner les macrophages, les neutrophiles et les lymphocytes T qui, par la libération de plusieurs facteurs (prostaglandine (Nielson *et al.*, 1991 et Galasko, 1995), facteur de nécrose tumorale alpha (TNF-

α) (Nadler *et al.*, 2000 et DeLeo *et al.*, 2001), endothelines (Nelson *et al.*, 2000 et Davar, 2001), interleukines-1 et -6 (Watkins *et al.*, 1995; Oprea *et al.*, 2000; DeLeo *et al.*, 2001), facteur de croissance de l'épiderme (EGF)(Stoscheck *et al.*, 1986), facteur de transformation de croissance beta (TGF- β)(Poon *et al.*, 2001 et Roman *et al.*, 2001), facteur de croissance dérivé des plaquettes (PGF)(Radinsky, 1991 et Silver, 1992), et bien d'autres), contribuent donc à la sensibilisation des fibres afférentes primaires (Figure 3 et 4-D en annexe).

6.1.5 Modulation phénotypique et réorganisation neurochimique du système nerveux central et périphérique

Suite à une stimulation persistante des neurones nociceptifs, ces fibres sont capables de présenter une certaine plasticité en modifiant leur phénotype et donc de moduler la production de peptides et de facteurs de croissance (Woolf *et al.*, 2000 et Kanai *et al.*, 2005). Ces modifications phénotypiques auront pour effet d'abaisser le seuil d'activation des nocicepteurs et donc de changer l'interprétation d'une stimulation douloureuse ou non douloureuse en une sensation respectivement anormalement douloureuse (hyperalgésie) et douloureuse (allodynie). L'allodynie et l'hyperalgésie sont d'ailleurs les marques distinctives des phénomènes de sensibilisation périphérique et centrale desquels l'activation de récepteurs silencieux fait aussi partie (Schmidt *et al.*, 1995). Quelques exemples de ce phénomène incluent l'augmentation de la sécrétion de la substance P au niveau de la moelle épinière dans un cas de DOC (Hunt et Mantyh, 2001) et l'expression de la protéine c-fos au niveau de la moelle épinière suite à une palpation non douloureuse dans un cas de DOC (Hunt *et al.*, 1987).

Dans un article de Schewei *et al.* (1999), il a été démontré que les modifications neurochimiques de la moelle épinière, suite à un modèle murin d'inoculation de cellules d'ostéosarcome fémorale, sont comparables aux altérations phénotypiques découlant d'une lésion d'un nerf périphérique. Ces

stimulations nociceptives, soutenues des neurones afférents primaires innervant l'os atteint, induiront donc plusieurs types de modifications du segment visé de la moelle épinière (Honore *et al.*, 2000a,b,c et Luger *et al.*, 2001). Entre autres, il sera possible de constater une hypertrophie astrocytaire (Honore *et al.*, 2000b) (Figure 4 en annexe) qui conduit à une diminution de la re-capture glutamaergique ce qui augmentera donc la disponibilité de ce neuromédiateur pro-algésique qui agit principalement au niveau des récepteurs NMDA (Rothstein *et al.*, 1992 et Fukamachi *et al.*, 2001). Cette stimulation chronique des récepteurs NMDA construit étape par étape la charpente d'un phénomène de "wind-up" et éventuellement une potentialisation à long terme (LTP), phénomène à la base de la sensibilisation centrale (Kandel, 2000).

6.1.6 Le rôle de l'acidose

La découverte de récepteurs et donc de neurones sensibles à une baisse du pH constitue, ces dernières années, une avancée importante dans la compréhension du mécanisme douloureux entourant les cancers osseux (Woolf, 2004). Ces canaux sensibles à l'acide (ASIC) exprimés par les nocicepteurs osseux sont principalement de deux types : les TRPV1 (Caterina, 1997 et Tominaga *et al.*, 1998) et les ASIC-3 (Sutherland *et al.*, 2000). Ils seront donc activés dans le cas d'une invasion osseuse tumorale par le biais de quatre sources de protons : la nécrose ischémique induite par la tumeur (Griffiths, 1991), les cellules inflammatoires qui envahissent la tumeur, l'apoptose des cellules tumorales (Mantyh *et al.*, 2004) et finalement la relâche de protons directement par les ostéoclastes (Delaisse *et al.*, 1992 et Clohisy *et al.*, 2000).

6.1.7 Les avenues de traitements

Grâce aux avancées décrites dans les pages précédentes, il est maintenant possible de proposer certaines avenues de traitement pour ce type de douleur qui a priori présente une résistance aux voies traditionnelles de traitement de la

douleur neuropathique osseuse. Les antagonistes des récepteurs TRPV1 ou ASCI-3 (Olson *et al.*, 1998 et Guo *et al.*, 1999), l'ostéoprotégérine (OPG)(Honore *et al.*, 2000a), les biphosphonates (Major *et al.*, 2000), les inhibiteurs des cyclooxygénases 2 (Sabino *et al.*, 2002), les antagonistes des endothelines (Carducci *et al.*, 2002), la gabapentine (Ripamonti *et al.*, 2001) et les antagonistes des récepteurs de l'ATP (Xu *et al.*, 2002) offrent maintenant de nouvelles avenues de traitement.

6.2 Description des matériels, méthodes, résultats et conclusions

6.2.1 Résumé des matériels et méthodes

L'article de Ghilardi *et al.*, (2005) explore l'atténuation de l'hyperalgésie induite par un modèle de DCO chez la souris, décrit ci-haut, par un antagoniste des récepteurs TRPV1 (JNJ-17203212) et le rôle des TRPV1 dans ce type de douleur. L'étude compare donc des individus ayant subi la chirurgie sans injection de cellules de sarcome (contrôle négatif) et des individus ayant subi la chirurgie avec injection de cellules de sarcome et ce, chez trois types de souris : sauvages (+/+) et transgéniques (-/-) et (+/-). L'utilisation des souris transgéniques (-/- et +/-) permet premièrement d'explorer le rôle des récepteurs TRPV1 dans la perception de la DCO chez la souris mais constitue aussi un contrôle négatif sur le traitement de cette douleur par la molécule testée. La douleur induite par l'inoculation tumorale a été quantifiée grâce aux tests comportementaux spécifiques (décrit par Luger *et al.*, 2001) évaluant la douleur lancinante (DL) et la douleur évoquée par le mouvement (DEM) qui comprend la douleur ambulatoire et la douleur induite par la palpation. Suite à l'induction d'une douleur par palpation du fémur affecté, une analyse immunohistochimique sur la moelle épinière fut réalisée, après 14 jours de traitement, sur l'expression de la protéine c-Fos. Par la suite, des images microscopiques confocales et de fluorescence ont été réalisées sur le ganglion de la racine dorsale et sur la moelle osseuse grâce à l'étude du facteur de transcription 3 (anticorps anti-ATF-3), à

l'identification des fibres non myélinisées (anticorps anti-Calcitonine Gene-Related Peptide) et à l'expression des récepteurs TRPV1 (anticorps anti-TRPV1) et ce, après 14 jours de traitement. L'évolution générale de la tumeur suite aux différents traitements a été évaluée grâce aux images radiographiques et à la coloration à hématoxyline et éosine (H & E)

6.2.2 Résumé des résultats

Partie 1 : L'expression des récepteurs TRPV1 par les neurones qui innervent le fémur

Les fibres qui expriment le récepteur TRPV1 et le CGRP (non myélinisées) sont retrouvées au niveau de l'os minéralisé et de la moelle osseuse où elles sont associées aux vaisseaux sanguins. Cette association persiste même avec l'invasion osseuse de cellules tumorales (Figure 5 en annexe). Avec la double coloration TRPV1 et ATF-3, il fut possible de démontrer que non seulement les fibres expriment les récepteurs TRPV1 tout au long de la progression tumorale mais qu'environ 30% des neurones affectés (ATF-3 positif) démontrent une co-liaison aux anticorps TRPV1. (Figure 6 en annexe)

Partie 2 : Les animaux inoculés traités avec l'antagoniste TRPV1 et les animaux transgéniques (-/-) inoculés démontrent une réduction de la douleur lancinante, de la douleur évoquée par le mouvement et une atténuation de l'expression par la moelle épinière du gène c-Fos.

Les animaux ayant subi la chirurgie du modèle et traités avec l'antagoniste des récepteurs TRPV1, démontrent une réduction significative des deux types de douleur (DL et DEM), 10 à 14 jours après l'inoculation avec les cellules de sarcome. Ainsi, les souris modifiées génétiquement pour l'absence du gène codant pour le récepteur TRPV1 (-/-) sans le traitement avec la molécule JNJ-17203212 démontrent une réduction significative de la douleur lancinante et évoquée par le mouvement. De plus, les souris, aux gènes +/+ et

+/- inoculées avec la tumeur, ont présenté un développement comportemental nociceptif comparable aux souris sauvages. Par contre, les souris, (-/-) traitées avec la molécule antagoniste, n'ont pas démontré une baisse supplémentaire de la nociception. Aussi, le traitement chronique avec l'antagoniste TRPV1 chez les souris sauvages a diminué de façon significative l'expression du gène c-Fos au niveau des laminae I et II de la corne dorsale sur les segments L3 et L4 de la moelle épinière. Finalement, la coloration H & E de la moelle osseuse démontre que le traitement avec l'antagoniste ne ralentit pas la progression tumorale.

6.2.3 Résumé des conclusions

- Les récepteurs TRPV1 jouent un rôle important dans l'établissement (ATF-3 avec TRPV1) et le maintien (effet sur l'expression des c-Fos) de la douleur associée au sarcome osseux dans le modèle murin décrit ci-haut.
- Les récepteurs TRPV1 sont associés aux vaisseaux sanguins et aux fibres non myélinisées de la moelle osseuse.
- Les récepteurs TRPV1 restent présents tout au long du développement de la tumeur osseuse décrite dans cet article.
- Les souris transgéniques -/- sont un modèle fiable pour l'étude des récepteurs TRPV1.

6.3 Points forts

L'utilisation dans cet article des souris modifiées génétiquement (-/- et +/-) constitue une avancée importante dans la compréhension du fonctionnement du récepteur TRPV1. De plus, cela permet de faire une double vérification du rôle des récepteurs TRPV1 chez une souris sans cancer osseux avec l'établissement de la douleur neuropathique suite au cancer osseux et de contre-vérifier le traitement avec un antagoniste de ces récepteurs. Une autre avancée pour la science, présentée dans cet article, tient dans la représentation de l'évolution de ces récepteurs avec celle d'une tumeur osseuse. En effet, la

démonstration que les récepteurs TRPV1 sont présents tout au long du développement du cancer osseux, avant l'établissement de la tumeur jusqu'aux derniers jours de l'étude, ouvre une porte à une alternative de traitement de la DCO. Aussi, l'expression par les fibres sensitives affectées par le cancer (ATF-3 positif) des récepteurs TRPV1 (environ 30% d'entre eux) explique l'efficacité d'un antagoniste spécifique à ces récepteurs. Considérant le rôle des récepteurs TRPV1 dans l'activation de la production de gènes (gènes immédiats de la phase aiguë) dans la phase aiguë de l'inflammation (c-Fos positif), il a été intéressant de noter une atténuation significative par l'antagoniste JNJ-17203212 de ce processus. Cette atténuation aura donc pour effet de freiner le processus de "wind-up" et de sensibilisation à long terme qu'une stimulation nociceptive chronique tend à établir.

6.4 Points à améliorer

D'une façon générale, l'article du Dr Ghilardi, (2005) est selon nous très bien structuré. Seulement quelques nuances et de rares améliorations seraient à apporter. Le premier point concerne le traitement de la douleur osseuse induite. Dans le dernier paragraphe de l'article, il est dit que l'antagoniste TRPV1 réduit la douleur lancinante et celle évoquée par le mouvement tout au long du développement de la tumeur d'ostéosarcome chez la souris. Par contre, cette affirmation n'est basée sur aucune expérimentation car, dans l'article de Ghilardi, l'expérimentation n'explore pas l'effet du traitement dans le temps mais seulement à un moment précis c'est-à-dire après 14 jours de traitement. Il est donc possible que les antagonistes TRPV1 ne soient pas le traitement de choix tout au long du développement de la tumeur. Ainsi, considérant les caractéristiques propres des différentes étapes de développement algique, certaines substances seraient plus appropriées que d'autres pour le traitement de la douleur qui en découle. Donc, premièrement, suite à l'injection de cellules tumorales dans le fémur de la souris, une douleur apparaît bien avant que l'on

puisse distinguer une atteinte osseuse. Cette douleur serait expliquée par la libération de prostaglandines et d'endothelins par la tumeur en croissance et pourrait donc être atténuée par des inhibiteurs de COX-2 (Sabino *et al.*, 2002), et des antagonistes d'endotheline (Carducci *et al.*, 2002). Ensuite, la tumeur continue de croître et les fibres sensibles de la moelle osseuse commencent à être comprimées et détruites causant l'apparition d'une douleur neuropathique qui répond bien à la gabapentine (Ripamonti *et al.*, 2001). Dans l'étape suivante, les ostéoclastes prolifèrent et s'hypertrophient de façon importante. Cette douleur répond donc à des inhibiteurs ostéoclastiques comme les biphosphonates (Major *et al.*, 2000) et l'ostéoprotégérine (Honoré *et al.*, 2000a). Par la suite, le pH intramédullaire diminue à cause de la nécrose importante induite par l'envahissement de tout l'espace intramédullaire par la tumeur, douleur réversible grâce aux antagonistes TRPV1 et ASICs (Olson *et al.*, 1998 et Guo *et al.*, 1999). La dernière étape présente une déformation osseuse et une destruction de la matrice osseuse ce qui crée une douleur mécanique répondant bien aux antagonistes des récepteurs ATP (Xu *et al.*, 2002).

À la page 3130 de l'article de Ghilardi *et al.* (2005), il est dit que le nombre de récepteurs TRPV1 est régularisé à la hausse suite à une inflammation et à la baisse suite à une lésion d'un nerf périphérique. Cette affirmation est référencée par un article de Michael G.J. et Priestly J.V. (1999) qui étudia l'effet d'une axotomie et non d'une lésion ou constriction d'un nerf périphérique. De plus il est intéressant de noter que dans l'article de Kanai *et al.* (2005), il est dit que les récepteurs TRPV1 sont régularisés à la hausse suite à un modèle de constriction chronique qui induit une allodynie mécanique comme dans le cas d'une constriction d'un nerf périphérique par une tumeur osseuse. Aussi, il est important de mentionner que la sensibilisation des récepteurs TRPV1 passe par le transport axonal de ces derniers et que l'axotomie empêche en partie la mobilisation de ce type de récepteurs.

À la page 3127 de l'article de Ghilardi *et al.* (2005) dans la partie analyse du comportement, il est mentionné que seulement quatre souris, constituant le groupe, sont injectées avec les cellules de sarcome et sont traitées avec l'antagoniste. Puisque ce groupe est le plus important de cette étude pour le contrôle positif du traitement, il m'aurait semblé important de tester un minimum de six individus afin de respecter les exigences statistiques.

Lors de la description du modèle murin d'inoculation du sarcome par Schwei *et al.* (1999), il est mentionné qu'une grande attention doit être portée lors de l'injection des cellules dans la cavité intramédullaire pour s'assurer qu'aucune cellule ne soit déposée dans l'articulation fémoro-tibiale. Cette spécification découle du principe que la douleur induite par des cellules tumorales articulaires viendrait confondre les résultats d'évaluation de la douleur strictement osseuse. Il serait donc intéressant de réaliser des analyses histopathologiques sur le liquide synovial et sur le cartilage articulaire de tous les spécimens après euthanasie pour pouvoir affirmer qu'aucune cellule tumorale ne se retrouvait dans l'articulation, artefact de l'inoculation.

Finalement, il aurait été intéressant de suivre l'évolution des fibres afférentes primaires dans la moelle osseuse, au niveau des ganglions de la racine dorsale et au niveau de la moelle épinière avec et sans traitement au lieu de faire une seule évaluation après 14 jours de traitement.

6.5 Les récepteurs TRPV1, un avenir prometteur

Comme décrit dans l'article de Ghilardi *et al.*(2005), les récepteurs TRPV1 jouent un rôle clé dans l'établissement de la douleur neuropathique induite par l'inoculation fémorale chez un model murin (décri ci-haut). Étant un récepteur activé directement par les protons extracellulaires, la chaleur et les molécules lipidiques (comme la capsaïcine et l'eugénol) (Szallasi *et al.*, 1999) et indirectement par des facteurs associés à l'inflammation (bradykinine, ATP et NGF) (Julius *et al.*, 2001), les récepteurs TRPV1 participent grandement à la

sensibilisation des neurones afférents primaires. Plus particulièrement, il fut établi que ces canaux calciques vanilloïdes sont localisés sur les fibres sensibles C et A δ (Brodin, 1985 et Ueda *et al.*, 2006). Dans cette ligne de pensée, il serait intéressant de présenter des images confocales suite à une inoculation du sarcome chez la souris (modèle décrit ci-haut) et ce, tout au long du développement de la tumeur. Premièrement, avec les anticorps TRPV1, les CGRP (qui identifient les fibres non myélinisées C) et les NF200 (qui identifient les fibres myélinisées A) :

- suivre l'évolution de ces fibres et récepteurs dans le temps avec l'évolution de la tumeur;
- suivre l'effet d'un antagoniste TRPV1 sur ces fibres et récepteurs TRPV1 dans le temps.

Deuxièmement, comme nous savons que le sarcome présente différentes étapes dans le développement de la douleur associée, il serait intéressant de vérifier l'effet d'une molécule antagoniste TRPV1 sur les modifications phénotypiques induites par la tumeur sur l'os en tant que tel, sur la moelle épinière et sur ses astrocytes. L'utilisation d'images confocales de AFT-3 (indique une atteinte des fibres sensibles), de c-Fos (indique une augmentation de l'activité de la moelle épinière) et de GFAP (marquage astrocytaire) permet de suivre les effets d'un antagoniste TRPV1 sur ces trois structures :

- suivre l'effet d'un antagoniste TRPV1 sur l'expression génique par la moelle épinière, des fibres nerveuses de l'os et des ganglions de la racine dorsale et la réaction astrocytaire de la moelle épinière dans le temps (à partir du temps 0 jusqu'à l'euthanasie);
- tester une autre molécule, l'eugénol sur les deux mêmes paramètres.

L'élaboration de cette expérimentation serait, à toute fin pratique, identique à celle décrite dans l'article du Dr Ghilardi (2005) par l'utilisation du modèle murin et par le choix des tests comportementaux. Donc, il s'agirait de réaliser des images confocales d'une souris naïve (n=6), d'une souris contrôle négatif

(chirurgie sans inoculation) (n=6), d'une souris inoculée traitée seulement avec le véhicule (n=6) et finalement d'une souris inoculée et traitée avec la molécule (n=6) (pour chacune des deux molécules testées). L'étude s'étendrait sur un minimum de trois semaines pour permettre l'apparition de la destruction osseuse et donc d'inclure cette étape de la douleur dans la deuxième partie de l'expérimentation. En ce qui concerne les molécules de traitement, l'antagoniste JNJ-17203212 de TRPV1 (si l'utilisation en est permise et administrée comme décrit dans l'article mais sur une période de trois semaines) et l'eugénol seraient utilisés. L'eugénol serait administré à une dose de 40 mg/kg par gavage chronique matin et soir pendant les trois semaines de l'étude ($T_{1/2}$: 14 h dans le plasma (Guénette *et al.*, 2006) (Toser *et al.*, 2006).

6.6 Hypothèses :

- Colocalisation des récepteurs TRPV1 aux fibres C et A et ce tout au long du développement de la tumeur avec augmentation de la densité des récepteurs dans le temps.
- Colocalisation des récepteurs TRPV1 aux fibres C et A et ce tout au long du développement de la tumeur avec stabilisation du nombre de récepteurs dans le temps suite au traitement avec la molécule JNJ-17203212 et avec l'eugénol en comparaison avec la souris sham.
- Diminution de l'expression génique c-Fos et ATF-3 et de l'hypertrophie astrocytaire avec la présence des deux antagonistes TRPV1 (JNJ-17203212 et eugénol) dans le temps en regard de la souris sham.

6.7 Objectif :

- Démontrer l'effet des antagonistes TRPV1 du temps 0 à la fin de la vie de l'animal en vue du contrôle de la douleur induite par la présence d'un sarcome osseux chez la souris.

6.8 Bibliographie

- Alvarez, F.J. et R.E. Fyffe. 2000. Nociceptor for the 21st century. *Current Review on Pain*, 4(6):451-458.
- Bevan, S. et P. Geppetti. 1994. Protons: small stimulants of capsaicin-sensitive sensory nerves. *Trends in Neuroscience*, 17(12): 509-512.
- Brodin, P. 1985. Differential inhibition of A, B and C fibres in the rat vagus nerve by lidocaine, eugenol and formaldehyde. *Arch. Oral. Biol.* 30(6): 477-480.
- Carducci, M.A., J.B. Nelson, M.K. Bowling, *et al.* 2002. Atrasentan, an endothelin-receptor antagonist for refractory adenocarcinomas: safety and pharmacokinetics [erratum in: *Journal of Clinical Oncology*, 2003; 21:2449]. *Clinical Oncology*, 20:2171-2180.
- Caterina M.J. and D. Julius. 2001. The vanilloid receptor: a molecular gateway to the pain pathway. *Annual Review on Neuroscience*, 24: 487-517.
- Caterina M.J., A. Leffler, A.B. Malmberg, *et al.* 2000. Impaired nociception and pain sensation in mice lacking the capsaicin receptor. *Science*, 288:306-313.
- Caterina M.J., M.A. Schumacher, M. Tominaga, T.A. Rosen, J.D. Levine and D. Julius. 1997. The capsaicin receptor: a heat-activated ion channel in the pain pathway, *Nature* 389, pp. 816-824.
- Clohisy, D.R., S.L. Perkins et M.L.R. Ramnaraine. 2000. Review of Cellular Mechanisms of Tumor Osteolysis. *Clinical Orthopedics and Related Research*, 373:104-114.
- Coleman, R.E. 2001. Metastatic bone disease: clinical features, pathophysiology and treatment strategies. *Cancer Treatment Review*. 27: 165-176.
- Davar, G. 2001. Endothelin-1 and metastatic cancer pain. *Pain Medicine*, 2:24-27.
- Delaisse, J.-M., et G. Vaes. 1992. Mechanism of mineral solubilisation and matrix degradation in osteoclastic bone resorption. In: Rifkin, B.R. et Gay, C.V. (Eds). *Biology and Physiology of the Osteoclasts*. Annual Arbor: CRC, pp 289-314.
- DeLeo, J.A. et R.P. Yeziarski. The role of neuroinflammation and neuroimmune activation in persistent pain. *Pain*, 90:1-6.

Djouhi, L., L. Bleazard et S.N. Lawson. 1998. Association of somatic action potential shape with sensory receptive properties in guinea-pig dorsal root ganglion neurones. *Journal of Physiology*, 13: 857-872.

Fukamachi, S., A. Furuta, T. Ikeda, *et al.* 2001. Altered expressions of glutamate transporter subtypes in rat model of neonatal cerebral hypoxia-ischemia. *Brain research. Developmental brain research*, 132: 131-139.

Galasko, F., A. Casuccio, C. Ticozzi et C. Ripamonti. 1995. Diagnostic of skeletal metastases and assessment of response to treatment. *Clinical Orthopedic*, 312:64-75.

Ghilardi, J.R., H. Rohich, T.H. Lindsay, M.A. Sevcik, M.J. Schwei, K. Kubota, K.G. Halvorson, J. Poblete, S.R. Chaplan, A.E. Dubin, N.I. Carruthers, D. Swanson, M. Kuskowski, C.M. Flores, D. Julius and P.W. Mantyh. 2005. *The Journal of Neuroscience*, 25(12): 3126-3131.

Griffiths, J.R. 1991. Are cancer cells acidic? *British Journal of Cancer*, 64 : 425-427.

Guénette, S.A., A. Ross, J.-F. Marier, F. Beaudry et P. Vachon. 2006. Eugenol for the treatment of neuropathic pain : Pharmacodynamic and Pharmacokinetic studies in male Sprague-Dawley rats. *European Journal of Pharmacology (en revision)*.

Guo, A., L. Vulchanova, J. Wang, X. Li et R. Elde. 1999. Immunocytochemical localization of the vanilloid receptor 1(VR1): relationship to neuropeptides, the P2X3 purinoceptor and IB4 binding sites. *European Journal of Neuroscience*, 11:946-958.

Honore, P., N.M. Luger, M.A. Sabino *et al.* 2000a. Osteoprotegerin blocks bone cancer-induced skeletal destruction, skeletal pain and pain-related neurochemical reorganization of the spinal cord. *Natural Medicine*, 6(5):521-528.

Honore, P., S.D. Rogers, M.J. Schwei, *et al.* 2000b. Murine models of inflammatory, neuropathic and cancer pain each generates a unique set of neurochemical changes in the spinal cord and sensory neurons. *Neuroscience*, 98(3):585-598.

Honore, P., J. Schwei, S.D. Rogers, *et al.* 2000c. Cellular and neurochemical remodeling of the spinal cord in bone cancer pain. *Progress in Brain Research*, 129:389-397.

Hunt, S.P., A. Pini et G. Evan. 1987. Induction of c-fos-like protein in spinal cord neurons following sensory stimulation. *Nature*, 328(6131):632-634.

Hunt, S.P. et P.W. Mantyh. 2001. The molecular dynamics of pain control. *Natural Reviews on Neuroscience*, 2(2):83-91.

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

Kanai, Y., E. Nakazato, A. Fujiuchi, T. Hara et A. Imai. 2005. Involvement of an increase spinal TRPV1 sensitization through its up-regulation in mechanical allodynia of CCI rats. *Neuropharmacology*, 49: 997-984.

Kandel, E.R., J.H. Schwartz et T.M.Jessell. 2000. *Principle of Neural Science*. Elsevier/North-Holland, New York. 1414 pages.

Kirschstein, T., W. Greffrath, D. Busselberg et R.D. Treede. 1999. Inhibition of rapid heat responses in nociceptive primary sensory of rats by vanilloids receptors antagonists. *Journal of Neurophysiology*, 82(6): 2853-2860.

Luger, N.M., P. Honore, M.A.C. Sabino, *et al.* 2001. Osteoprotegerin diminishes advanced bone cancer pain. *Cancer Research*, 61(10):4038-4047.

Mach, D.B., S.D. Rogers, M.C. Sabino, *et al.* 2002. Origins of skeletal pain : sensory and sympathetic innervation of the mouse femur. *Neuroscience*, 113: 155-166.

Major, P.P., A. Lipton, J. Berenson et G. Hortobagyi. Oral biphosphonates: a review of clinical use in patients with bone metastases. *Cancer*, 88:6-14.

Mantyh, P.W. 2004. Bone Cancer Pain: Mechanisms and Potential Therapies. In: *The Pain System in Normal and Pathological States: A Primer for Clinicians*. Villanueva, L., A.H. Dickenson et H.Ollat (eds). *Progress in Pain Research and Management*, Vol 31. International Association for the Study of Pain Press, Seattle, USA. P 259-278.

Marieb, E.N. et J. Mallatt. 1997. *Human Anatomy*, 2nd ed. San Francisco, California: Benjamin Cummings.

McMahon, S.B. 1996. NGF as a mediator of inflammation pain. *Philosophical transactions of the Royal Society of London B Biological Science*, 351(1338):431-440.

Mercadante, S. 1997. Malignant bone pain: pathophysiology and treatment. *Pain*, 69:1-18.

Michael, G.J. et J.V. Priestley. 1999. Differential expression of the mRNA for the vanilloid receptor subtype 1 in cells of the adult rat dorsal root and nodose ganglia and its downregulation by axotomy. *Journal of Neuroscience*, 19:1844-1854.

Nadler, R.B., A.E. Koch, E.A. Calhoun *et al.* 2000. IL-1 beta and TNF-alpha in prostatic sections are indicators in the evaluation of men with chronic prostatitis. *Journal of Urology*, 164:214-218.

Nelson, J.B. et M.A. Carducci. 2000. The role of endothelin-1 and endothelin receptor antagonists in prostate cancer. *BJU International*, 85(Suppl 2):45-48.

Nielsen, O.S., A.J. Munro et I.F. Tannock. 1991. Bone metastases: pathophysiology and management policy. *Journal of Clinical Oncology*, 9(3):509-524.

Olson, T.H., M.S. Riedl, L. Vulchanova, X.R. Ortiz-Gonzalez et R. Elde. An acid sensing ion channel (ASIC) localizes to small primary neurons in rats. *Neuroreport*, 9:1109-1113.

Oprea, A. et M. Kress. Involvement of the proinflammatory cytokines tumor necrosis factor-alpha, IL-1 beta, and IL-6 but not IL-8 in the development of heat hyperalgesia: effects-evoked calcitonin gene-related peptide release from rat skin. *Journal of Neuroscience*, 20:6289-6293.

Pecherstorfer, M. et M. Vesely. 2000. Diagnosis and monitoring of bone metastases: clinical means. In: Body, J.J. ed. *Tumor Bone Disease and Osteoporosis in Cancer Patients*. New York, NY: Marcel Dekker, Inc; 97-129.

Poon, R.T., S.T. Fan et J. Wong. 2001. Clinical implications of circulating angiogenic factors in cancer patients. *Journal of Clinical Oncology*, 19:1207-1225.

Portenoy, R.K. D. Payne et P. Jacobsen. 1999. Breakthrough pain: characteristics and impact in patients with cancer pain. *Pain*, 81: 129-134.

Radinsky, R. 1991. Growth factors and their receptors in metastasis. *Seminar on Cancer Biology*, 2:169-177.

Ripamonti, C. et E.D. Dickerson. 2001. Strategies for the treatment of cancer pain in the new millennium. *Drugs*, 61(7):955-977.

Roman, C., D. Saha et R. Beauchamp. 2001. TGF-beta and colorectal carcinogenesis. *Microscopy research and technique*, 52 :450-457.

Rothstein, J.D., L.J. Martin et R.W. Kuncl. 1992. Decrease glutamate transport by the brain and spinal cord in amyotrophic lateral sclerosis. *New England Journal of Medicine*, 326:1464-1468.

Sabino, M.A., J.R. Ghilardi, J.L. Jongen, C.P. Keyser, N.M. Luger, D.B. Mach, C.M. Peters, S.D. Rogers, M.J. Schwei, C. de Felipe, P.W. Mantyh. 2002. Simultaneous reduction in cancer pain, bone destruction, and tumor growth by selective inhibition of cyclooxygenase-2. *Cancer Research*. 62: 7343-7349.

Sabino, M.A. et P.W. Mantyh. 2005. Pathophysiology of Bone Cancer Pain, Review. *The Journal of Supportive Oncology*, Vol 3, Number 1: 15-24.

Schmidt, R., M. Schmelz, C. Forster *et al.* 1995. Novel classes of responsive and unresponsive C nociceptors in human skin. *Journal of Neuroscience*, 15:333-341.

Schwei, M.J., P. Honore, S.D. Rogers *et al.* 1999. Neurochemical and cellular reorganisation of the spinal cord in a murine model of bone cancer pain. *Journal of Neuroscience*, 19:10886-10897.

Silver, B.J. 1992. Platelet-derived growth factor in human malignancy. *Biofactors*, 3:217-227.

Stoscheck, C.M. et L.E. King Jr. 1986. Role of epidermal growth factor in carcinogenesis. *Cancer Research*, 46:1030-1037.

Sutherland, S.P., S.P. Cook et E.W. McCleskey. 2000. Chemical mediators of pain due to tissue damage and ischemia. *Progress in Brain Research*, 129:21-38.

Szallasi, A., P. Blumberg. 1999. Vanilloid (Capsaicin) Receptors and Mechanisms. *Pharmacological Review*, 51(2): 159-212.

Tominaga M, Caterina MJ, Malmberg AB, Rosen TA, Gilbert H, Skinner K, Raumann BE, Basbaum AI and Julius D .1998. The cloned capsaicin receptor integrates multiple pain-producing stimuli. *Neuron* 21: 531-543.

Tozer, T.N. et M. Rowland. 2006. Introduction to Pharmacokinetics and Pharmacodynamics, *The Quantitative Basis of Drug Therapy*. Edité par Lippincott Williams and Wilkins, Baltimore USA. 326 pages.

Ueda, H. 2006. Molecular mechanisms of neuropathic pain-phenotypique switch and initiation mechanisms. *Pharmacology and Therapeutics*, 109:57-77.

Watkins, L.R., L.E. Goehler, J. Relton, M.T. Brewer et S.F. Maier. 1995. Mechanisms of tumor necrosis factor-alpha (TNF-alpha) hyperalgesia. *Brain Research*, 692:244-250.

Woolf, C.J. 2004. American College of Physicians, American Physiological Society. Pain: moving from symptom control toward mechanism-specific pharmacologic management. *Annals of Internal Medicine*, 140 :441-451.

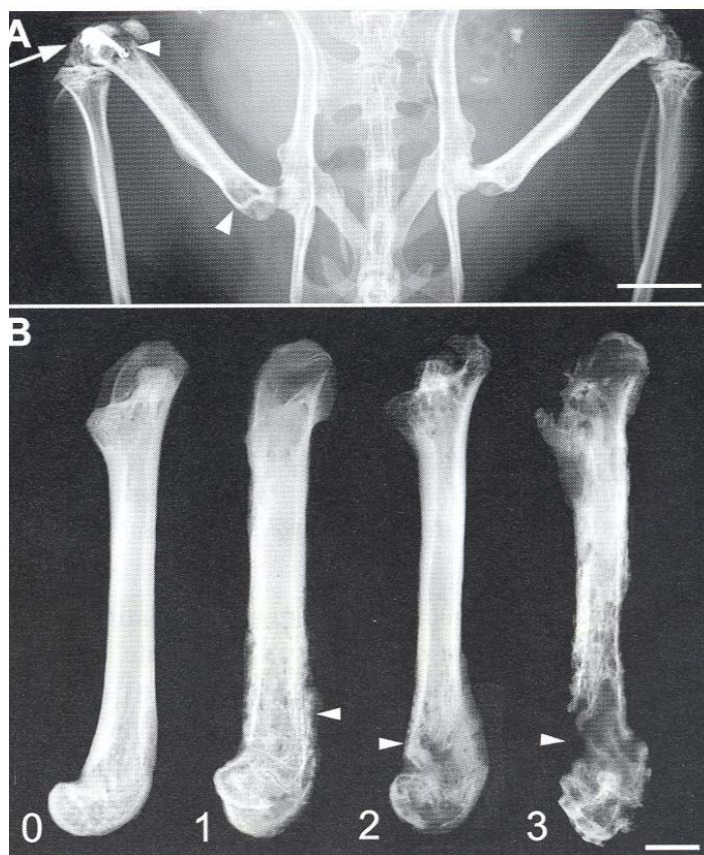
Woolf, C.J., M.W. Salter. 2000. Neuronal Palsticity: increasing the gain in pain. *Science*, 288(5472): 1765-1769.

Xu, G.Y. et L.Y.M. Huang. 2002. Peripheral inflammation sensitizes P2X receptor-mediated responses in dorsal root ganglions neurons. *Journal of Neuroscience*, 22(1):93-102.

Yang, B.H., Z.G. Piao, Y.B. Kim, C.H. Lee, K. Park, J.S. Kim and S.B. Oh. 2003. Activation of Vanilloid Receptor 1 (VR1) by Eugenol. *J Dent Res*. 82(10) : 781-785.

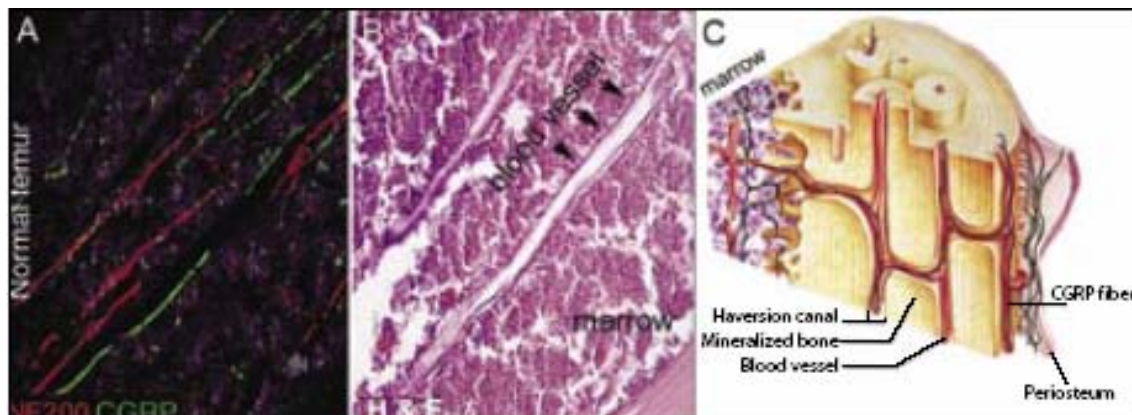
6.9 Figures

Figure 1: A : Image radiographique du bassin et des membres postérieurs où l'on voit le fémur implanté avec les cellules ostéolytiques de sarcome et où l'on discerne l'amalgame de fermeture. B : Évolution radiographique du sarcome au temps 0, après 1, 2 et 3 semaines post-ensemencement. À noter les lésions d'ostéolyse et d'ostéoprolifération qui s'étendent jusqu'à la tête fémorale.



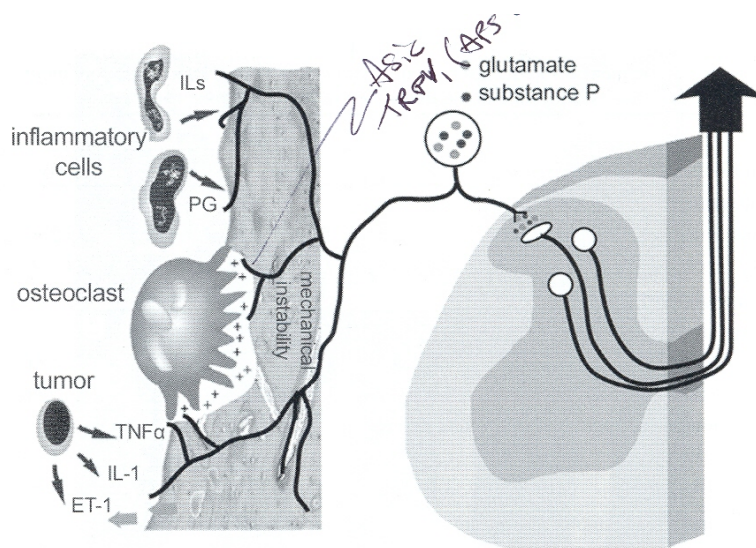
Source: Mantyh, P.W. 2004. Bone Cancer Pain: Mechanisms and Potential Therapies. In: *The Pain System in Normal and Pathological States: A Primer for Clinicians*. Villanueva, L., A.H. Dickenson et H.Ollat (eds). Progress in Pain Research and Management, Vol 31. International Association for the Study of Pain Press, Seattle, USA. P 259-278. Figure 1, p. 260.

Figure 2 : Image confocale en A et histophotomicrographie en B de la moelle osseuse d'un os normal. A : Coloration des fibres myélinisées en rouge (NF200) et en vert, les fibres non myélinisées (CGRP) qui en B sont concentrées le long des vaisseaux sanguins. C : Image graphique des structures innervées de l'os.



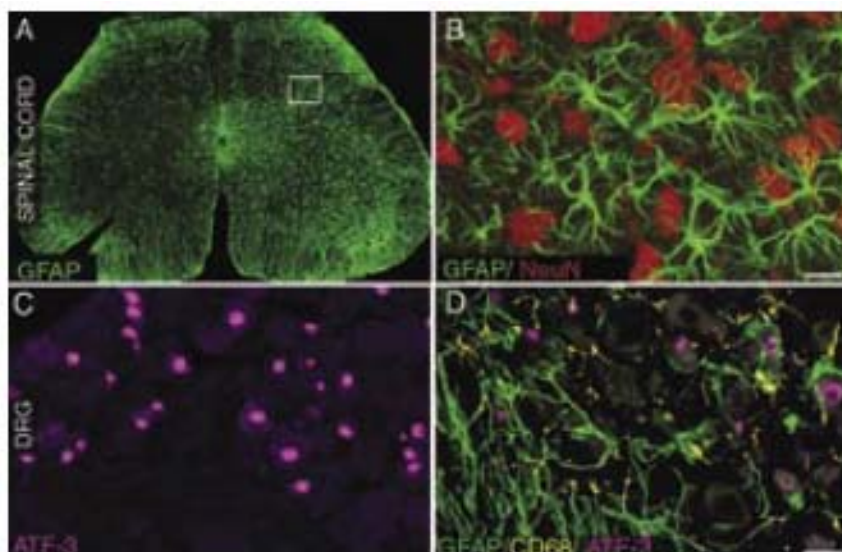
Source : Sabino, M.A. et P.W. Mantyh. 2005. Pathophysiology of Bone Cancer Pain, Review. The Journal of Supportive Oncology, Vol 3, Number 1: 15-24. Figure 2, p.17.

Figure 3: Représentation des substances relâchées par les cellules inflammatoires, par les ostéoclastes et par les cellules tumorales qui contribuent à la sensibilisation des fibres afférentes primaires. Cette information nociceptive voyage par les fibres afférentes et entre dans la moelle épinière par la corne dorsale et stimule la relâche de substances pro-algésiques comme la substance P et le glutamate. IL : interleukine, PG : prostaglandines, TNF- α : facteur de nécrose tumorale alpha, ET : Endotheline, + : protons extracellulaires.



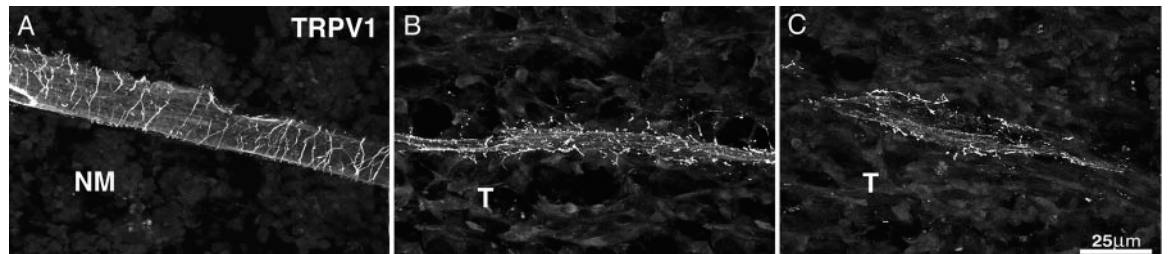
Source: Mantyh, P.W. 2004. Bone Cancer Pain: Mechanisms and Potential Therapies. In: The Pain System in Normal and Pathological States: A Primer for Clinicians. Villanueva, L., A.H. Dickenson et H.Ollat (eds). Progress in Pain Research and Management, Vol 31. International Association for the Study of Pain Press, Seattle, USA. P 259-278. Figure 2, p. 262.

Figure 4 : Image cofocale d'une section de moelle épinière. A : Coloration des astrocytes en vert (GFAP : protéine gliale fibrillaire acide) à noter l'augmentation des astrocytes du côté ipsilatéral à la lésion. B : Grossissement de la zone encadrée où il est possible de voir l'hypertrophie astrocytaire (vert) sans changement du nombre de neurones en rouge (NeuN : Marqueur neuronale). C : Image confocale du ganglion de la racine dorsale du côté ipsilatéral en mauve qui indique la présence d'une lésion du nerf (ATF-3 : facteur d'activation de transcription 3). D : Image confocale des cellules de Schwann non myélinisées en vert (GFAP) et de l'infiltration par les macrophages en jaune (CD68).



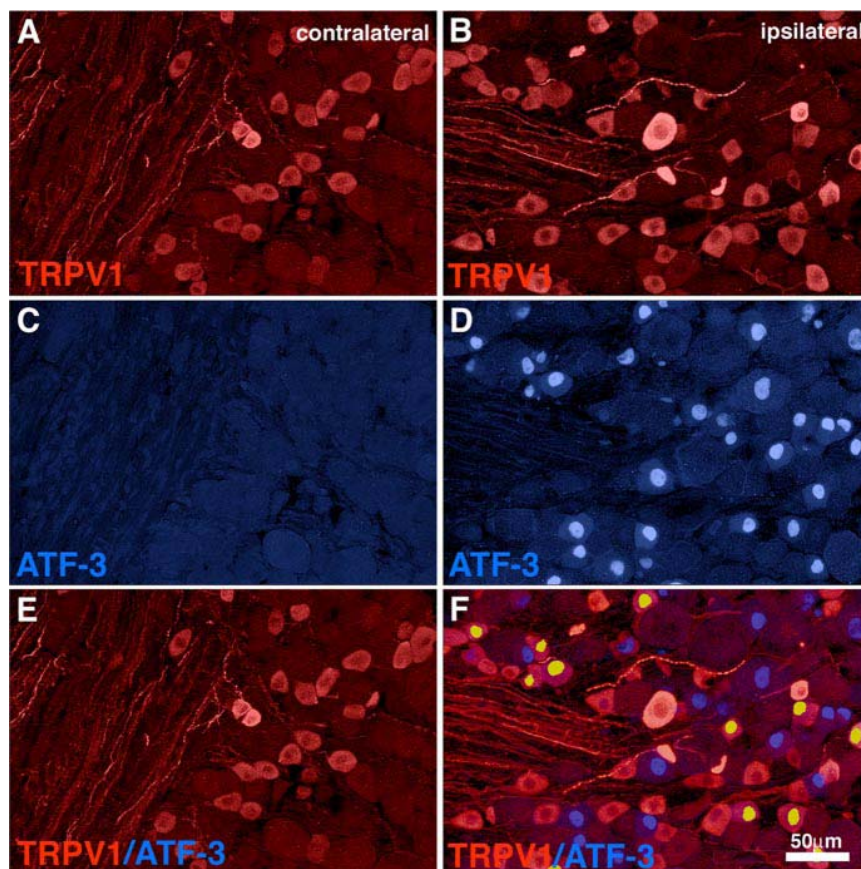
Source : Sabino, M.A. et P.W. Mantyh. 2005. Pathophysiology of Bone Cancer Pain, Review. *The Journal of Supportive Oncology*, Vol 3, Number 1: 15-24. Figure 4, p.19.

Figure 5 : Image confocale des nerfs sensitifs de l'os qui présentent des canaux TRPV1 dans un os normal et suite à l'invasion osseuse du néoplasme. A : Image normale où l'on peut voir l'association des fibres nerveuses qui démontrent des canaux TRPV1 associés aux vaisseaux sanguins. NM : moelle normale. B : Image où les cellules cancéreuses ont commencé à envahir la moelle osseuse (T : tumeur) et où les TRPV1 restent associés aux vaisseaux sanguins mais présentent une ramification moindre. C : Image où les cellules tumorales ont envahi plus amplement la moelle osseuse et où les canaux TRPV1 sont encore visibles mais plus fragmentés.



Source : Ghilardi, J.R., H. Rohich, T.H. Lindsay, M.A. Sevcik, M.J. Schwei, K. Kubota, K.G. Halvorson, J. Poblete, S.R. Chaplan, A.E. Dubin, N.I. Carruthers, D. Swanson, M. Kuskowski, C.M. Flores, D. Julius and P.W. Mantyh. 2005. *The Journal of Neuroscience*, 25(12): 3126-3131. Figure 1 p. 3127.

Figure 6 : Image des fibres nerveuses dans le ganglion de la racine dorsale L2 contra et ipsilatérales à une lésion tumorale 14 jours après l'inoculation de l'os. A et B : En rouge, les fibres contra et ipsilatérales à la lésion qui expriment le récepteur TRPV1. C et D : En bleu, les nerfs affectés par la tumeur (colorés avec ATF-3) contra et ipsilatéraux à la lésion. E et F : Superposition des récepteurs TRPV1 et des nerfs affectés par la lésion démontre une concentration importante de ces récepteurs sur ces fibres nerveuses lésées.



Source : Ghilardi, J.R., H. Rohich, T.H. Lindsay, M.A. Sevcik, M.J. Schwei, K. Kubota, K.G. Halvorson, J. Poblete, S.R. Chaplan, A.E. Dubin, N.I. Carruthers, D. Swanson, M. Kuskowski, C.M. Flores, D. Julius and P.W. Mantyh. 2005. *The Journal of Neuroscience*, 25(12): 3126-3131. Figure 2 p. 3128.

BIBLIOGRAPHIE

Ács, G. et P.M. Blumberg. 1994. [³H] Resiniferatoxin binding to pig dorsal horn membranes displays positive cooperativity. *Life Science*. 55: pp. 337-346.

Ács, G., M. Palkovits et P.M. Blumberg. 1996. Specific binding of [³H]resiniferatoxin by human and rat preoptic area, locus ceruleus, medial hypothalamus, reticular formation and ventral thalamus membrane preparations. *Life Science*. 59: pp.1899-1908.

Alvarez, F.J. et R.E. Fyffe. 2000. Nociceptor for the 21st century. *Current Review on Pain*, 4(6):451-458.

Anderson, W.G., R.S. McKinley et M. Colavecchia. 1997. The Use of Clove Oil as an Anesthetic for Rainbow Trout and Its Effects on Swimming Performance. *North American Journal of Fisheries Management*. 17(2): pp.301-307.

Aoshima, H. et K. Hamamoto. 1999. Potentiation of GABA A receptors expressed in *Xenopus* oocytes by perfumes and phytoncid. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*. 63: pp.743-748.

Atsusane, T. 1991. Clove oil or dehydroeugenol for controlling oxygen in the human body. *Japan Kokai Tokkyo Koho*. 227: pp.6.

Baccaglini, P.J., Hogan, P.G., 1983. Some rat sensory neurons in culture express characteristics of differentiated pain sensory cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80, 594-598.

Balon, E.K. 2000. Defending fishes against recreational fishing: an old problem to be solved in the new millennium. *Environmental Biology of Fishes*. 57: pp.1-8.

Beaudry, F., 1999. Statistical evaluation of linearity and non linearity of LC/MS/MS quantitation analysis. *Pharm Sci*. 1, (S1) 2437.

Beaudry, F., S.A. Guénette, A. Winterborn, J.-F. Marier et P. Vachon. 2005. Development of a rapid and sensitive LC-ESI/MS/MS assay for the quantification of propofol using a simple off-line dansyl chloride derivatization reaction to enhance signal intensity. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 39: pp. 411-417.

Beaudry, F., S.A. Guénette et P. Vachon. 2006. Determination of eugenol in rat plasma by liquid chromatography-quadrupole ion trap mass spectrometry using a

simple off-line dansyl chloride derivatization reaction to enhance signal intensity. *Biomedical Chromatography*. 20: pp. 1216-1222.

Beaudry, F. et P. Vachon. 2006. Electrospray ionisation suppression, a physical or chemical phenomenon? *Biomedical chromatography*. 20: pp.200-205.

Bennett, A.D., K.M. Chastain et C.E. Hulsebosch. 2000a. Alleviation of mechanical and thermal allodynia by CGRP (8-37) in a rodent model of chronic central pain. *Pain*. 86: pp.163-175.

Bennett, A.D., A.W. Everhart et C.E. Hulsebosch. 2000b. 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 Research*. 859: pp. 72-82.

Bennett, G.J. et Y.K.A Xie. 1988. A peripheral mononeuropathy in rat that produces disorders of pain sensation like those seen in man. *Pain*. 33: pp. 87-107.

Bernard, J.-F. et C. Gauriau. 2004. Brainstem and Pain: A Complementary Role with Regard to the Thalamus? *In: The pain system in normal and pathological states: a primer for clinicians*. Villanueva, L., A.H. Dickenson, H. Ollat. International Association for the Study of Pain, Seattle, Washington, USA. 347 p.

Bernstein, P, K. Digre et D. Creel. 1997. Retinal toxicity associated with occupational exposure to the fish anesthetic MS-222. *American Journal of Ophthalmology*. 124(6): pp.843-844.

Bester, H., Chapman, V., Besson. J.M., Bernard, J.F., 2000. *J. Neurophysiol*. 83, 2239-2259.

Beukema, J.J. 1970a. Angling experiments with carp (*Cyprinus carpio* L.). Part II. Decrease catchability through one trial learning. *Netherlands Journal of Zoology*. 19: pp. 81-92.

Beukema, J.J. 1970b. Acquired hook avoidance in the pike *Esox lucius* fished with artificial and natural baits. *Journal of Fisheries Biology*. 2: pp. 155-160.

Bevan, S. et P. Geppetti. 1994. Protons: small stimulants of capsaicin-sensitive sensory nerves. *Trends in Neuroscience*, 17(12): 509-512.

Bouhassira, D., L. Villanueva, Z. Bing et D. Le Bars. 1992. Involvement of the subnucleus reticularis dorsalis in diffuse noxious inhibitory controls in the rat. *Brain Research*. 595: pp. 353-357.

Brammer, A., C.D. West et S.L. Allen. 1993. a comparison of propofol with other injectable anesthetics in a rat model for measuring cardiovascular parameters. *Laboratory Animals*. 27: pp. 250-257.

Brookes JP. 1994. New Approaches to Amphibian Limb Regeneration. *Trends in Genetics*. 10: pp.169-173.

Brookes JP. 1997. Amphibian Limb Regeneration: Rebuilding a Complex Structure. *Science*. 276: pp. 81-87.

Brodin, P. 1985. Differential inhibition of A, B and C fibres in the rat vagus nerv by lidocaine, eugenol and formaldehyde. *Arch. Oral. Biol*. 30(6): 477-480.

Brown, L.A. 1993. Anaesthesia and restraint. In: Stoskopf, M.K. eds., *Fish Medicine*, W.B. Saunders Company, Harcourt Brace Jovanovich Inc., Philadelphia. pp. 79-90.

Burkhart J.G., J.C. Helgen, D.J. Fort, K. Gallagher, D. Bowers, T.L. Propst, M. Gernes, J. Manger, M.D. Shelby et G. Lucier. 1998. Introduction of Mortality and Malformation in *Xenopus laevis* Embryos by Water Sources Associated with Field Frog deformities. *Environmental health perspectives*. 106: pp.841-848.

Carducci, M.A., J.B. Nelson, M.K. Bowling, *et al.* 2002. Atrasentan, an endothelin-receptor antagonist for refractory adenocarcinomas: safety and pharmacokinetics [erratum in: *Journal of Clinical Oncology*, 2003; 21:2449]. *Clinical Oncology*, 20:2171-2180.

Caterina, M.J. et D. Julius. 2001. The vanilloid receptor: a molecular gateway to the pain pathway. *Annual Review on Neuroscience*. 24: pp. 487-517.

Caterina M.J., A. Leffler, A.B. Malmberg, *et al.* 2000. Impaired nociception and pain sensation in mice lacking the capsaicin receptor. *Science*, 288:306-313.

Caterina, M.J., M.A. Schumacher, M. Tominaga, T.A. Rosen, J.D. Levine et D. Julius. 1997. The capsaicin receptor: a heat-activated ion channel in the pain pathway. *Nature*. 389: pp. 816-824.

Chandross, K.P., I.J.H. Duncan et R.D. Moccia. 2004. Can fish suffer?: perspectives on sentience, pain, fear and stress. *Applied Animal Behaviour Science*. 86: pp. 225-250.

Chaplan, S.R., F.W. Bach, J.W. Pogrel, J.M. Chung et T.L. Yaksh. 1994. Quantitative assessment of tactile allodynia in the rat paw. *Journal of Neuroscience Methods*. 53: pp. 55-63.

Clapham, D.E. 2003. TRP channels as cellular sensors. *Nature*. 426: pp.517-524.

Clohisey, D.R., S.L. Perkins et M.L.R. Ramnaraine. 2000. Review of Cellular Mechanisms of Tumor Osteolysis. *Clinical Orthopedics and Related Research*, 373:104-114.

Coleman, R.E. 2001. Metastatic bone disease: clinical features, pathophysiology and treatment strategies. *Cancer Treatment Review*. 27: 165-176.

Cooper, J.R., F.E. Bloom et R.H. Roth. 1996. *The Biochemical Basis of Neuropharmacology*, seventh edition. Oxford University Press, New York, Oxford. 518 p.

Cortright, D.N. et A. Szallasi. 2004. Biochemical pharmacology of the vanilloid receptors TRPV1, An update. *European Journal of Biochemistry*. 271: pp. 1814-1819.

Craig, A.D., 2002. How do you feel? Interoception: the sense of the physiological condition of the body. *Natl. Rev. Neurosci*. 3, 655-66.

D'Amour, F.E. et D.L. Smith. 1941. A method for determining loss of pain sensation. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutic*. 72: pp. 74-79.

Davar, G. 2001. Endothelin-1 and metastatic cancer pain. *Pain Medicine*, 2:24-27.

Davidoff, R.A. 1972. Gamma-aminobutyric acid antagonism and presynaptic inhibition in the frog spinal cord. *Science*. 175: 331-333.

Davies, B., & Morris, T. (1993) Physiological parameters in laboratory animals and humans. *Pharmaceutical Research*, 10, 1093-1095.

Davis J.B., J. Gray, M.J. Gunthorpe, J.P. Hatcher, P.T. Davey, P. Overend, M.H. Harries, J. Latcham, C. Clapham, K. Atkinson, S.A. Hughes, K. Rance, E. Grau,

Davis, R.E. et P.D. Klinger. 1994. NMDA receptor antagonist MK-801 blocks learning of conditioned stimulus-unconditioned stimulus contiguity but not fear on conditioned stimulus in goldfish (*Carassius auratus*). Behavioral Neuroscience. 108: pp. 935-940.

Davis, K.B., N.C. Parker et M.A. Suttle. 1982. Plasma corticosteroids and chlorides in striped bass exposed to tricaine methanesulfonate, quinaldine, etomidate, and salt. Progressive Fish-Culturist. 44: pp. 205-207.

Decosterd, I. et C.J. Woolf. 2000. Spared nerve injury: an animal model of persistent peripheral neuropathic pain. Pain. 87: pp. 149-158.

Delaisse, J.-M., et G. Vaes. 1992. Mechanism of mineral solubilisation and matrix degradation in osteoclastic bone resorption. In: Rifkin, B.R. et Gay, C.V. (Eds). Biology and Physiology of the Osteoclasts. Annual Arbor: CRC, pp 289-314.

DeLeo, J.A. et R.P. Yeziarski. The role of neuroinflammation and neuroimmune activation in persistent pain. Pain, 90:1-6.

Dickenson, A.H., R. Suzuki, E.A. Matthews, W. Rahman, C. Urch, L. Seagrove et L. Rygh. 2004. Balancing Excitations and Inhibitions in Spinal Circuits. *In: The pain system in normal and pathological states: a primer for clinicians.* Villanueva, L., A.H. Dickenson, H. Ollat. International Association for the Study of Pain, Seattle, Washington, USA. 347 p.

Di Marzo, V., P.M. Blumberg et A. Szallasi. 2002. Endovanilloid signalling in pain. Current Opinion in Neurobiology. 12 : 372-380.

Djouhi, L., L. Bleazard et S.N. 1998. Lawson. Association of somatic action potential shape with sensory receptive properties in guinea-pig dorsal root ganglion neurones. Journal of Physiology, 13: 857-872.

Dougherty, P.M., W.D. Willis et F.A. Lenz. 1998. Transient inhibition of responses to thermal stimuli of spinal sensory tract neurons in monkeys during sensitization by intradermal capsaicin. Pain. 77: pp. 129-136.

Driever, W., L. Solnica-Krezel, A.F. Schier, S.C. Neuhauss, J. Malicki, D.L. Stemple, D.Y. Stainier, F. Zwartkruis, S. Abdelilah, Z. Rangini, J. Belak et C.

Dubner, R. et K. Ren. 2004. Brainstem modulation of Pain after Inflammation. *In: The pain system in normal and pathological states: a primer for clinicians.* Villanueva, L., A.H. Dickenson, H. Ollat. International Association for the Study of Pain, Seattle, Washington, USA. 347 p.

- Dubuisson, D. et S.G. Dennis. 1977. The formalin test : a quantitative study of the analgesic effects of morphine, meperidine, and brain stem stimulation in rats and cats. *Pain*. 4: pp. 161-174.
- Dugast, C., A. Almeida et D. Lima. 2003. The medullary dorsal reticular nucleus enhances the responsiveness of spinal nociceptive neurons to peripheral stimulation in the rat. *European Journal of Neuroscience*.18: pp. 580-588.
- Dunlop, R. et P. Laming. 2005. Mechanoreceptive and Nociceptive Responses in the Central Nervous System of Goldfish (*Carassius auratus*) and Trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Journal of Pain*. 6(9): pp. 561-568.
- Ebesson, S.O.E. Morphology of the Spinal Cord. 1976. In: *Frog Neurobiology, a handbook*. R. Llinás and W. Precht, eds. Springer-Verlag Berlin Heiderlberg, New York. pp. 679-706.
- Ebesson, S.O.E. et K.C. Hodde. 1981. Ascending spinal systems in the nurse shark, *Ginglymostoma cirratum*. *Cell and Tissue Research*. 216: pp. 313-331.
- Ehensing, R.H., G.F. Michell et A.J. Kastin. 1982. Similar antagonism of morphine analgesia by MIF-1 and naloxone in *Carassius auratus*. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*. 17: pp. 757-761.
- Endo, T., K. Ogishima, H. Tanaka et S. Ohshima. 1972. Studies on the anesthetic effects of eugenol in some fresh water fishes. *Bulletin of Japanese Society of Science Fisheries*. 38: pp.761-767. (in Japanese with abstract in English).
- Engelman, H.S., T.B. Allen et A.B. MacDermott. 1999. The distribution of neurons expressing calcium-permeable AMPA receptors in the superficial laminae of the spinal cord dorsal horn. *The Journal of Neuroscience*. 19(6): pp. 2081-2089.
- Fields, H.L. 1987. *Pain*. New York, McGraw-Hill Book Company.
- Fields, H.L. 1989. *Douleur*. New York, Medsi/McGraw-Hill.
- Fischer, I.U. et H.J. Dengler. 1990. Sensitive high-performance liquid chromatographic assay for the determination of eugenol in body fluids. *Journal of Chromatography*. 525 (2): pp. 369-377.

Flecknell, P.A. et M. Mitchell, 1984. Midazolam and fentanyl-fluanisone: assessment of anesthetic effects in laboratory rodents and rabbits. *Laboratory Animals*. 18: pp. 143-146.

Food and Drug Administration: Center for Veterinary Medicine (2002) Guidance number 150 for industry, status of clove oil and eugenol for anaesthesia of fish. U.S. Department of Health and Human Services.

Forbes, C.A., Bevan, S.J., 1988. Properties of single capsaicin-activated channels. *Society for Neuroscience Abstracts*. 14: pp.642.

Fowler, C.J. 2004. Possible involvement of the endocannabinoid system in the actions of three clinically used drugs. *Trends Pharmacological Science*. 25(2): pp.59-61.

Fox, A, C. Eastwood, C. Gentry, D. Manning et L. Urban. 1999. Critical evaluation of the streptozotocin model of painful diabetic neuropathy in the rat. *Pain*. 81: pp. 81-87.

Fukamachi, S., A. Furuta, T. Ikeda, *et al.* 2001. Altered expressions of glutamate transporter subtypes in rat model of neonatal cerebral hypoxia-ischemia. *Brain research. Developmental brain research*, 132: 131-139.

Galasko, F., A. Casuccio, C. Ticozzi et C. Ripamonti. 1995. Diagnostic of skeletal metastases and assessment of response to treatment. *Clinical Orthopedic*, 312:64-75.

Gall, O., D. Bouhassira, D. Chitour et D. Le Bar. 1998. Involvement of the caudal medulla in negative feedback mechanisms triggered by spatial summation of nociceptive inputs. *Journal of Neurophysiology*. 79: pp. 304-311.

Gamse, R., U. Petsche, F. Lembeck et G. Jancsó. 1982. Capsaicin applied to the peripheral nerve inhibits axoplasmic transport of substance P and somatostatin. *Brain Research*. 238: pp. 447-462.

García-Martínez, C., M. Humet, R. Planells-Cases, A. Gomis, M. Caprini, F. Viana, E. De la Peña, F. Sanchez-Baeza, T. Carbonell, C. De Felipe, E. Pérez-

Garibaldi, J.A., J. Greenlaw, J. Choi et M. Fotovatjah. 1995. Treatment of post-operative pain. *Journal of the California Dental Association*. 23(4): pp. 71-72.

Georger M (2002) Concepts in the routine preparation of eye specimens. *Histol Rev* 35, 34-36.

Ghilardi, J.R., H. Rohich, T.H. Lindsay, M.A. Sevcik, M.J. Schwei, K. Kubota, K.G. Halvorson, J. Poblete, S.R. Chaplan, A.E. Dubin, N.I. Carruthers, D. Swanson, M. Kuskowski, C.M. Flores, D. Julius and P.W. Mantyh. 2005. *The Journal of Neuroscience*, 25(12): 3126-3131.

Green CJ. 1979. Classes amphibia, reptilia and aves. In Green CJ (ed): *Animal Anaesthesia, Laboratory animal handbook 8. Laboratory Animals*, London, UK, pp. 111-113.

Gregory, N. 1999. Do fish feel pain? *ANZCART News*. 12 : pp. 1-3.

Griffiths, J.R. 1991. Are cancer cells acidic? *British Journal of Cancer*, 64 : 425-427.

Groupe d'Experts Douleurs Neuropathiques (GEDN), 2004. Thoughts on the definition of postherpetic pain: the time criterion adds nothing. *Revue Neurologique (Paris)*. 160: pp. 721-725.

Guénette, S.A., P. Hélie, F. Beaudry et P. Vachon. 2007a. Eugénol for anesthesia of African clawed frogs (*Xenopus laevis*). *Veterinary Anaesthesia and Analgesia*. 34 : pp. 164-170.

Guénette, S.A., A. Ross, J.-F. Marier, F. Beaudry et P. Vachon. 2007b. Pharmacokinetics of eugenol and its effects on thermal hypersensitivity in rats. *European Journal of Pharmacology*. 562: pp. 60-67.

Guénette, S.A. F.C. Uhlend, P. Hélie, F. Beaudry et P. Vachon. 2007c. Pharmacokinetics of Eugenol in Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture*, 266 (1-4): pp. 262-265.

Guénette, S.A., F. Beaudry, J.-F. Marier et P. Vachon. 2006. Pharmacokinetics and anesthetic activity of eugenol in male Sprague-Dawley rats. *Journal of Veterinary Pharmacological Therapeutic*. 29: pp.265-270.

Guilbaud, G. et J.M. Besson. 1997. Physiologie du circuit de la douleur. *Dans* : Brasseur, L., M. Chauvin et G. Guilbaud (éd.), *Douleurs, bases fondamentales, pharmacologie, douleurs aiguës, douleurs chroniques, thérapeutiques*. Paris, Éditions Maloine, pp. 7-22.

Guo A., L. Vulchanova, J. Wang, X. Li et R. Elde. 1999. Immunocytochemical localization of the vanilloid receptor 1 (VR1): Relationship to neuropeptides, the P2X₃ purinoceptor and IB4 binding sites. *European Journal of Neuroscience*. 11: pp.946-958.

Gurdon, J.B. 1996. Introductory Comments : *Xenopus* as a Laboratory Animal. In: *The Biology of Xenopus*. R.C. Tinsley and H.R. Kobel, eds. Pp.3-8. Clarendon Press, Oxford.

Haines, M., L.M. Mao, L. Yang, A. Arora, E.E. Fibuch et J.Q. Wang. 2008. Modulation of AMPA receptor GluR1 subunit phosphorylation in neurons by the intravenous anaesthetic propofol. *British Journal of Anaesthesia*. 100(5): pp. 676-682.

Hamamoto, D.T. et D.A. Simone, 2003. Characterization of cutaneous primary afferent fibers excited by acetic acid in a model of nociception in frogs. *Journal of Neurophysiology*. 90 (2): pp. 566-577.

Harper, A.J., P.L. Pugh, D.C. Rogers, S. Bingham, A. Randall et S.A. Sheardown. 2000. Vanilloid receptor-1 is essential for inflammatory thermal hyperalgesia. *Nature*. 405 (11): pp. 183-187.

Héon, H. 2005. Les modèles animaux de douleur. *In: Pharmacologie de la douleur*. P. Beaulieu. Les Presses de l'Université de Montréal, Québec, Canada. 593 p.

Heyman, I., Rang, H.P., 1985. Depolarizing responses to capsaicin in a subpopulation of rat dorsal root ganglion cells. *Neurosci. Lett*. 56, 69-75.

Hikasa, Y., K. Takase, T. Ogasawara et S. Ogasawara. 1986. Anesthesia and recovery with tricaine methanesulfonate, eugenol and thiopental sodium in the carp, *Cyprinus carpio*. *Japanese Journal of Veterinary Science*. 48(2): pp. 341-351.

Hogan, Q. 2002. Animal pain models. *Regional Anesthesia and Pain Medicine*. 27: pp. 385-401.

Holzer, P. 1991. Capsaicin: Cellular targets, mechanisms of action, and selectivity for thin sensory neurons. *Pharmacological Review*. 43: 143-201.

Honore, P., N.M. Luger, M.A. Sabino *et al.* 2000a. Osteoprotegerin blocks bone cancer-induced skeletal destruction, skeletal pain and pain-related neurochemical reorganization of the spinal cord. *Natural Medicine*, 6(5):521-528.

- Honore, P., S.D. Rogers, M.J. Schwei, *et al.* 2000b. Murine models of inflammatory, neuropathic and cancer pain each generates a unique set of neurochemical changes in the spinal cord and sensory neurons. *Neuroscience*, 98(3):585-598.
- Honore, P., J. Schwei, S.D. Rogers, *et al.* 2000c. Cellular and neurochemical remodeling of the spinal cord in bone cancer pain. *Progress in Brain Research*, 129:389-397.
- Hunt, S.P. et P.W. Mantyh. 2001. The molecular dynamics of pain control. *Natural Reviews on Neuroscience*, 2(2):83-91.
- Hunt, S.P., A. Pini et G. Evan. 1987. Induction of c-fos-like protein in spinal cord neurons following sensory stimulation. *Nature*, 328(6131):632-634.
- Hutchison V, Whitford W, Kohl M (1968). Relation of body size and surface area to gas exchange in anurans. *Physiol Zool* 41,65-85.
- Ikeda, H., Tokita, Y., Suda, H., 1997. Capsaicin-sensitive A delta fibres in cat tooth pulp. *J. Dent. Res.* 76,1341-1349.
- Iwahori, N., T. Kawawaki et J. Baba. 1998. Neuronal organisation of the spinal cord in the red stingray (*Dasyatis akajei: Chondrichthyes*). *Journal of Brain Research*. 39: pp. 103-116.
- Jadhav, B.K., K. R. Khandelwal, A.R. Ketkar et S.S. Pisal. 2004. Formulation and Evaluation of Mucoadhesive Tablets Containing Eugenol for the Treatment of Periodontal Disease. *Drug Development and Industrial Pharmacy*. 30(2): 195-203.
- Jancsó-Gábor, A., J. Szolcsányi et N. Jancsó. 1970. Stimulation and desensitization of the hypothalamic heat sensitive structures by capsaicin in rats. *Journal of Physiology (London)*. 208: pp.449-459.
- Jemal, M. 2000. High-throughput quantitative bioanalysis by LC/MS/MS. *Biomedical Chromatography*. 14: pp. 422-429.
- Jørgensen CB (2000) Amphibian respiration and olfaction and their relationships: from Robert Townson (1794) to the present. *Biol Rev Camb Philos Soc* 75, 297-345.
- Julius, D. et A.I Basbaum. 2001. Molecular mechanisms of nociception. *Nature*, 413:203-210.

- Kahn, P. 1994. Zebrafish hit the big time. *Science*. 264: pp. 904-905.
- Kanai, Y., E. Nakazato, A. Fujiuchi, T. Hara et A. Imai. 2005. Involvement of an increase spinal TRPV1 sensitization through its up-regulation in mechanical allodynia of CCI rats. *Neuropharmacology*. 49: pp. 984-997.
- Kandel, E.R., J.H. Schwartz et T.M. Jessell. 2000. *Principle of Neural Science*. Elsevier/North-Holland, New York. 1414 p.
- Keene, J.L., D.L.G. Noakes, R.D. Moccia, C.G. Soto. 1998. The efficacy of clove oil as an anesthetic for rainbow trout, *Onchorhynchus mykiss*. *Aquaculture Resources*. 29: pp.89-101.
- Kicliter, E. et S.O.E. Ebesson. 1976. Organization of the "Nonolfactory" Telencephalon. In: *Frog Neurobiology, a handbook*. R. Llinás and W. Precht, eds. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, New York. pp. 946-972.
- Kim, S.H. et J.M. Chung. 1992. An experimental model for peripheral neuropathy produced by segmental spinal nerve ligation in the rat. *Pain*. 50: pp. 355-363.
- Kirschstein, T., W. Greffrath, D. Busselberg et R.D. Treede. 1999. Inhibition of rapid heat responses in nociceptive primary sensory of rats by vanilloids receptors antagonists. *Journal of Neurophysiology*, 82(6): 2853-2860.
- Koblin, D.D. 1992. Characteristics and implications of desflurane metabolism and toxicity. *Anesthesia and Analgesia*. 75(4): pp. 10-16.
- Kohn, F.D. et C.B. Clifford. 2002. *Biology and Disease of Rats*. In: *Laboratory Animal Medicine*, 2nd Edition. By Fox, J.G., Anderson, L.C., Franklin, M.L. and Quimby, F.W. Ed Elsevier Science (USA), New York, 1325 p.
- Kozam, G. 1977. The effect of eugenol on nerve transmission. *Oral Surgery*. 44: pp.799.
- Laekeman, S.M., V.L. Hoof, A. Haemers, V.A.D. Berghe, A.G. Herman et A.K. Vlietink. 1990. Eugenol, a valuable compound for in-vitro experimental research and worthwhile for further in-vivo investigation. *Phytotherapy Research*. 4(3): pp.90-96.
- Lafortune, M., M.A. Mitchell et J.A. Smith. 2001. Evaluation of medetomidine, clove oil and propofol for anesthesia of leopard frogs, *Rana pipiens*. *Journal of Herpetological Medicine and Surgery*. 11: pp. 13-18.

- Laughlin, T.M., T.W. Vanderah, J. Lashbrook, M.L. Nichols, M. Ossipov, F. Porreca et G.L. Wilcox. 1997. Spinally administered dynorphin A produces long-lasting allodynia: involvement of NMDA but not opioid receptors. *Pain*. 72: pp. 253-260.
- Lawand, N.B., W.D. Willis et K.N. Westlund. 1997. Excitatory amino acid receptor involvement in peripheral nociceptive transmission in rats. *European Journal of Pharmacology*. 324: pp.169-177.
- Lawson, S.N., 2002. Phenotype and function of somatic primary afferent nociceptive neurones with C-, A delta- or A alpha/beta-fibres. *Exp. Physiol*. 87, 239-244.
- Le Bars, D., A.H. Dickenson et J.M. Besson. 1979a. Diffuse noxious inhibitory controls (DNIC). I. Effects on dorsal horn convergent neurones in the rat. *Pain*. 6 : pp. 283-304.
- Le Bars, D., A.H. Dickenson et J.M. Besson. 1979b. Diffuse noxious inhibitory controls (DNIC). II. Lack of effect on non-convergent neurones, supraspinal involvement and theoretical implications. *Pain*. 6: pp. 305-327.
- Le Bars, D., M. Gozariu et S.W. Cadden. 2001. Évaluation de la douleur aiguë chez l'animal d'expérience - Première partie. *Annales Françaises d'Anesthésie et de Réanimation*. 20 : pp. 347-365.
- LeChat, M.R. 1996. An argument in defence of fishing. *Fisheries*. 21: pp.20-21.
- Letcher, J. et R. Durante. 1995. Evaluation of use of tiletamine/zolazepam for anesthesia of bullfrogs and leopard frogs. *Journal of the American Veterinary Association*. 207: pp.80-82.
- Levine, J.D. N.C. Gordon et H.L. Fields. 1978. The mechanism of placebo analgesia. *The Lancet*. 2: pp.654-657.
- Liu, M., M.C. Liu, C. Magoulas, J.A.V. Priestley et N.J. Willmott. 2003. Versatile regulation of cytosolic Ca^{2+} by vanilloid receptor-1 in rat dorsal root ganglion neuron. *Journal of Biological Chemistry*. 278: pp.5462-5472.
- Liu, L. et S.A. Simon. 1996. Similarities and differences in the currents activated by capsaicin, piperine and zingerone in rat trigeminal ganglion cells. *Journal of Neurophysiology*. 76: pp.1858-1869.

Lovell, D.P. 1986a. Variation in pentobarbitone sleeping time in mice. 1. Strain and sex differences. *Laboratory Animals*. 20: pp.85-90.

Lovell, D. P. 1986b. Variation in pentobarbitone sleeping time in mice. 2. Variable affecting test results. *Laboratory Animals*. 20: pp. 91-96.

Lovell, D. P. 1986c. Variation in pentobarbitone sleeping time in mice. 3. Strain X environment interactions. *Laboratory Animals*. 20: pp. 307-312.

Luger, N.M., P. Honore, M.A.C. Sabino, *et al.* 2001. Osteoprotegerin diminishes advanced bone cancer pain. *Cancer Research*, 61(10):4038-4047.

Lynn, B. 1994. The fibre composition of cutaneous nerves and the classification and response properties of cutaneous afferents, with particular reference to nociception. *Pain Review*. 1: pp. 172-183.

Mach, D.B., S.D. Rogers, M.C. Sabino, *et al.* 2002. Origins of skeletal pain : sensory and sympathetic innervation of the mouse femur. *Neuroscience*, 113: 155-166.

Mader, D.R. 1996. *Reptile medicine and surgery*. WB Saunders Comp, Philadelphia. p.442-443.

Major, P.P., A. Lipton, J. Berenson et G. Hortobagyi. Oral biphosphonates: a review of clinical use in patients with bone metastases. *Cancer*, 88:6-14.

Mantyh, P.W. 2004. Bone Cancer Pain: Mechanisms and Potential Therapies. In: *The Pain System in Normal and Pathological States: A Primer for Clinicians*. Villanueva, L., A.H. Dickenson et H.Ollat (eds). *Progress in Pain Research and Management*, Vol 31. International Association for the Study of Pain Press, Seattle, USA. P 259-278.

Marchand, S. 1998. *Le phénomène de la douleur*. Chenelière/McGraw-Hill et Masson eds, Montréal et Paris. 300 p.

Marchand, S. 2005. Neurophysiologie de la douleur. *In: Pharmacologie de la douleur*. P. Beaulieu. Les Presses de l'Université de Montréal, Québec, Canada. 593 p.

Marieb, E.N. et J. Mallatt. 1997. *Human Anatomy*, 2nd ed. San Francisco, California: Benjamin Cummings.

Marier, J.-F., Vachon, P., Gritsas, A., Zhang, J., Moreau, J.-P., Ducharme, M.P., 2002. Metabolism and disposition of resveratrol in rats: extent of absorption, glucuronidation, and enterohepatic recirculation evidenced by a linked-rat model. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. 302, 369-373.

Marking, L.L. et F.P. Meyer. 1985. Are better anesthetics needed in fisheries? *Fisheries*. 10: pp.2-5.

Markowitz, K., M. Moynihan, M. Liu et S. Kim. 1992. Biologic properties of eugenol and zinc oxide-eugenol. A clinically oriented review. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology and Endodontology*. 73(6): pp. 729-737.

Marshall, I.C.B., D.E. Owen, T.V. Cripps, J.B. Davis, S. McNulty et D. Smart. 2003. Activation of vanilloid receptor 1 by resiniferatoxin mobilizes calcium form inositol 1,4,5-triphosphate-sensitive stores. *British Journal of Pharmacology*. 138: pp. 172-176.

Matsuzawa, T., Nomura M., Unno, T., 1993. Clinical pathology reference ranges of laboratory animals. Working Group II, Nonclinical Safety Evaluation Subcommittee of the Japan Pharmaceutical Manufacturers Association. *J. Vet. Med. Sci*. 55:351-362.

McMahon, S.B. 1996. NGF as a mediator of inflammation pain. *Philosophical transactions of the Royal Society of London B Biological Science*, 351(1338):431-440.

Melzack, R. et P.D. Wall. 1965. Pain mechanisms: a new theory. *Science*. 150: pp. 971-979.

Mercadante, S. 1997. Malignant bone pain: pathophysiology and treatment. *Pain*, 69:1-18.

Merck Index, An Encyclopedia of Chemicals, Drugs, and Biologicals, Twelfth Edition (1996) . pp 3947. Merck & Co., Whitehouse Station, NJ.

Meyer, R.A., J.N. Campbell et S.N. Raja. 1994. Peripheral neural mechanisms of nociception, in *Textbook of Pain* (Wall PD and Melzack R eds), Churchill Livingstone, London. pp 13-43.

Michael, G.J. et J.V. Priestley. 1999. Differential expression of the mRNA for the vanilloid receptor subtype 1 in cells of the adult rat dorsal root and nodose

ganglia and its downregulation by axotomy. *Journal of Neuroscience*, 19:1844-1854.

Miller, M.S., S.H. Buck, I.G. Sipes, H.I. Yamamura et T.F. Burks. 1982. Regulation of substance P by nerve growth factor: Disruption by capsaicin. *Brain Research*. 250: 193-196.

Mogil, J.S., S.G. Wilson, K. Bon, S.E. Lee, K. Chung, P. Raber, J.O. Pieper, H.S. Hain, J.K. Belknap, L. Hubert, G.I. Elmer, J.M. Chung et M. Devor. 1999. Heritability of nociception I: responses of 11 inbred mouse strain on 12 measures of nociception. *Pain*. 80: pp. 67-82.

Monographie propofol. Diprivan ® 1% p/v. propofol injectable à 10mg/ml. Émulsion intraveineuse-anesthésique-sédatif. AstraZeneca, Canada Inc. No de contrôle : 091695.

Munday P.L. et S.K. Wilson. 1997. Comparative efficacy of clove oil and other chemicals in anaesthetization of *Pomacentrus amboinensis*, a coral reef fish. *Journal of Fish Biology*. 51: pp.931-938.

Nadler, R.B., A.E. Koch, E.A. Calhoun *et al.* 2000. IL-1 beta and TNF-alpha in prostatic sretions are indicators in the evaluation of men with chonic prostatitis. *Journal of Urology*, 164:214-218.

Nelson, E.K. 1919. The constitution of capsaicin the pungent principle of capsicum. *Journal of the American Chemical Society*. 41: pp.1115-1117.

Nelson, J.B. et M.A. Carducci. 2000. The role of endotheline-1 and endotheline receptor antagonists in prostate cancer. *BJU International*, 85(Suppl 2):45-48.

Nichols, M.L., B.J. Allen, S.D. Rogers, J.R. Ghilardi, P. Honore, N.M. Luger, M.P. Finke, J. D.A. Lappi, D.A. Simone et P.W. Mantyh. 1999. Transmission of chronic nociception by spinal neurons expressing the substance P receptor. *Science*. 286: pp. 1558-1561.

Nielsen, O.S., A.J. Munro et I.F. Tannock. 1991. Bone metastases: pathophysiology and management policy. *Journal of Clinical Oncology*, 9(3):509-524.

Niemi, M.B., G. Pacheco-Lopez, W. Kou, M. Harting, A. del Rey, H.O. Besedovsky et M. Schedlowski. 2006. Murine taste-immune associative learning. *Brain, Behavior, and Immunity*. 6: pp. 527-531.

Nishijima, H., R. Uchida, N. Kawakami, K. Shimamura et K. Kitamura. 1998. Role of endothelium and adventitia on eugenol induced relaxation of rabbit ear

artery precontracted by histamine. *Journal of Smooth Muscle Research*. 34(3): pp. 123-137.

Northcutt, R.G. 1981. Evolution of the telencephalon in non mammals. *Annual Review of Neuroscience*. 4: pp. 301-350.

Ohkubo, T. et M. Shibata. 1997. The Selective Capsaicin Antagonist Capsazepine Abolishes the Antinociceptive Action of Eugenol And Guaicol. *Journal of Dental Research*. 76(4): 848-851.

Oliveras, J.L. et J.M. Besson. 1988. Stimulation-produced analgesia in animals: behavioural investigations. *Progress in Brain Research*. 77: pp. 141-157.

Olson, T.H., M.S. Riedl, L. Vulchanova, X.R. Ortiz-Gonzalez et R. Elde. An acid sensing ion channel (ASIC) localizes to small primary neurons in rats. *Neuroreport*, 9:1109-1113.

Oprea, A. et M. Kress. Involvement of the proinflammatory cytokines tumor necrosis factor-alpha, IL-1 beta, and IL-6 but not IL-8 in the development of heat hyperalgesia: effects-evoked calcitonin gene-related peptide release from rat skin. *Journal of Neuroscience*, 20:6289-6293.

O'Rourke D.P. et T.W. Schultz. 2002. *Biology and Diseases of Amphibians. In: Laboratory Animal Medicine, 2nd Edition.* By Fox, J.G., Anderson, L.C., Franklin, M.L. and Quimby, F.W. Ed Elsevier Science (USA), New York, 1325 p.

Payá, C. Belmonte, A. Messeguer et A. Ferrer-Montiel. 2002. Attenuation of thermal nociception and hyperalgesia by VR1 blockers. *Proceedings of the National Academy of Sciences (USA)*. 19 (99): pp. 2374-2379.

Peake, S. 1998. Sodium bicarbonate and clove oil as potential anaesthetics for nonsalmonid fishes. *North American Journal of Fisheries Management*. 18: pp.919-924.

Pecherstorfer, M. et M. Vesely. 2000. Diagnosis and monitoring of bone metastases: clinical means. In: Body, J.J. ed. *Tumor Bone Disease and Osteoporosis in Cancer Patients*. New York, NY: Marcel Dekker, Inc; 97-129.

Pelissier, T., J. Pajot et R. Dallel. 2002. The orofacial capsaicin test in rats : effects of different capsaicin concentrations and morphine. *Pain*. 96: pp. 81-87.

- Pirhonen, J. et C.B. Scheck. 2003. Effects of anesthesia with MS-222, clove oil and CO₂ on feed intake and plasma cortisol in steelhead trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture*. 220: pp.507-514.
- Pitcher, G.M. et J.L. Henry. 2000. Cellular mechanisms of hyperalgesia and spontaneous pain in a spinalized rat model of peripheral neuropathy: changes in myelinated afferent inputs implicated. *European Journal of Neuroscience*. 12: pp. 2006-2020.
- Pitcher, G.M., J. Ritchie et J.L. Henry. 1999. Nerve constriction in the rat: model of neuropathic, surgical and central pain. *Pain*. 83: pp.37-46.
- Poon, R.T., S.T. Fan et J. Wong. 2001. Clinical implications of circulating angiogenic factors in cancer patients. *Journal of Clinical Oncology*, 19:1207-1225.
- Portenoy, R.K. D. Payne et P. Jacobsen. 1999. Breakthrough pain: characteristics and impact in patients with cancer pain. *Pain*, 81: 129-134.
- Quirke, J.M., C.L. Adams et G.J. Van Berkel. 1994. Chemical derivatisation for electrospray ionization mass spectrometry. 1. Alkyl halides, alcohols, phenols, thiols, and amines. *Analytical Chemistry*. 66: pp. 1302-1315.
- Radinsky, R. 1991. Growth factors and their receptors in metastasis. *Seminar on Cancer Biology*, 2:169-177.
- Rainville, P., G.H. Duncan, D.D. Price, B. Carrier et M.C. Bushnell. 1997. Pain affect encoded in human anterior cingulate but not somatosensory cortex. *Science*. 277: pp. 968-971.
- Reddy, A.C. et B.R. Lokesh. 1994. Studies on anti-inflammatory activity of spice principles and dietary n-3 polyunsaturated fatty acids on carrageenan-induced inflammation in rats. *Annals of nutrition & metabolism*. 38: pp.349-358.
- Rhys, A.T., S.A. Winfield et R.C. Belloli. 1982. DNS derivatisation of anabolic agents with high-performance liquid chromatographic separation and fluorescence detection. *Journal of Chromatography*. 240: pp. 224-229.
- Ripamonti, C. et E.D. Dickerson. 2001. Strategies for the treatment of cancer pain in the new millennium. *Drugs*, 61(7):955-977.
- Roman, C., D. Saha et R. Beauchamp. 2001. TGF-beta and colorectal carcinogenesis. *Microscopy research and technique*, 52 :450-457.

Rose, J.D. 2002. The neurobehavioral nature of fishes and the question of awareness and pain. *Fisheries Science*. 10: pp.1-38.

Ross, A., S.A. Guénette, P. Hélie et P. Vachon. 2006. Cas de nécrose cutanée chez des grenouilles africaines à griffes *Xenopus laevis* suite à une application topique d'eugénol = Case of cutaneous necrosis in African Clawed frogs *Xenopus laevis* after the topical application of eugenol. *Canadian Veterinary Journal*. 47 , pp. 1115-1117

Rothstein, J.D., L.J. Martin et R.W. Kuncl. 1992. Decrease glutamate transport by the brain and spinal cord in amyotrophic lateral sclerosis. *New England Journal of Medicine*, 326:1464-1468.

Rowland, M. & Towzer, T.N. (1995) *Clinical Pharmacokinetics: Concepts and Application*, 3rd ed. Chapter 21, Lippincott Williams & Wilkins, Media, PA.

Rybak SM, Pearson JW, Fogler WE, Volker K, Spence SE, Newton, Mikulski SM, Ardelt W, Riggs CW, Kung HF, Logon DL. 1996. Enhancement of Vincristine Cytotoxicity in Drug-Resistant Cells by Simultaneous Treatment with Onconase, an Antitumor Ribonuclease. *Journal of the National Cancer Institute*. 88: pp.747-753.

Sabino, M.A., J.R. Ghilardi, J.L. Jongen, C.P. Keyser, N.M. Luger, D.B. Mach, C.M. Peters, S.D. Rogers, M.J. Schwei, C. de Felipe, P.W. Mantyh. 2002. Simultaneous reduction in cancer pain, bone destruction, and tumor growth by selective inhibition of cyclooxygenase-2. *Cancer Research*. 62: 7343-7349.

Sabino, M.A. et P.W. Mantyh. 2005. Pathophysiology of Bone Cancer Pain, Review. *The Journal of Supportive Oncology*, Vol 3, Number 1: 15-24.

Sakurada, T., K. Wako, A. Sugiyama, C. Sakurada, K. Tan-No et K. Kisara. 1998. Involvement of spinal NMDA receptors in capsaicin-induced nociception. *Pharmacology, Biochemistry, and Behavior*. 59: pp.339-345.

Sasamura, T., M. Sasaki, C. Tohda et Y. Kuraishi. 1998. Existence of capsaicin-sensitive glutamatergic terminals in rat hypothalamus. *Neuroreport*. 9: pp.2045-2048.

Schmidt, R., M. Schmelz, C. Forster *et al.* 1995. Novel classes of responsive and unresponsive C nociceptors in human skin. *Journal of Neuroscience*, 15:333-341.

- Schwei, M.J., P. Honore, S.D. Rogers *et al.* 1999. Neurochemical and cellular reorganisation of the spinal cord in a murine model of bone cancer pain. *Journal of Neuroscience*, 19:10886-10897.
- Sell, A.B. et E.A. Carlini. 1996. Anesthetic action of methyleugenol and other eugenol derivatives. *Pharmacology*. 14: pp.367-377.
- Seltzer, Z., R. Dubner et Y.A. Shir. 1990. A novel model of neuropathic pain disorders produced in rats by partial sciatic nerve injury. *Pain*. 43: pp. 205-218.
- Shibata, T., T. Ohkubo, K. Tsuruda et H. Takahashi. 1994. Mode of analgesic action of phenolic dental medicaments through substance P release. *Japanese Journal of Oral Biology*. 36: pp. 49-59.
- Silver, B.J. 1992. Platelet-derived growth factor in human malignancy. *Biofactors*, 3:217-227.
- Silverman, J., M. Huhndorf et M. Balk. 1983. Evaluation of a combination of tiletamine and zolazepam as an anesthetic for laboratory rodents. *Laboratory Animal Science*. 43(3): pp.210-216.
- Sive, H.L., R.M. Grainger et R.M. Harland. 2000. Early Development of *Xenopus laevis*: A Laboratory Manual. Coldspring Harbor Laboratory Press. 341p.
- Sladky, K.K., C.R. Swanson, M.K. Stoskopf, M.R. Loomis et G.A. Lewbart. 2001. Comparative efficacy of tricaine methanesulfonate and clove oil for use as anesthetics in red pacu (*Piaractus brachypomus*). *American Journal of Veterinary Research*. 62: pp. 337-342.
- Smith J.M. et K.C. Stump. 2000. Isoflurane anesthesia in the African Clawed frog (*Xenopus laevis*). *Contemporary Topics in Laboratory Animal Medicine*. 39: pp.39-42.
- Sneddon, L.U. 2002. Anatomical and electrophysiological analysis of the trigeminal nerve in the rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Neuroscience Letters*. 319: pp. 167-171.
- Sneddon, L.U. et M.J. Gentle. 2002. Receptor types on the head of the rainbow trout : are nociceptors presents? *Comparative Biochemistry and Physiology*. 32A, (Suppl.1), S42.
- Sneddon, L.U. 2003a. The evidence for pain in fish: the use of morphine as an analgesic. *Applied Animal Behaviour Science*. 83: pp. 153-162.

- Sneddon, L.U. 2003b. Trigeminal somatosensory innervation of the head of a teleost fish with particular reference to nociception. *Brain Research*. 972: pp.44-52.
- Sneddon, L.U. 2004. Evolution of nociception in vertebrate: comparative analysis of lower vertebrates. *Brain Research Review*. 46: pp.123-130.
- Soto, C.G. et C.G. Burhanuddin. 1995. Clove oil as a fish anaesthetic for measuring length and weight of rabbitfish (*Siganus lineatus*). *Aquaculture*. 135: pp.149-152.
- Spath, E. et S.F. Darling.1930. Synthesis of capsaicin. *Berichte der Deutschen Chemischen Gesellschaft*. 63B: pp.737-740.
- Spray D.C. 1976. Pain and Temperature Receptors of Anurans. In: *Frog Neurobiology, a handbook*. R. Llinás and W. Precht, eds. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, New York, pp. 607-628.
- Stetter, M.D. 2001. Fish and amphibian anesthesia. *The Veterinary Clinics of North America*. 4: pp.69-82.
- Stevens, C.W. 1992. Alternatives to the Use of Mammals for Pain Research. *Life Science*. 50: pp. 901-912.
- Stevens, C.W., D.N. Maciver et L.C. Newman. 2001. Testing and Comparison of Non-Opioid Analgesics in Amphibians. *Contemporary Topics in Laboratory Animal Science*. 40(4): pp. 23-27.
- Stoscheck, C.M.et L.E. King Jr. 1986. Role of epidermal growth factor in carcinogenesis. *Cancer Research*, 46:1030-1037.
- Stoskopf, M.K. 2002. Biology and Health of Laboratory Fishes. *In: Laboratory Animal Medicine*, 2nd Édition. Eds.,Fox, J.G., C. Anderson, F.M. Loew and F.W. Quimby. Academic Press, Amsterdam, 1325 p.
- Sutherland, S.P., S.P. Cook et E.W. McCleskey.2000. Chemical mediators of pain due to tissue damage and ischemia. *Progress in Brain Research*, 129:21-38.
- Suzuki,M., Mizuno, A., Kodaira, K., Imai, M., 2003. Impaired pressure sensation in mice lacking TRPV4. *J. Biol. Chem*. 278, 22664-22668.
- Swindle, M.M., G.A. Vogler, L.K. Fulton, R.P. Marini et S. Popilski. 2002. Preanesthesia, Anesthesia, Analgesia, and Euthanasia. *In: Laboratory Animal*

Medicine, 2nd Edition. By Fox, J.G., Anderson, L.C., Franklin, M.L. and Quimby, F.W. Ed Elsevier Science (USA), New York, 1325 p.

Szallasi, A. 1995. Autoradiographic visualization and pharmacological characterization of vanilloid (capsaicin) receptors in several species, including man. *Acta Physiologica Scandinavia*. 155 (Suppl. 629): pp.1-68.

Szallasi, A., Biro, T., Szabo, T., Modarres, S., Petersen, M., Klusch, A., Blumberg, P.M., Krause, J.E., Sterner, O., 1999. A non-pungent triprenyl phenol of fungal origin, scutigeral, stimulates rat dorsal root ganglion neurons via interaction at vanilloid receptors. *Br. J. Pharm.* 126, 1351-1358.

Szallasi, A. et P. Blumberg. 1993. [³H]resiniferatoxin binding by the vanilloid receptor: species-related differences, effects of temperature and sulfhydryl reagents. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*. 347: pp.84-91.

Szallasi, A. et P. Blumberg. 1999. Vanilloid (Capsaicin) Receptors and Mechanisms. *Pharmacological Review*. 51(2): pp.159-212.

Szallasi, A., P.M. Blumberg, S. Nilsson, T. Hökfelt et J.M. Lundberg. 1994. Visualization by [³H]resiniferatoxin autoradiography of capsaicin-sensitive neurons in the rat, pig and man. *European Journal of Pharmacology*. 264: pp.217-221.

Szolcsányi, J. F. Joó et A. Jancsó-Gábor. 1971. Mitochondrial changes in preoptic neurons after capsaicin desensitization of the hypothalamic thermoreceptors in rats. *Nature*. 299: pp.116-117.

Taylor, D.C.M., F.-K. Pierau, J. Szolcsanyi, O. Krishtal et M. Petersen. 1984. Effect of capsaicin on rat sensory neurones. In: *Thermal Physiology*, ed. JRS Hales, New-York: Raven. Pp.23-27.

Taylor, P.W. et S.D. Roberts. 1999. Clove oil: an alternative anaesthetic for aquaculture. *N Am J Aquaculture*. 61: pp.150-155.

Thesh, L.T. 1846. Isolation of capsaicin. *Pharmaceutical Journal*. 6: pp.941.

Thompson, D.C., D. Constantin-Teodosiu et P. Moldeus. 1991. Metabolism and cytotoxicity of eugenol in isolated rat hepatocytes. *Chemical Biology Interactions*, 77, pp. 137-147.

Todd, A.J., Puskar, Z., Spike, R.C., Hughes, C., Watt, C., Forrest, L., 2002. Projection neurons in lamina I of rat spinal cord with the neurokinin 1 receptor

are selectively innervated by substance P-containing afferents and respond to noxious stimulation. *J. Neurosci.* 22, 4103-4113.

Tominaga, M., M.J. Caterina, A.B. Malmberg, T.A. Rosen, H. Gilbert, K. Skinner, B.E. Raumann, A.I. Basbaum et D. Julius. 1998. The cloned capsaicin receptor integrates multiple pain-producing stimuli. *Neuron.* 21: pp.531-543.

Tozer, T.N. et M.Rowland. 2006. Introduction to Pharmacokinetics and Pharmacodynamics, The Quantitative Basis of Drug Therapy. Edité par Lippincott Williams and Wilkins, Baltimore USA. 326 pages.

Ueda, H. 2006. Molecular mechanisms of neuropathic pain-phenotypique switch and initiation mechanisms. *Pharmacology and Therapeutics*, 109:57-77.

Vachon, P., Massé, R., Gibbs, B., 2004. Substance P and neurotensin are up-regulated in the lumbar spinal cord of neuropathic animals. *Can. J. Vet. Res.* 69, 86-92.

Vlachova, V., Vyklicky, L., 1993. Capsaicin-induced membrane currents in cultured sensory neurons of the rat. *Physiol. Res.* 42, 301-311.

Verheijen, F.J. et W.F.G. Flight. 1997. Decapitation and brining: experimental tests that after these commercial methods for slaughtering eel *Anguilla anguilla* (L.), death is not instantaneous. *Aquaculture Research.* 28: pp. 361-366.

Vesselkin N.P., A.L. Agayan et L.M. Nomokonova. 1971. A Study of thalamo-telencephalic afferent systems in frogs. *Brain, Behavior and Evolution.* 4: pp. 295-306.

Von Esse, F.V. et K.M. Wright. 1974. Effect of intracoelomic propofol in white's tree frogs, *Pelodytes caerulea*. *Bulletin ARAV.* 9 : pp. 7-8.

Walczak, J.-S., V. Pichette, F. Leblond, K. Desbiens et P. Beaulieu. 2005. Behavioral, pharmacological and molecular characterization of the saphenous nerve partial ligation: a new model of neuropathic pain. *Neuroscience.* 132: pp.1093-1102.

Walczak, J.-S., V. Pichette, F. Leblond, K. Desbiens et P. Beaulieu. 2006. Characterization of Chronic Constriction of the Saphenous Nerve, a Model of Neuropathic Pain in Mice Showing Rapid Molecular and Electrophysiological Changes. *Journal of Neuroscience Research.* 83: pp. 1310-1322.

Wass, J.A. et H.M. Kaplan. 1974. Methoxyflurane anesthesia for *Rana pipiens*. *Laboratory Animal Science.* 24: pp. 669.

- Watkins, L.R., L.E. Goehler, J. Relton, M.T. Brewer et S.F. Maier. 1995. Mechanisms of tumor necrosis factor-alpha (TNF-alpha) hyperalgesia. *Brain Research*, 692:244-250.
- Whelan, G. et P.A. Flecknell. 1992. The assessment of depth of anesthesia in animals and man. *Laboratory Animals*. 26: pp. 153-162.
- Wie, M.B., M.H. Won, K.H. Lee, J.H. Shin, J.C. Lee, H.W. Suh, D.K. Song et Y.H. Kim. 1997. Eugenol protects neuronal cells from excitotoxic and oxidative injury in primary cortical cultures. *Neuroscience Letters*. 225(2): pp. 93-96.
- Wiechmann AF, Wirsig-Wiechmann CR (2003) *Atlas of Xenopus laevis histology*. Kluwer Academic, Norwell.
- Williams, D.B. et M.H. Akabas. 2002. Structural evidence that propofol stabilizes different GABAA receptor states a. *The Journal of Neuroscience*. 22: pp. 7417-7424.
- Willis, W.D. et R.E. Coggeshall. 2004. *Sensory Mechanisms of the Spinal Cord, Primary Afferent Neurons and the Spinal Dorsal Horn, Third Edition. Vol 1 et 2.* Klüwer Academic/Plenum Publishers, USA, 962 p.
- Wilson, R.P., I.S. Zagon et D.R. Larach. 1992. Antinociceptive properties of tiletamine-zolazepam improved by addition of xylazine or butorphanol. *Pharmacology, Biochemistry, and Behavior*. 43, pp. 1129-1133.
- Wilson, R.P., I.S. Zagon et D.R. Larach. 1993. Cardiovascular and respiratory effects of tiletamine-zolazepam. *Pharmacology, Biochemistry, and Behavior*. 44: pp. 1-8.
- Winter, J., Dray, A., Wood, J.N., Yeats, J.C., Bevan, S., 1990. Cellular mechanism of action of resiniferatoxin: A potent sensory neuron excitotoxin. *Brain Research*. 520, 131-140.
- Wixson, S.K., W.J. White et H.C. Hughes. 1987. The effects of pentobarbital, fentanyl-droperidol, ketamine-xylazine, and ketamine-diazepam on noxious stimulus perception in adult male rats. *Laboratory Animal Science*. 37(6): pp. 731-735.
- Woolf, C.J. 2004. American College of Physicians, American Physiological Society. Pain: moving from symptom control toward mechanism-specific pharmacologic management. *Annals of Internal Medicine*, 140 :441-451.

Woolf, C.J., M.W. Salter. 2000. Neuronal Plasticity: increasing the gain in pain. *Science*, 288(5472): 1765-1769.

Wright, K.M. 1996. Amphibian husbandry and medicine. In Mader, D.R. (ed): *Reptile Medicine and Surgery*. WB Saunders Co, Philadelphia, PA: 436-458.

Wright, K.M. 2001 Restraint techniques and euthanasia. In: *Amphibian Medicine and Captive Husbandry*. Wright KM, Whitaker BR (eds.). Krieger Publishing Company, Malabar, Fl, pp.111-122.

Xu, G.Y. et L.Y.M. Huang. 2002. Peripheral inflammation sensitizes P2X receptor-mediated responses in dorsal root ganglions neurons. *Journal of Neuroscience*, 22(1):93-102.

Yang, B.H., Z.G. Piao, Y.B. Kim, C.H. Lee, K. Park, J.S. Kim et S.B. Oh. 2003. Activation of Vanilloid Receptor 1 (VR1) by Eugenol. *Journal of Dental Research*. 82(10): pp. 781-785.

Zahn, P.K., Umali, E., & Brennan, T.J. (1998) Intrathecal non-NMDA excitatory amino acid receptor antagonists inhibit pain behaviors in a rat model of postoperative pain. *Pain*, 74, 213-23

ANNEXE I Article comme deuxième auteur concernant la technique de dérivatisation du propofol

Development of a rapid and sensitive LC-ESI/MS/MS assay for the quantification of propofol using a simple off-line dansyl chloride derivatisation reaction to enhance signal intensity. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*, 39 (3-4) (2005), pp. 411-417.

Reprinted from Publication, Copyright Owner, Copyright (2005), with permission from Elsevier.

^a Francis Beaudry, ^a Sarah Annie Guénette, ^a Andrew Winterborn, ^b Jean-Francois Marier, ^a Pascal Vachon

^a Faculty of Veterinary Medicine, Department of Veterinary Biomedicine, University of Montreal, St-Hyacinthe, Canada

^b MDS Pharma Services, Ville S-Laurent (Montréal), Canada

Corresponding Author:

Francis Beaudry
Faculty of Veterinary Medicine
Department of Veterinary Biomedicine
C.P. 5000, St-Hyacinthe, QC
J2S 7C6, Canada

Abstract

A rapid, selective and sensitive method was developed for the determination of propofol concentration using an off-line dansyl chloride derivatization step to enhance signal intensity. The method consisted of a protein precipitation extraction followed by derivatization with dansyl chloride and analysis by liquid chromatography ionspray tandem mass spectrometry (LC-ESI/MS/MS). The separation was achieved using a 100 x 2 mm C₈ analytical column combined with an isocratic mobile phase composed of 80:20 acetonitrile: 0.5% formic acid in water. Signal intensity of the propofol-dansyl chloride derivative was increased up to 200-fold as compared to the underivatized propofol in positive electrospray mode. An analytical range of 20 to 20 000 ng/mL was used in the calibration curve of plasma and blood samples. The novel method met all requirements of specificity, sensitivity, linearity, precision, accuracy and stability. A pharmacokinetic study was performed in rats and the novel analytical method was used as a routine analysis to provide enhanced measurements of plasma and blood concentrations of propofol. Blood and plasma pharmacokinetic results show that a very important fraction of propofol distributes into red blood cells. In conclusion, a rapid and sensitive LC-ESI/MS/MS method using a derivatization agent was developed to enhance signal intensity of propofol. Routine analysis with the novel method provided accurate results and enhanced the detection levels of plasma and blood concentrations of propofol to better characterize the *in vivo* biodistribution of propofol.

Keywords: propofol, dansyl chloride, mass spectrometry, HPLC, blood, plasma, rats, pharmacokinetics.

1. Introduction

Propofol (2,6-diisopropylphenol) is rapidly gaining popularity within the veterinary medicine community for anesthesia of different species including cats and dogs. It is used for both induction [1] and maintenance of anesthesia [2]. Moreover, propofol is widely used during minor surgery of laboratory animals (rat, mice and dog). The major advantage of this drug over other injectable anesthetic agents is the rapid and complete recovery that occurs even after prolonged intravenous infusion [3]. This property is attributed to the rapid and extensive biotransformation of the parent compound, primarily by the liver, to multiple inactive metabolites, which are excreted in the urine. The relative abundance of individual metabolic pathways has been found to vary between different species, which is a typical finding for drugs mainly metabolized by the liver. The pharmacokinetic profile of propofol is characterized by a multi-exponential decline in plasma and blood concentrations so that concentration levels can be measured over a long period of time [4].

In order to properly characterize the biodisposition of propofol, it is necessary to develop a precise and accurate analytical method suitable for the routine analysis of propofol concentrations in blood and plasma. Various methods have been reported in the literature based on HPLC equipped with either ultraviolet (UV) [5] or fluorescence [6,7] detectors. Most of these methods require extensive sample preparation procedures and various steps to concentrate the product. These methods typically use solid phase extraction or liquid-liquid extraction to isolate propofol from the biological matrix. Although these preparation steps are necessary to improve selectivity of the method and increase the sensitivity of the detection, they require intensive labor and manipulations [5,6,7].

In recent years, liquid chromatography coupled with atmospheric pressure ionization and mass spectrometry has progressed to become the method of choice in bioanalysis [8]. Simple, rapid and automated analysis methods can be

developed to provide high precision and accuracy, improved sensitivity and selectivity, and finally provide molecular information (e.g. full scan MS/MS on ion trap). However, due to its non-polar nature and the absence of an ionizable group on the molecule, the ionization efficiency of propofol in electrospray is low and leads to poor detection limits. Propofol has a phenol group that can be modified chemically by a single step reaction with common derivatization agents used in HPLC with fluorescence detector [9]. Dansyl chloride has been used recently to improve ESI signal intensity [10] and more specifically for ultra trace analysis of ethinyl estradiol in human plasma [11]. As depicted in Figure 1, the reaction of dansyl chloride and propofol results in a product containing a tertiary amine, which is easily protonated in positive electrospray mode and can significantly improve the limit of detection of propofol.

The objective of the current study was to develop a novel LC-ESI/MS/MS method using a simple off-line dansyl chloride derivatization reaction of propofol. The derivatization step is expected to significantly enhance signal intensity and improve the limit of detection of the assay. Propofol was administered intravenously to rats and the novel method was used for routine analysis of plasma and blood samples in order to characterize its pharmacokinetics.

2. Experimental

2.1. Reagents

Propofol and the internal standard eugenol [2-Methoxy-4-(2-propenyl)phenol] were purchased from Sigma-Aldrich (St-Louis, MO, USA). The derivatization agent, dansyl chloride was purchased from Sigma-Aldrich. Other chemicals, including acetonitrile, methanol, sodium hydroxide and formic acid were purchased from J.T. Baker (Phillipsburg, NJ, USA).

2.2. Instrumentation

The HPLC system consisted of an autosampler Varian 9100 (Palo Alto, CA, USA) and a Water 625 pump (Milford, MA, USA). The LC-MS/MS system used was a *PE*Sciex API 3⁺ (*Applied Biosystem/MDS Sciex*, Concord, ON, Canada). Data was acquired on an Apple[™] Macintosh[®] (Silicon Valley, CA, USA) equipped with operation system 7.4. Data acquisition and analysis were performed using MassChrom 1.0 (Concord, ON, Canada). Calibration curves were calculated from the equation $y = ax + b$, as determined by weighted (1/x) linear regression of the calibration line constructed from the peak-area ratios of the drug and the internal standard.

2.3. Sample Preparation

Using a simple protein precipitation method, propofol was extracted from rat plasma (or blood). A total of 50 μL of sample was mixed with 250 μL of internal standard solution (250 ng/mL of eugenol in acetone) in a 1.5mL centrifuge tube. The sample was then vortexed vigorously and the samples were allowed to rest 10 min at room temperature prior to centrifugation. Samples were centrifuged at approximately 12000g for 10 min and 250 μL of the supernatant was transferred into a 650 μL injection vial. One hundred μL of dansyl chloride solution (1 mg/mL in acetone) and 20 μL of 100 mM NaOH solution were added to injection vials and the sample was heated at 60°C for 10 min. The vial was vortexed briefly and transferred to an autosampler for analysis.

2.4. Chromatographic Conditions

An isocratic mobile phase was used with a Keystone Scientific (Thermo) BDS Hypersil C8 100 x 2 mm with particle size of 5 μm column. The mobile

phase consisted of acetonitrile and 0.5% formic acid in water at a ratio of 80:20, respectively. The flow rate was fixed at 0.55 mL/min and propofol eluted at 2.7 min and the internal standard at 1.8 min. The eluent was split 1:10 prior to introduction into the electrospray source. 10 μ L of the extracted sample was injected and the total run time was set at 3.2 min.

2.5. Mass Spectrometry Conditions

The mass spectrometer was interfaced with the HPLC system using a pneumatic assisted electrospray ion source. The N₂ pressure of the nebulizer gas was set at 40 psi and the ESI electrode was set to 4000V. The declustering potential was set at 15V and the collision energy (E_{lab}) at 25V. The collision gas used was argon at 2.7×10^{14} molecules/cm². The SRM transitions were m/z 412 \rightarrow 171 and 398 \rightarrow 171 for propofol and eugenol, respectively. The dwell time was set at 200 msec and the pause time at 5 msec.

2.6. In Vivo Study design

Male Fisher Rats (average weight 300 g) were purchased from Charles River (St-Constant, Canada) for a pharmacokinetic study of a commercially available lipid emulsion formulation of propofol (Diprivan®, Astra Zeneca, USA) in plasma (n = 6 rats) or blood (n = 6 rats). Rats received a 10 mg/kg dose of propofol administered intravenously at a dose volume of 1 mL/kg over a period of 1 min *via* jugular venipuncture under isoflurane anesthesia. Blood samples (0.3 mL) were collected from the contralateral jugular vein at 1, 2, 3, 5, 7, 10, 15, 30 and 60 min following dosing.

Blood samples were collected into heparinized tubes and immediately placed on ice pending further processing. For the pharmacokinetic study of propofol in plasma, blood samples were centrifuged at 4°C for 10 min at 3200 g and plasma aliquots were stored at -80°C pending analysis. For the pharmacokinetic study of propofol in blood, blood samples were stored at -80°C

pending analysis. Concentrations of propofol in plasma and blood were assessed using the novel LC-ESI/MS/MS method.

Pharmacokinetic parameters of propofol in plasma and blood were calculated using non-compartmental methods [12]. The area under the curve from time 0 to 60 min (AUC_{0-60}) was calculated using the linear trapezoidal rule. A terminal rate constant of elimination (k_{el}) was calculated using a minimum of three measurable plasma concentrations and a terminal elimination half-life ($T_{1/2}$) was calculated using $0.693/k_{el}$. The area under the curve extrapolated to infinity (AUC_{INF}) was calculated using $AUC_{0-60} + C_{last}/k_{el}$ where C_{last} was the last measurable blood or plasma concentration. Clearance (CL) was calculated by dividing the actual dose administered by the AUC_{INF} . The mean residence time (MRT) was obtained by dividing the area under the first moment-time curve ($AUMC_{INF}$) by the AUC_{INF} . The total volume of distribution (V_{ss}) was calculated using $CL \times MRT$.

Propofol distribution between blood, plasma and RBC can be described by the following equation:

$$CONC_{BLOOD} \times V_{BLOOD} = CONC_{PLASMA} \times V_{PLASMA} + CONC_{RBC} \times V_{RBC} \quad (1)$$

Where $CONC_{BLOOD}$, $CONC_{PLASMA}$ and $CONC_{RBC}$ represent the concentrations of propofol in blood, plasma, and RBC, respectively and V_{BLOOD} , V_{PLASMA} and V_{RBC} represent the volume of blood, plasma, and RBC, respectively. The volume occupied by RBC and plasma are related to hematocrit (H) and blood volume by the following equations:

$$V_{RBC} = H \times V_{BLOOD} \quad (2)$$

$$V_{\text{PLASMA}} = (1 - H) \times V_{\text{BLOOD}}$$

(3)

By substituting equations 2 and 3 in equation 1, propofol concentrations in RBC were calculated with the following equation [12]:

$$\text{CONC}_{\text{RBC}} = [(\text{CONC}_{\text{BLOOD}} - \text{CONC}_{\text{PLASMA}}) \times (1 - H)] / H$$

(4)

In this study, the hematocrit for male rats was fixed to a nominal value of 0.45 based values found in the literature [13].

3. Results and Discussion

3.1. Sample preparation and extraction

The protein precipitation approach was the simplest method available for preparation and the observed recovery was > 90%. One drawback of using a protein precipitation method is the impact of ionization suppression and matrix effect on the quantification precision and accuracy due to possible competition for ionization from extracted endogenous substances. In order to test the potential matrix effect and ionization suppression, we fortified six different samples to obtain 20, 5000 and 20000 ng/mL, and compared the signal intensity versus a pure reference and a fortified blank extract. No significant differences were observed, since the signal intensity corresponded to 86 to 97% those of the reference for all blank samples. The experiment described by King *et al*, 2000 [14] could not be performed in the current study since the reference solution included residues of derivatization agent and this could have impacted the efficiency of ionization. The derivatization is the most critical part of the methodology. A kinetic experiment of the reaction of propofol with dansyl chloride showed no significant increase in signal intensity after 5 min. In order

to be certain that the reaction went to completion, the reaction was conducted over a 10 min period.

3.2. Tandem mass spectrometry

Full scan and product ion mass spectra for propofol and eugenol were obtained in positive ion mode. The full scan spectra of the dansyl chloride derivative of propofol and eugenol showed an intense signal for the protonated molecular ion ($[M+H]^+$) at m/z 412 and 398, respectively. The reactions lead to a mass increase of 233 Da for each compound. The product ion spectra of propofol and eugenol have predominant fragment ions at m/z 171 (fig. 2). The mass transition in selected reaction monitoring mode was set for best sensitivity at $412 \rightarrow 171$ and $398 \rightarrow 171$ for propofol and eugenol respectively. The product ion spectra were compatible with the molecular structure of derivatized products. With the propofol-dansyl chloride derivative, signal intensity was increased up to 200-fold as compared to underivatized propofol in positive electrospray mode and up to 50-fold when compared to underivatized propofol in negative electrospray mode. In both positive and negative electrospray modes, the ion abundance of underivatized propofol was weak and not reproducible. The limit of detection, defined as being the quantity of analyte required to obtain 3 times the signal to noise ratio response, was established at 25 fmol injected on column for the propofol-dansyl chloride derivative in the positive electrospray mode.

3.3. Sensitivity and Selectivity

The precision (coefficient of variance, %CV) and accuracy (%NOM) at the LLOQ level were determined in six replicates of plasma samples fortified at 20 ng/mL of propofol. The precision obtained was 5.7% and the accuracy was 95.0%. A representative chromatogram of LLOQ samples is shown in Fig. 3A. Extracted blank plasma did not show any interference from endogenous

substances, as shown in a representative chromatogram of an extracted blank sample (Fig. 3B). During all experimentations, no interference at the mass transition and retention times of propofol and eugenol were observed in any of the rat plasma samples tested.

3.4. Calibration curve analysis

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 [15]. By convention, the regression line is considered to properly fit the calibration set when the sum of squares of the deviation is minimized. The calculated coefficients of correlations (r) were better than 0.995 for an analytical range set from 20 to 20 000 ng/mL.

3.5. Precision and accuracy

The reproducibility of the method was evaluated by analyzing six replicates of plasma samples fortified with propofol at the nominal concentration of 20, 1000 and 20 000 ng/mL in three individual runs. The inter batch precision and accuracy statistical results are shown in Table 1. With the determination of intra batch precision, the %CV and accuracy were 6.0%, 7.7%, 5.7% and 99.0%, 97.3%, 99.8% at 20, 1000 and 20 000 ng/mL, respectively.

A set of quality-control (QC) samples were prepared in rat blood at nominal concentrations of 20, 1000 and 20000 ng/mL and were analyzed with a calibration curve from rat blood samples. The observed intra batch precision and observed accuracy were 9.7%, 6.5%, 5.0% and 97.9%, 93.6%, 91.4% at 20, 1000 and 20000 ng/mL, respectively.

The limit of quantification was set at 20 ng/mL and, according to the bioanalytical validation guideline published by the FDA [16], acceptable precision and accuracy results were achieved. In most bioanalytical reports, the precision of an analytical assay is usually measured using %CV (standard deviation / mean x 100), even though this does not provide a direct estimation of the analytical error. A better statistical estimate of the error is provided by using confidence intervals (CI) around the mean value. As a result, the acceptance criteria can be defined as a function of the confidence levels instead of an arbitrary number. This method has allowed the quantification of propofol down to 20.0 ± 0.6 ng/mL with a 95% confidence level.

3.6. Stability

Stability experiments were performed to demonstrate whether or not propofol is stable under typical sample storage and analysis conditions. Bench-top stability was performed at room temperature and propofol was stable in rat plasma and blood for at least 4 h. Freeze and thaw stability after 3 cycles was verified and no significant differences were observed versus freshly prepared samples (< 6% difference). Storage stability at -80°C was performed and propofol was stable for at least 7 weeks in rat plasma.

3.7. In vivo study

Mean propofol concentrations in plasma, blood and RBC (ng/mL) following an intravenous dose of 10 mg/kg in rats are depicted in Figure 5. Overall, mean concentrations of propofol declined in a multiexponential manner. It has been suggested that plasma concentrations of propofol greater than 2800 ng/mL are associated with anesthesia in rats [17]. Mean plasma concentrations of propofol remained higher than 3000 ng/mL within the first 7

min following intravenous administration, whereas those observed in blood remained higher than 3000 ng/mL until 30 min post-administration. The higher exposure of propofol in blood as compared to plasma suggests a preferential distribution of the drug into red blood cells. This fraction is likely to be distributed into the RBC or to bind directly on the RBC membrane [18].

Mean pharmacokinetic parameters of propofol in plasma and blood are presented in Table 2. The clearance of propofol in plasma was markedly higher than that observed in blood (CL: 130 vs. 39 mL/min/kg). This resulted in a significantly lower AUC_{INF} in plasma (94254 ng.min/mL) as compared to blood (330650 ng.min/mL). The total volume of distribution of propofol in plasma was approximately 2-fold higher than that observed in blood (2989 vs. 1564 mL/kg). MRT of propofol in plasma was lower than than blood (23.4 vs. 40.0 h, respectively) as well as T_{1/2} (21.4 vs. 28.8 min, respectively). Partition coefficient (K_p) between RBC and plasma at each time points were presented in Table 3. The RBC: plasma partition coefficient decreased over time, suggesting a re-distribution of propofol from red blood cells to plasma, where it is cleared from the system by liver metabolism.

4. Conclusion

A novel high-performance liquid chromatographic-mass spectrometric method was developed using a simple off-line dansyl chloride derivatization reaction of propofol. The derivatization of propofol with dansyl chloride improved significantly the detection limit and signal stability in positive electrospray ionization for the determination of plasma and blood concentrations of propofol. The novel method met all requirements of specificity, sensitivity, linearity, precision, accuracy and stability generally accepted in bioanalytical chemistry. An *in vivo* study was performed in rats and the novel analytical

method was used to assay plasma and blood concentrations of propofol in order to characterize the biodisposition of propofol.

References

- [1] A. Shafer, Doze, V.A. Shafer, S.L. , P.F. White, *Anesthesiology* 69 (1988) 348-56.
- [2] P. Dailland, D.I. Cockshott, J.D. Lirzin, P. Jacquinet, J.C. Jorrot, J. Devery, J.L. Harmey, C. Conseiller, *Anesthesiology* 71 (1989) 827-834.
- [3] R.E.Mandsager, C.R. Clarke, R.V. Shawley, C.M. Hague, *Am. J. Vet. Res.* 56 (1995) 95-99.
- [4] B. Marsh, M. White, N. Morton, G.N.C. Kenny, *Br. J. Anaesth.* 67 (1991) 41-48.
- [5] D. Teshima, H. Nagahama, K. Makino, Y. Kataoka, R. Oishi, *J. Clin. Pharm. Ther.* 26 (2001) 381-385.
- [6] T.B. Vree , A.J. Lagerwerf, C.P. Bleeker, P.M.R.M. de Groot, *J.Chromatogr. B* 721 (1999) 217–228.
- [7] N.H. Kay, J.W. Sear, J. Uppington, I.D. Cockshott, J.E., Douglas, *Br. J. Anaesth.* 58 (1986)1075-1079.
- [8] M. Jemal, *Biomed. Chromatogr.* 14 (2000) 422–429.
- [9] A.T.Rhys Williams, S.A. Winfield, R.C.Belloli, *J. Chromatography* 240 (1982) 224–229.
- [10] J.M. Quirke, C.L.Adams, G.J.Van Berkel, *Analytical Chemistry* 66 (1994)1302–1315.
- [11] W. Z. Shou, X. Jiang , W. Naidong, *Biomed. Chromatogr.* 18 (2004) 414–421.
- [12] M. Rowland, T.N. Towzer, *Clinical pharmacokinetics: concepts and applications*, Lippincott Williams and Wilkins, PA, 1995.
- [13] T. Matsuzawa, M. Nomura, T Unno, *J. Vet. M. Sci.* 55 (1993) 351-362.
- [14] R. King, R. Bonfiglio, C. Fernandez-Metzler, C. Miller-Stein, T. Olah, *J. Am. Soc. Mass Spectrom* 11 (2000) 942-950.
- [15] F. Beaudry , *Pharm. Sci.* 1 (2000) 2437.

- [16] Guidance for Industry. Bioanalytical Method Validation. Center for Drug Evaluation and Research (CDER), Center for Veterinary Medicine (CVM). May 2001. <http://www.fda.gov/cder/guidance/4252fnl.pdf>
- [17] H.K. Adams, J.B. Glen, P.A. Hoyle, Br. J. Anaesth. (1980) 743-746.
- [18] K. Samii, JX Mazoit, Br. J. Clin. Pharm.47 (1999) 35-42.

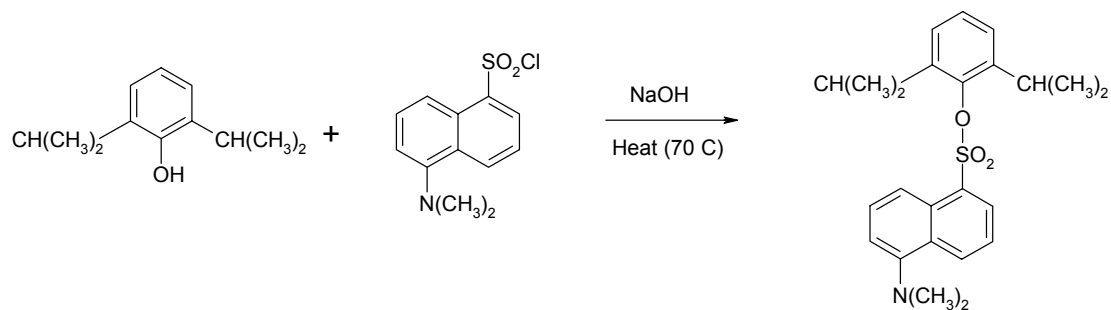
Figures**Figure 1.** Reaction scheme of propofol with dansyl chloride

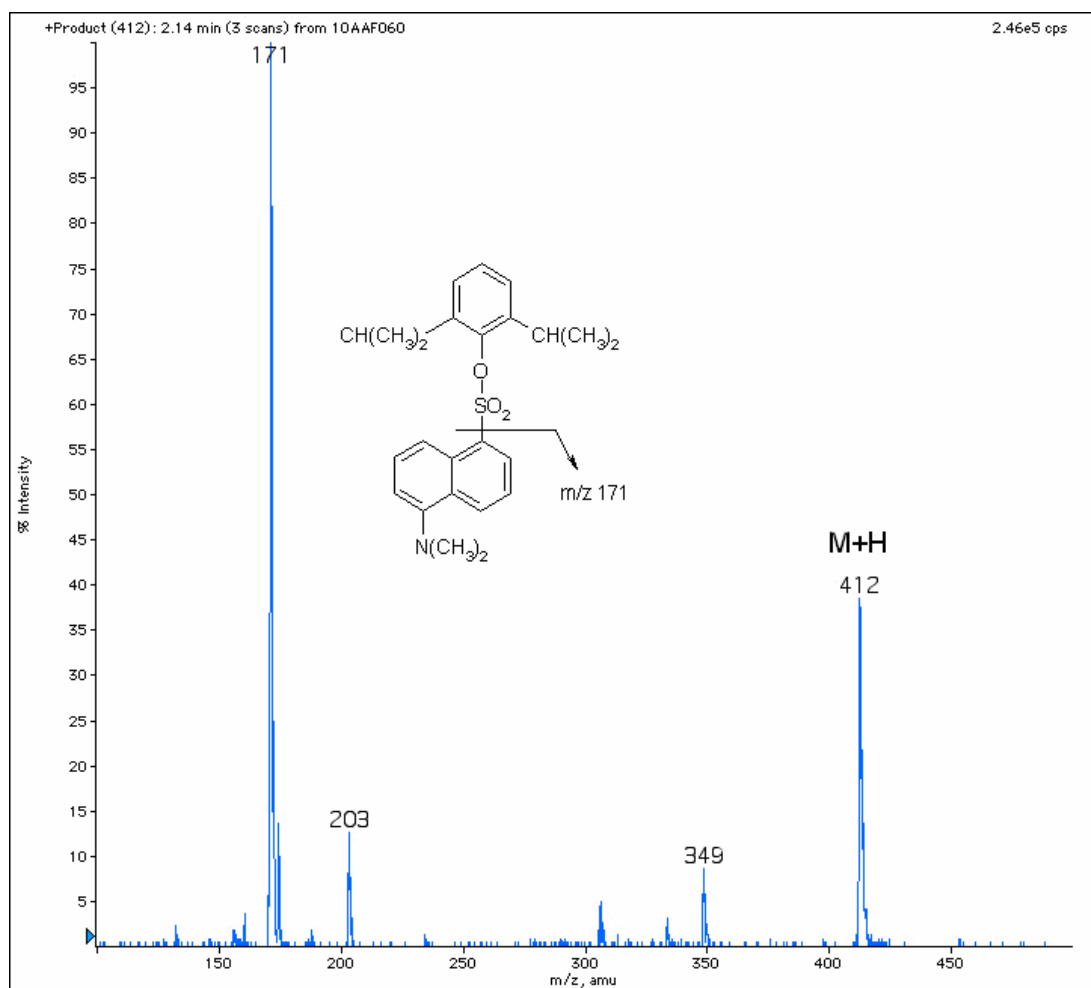
Figure 2. Product ion spectrum of the propofol-dansyl chloride derivative

Figure 3A. Representative extracted LLOQ (20 ng/mL) chromatogram of propofol in rat plasma.

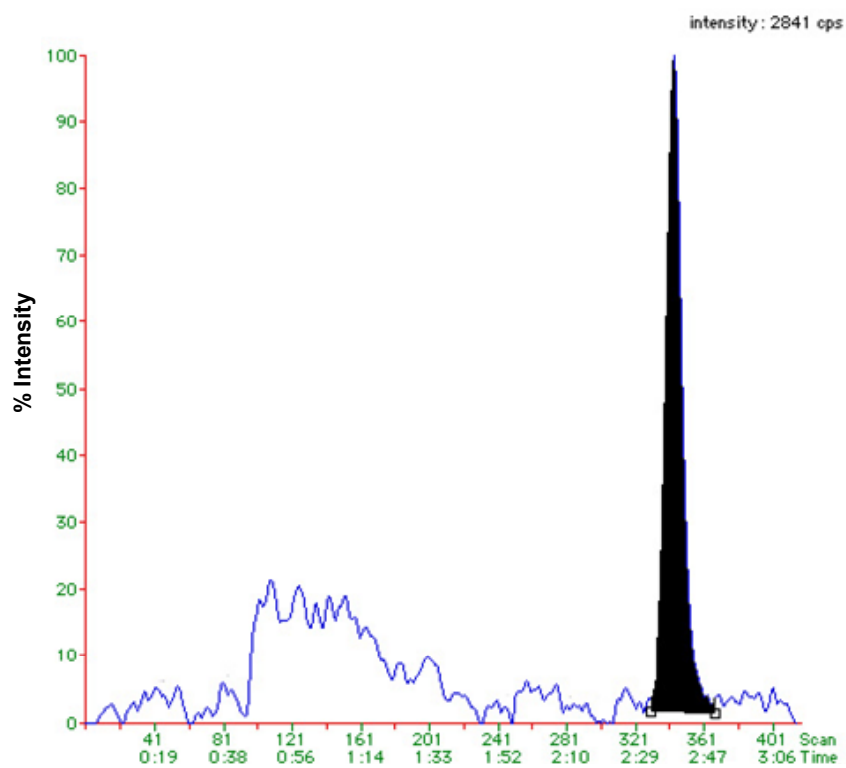


Figure 3B. Representative chromatogram of an extracted control (blank) rat plasma

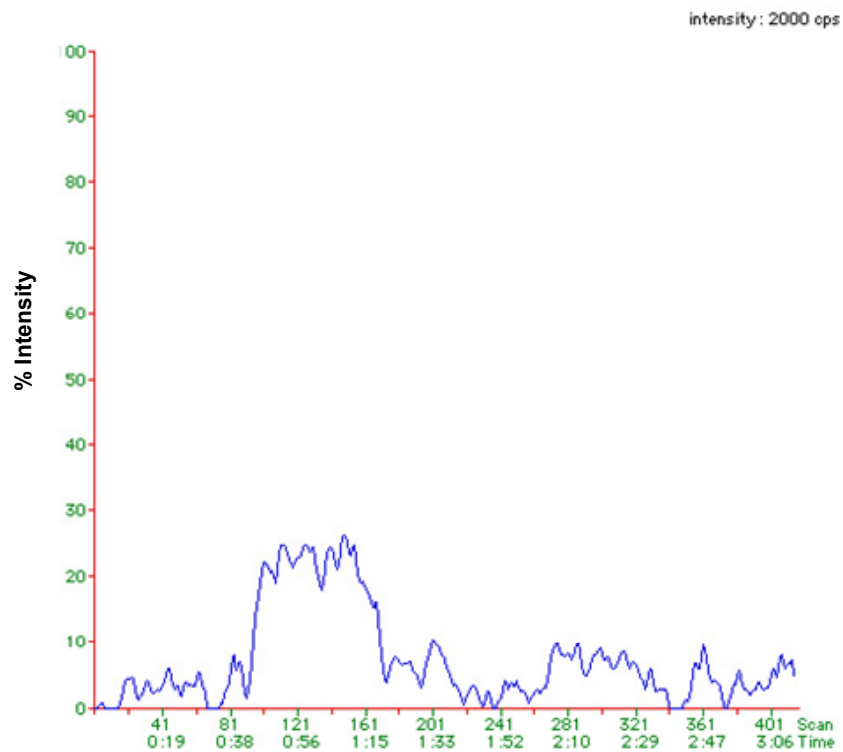
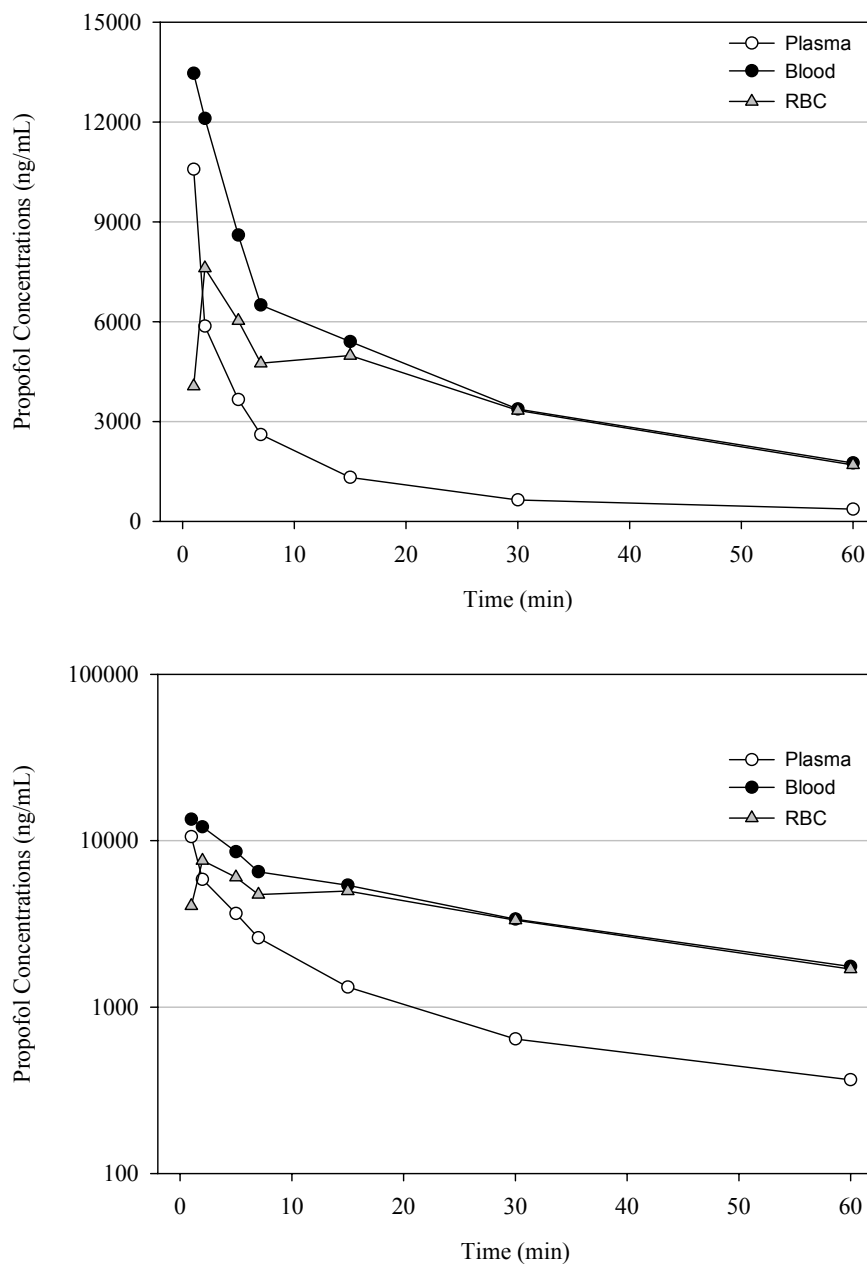


Figure 4. Mean propofol concentrations (ng/mL) in plasma, blood and RBC following a single intravenous dose (10 mg/kg) of a commercially available emulsion formulation of propofol in male Fisher rats (Linear (top) and semi-log scale (bottom)).



Tables**Table 1**

Summary of inter-batch precision and accuracy data for propofol in plasma.

[] ng/mL	20	1000	20000
<i>n</i>	18	18	18
Mean	19.2	1060	19895
SD	1.292	113.3	1737.9
%CV	6.7%	10.7%	8.7%
%NOM	95.8%	106.0%	99.5%
95% CI	0.6	52	803

Table 2

Mean \pm SD pharmacokinetic parameters of propofol in plasma and blood following a single intravenous dose (10 mg/kg) of a commercially available emulsion formulation in male Fisher rats.

Parameters	Plasma	Blood
AUC ₀₋₆₀ (ng.min/mL)	79668 \pm 18962	256102 \pm 22839
AUC _{inf} (ng.min/mL)	94254 \pm 23515	330650 \pm 56637
CL (mL/min/kg)	130 \pm 29.6	39.3 \pm 3.1
MRT (min)	23.4 \pm 10.3	40.1 \pm 8.0
T _{1/2} (min)	21.4 \pm 6.3	28.8 \pm 7.1
V _{ss} (mL/kg)	2989 \pm 1311	1564 \pm 262

Table 3

Mean \pm SD partition coefficient (K_p) of propofol in blood following a single intravenous dose (10 mg/kg) of a commercially available emulsion formulation in male Fisher rats.

Time (min)	Mean K_p (RBC:Plasma)
1	3.2 ± 1.9
2	0.8 ± 0.5
5	1.3 ± 2.1
7	0.6 ± 0.2
15	0.3 ± 0.2
30	0.2 ± 0.1
60	0.2 ± 0.2

ANNEXE II Article comme deuxième auteur concernant la technique de dérivatisation de l'eugénol

Determination of eugenol in rat plasma by liquid chromatography-quadrupole ion mass spectrometry using a simple off-line dansyl chloride derivatisation reaction to enhance signal intensity. *Biomedical Chromatography*, 20, (2006) pp.1216-1222.

Reprinted from Publication, Copyright Owner, Copyright (2006), with permission from Blackwell.

Francis Beaudry, Sarah Annie Guénette and Pascal Vachon

Faculty of Veterinary Medicine, Department of Veterinary Biomedicine, University of Montreal, St-Hyacinthe, Canada

Corresponding Author:

Francis Beaudry
Faculty of Veterinary Medicine
Department of Veterinary Biomedicine
C.P. 5000, St-Hyacinthe, QC
J2S 7C6, Canada

Abstract

A rapid, selective and sensitive method was developed for the determination of eugenol concentration using an off-line dansyl chloride derivatization step to enhance signal intensity. The method consisted of a protein precipitation extraction followed by derivatization with dansyl chloride and analysis by full scan liquid chromatography electrospray quadrupole ion trap mass spectrometry (LC-ESI-QIT). The separation was achieved using a 100 x 2 mm C₈ analytical column combined with an isocratic mobile phase composed of 75:25 acetonitrile: 0.1% formic acid in water set at a flow rate of 0.25 mL/min. Signal intensity of the eugenol-dansyl chloride derivative was increased up to 100-fold as compared to the underivatized eugenol in positive electrospray mode. An analytical range of 100 to 20 000 ng/mL was used in the calibration curve of plasma and blood samples. The LOD observed was 0.5 pg injected on column. The novel method met all requirements of specificity, sensitivity, linearity, precision, accuracy and stability. In conclusion, a rapid and sensitive LC-ESI/MS/MS method using a derivatization agent was developed to enhance signal intensity of eugenol.

Keywords: eugenol, dansyl chloride, mass spectrometry, quadrupole ion trap, electrospray, HPLC, blood, plasma, rats

1. Introduction

Eugenol (2-methoxy-4-(2-propenyl) phenol) is the principle chemical constituent of clove oil (*Eugenia aromatica*) and has been used for decades in dentistry for its analgesic properties (Ohkubo and Shibata, 1997). Eugenol was incorporated in diverse dental treatments and was also reported to display anti-inflammatory (Reddy *et al.*, 1994), and anti-bacterial activities (Laekeman *et al.*, 1990). Furthermore, eugenol was reported to inhibit thromboxane biosynthesis (Laekeman *et al.*, 1990) and to display other pharmacological properties such as neuroprotective (Wie *et al.*, 1997), anticancer (Atsusane, 1991), anti-ischemic (Atsusane, 1991), anti-histaminic (Nishijima *et al.*, 1998) and anti-anaphylactic (Jadhav *et al.*, 2004) effects. Further studies of eugenol have revealed interesting anesthesia and analgesia activity in fish (Hikasa *et al.*, 1986; Sladky *et al.*, 2001) and frogs (Lafortune *et al.*, 2001). The exact mechanisms of action responsible for the anesthesia and analgesia activity of eugenol are still under study. It was demonstrated that the analgesia properties of eugenol are mediated by an antagonist effect at the vanilloid receptor type 1 (TRPV1), since the phenol-like structure of eugenol is similar to the main constituent of hot pepper, capsaicin (Szallasi and Blumberg, 1999; Yang *et al.*, 2003) also acting on this receptor to inhibit pain. In addition, eugenol also demonstrated affinity with gamma aminobutyric acid (GABA) and N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptors, which are both involved in pain sensitivity and anesthesia (Wie *et al.*, 1997; Aoshima and Hamamoto, 1999).

We are presently interested in studying the pharmacokinetic of eugenol following i.v. and gavage administrations in rats. We would like to evaluate eugenol's anesthetic and analgesic properties in rat to determine its efficacy. In order to properly characterize the biodiposition and bioavailability of eugenol, it is necessary to develop a precise and accurate analytical method suitable for the analysis of eugenol concentrations in blood and plasma. Various methods have

been reported in the literature based on HPLC equipped with ultraviolet (UV) detector (Fischer and Dengler, 1990). This method shows interesting results however we wanted to develop a more selective assay using a quadrupole ion trap mass spectrometer. Although ion trap mass spectrometer is widely recognized for its capability to provide rich MS/MS spectrum for structural elucidation and identification of unknowns in complex matrices, these mass spectrometer can provide adequate precision and accuracy for quantitative analyses.

In recent years, liquid chromatography coupled with atmospheric pressure ionization and mass spectrometry has progressed to become the method of choice in bioanalysis (Jemal, 1999). Simple, rapid and automated analysis methods can be developed to provide high precision and accuracy, improved sensitivity and selectivity, and finally provide molecular information (e.g. full scan MS/MS on ion trap). However, due to its non-polar nature and the absence of an ionizable group on the molecule, the ionization efficiency of eugenol in electrospray is low and leads to poor detection limits. Eugenol has a phenol group that can be modified chemically by a single step reaction with common derivatization agents used in HPLC with fluorescence detector (Rhys, 1982). Dansyl chloride has been used recently to improve ESI signal intensity (Quirke *et al.* 1994) and more specifically for the analysis of propofol in rat blood and plasma (Beaudry *et al.*, 2005). Figure 1 depicts the reaction of dansyl chloride and eugenol resulting in a product containing a tertiary amine, which can be ionized in positive electrospray mode and provide significant improvement of the limit of detection. The objective of the current study was to develop a novel LC-ESI/MS/MS method using a simple off-line dansyl chloride derivatization reaction of eugenol. The derivatization step is expected to significantly enhance signal intensity and improve the limit of detection obtained normally for non-polar phenol-like compounds.

2. Experimental

2.1 Reagents

Eugenol and the internal standard thymol were purchased from Sigma-Aldrich (St-Louis, MO, USA). The derivatization agent, dansyl chloride was purchased from Sigma-Aldrich. Other chemicals, including acetonitrile, methanol, sodium hydroxide and formic acid were purchased from J.T. Baker (Phillipsburg, NJ, USA).

2.3 Instrumentation

The HPLC system consisted of a Thermo Surveyor autosampler and a Thermo Surveyor MS pump (San Jose, CA, USA). The LC-MS/MS system used was a Thermo LCQ Advantage (San Jose, CA, USA). Data was acquired on an Dell Optiplex desktop computer (Round Rock, TX, USA) equipped with operation Windows XP professional. Data acquisition and analysis were performed using Xcalibur 1.4 (San Jose, CA, USA). Calibration curves were calculated from the equation $y = ax + b$, as determined by weighted ($1/x$) linear regression of the calibration line constructed from the peak-area ratios of the drug and the internal standard.

2.4 Sample Preparation

Using a simple protein precipitation method, eugenol was extracted from rat plasma. An aliquot of 50 μL of sample was mixed with 250 μL of internal standard solution (250 ng/mL of thymol in acetone) in a 1.5 mL centrifuge tube. The sample was then vortexed vigorously and the samples were allowed to rest 10 min at room temperature prior to centrifugation. Samples were centrifuged at approximately 12000g for 10 min and 250 μL of the supernatant was transferred into a 500 μL injection vial. One hundred μL of dansyl chloride solution (1 mg/mL in acetone) and 20 μL of 0.1N NaOH solution were added to injection vials. The vials were vortexed briefly and the reaction was conducted at room

temperature for 15 min and then the vials were transferred to an autosampler for analysis.

2.5 Chromatographic Conditions

An isocratic mobile phase was used with a Thermo BDS Hypersil C8 100 x 2 mm with particle size of 5 μm column. The mobile phase consisted of acetonitrile and 0.1% formic acid in water at a ratio of 75:25, respectively. The flow rate was fixed at 0.25 mL/min and eugenol eluted at 2.4 min and the internal standard (thymol) at 3.4 min. The eluent was split 1:10 prior to introduction into the electrospray source. Ten μL of the extracted sample was injected and the total run time was set at 4 min.

2.6 Mass Spectrometry Conditions

The mass spectrometer was interfaced with the HPLC system using a pneumatic assisted electrospray ion source. The sheath gas was set to 20 units and the ESI electrode was set to 5000 V. The capillary temperature was set at 250 $^{\circ}\text{C}$, the capillary voltage to -10 V and the collision energy was set at 40%. The mass spectrometer was operating in full scan MS/MS mode using two segment analysis ($398 \rightarrow [110-500]$, $384 \rightarrow [110-500]$), an isolation width of 3 Da and the maximum injection time was set to 400 ms. The quantification mass transitions used were m/z $398 \rightarrow 171$ and $384 \rightarrow 171$ for eugenol and thymol, respectively.

3. Results and Discussion

3.1 Sample preparation and extraction

The protein precipitation approach was the simplest method available for preparation and the observed recovery was greater than 90%. One drawback of using a protein precipitation method is the impact of ionization suppression and

matrix effect on the quantification precision and accuracy due to possible competition for ionization from extracted endogenous substances. In order to test the potential matrix effect and ionization suppression, we fortified six different samples to obtain 100, 5000 and 20000 ng/mL, and compared the signal intensity versus a pure reference and a fortified blank extract. No significant differences were observed, since the signal intensity ranged from 88 to 103% of the reference for all blank samples. The derivatization is the most critical part of the methodology. A kinetic experiment of the reaction of eugenol with dansyl chloride at room temperature showed no significant increase in signal intensity after 10 min. It is recommended to allow the reaction to go for at least 15 minutes prior analysis.

3.2 Tandem mass spectrometry

Full scan and product ion mass spectra for eugenol and thymol were obtained in positive ion mode. The full scan spectra of the dansyl chloride derivative of eugenol and thymol showed an intense signal for the protonated molecular ion ($[M+H]^+$) at m/z 398 and 384, respectively. The reactions lead to a mass increase of 233 Da for each compound. The product ion spectra of eugenol and thymol have predominant fragment ions at m/z 171 (fig. 2). The mass transition for quantitation was set for best sensitivity at $398 \rightarrow 171$ and $384 \rightarrow 171$ for eugenol and thymol respectively. The product ion spectra were compatible with the molecular structure of derivatized products. With the eugenol-dansyl chloride derivative, signal intensity was increased up to 100-fold as compared to underivatized eugenol in positive electrospray mode and up. In both positive and negative electrospray modes, the ion abundance of underivatized eugenol was weak and not reproducible. The limit of detection, defined as being the quantity of analyte required to obtain 3 times the signal to noise ratio response, was established at 0.5 pg injected on column for the

eugenol-dansyl chloride derivative in the positive electrospray mode. The results indicate that the analytical range could be potentially scale down significantly.

3.3 Sensitivity and Selectivity

The precision (coefficient of variance (%CV)) and accuracy (%NOM) at the LOQ level were determined in six replicates of plasma samples fortified at 100 ng/mL of eugenol. The precision obtained was 10.2% and the accuracy was 108.7%. A representative chromatogram of LLOQ samples is shown in Fig. 3. Extracted blank plasma did not show any interference from endogenous substances. During all experimentations, no interference at the mass transition and retention times of eugenol and thymol were observed in any of the rat plasma samples tested.

3.4 Calibration curve analysis

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 (Beaudry, 2000). By convention, the regression line is considered to properly fit the calibration set when the sum of squares of the deviation is minimized. The calculated coefficients of correlations (r) were better than 0.992 for an analytical range set from 100 to 20 000 ng/mL.

3.5 Precision and accuracy

The reproducibility of the method was evaluated by analyzing six replicates of plasma samples fortified with eugenol at the nominal concentration of 500, 5000 and 20 000 ng/mL in three individual runs. The inter batch precision and accuracy statistical results are shown in Table 1. With the determination of intra batch precision (%CV) and accuracy (%NOM) were

9.4%, 6.7%, 6.1% and 95.1%, 99.7%, 104.6% at 500, 5000 and 20 000 ng/mL, respectively.

A set of quality control (QC) samples were prepared in rat blood at nominal concentrations of 100, 5000 and 20000 ng/mL and were analyzed with a calibration curve from rat blood samples. The observed intra batch precision and observed accuracy were 6.1%, 7.6%, 5.6% and 90.3%, 98.6%, 107.8% at 100, 5000 and 20000 ng/mL, respectively. The method can also be used to quantify eugenol in rat blood in order to assess *in vivo* red blood cell partitioning. The precision and accuracy results observed with the quadrupole ion trap instrument were comparable with the triple quadrupole instrument (data not shown).

The limit of quantification was set at 100 ng/mL and, according to the bioanalytical validation guideline published by the FDA in May 2001, acceptable precision and accuracy results were achieved.

The method has also been tested for the analysis of blood sample from other animal species such as trout (*Onchorynchys mykiss*) fish and African clawed frogs (*Xenopus laevis*) frog. Precision and accuracy results were similar to our results obtained from rat blood.

3.6 Stability

Stability experiments were performed to demonstrate whether or not eugenol is stable under typical sample storage and analysis conditions. Bench-top stability was performed at room temperature and eugenol was stable in rat plasma and blood for at least 4 h. Freeze and thaw stability after 3 cycles was verified and no significant differences were observed versus freshly prepared

samples (< 8% difference). Storage stability at -80°C was performed and eugenol was stable for at least 14 weeks in rat plasma and blood.

4. Conclusion

A novel high-performance liquid chromatographic-mass spectrometric method to detect eugenol using a quadrupole ion trap mass spectrometer was developed. Significant ionization efficiency enhancement was obtained using a simple off-line dansyl chloride derivatization reaction with eugenol. This derivatization improved significantly the detection limit and signal stability in positive electrospray ionization for the determination of plasma and blood concentrations of eugenol. The novel method met all requirements of specificity, sensitivity, linearity, precision, accuracy and stability generally accepted in bioanalytical chemistry. The results demonstrate that quadrupole ion trap mass spectrometer can effectively quantify compounds in biological matrices. We believe that this simple derivatization can be used to study other phenol-like molecules and that a significant improvement of instrument sensitivity can be achieved.

References

Aoshima, H. & Hamamoto, K. (1999). Potentiation of GABAA receptors expressed in *Xenopus* oocytes by perfume and phytoncid. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 63, 743-748.

Atsusane, T. (1991) Clove oil or dehydroeugenol for controlling oxygen in the human body. *Japan Kokai Tokkyo Koho* 227: 6.

Beaudry, F. (2000), Statistical evaluation of linearity and non linearity of LC-MS/MS quantitation analysis, *Pharmaceutical Science*, 1(4), 2437

Beaudry, F., Guenette, S.A., Winterborn, A, Marier, J-F., and Vachon, P. (2005) Development of a rapid and sensitive LC-ESI/MS/MS assay for the quantification of propofol using a simple off-line dansyl chloride derivatization reaction to enhance signal intensity, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 39, 411-417.

Fischer, I.U. and Dengler, H.J. (1990), Sensitive high-performance liquid chromatographic assay for the determination of eugenol in body fluids, *Journal of Chromatography*, 23;525(2):369-377.

Hikasa, Y., Takase, K., Ogasawara, T. & Ogasawara, S. (1986) Anesthesia and recovery with tricaine methanesulfonate, eugenol and thiopental sodium in the carp, *Cyprinus carpio*. *Nippon Juigaku Zasshi*, 48, 341-351.

Jadhav, B.K., Khandelwal, K.R., Ketkar, A.R. & Pisal, S.S. (2004) Formulation and evaluation of mucoadhesive tablets containing eugenol for the treatment of periodontal diseases. *Drug Development of Indian Pharmaceutical*, 30, 195-203.

Jemal, M.(2000), High-throughput quantitative bioanalysis by LC/MS/MS, *Biomedical Chromatography*, 14, 422-429

Laekeman, G.M., Hoof, V.L., Haemers, A., Berghe, V.A.D., Herman, A.G. & Vlietink, A.K. (1990) Eugenol, a valuable compound for in vitro experimental research and worthwhile for further in vivo investigation. *Phytotherapy Research*, 4, 90-96.

Lafortune, M., Mitchell, M.A., & Smith, J.A. (2001) Evaluation of medetomidine, Clove Oil and Propofol for Anesthesia of Leopard Frogs, *Rana pipiens*. *The Journal of Herpetological Medicine and Surgery*, 11, 13-18.

Nishijima, H., Uchida, R., Kawakami, N., Shimamura, K., & Kitamura, K. (1998) Role of endothelium and adventitia on eugenol-induced relaxation of rabbit ear artery precontracted by histamine. *Journal of Smooth Muscle Research*, 34,123-137.

Ohkubo, T., & Shibata, M. (1997) The selective capsaicin antagonist capsazepine abolishes the antinociceptive action of eugenol and guaiacol. *Journal of Dentistry Research*, 76, 848-851.

Quirke, J.M., Adams, C.L. and Van Berkel, G.J. (1994), Chemical Derivatization for Electrospray Ionization Mass Spectrometry. 1. Alkyl Halides, Alcohols, Phenols, Thiols, and Amines *Analytical Chemistry*, 66, 1302–1315.

Reddy, A.C.P., & Lokesh, B.R. (1994) Studies on anti-inflammatory activity of spice principles and dietary N-2 polyunsaturated acids on carrageenan-induced inflammation in rats. *Annals of Nutrition and Metabolism*, 38, 349–358.

Rhys, A.T., Winfield, S.A. and Belloli, R.C. (1982), Dns derivatization of anabolic agents with high-performance liquid chromatographic separation and fluorescence detection , *Journal of Chromatography* 240(1), 224–229.

Sladky, K.K., Swanson, C.R., Stoskopf, M.K., Loomis, M.R., & Lewbart, G.A. (2001) Comparative efficacy of tricaine methanesulfonate and clove oil for use as anesthetics in red pacu (*Piaractus brachypomus*). *American Journal of Veterinary Research*, 62, 337-342.

Szallasi, A., & Blumberg, P.M. (1999) Vanilloid (Capsaicin) receptors and mechanisms. *Pharmacological Review*, 51, 159-212.

Wie, M.B., Won, M.H., Lee, K.H., Shin, J.H., Lee, J.C., Suh, H.W., Song, D.K. & Kim, Y.H. (1997) Eugenol protects neuronal cells from excitotoxic and oxidative injury in primary cortical cultures. *Neuroscience Letters*, 225, 93-96.

Wie, M.B., Won, M.H., Lee, K.H., Shin, J.H., Lee, J.C., Suh, H.W., Song, D.K. & Kim, Y.H. (1997) Eugenol protects neuronal cells from excitotoxic and oxidative injury in primary cortical cultures. *Neuroscience Letters*, 225, 93-96.

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. *Journal of Dentistry Research*, 82, 781-785.

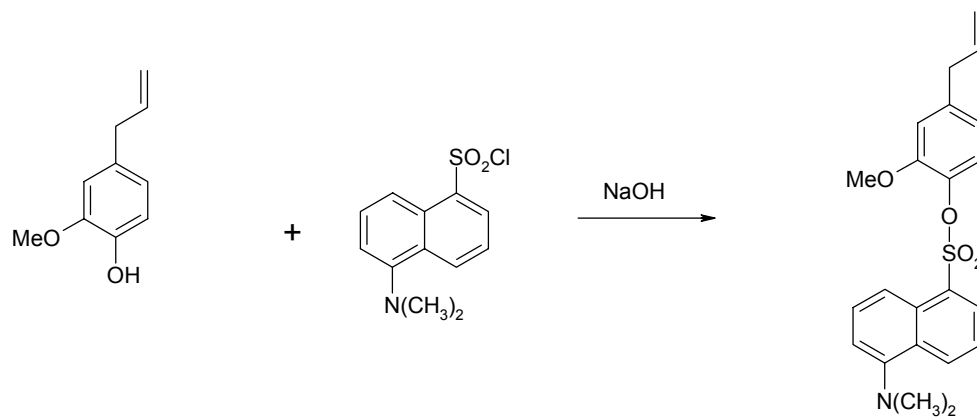
Figures**Figure 1.** Reaction scheme of eugenol with dansyl chloride

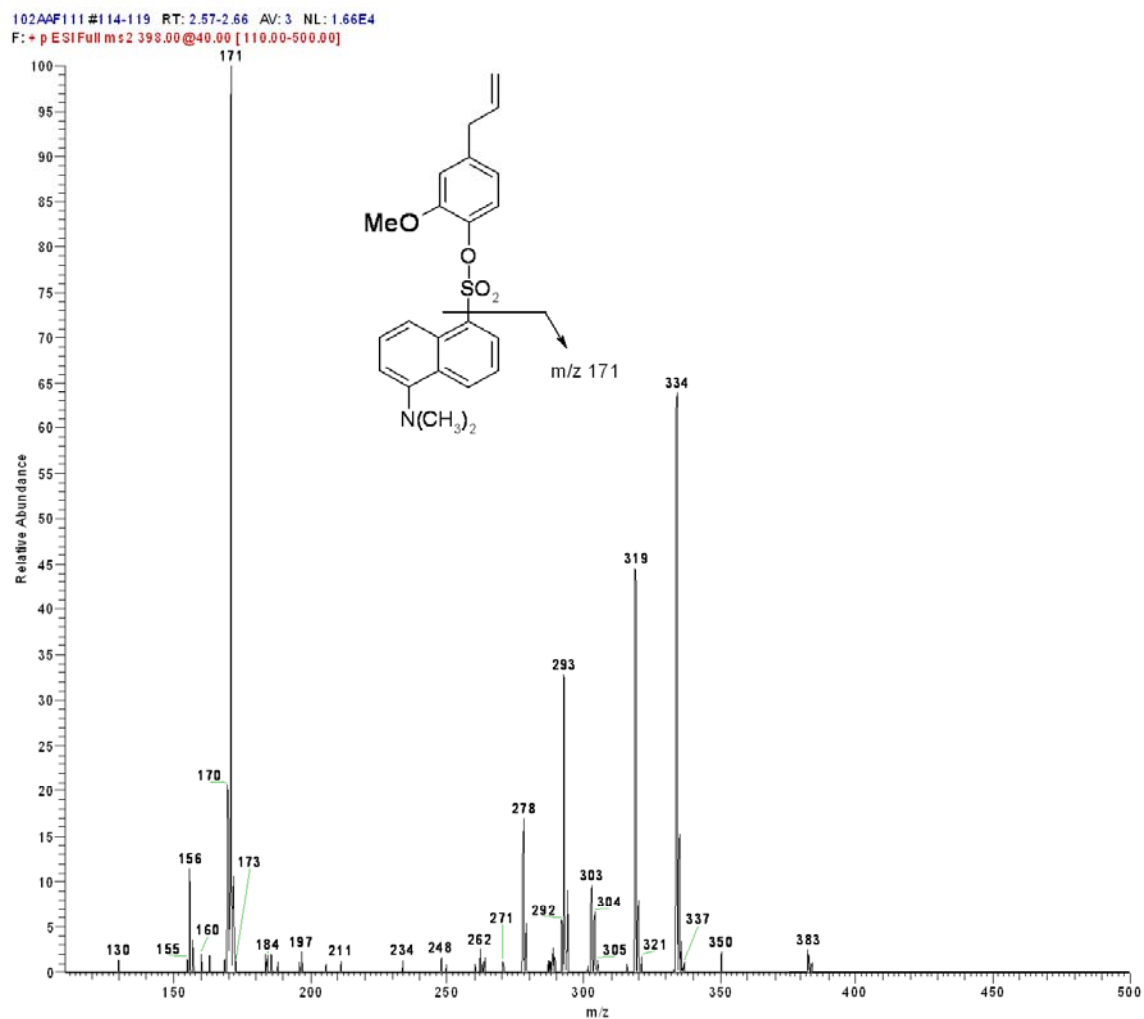
Figure 2. Product ion spectrum of the eugenol-dansyl chloride derivative

Figure 3. Representative extracted LOQ (100 ng/mL) chromatogram of eugenol in rat plasma.

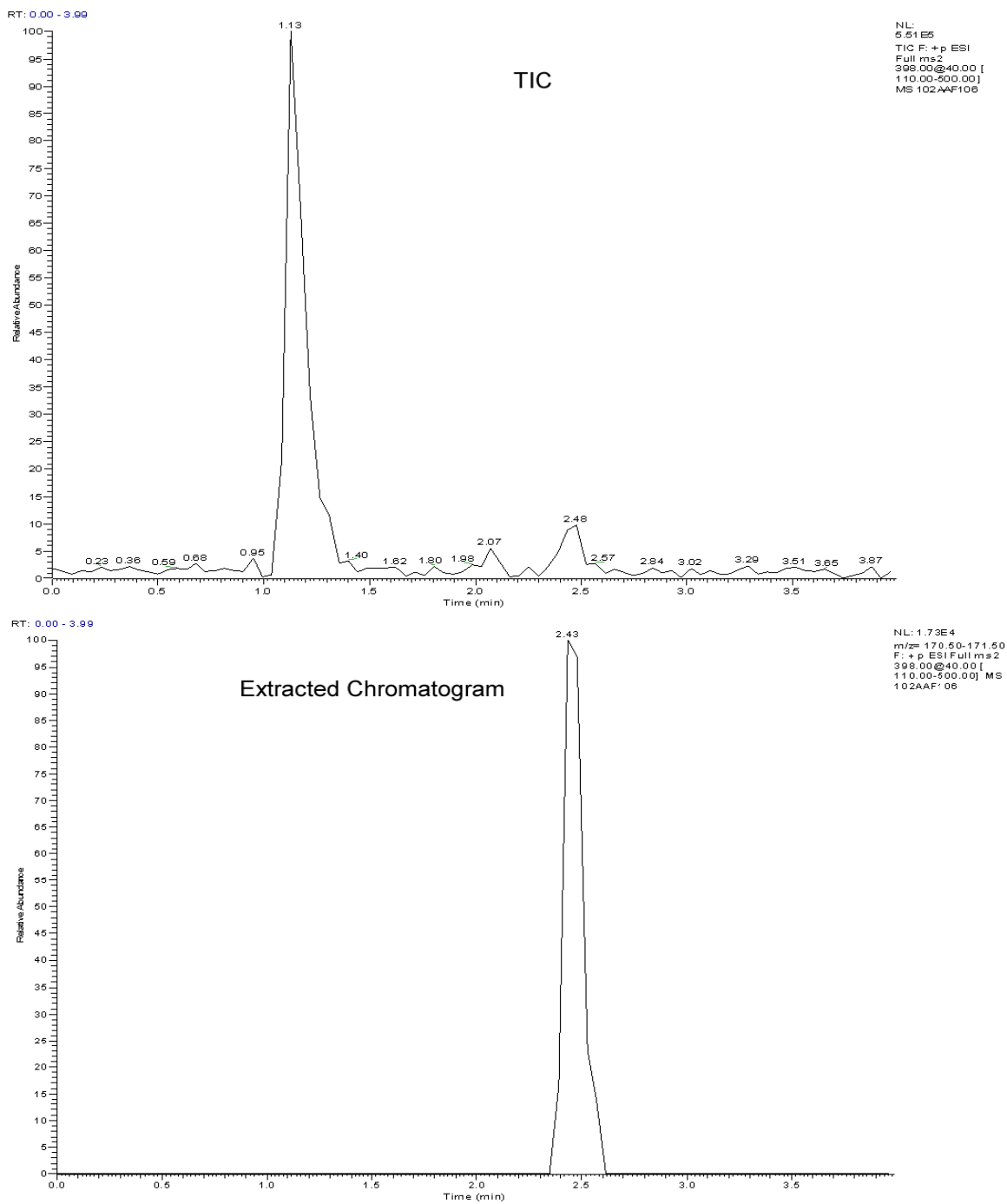
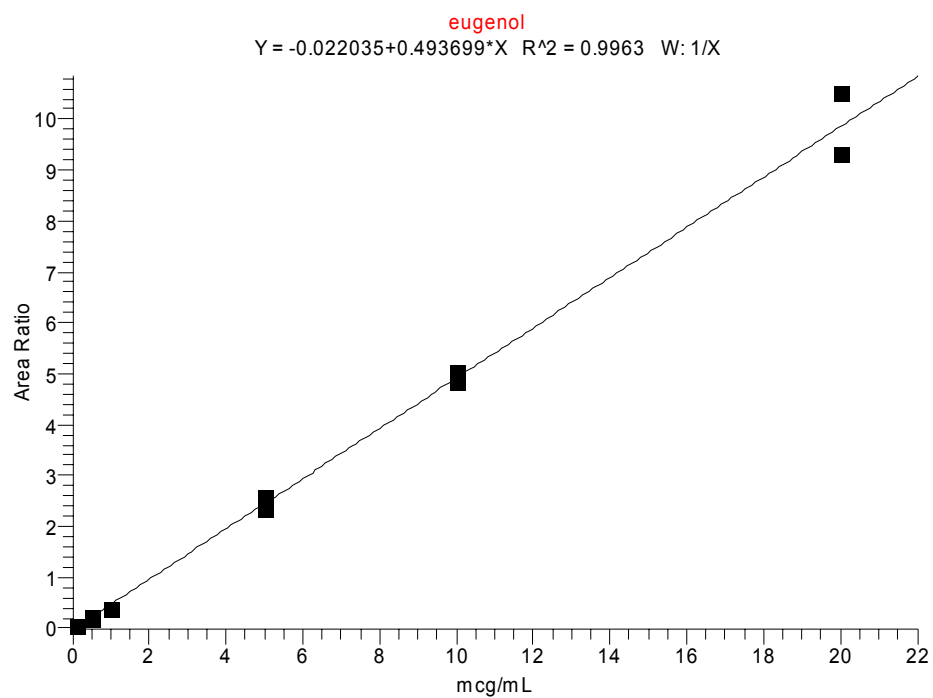


Figure 4. Representative Calibration curve for eugenol in rat plasma

Tables**Table 1**

Summary of inter-batch precision and accuracy data for eugenol in plasma.

[] ng/mL	500	5000	20000
n	18	18	18
Mean	475,5	4982,8	20920,0
SD	44,532	333,207	1283,246
%CV	9,4%	6,7%	6,1%
%NOM	95,1%	99,7%	104,6%

ANNEXE III *Curriculum vitae***Dre Sarah Annie Guénette**, BSc Zoologie, DMV, PhD candidate

6 rue Gélinoites

L'Île-Perrot

J7V 9N1

TÉLÉPHONE RÉSIDENCE: 514-425-8833**TÉLÉPHONE CELLULAIRE** : 514-952-0941**LANGUES PARLÉES ET ÉCRITES** : français et anglais**FORMATION SCOLAIRE****SEPTEMBRE 2004-AUJOURD'HUI**Maîtrise et Doctorat Sciences Biomédicales Vétérinaires, Anesthésiologie et
AnalgésieFaculté de Médecine Vétérinaire, Université de Montréal, St-Hyacinthe,
Québec, Canada**SEPTEMBRE 1999-MAI 2004**

Doctorat Médecine Vétérinaire

Faculté de Médecine Vétérinaire, Université de Montréal, St-Hyacinthe,
Québec, Canada**SEPTEMBRE 1996-JUIN 1999**

Baccalauréat avec majeure en Zoologie Appliquée (BSc Agr.)

Faculté de l'agriculture et des sciences environnementales, Campus MacDonald,
Université McGill, Sainte-Anne-de-Bellevue, Qc, Canada**DÉCEMBRE 1995**

Diplôme d'Études Collégiales (DEC), Sciences de la Nature

CÉGEP Maisonneuve, Montréal, Québec, Canada

EMPLOIS ACTUELS

- Vétérinaire Auxiliaire d'enseignement : Morphophysiologie Comparée des Reptiles et poissons, DMV 2510 (Depuis hiver 2007).
- Vétérinaire Auxiliaire d'enseignement : Comportement de Manipulation des Reptiles, DMV 1410 (Depuis 1999)
- Propriétaire Hôpital Vétérinaire Anima-Plus succ. Laurier, Montréal, Qc (Depuis juillet 2007)
- Co-propriétaire, Hôpital Vétérinaire Anima-Plus Succ. St-Hubert, QC (Depuis Nov 2006)
- Vétérinaire en Charge, Zoo Écomuséum, Saint-Anne-de-Bellevue, Qc. (Depuis juillet 2004)

HISTORIQUE EMPLOIS, STAGES et EXPÉRIENCES PERTINENTES

- Vétérinaire, Hôpital Vétérinaire Saint-Lazare, Saint-Lazare, Qc. (octobre 2004-2007)
- Vétérinaire, Hôpital Vétérinaire Des Trois Lacs, Vaudreuil-Dorion, Qc. (octobre 2004-2007)
- Vétérinaire, Hôpital Vétérinaire Venne et Bégin, Repentigny, Qc. (été 2004)
- Stage à l'Hôpital Vétérinaire Venne et Bégin (2004)
- Stage à l'Hôpital Vétérinaire Lachine, Montréal, Qc. (été 2000-2001-2002)
- Stage à l'Hôpital West Flamingo Animal Hospital, Las Vegas, Nevada. (été 2001)
- Stage à l'Hôpital Gentle Doctor Animal Hospital. (été 2001)
- Stage Institut de Recherche en Aviculture (HARI-HAGEN). (1996-1997)

ZOO

- Candidat sélectionné au poste de vétérinaire en chef, Zoo et Aquarium de Québec, Québec, Canada. (2004)
- Stage au Zoo de Granby, Granby, Qc. (été 2002)
- Stage à l'aquarium Shark Reef Mandalay Bay Casino, Las Vegas, Nevada, USA. (été 2001)
- Stage au Zoo de St-Félicien, St-Félicien, Qc. (été 2001)
- Stage au Zoo de L'Écomuséum, St-Anne-de-Bellevue, Montréal, Qc (de 2000 à 2004)

FAUNE

- Stage à la Clinique des Oiseaux de Proie, Faculté de Médecine Vétérinaire de l'Université de Montréal, St-Hyacinthe, Qc. (2004)
- Institut de Réhabilitation Le Nichoir, Hudson, Qc. (1997)
- Assistante de recherche avec l'Université du Québec à Montréal (UQUAM) sur le Goglu (*Dolichonys oryzivorus*) (1997)

ENSEIGNEMENT et SÉMINAIRES

- Auxiliaire d'enseignement cours Travaux Dirigés en Biomédecine Vétérinaire-1, DMV 2111, Section Animaux Exotiques (2006).
- Vétérinaire Auxiliaire de Laboratoire pour le cours : Exercices chirurgicaux. (2004-2005)
- Présentation d'un séminaire au congrès annuel de L'Association of Reptilian and Amphibian Veterinarians (ARAV), St-Paul-Minnneapolis, Mn, USA, intitulé : *Comparision of anesthetic products in amphibians*. (hiver 2003)

- Présentation d'un cours sur la manipulation, la contention, l'identification et les principes généraux de la médecine des reptiles et amphibiens. CEGEP St-Félicien (2003)
- Conférencière pour la section des reptiles et amphibiens dans le cadre du cours de formation des techniciens (nes) en santé animale. (2001-2002)
- Présentation d'un séminaire intitulé: *Les reptiles et amphibiens en clinique* dans le cadre de la formation continue offerte par la Faculté de Médecine Vétérinaire. (hiver 2001).
- Présentation d'un séminaire sur la manipulation et la contention des reptiles et amphibiens. Symposium Étudiant Vétérinaires. (2000)

PROJETS RECHERCHE

- **Réalisation d'un projet de recherche sur l'anesthésie des amphibiens, publication dans le journal de l'ARAV et présentation des résultats lors du congrès annuel de l'ARAV. (année 2003-2004)**

Guénette, S.A. et S.Lair. 2006. Anesthesia of the Leopard Frog, *Rana pipiens*: A Comparative Study between four Different 16 (2): pp. 38-44.

- **Réalisation d'un essai de fin de Baccalauréat. (hiver 1999).**

Participation à une étude concernant la comparaison des bandes terminales sur les rectrices des femelles Crécerelles d'Amérique (*Falco sparverius*) et de leur âge. Réalisation d'un essai comparatif sur les différentes techniques de détermination de l'âge de différents animaux.

LISTE DES PRODUCTIONS SCIENTIFIQUES

Articles publiés :

- Sarah A. Guénette, Carl F. Uhlend, Pierre Hélie, François Beaudry et Pascal Vachon. 2007. Pharmacokinetics of eugenol in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture*, 266 (1-4), pp. 262-265.
- Sarah A. Guénette, Andréanne Ross, Jean-François Marier, Francis Beaudry et Pascal Vachon. 2007. Pharmacokinetics of eugenol and its effects on thermal hypersensitivity in rats. *European Journal of Pharmacology*, 562, pp. 60-67.
- Sarah A. Guénette, Pierre Hélie, François Beaudry et Pascal Vachon. 2007. Eugenol for the anesthesia of African Clawed frogs (*Xenopus laevis*). *Journal of Veterinary Anesthesia and Analgesia*, 34, pp.164-170.
- Sarah A. Guénette et Stéphane Lair. 2007. Anesthesia of the leopard frog (*Rana pipiens*): A comparative study between four different agents. *Journal of herpetological medicine and surgery*, 16 (2), pp. 38-44.
- Sarah A. Guénette, François Beaudry, Jean-François Marier et Pacal Vachon. 2006. Pharmacokinetics and anesthetic activity of eugenol in

- male Sprague-Dawley rats. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, 29, pp.265-270.
- Francis Beaudry, Sarah A. Guénette et Pascal Vachon. 2006. Determination of eugenol in rat plasma by liquid chromatography-quadrupole ion trap mass spectrometry using a simple off-line dansyl chloride derivatization reaction to enhance signal intensity. *Biomedical Chromatography*, 20, pp.1216-1222.
 - Andréanne Ross, Sarah A. Guénette, Pierre Hélie et Pascal Vachon. 2006. Cas de nécrose cutanée chez des grenouilles africaines à griffes *Xenopus laevis* suite à une application topique d'eugénol = Case of cutaneous necrosis in African Clawed frogs *Xenopus laevis* after the topical application of eugenol. *Canadian Veterinary Journal*. 47, pp. 1115-1117
 - Sarah A. Guénette, Pierre Hélie et Pascal Vachon. 2006. Œdème sous-cutané généralisé chez des grenouilles *Xenopus Laevis*. *Canadian Association for Laboratory Animals Medicine Interface*, 19 (1) pp.9-14.
 - Sarah A. Guénette, David Rodrigue, Pierre Hélie et Pascal Vachon. 2006. Bilateral corneal opacification in a captive colony of green frogs (*Rana clamitans melanota*). *Canadian Association for Laboratory Animals Medicine Interface*, 19 (3), pp. 3-6.
 - Francis Beaudry, Sarah A. Guénette, Andrew Winterborn, Jean-François Marier et Pascal Vachon. 2005. Development of a rapid and sensitive LC-ESI/MS/MS assay for the quantification of propofol using a simple off-line dansyl chloride derivatization reaction to enhance signal intensity. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*, 39 (3-4), 15 September, pp. 411-417.
 - Sarah A. Guénette, David Rodrigue et Pascal Vachon. 2005. Utilisation des amphibiens en recherche : L'eugenol pour la gestion de la douleur chez la grenouille *Xenopus leavis*. *Le médecin vétérinaire du Québec*, 35 (1), pp. 12-14.
 - Sarah A. Guénette, C. Lazure, Chistianne Girard et Pascal Vachon. 2005. Fibrome cutané chez un rat Sprague-Dawley. *Canadian Association for Laboratory Animals Medicine Interface*, 18 (2), pp. 5-8.

Affiches scientifiques (Posters):

- Pharmacokinetics and anesthetic activity of eugenol in male Sprague-Dawley rats. Sarah A. Guénette, Francis Beaudry, Jean-François Marier et Pascal Vachon. Présenté dans le cadre des journées de la douleur ABCDouleur, Université de Montréal et dans le cadre congrès annuel de l'American association for laboratory animal science, St-Louis, MO, USA. 2006.
- Eugenol for the treatment of neuropathic pain. Sarah A. Guénette, Andréanne Ross, Jean-François Marier, Francis Beaudry et Pascal Vachon. San Antonio, Tx, USA. American Pain Society 2006.

- Eugenol for the treatment of neuropathic pain. Sarah .A.Guénette, Andrénne Ross, Jean-François Marier, François Beaudry et Pascal Vachon. Cernobio, Italie. Federation of European Laboratory Animal Science Association, 2007.

Conférences:

- Anesthesia of Amphibian and fish. Canadian Association of Laboratory Animal Science. Montréal, Canada 2006. Sarah A. Guénette et Pascal Vachon.
- Eugenol for the anesthesia of *Xenopus leavis* frogs. American Association for Laboratory Animals Science Meeting. Salt Lake City, Utah, USA 2006. Sarah A. Guénette, Pierre Hélie et Pascal Vachon.
- A comparative study between four different agents. Sarah A. Guenette et Stephane Lair. Présenté au congrès annuel de L'association of amphibian and reptilian veterinary (2003), St-Paul-Miniapolis, MN, USA.

RÉFÉRENCES :

- **Dr Pascal Vachon**, Professeur Agrégé Médecine des Animaux de Laboratoire, Directeur de ma thèse de Doctorat, Faculté de Médecine Vétérinaire, Université de Montréal, Saint-Hyacinthe, Qc, Ca. 514-773-8521 ext. : 8294,
- **Dr Normand Larivière**, Directeur, Département de Biomédecine, Faculté de Médecine Vétérinaire, Université de Montréal, St-Hyacinthe, Qc, Ca. 514-773-8521 ext. : 8301,
- **M David Rodrigue**, Directeur général, Zoo Ecomuseum, Saint-Anne-de-Bellevue, Qc,Ca. 514-457-9449 ext. : 105,
- **Dr Clément Lanthier**, Directeur général, Zoo de Calgary, Al, Ca. 403-232-9372,
- **Dr Isabelle Langlois**, Médecin Vétérinaire Animaux Exotiques, Clinicienne et professeure section animaux exotiques, Faculté de Médecine Vétérinaire, Université de Montréal, St-Hyacinthe, Qc, Ca. 450-773-8521 ext.: 8680
- **Autres références sur demande**