

Université de Montréal

**Rôle et localisation intraspinale du récepteur B₁ des kinines
dans la douleur neuropathique**

Par

Emna Chahmi

Département de physiologie

Faculté de Médecine

Mémoire présenté à la Faculté de médecine en vue de l'obtention du grade de

Maîtrise ès sciences (M.Sc.) en Physiologie

Décembre, 2010

© Emna Chahmi

Université de Montréal
Faculté de médecine

Ce mémoire intitulé :

**Rôle et localisation intraspinale du récepteur B₁ des kinines
dans la douleur neuropathique**

Présenté par :

Emna Chahmi

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Allan Smith, président - rapporteur

Réjean Couture, directeur de recherche

Arlette Kolta, membre du jury

Résumé

Le récepteur B₁ des kinines (RB₁) joue un rôle important dans l'inflammation et la nociception. Les sites de liaison du RB₁ sont augmentés dans la moelle épinière et le ganglion de la racine dorsale (GRD) chez le rat après la ligature partielle du nerf sciatique (LPNS). Dans ce modèle classique de douleur neuropathique, le traitement aigu avec des antagonistes sélectifs du RB₁ renverse l'hyperalgésie thermique mais non pas l'allodynie.

Cette étude vise à définir dans ce modèle de LPNS: 1- les effets de traitements aigu et chronique avec des antagonistes du RB₁ sur l'hyperalgésie thermique et les allodynies tactile et au froid; 2- la contribution du TRPV1 et du stress oxydatif dans la composante de la douleur neuropathique associée au RB₁; 3- l'expression du RB₁ au niveau de la moelle épinière lombaire, le GRD et le nerf sciatique par RT-PCR quantitatif (*Reverse transcriptase-polymerase chain reaction*); 4- la localisation cellulaire du RB₁ dans la moelle épinière lombaire par microscopie confocale.

L'hyperalgésie thermique et les allodynies tactile et au froid ont été mesurées par le réflexe de retrait de la patte arrière après l'application à la surface plantaire d'une source radiante de chaleur (méthode Hargreaves), de filaments de Von Frey et d'une goutte d'acétone qui produit une sensation de froid par évaporation.

Nous avons montré, dans un premier temps, que l'hyperalgésie thermique et les allodynies tactile et au froid sont renversées par un traitement chronique avec l'antagoniste du RB₁, SSR240612, administré par gavage à raison de 10 mg /kg/jr entre le 15^e et le 20^e jour après la ligature du nerf sciatique et par un traitement antioxydant, la N-acétyl-L-cystéine, administrée par gavage à la dose de 1g/kg/jr, 4jours précédant la ligature et pendant les 2 semaines après la ligature. Un traitement aigu avec le

SSR240612 (10 mg/kg) ou avec un antagoniste du RB₁ qui ne traverse pas la barrière hémato-encéphalique, le R-954 (2mg/kg, s.c.), n'a bloqué que l'hyperalgésie thermique.

Dans un second temps, l'antagoniste du TRPV1, le SB366791, administré à raison de 1 mg/kg/jr par voie sous-cutanée du j-1 au j-14 a renversé l'allodynie tactile et l'hyperalgésie thermique.

De plus, nous avons noté deux semaines après la LPNS, des augmentations significatives des niveaux d'ARNm du RB₁ dans la moelle épinière lombaire, le nerf sciatique et le GRD du côté ipsilatéral à la ligature. Ces augmentations ont été renversées par le traitement avec la N-acétyl-L-cystéine et l'antagoniste du TRPV1. Le RB₁ a été localisé au niveau des fibres de type C avec le marquage au CGRP (Calcitonin Gene-Related Peptide) et au niveau de la microglie utilisant le marquage au Iba-1 dans la moelle épinière lombaire des rats ayant subi une LPNS, 2 semaines plus tôt.

Au terme de cette étude, nous avons suggéré que la surexpression du RB₁ sur les fibres de type C contribuerait à l'hyperalgésie thermique alors que le RB₁ sur la microglie dans la moelle épinière contribuerait aux allodynies tactile et au froid dans le modèle LPNS chez le rat. Le stress oxydatif pourrait être impliqué dans l'induction du RB₁. Bien que le rôle du TRPV1 semble plutôt limité à la douleur thermique, il pourrait cependant agir via le RB₁ sur les fibres de type C.

Mots clés: Allodynie; Douleur neuropathique; Fibre C; Hyperalgésie thermique; Kinines; Ligature partielle du nerf sciatique; Moelle épinière; Microglie; Stress oxydatif; TRPV1.

Summary

The kinin B₁ receptor (B₁R) plays an important role in inflammation and nociception. B₁R binding sites are increased in the spinal cord and dorsal root ganglion (DRG) in rats after partial sciatic nerve ligation (PSNL). In this classic model of neuropathic pain, acute treatment with selective B₁R antagonists reversed thermal hyperalgesia but not allodynia. This study aims at determining in this model of PSNL: 1- the acute and chronic effects of B₁R antagonists on thermal hyperalgesia and tactile and cold allodynia; 2- the contribution of TRPV1 and the oxidative stress in the component of neuropathic pain associated to B₁R; 3 - the expression of B₁R in the lumbar spinal cord, the DRG and the sciatic nerve by quantitative RT-PCR (Reverse transcriptase-polymerase chain reaction); 4 - the cellular localization of B₁R in the lumbar spinal cord by confocal microscopy.

Thermal hyperalgesia and tactile and cold allodynia were measured by the reflex withdrawal of the hindpaw after application to the plantar surface of a radiant heat source (Hargreaves method), Von Frey filaments and a drop of acetone that produces a sensation of cold by evaporation.

We have shown, firstly, that the thermal hyperalgesia and tactile and cold allodynia are reversed by chronic treatment with the B₁R antagonist, SSR240612, administered by gavage at a dose of 10 mg/ kg / day from day 15 to day 20 after sciatic nerve ligation and with antioxidant treatment, N-acetyl-L-cysteine, administered by gavage at a dose of 1g /kg/ day, four days before ligation and for two weeks after ligation. Acute treatment with SSR240612 (10 mg/kg) or with the B₁R antagonist R-954 (2 mg/kg, s.c.) which does not pass the blood-brain barrier blocked thermal hyperalgesia only.

Secondly, the antagonist of TRPV1, SB366791, subcutaneously administered at a dose of 1 mg/kg/day from day 1 to day 14 reversed tactile allodynia and thermal hyperalgesia.

In addition, two weeks after PSNL, we noted significant increases of B₁R mRNA levels in the lumbar spinal cord, the sciatic nerve and DRG on the ipsilateral side to the ligation.

These increases were reversed by treatment with N-acetyl-L-cysteine and TRPV1 antagonist. The B₁R was found on sensory C-fibres by CGRP labeling (Calcitonin Gene-Related Peptide) and on microglia using the specific marker Iba-1 in the lumbar spinal cord of rats which underwent PSNL two weeks earlier.

Upon completion of this study, it was suggested that the overexpression of B₁R on sensory C-fibres contributes to thermal hyperalgesia while the B₁R on the microglia in the spinal cord could contribute to tactile and cold allodynia in the model of PSNL in rats. Oxidative stress seems involved in the induction of B₁R. Whereas the role of TRPV1 seems restricted to thermal pain, it could involve the contribution of B₁R on sensory C-fibers.

Keywords: Allodynia; C-fibers; Kinin; Microglia; Neuropathic pain; Oxidative stress
Partial sciatic nerve ligation; Spinal cord; Thermal hyperalgesia; TRPV1.

TABLE DES MATIÈRES

RÉSUMÉ.....	i
SUMMARY.....	iii
TABLE DES MATIÈRES.....	v
LISTE DES FIGURES.....	ix
LISTE DES TABLEAUX.....	x
LISTE DES ABRÉVIATIONS.....	x
DÉDICACE.....	xiv
REMERCIEMENTS.....	xv

CHAPITRE 1 : RECENSION DE LA LITTÉRATURE

INTRODUCTION

1.1 Système kallicroïne-kinines (SKK).....	1
1.1.1 Les kininogènes.....	1
1.1.2 Biosynthèse des kinines.....	2
1.1.3 Le catabolisme des kinines.....	4
1.1.3.1 Les aminopeptidases.....	4
1.1.3.2 Les carboxypeptidases.....	5
1.1.3.2.1 Les kininases I.....	5
1.1.3.2.2 Les kininases II.....	5
1.1.4 Les récepteurs des kinines.....	6
1.1.4.1 Le récepteur B ₁	7
1.1.4.2 Les antagonistes du RB ₁	8

1.1.4.3 Le récepteur B ₂	9
1.1.4.4 Les mécanismes de signalisation des récepteurs des kinines....	10
1.2 Le mécanisme de la régulation du RB₁ par le NF-κB.....	13
1.2.1 Le NF-κB comme cible thérapeutique.....	14
1.3 Le stress oxydatif.....	17
1.3.1 Fonctions des espèces réactives oxygénées (ERO).....	17
1.3.2 Les antioxydants.....	20
1.4 La douleur.....	22
1.4.1 La nociception.....	23
1.4.1.1 Les nocicepteurs.....	24
1.4.1.2 Les fibres sensorielles (Afférences nociceptives).....	25
1.4.2 Les voies ascendantes de la douleur.....	29
1.4.3 Les mécanismes de la douleur.....	30
1.4.3.1 Sensibilisation périphérique et centrale.....	30
1.4.3.2 Prostaglandines dans les mécanismes de la douleur.....	34
1.4.4 Modulation de la douleur.....	35
1.4.5 La douleur neuropathique.....	36
1.4.5.1 Les signes cliniques de douleur neuropathique.....	37
1.4.5.2 Le rôle des cellules gliales dans la douleur neuropathique....	38
1.4.5.3 Le traitement de la douleur chronique.....	41
1.4.5.4 Modèle animaux de douleur neuropathique.....	42
1.4.5.5 Mécanismes physiopathologiques de douleur neuropathique..	46
1.5 Transient Receptor Potential Vanilloid (TRPV).....	47
1.5.1 TRPV1.....	47

1.5.2. TRPV1 comme cible thérapeutique.....	49
1.6 Les kinines dans l'inflammation et la douleur.....	51
1.7 Hypothèse, objectifs et approches expérimentales.....	54

CHAPITRE 2 : ARTICLE SCIENTIFIQUE

Emna Chahmi, Sébastien Talbot, Réjean Couture. Contribution and spinal cellular localization of kinin B ₁ receptor in a rat model of neuropathic pain.....	55
---	----

CHAPITRE 3 : D'AUTRES ÉTUDES

3.0 Hypothèse.....	98
3.1 Objectif.....	98
3.2 Approche expérimentale.....	98
3.3 Résultats.....	99
3.3.1 Effet de l'antagoniste du NF-κB, SN50, sur l'allodynie tactile.....	99
3.3.2 Effet de l'antagoniste du NF-κB, SN50, sur l'allodynie au froid.....	100
3.3.3 Effet de l'antagoniste du NF-κB, SN50, sur l'hyperalgésie thermique.....	101

CHAPITRE 4 : DISCUSSION ET CONCLUSION

4.0 Discussion générale.....	102
4.1 Modèles classiques de douleur neuropathique (lésion du nerf sciatique).....	102
4.2 Les récepteurs des kinines sont surexprimés dans la moelle épinière et le GRD dans le modèle de lésion du nerf sciatique.....	103
4.3 Allodynie.....	104
4.4 L'hyperalgésie thermique.....	106
4.5 Implication des cellules gliales dans la douleur neuropathique.....	107

4.6 Le rôle du TRPV1 dans la douleur neuropathique périphérique.....	108
4.7 Le stress oxydatif est associé à la douleur neuropathique.....	109
Perspective.....	112
Conclusion.....	113
Bibliographie.....	114
Réalisations au plan scientifique.....	137

LISTE DES FIGURES

CHAPITRE 1 : RECENSION DE LA LITTÉRATURE

Figure 1 : La synthèse et de la dégradation des kinines.....	3
Figure 2 : Sites d'action des enzymes catalytiques des kinines.....	6
Figure 3 : Mécanisme de signalisation des récepteurs B ₁ et B ₂ des kinines.....	12
Figure 4 : Mécanisme d'activation du facteur de transcription NF-κB.....	16
Figure 5 : La formation et l'élimination des différentes espèces réactives oxygénées....	21
Figure 6 : Physiologie des voies de la douleur.....	24
Figure 7 : La transmission de l'influx nerveux par les fibres sensorielles primaires.....	27
Figure 8 : Les couches de la corne dorsale de la moelle épinière.....	28
Figure 9 : Les médiateurs périphériques impliqués dans la douleur inflammatoire.....	31
Figure 10 : L'hyperalgésie et sensibilisation centrale.....	33
Figure 11 : Organisation des cellules gliales autour des neurones.....	40
Figure 12 : Implication de la microglie et des astrocytes dans la douleur neuropathique	41
Figure 13 : Modèles de douleur-classification.....	44
Figure 14 : Résumé du mécanisme d'activation et d'inhibition du TRPV1.....	50

CHAPITRE 3 : D'AUTRES ÉTUDES

Figure 15 : Effet de l'antagoniste du NF-κB, SN50, sur l'allodynie tactile.....	99
Figure 16 : Effet de l'antagoniste du NF-κB, SN50, sur l'allodynie au froid.....	100
Figure 17 : Effet de l'antagoniste du NF-κB, SN50, sur l'hyperalgésie thermique.....	101

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Les caractéristiques des fibres sensorielles.....28

LISTE DES ABRÉVIATIONS

A β : fibre sensorielle A-beta

A δ : fibre sensorielle A-delta

ADP : adénosine-di-phosphate

AMPA : acide α -amino-propionique

AMPc : adénosine monophosphate cyclique

AINS : anti-inflammatoire non stéroïdien

ARNm : messenger de l'acide ribonucléique

ATP : adénosine tri-phosphate

BK: bradykinine

Ca²⁺: calcium

CCI : *chronic constriction injury* (modèle de Bennett)

CCR2: *chemokine (C-C motif) receptor 2*

CGRP: *calcitonin gene-related peptide*

CNS: *central nervous system*

DAG : diacylglycérol

EDHF: *endothelium-derived hyperpolarizing factor*

ERO: espèces réactives oxygénées

GABA : acide γ -aminobutyrique

GDNF: *glial cell line-derived neurotrophic factor*

GFAP: *glial fibrillary acidic protein*

GMPc : guanosine monophosphate cyclique

GPCR : *G protein-coupled receptors*

GRD : ganglion de la racine dorsale

H1: récepteur de type1 à l'histamine

IκB : inhibiteur du facteur de transcription nucléaire NF-κB

IKK-β : sous-unité beta de l'IκB kinase

IL-1β: interleukine-1beta

IL-1R : récepteur à l'interleukine-1

IL-6 : interleukine-6

Ins(1,4,5)P3 : inositol 1,4,5-tri-phosphate

IT : intrathécale

KBPM : kininogène de bas poids moléculaire

KD : kallidine

KHPM : kininogène de haut poids moléculaire

K⁺ : potassium

L5, L6 : nerfs lombaires 5 et 6

LPNS : ligature partielle du nerf sciatique

MAPK : *mitogen-activated protein kinase*

Mg²⁺ : magnésium

MMP2 : matrix metalloproteinase 2

MMP9 : matrix metalloproteinase 9

MRV : médulla rostroventrale

Na⁺: sodium

NAC : N-acétyl-L-cystéine

NF-K β : facteur de transcription nucléaire kappa B

NGF: *nerve growth factor*

NK1: récepteur de type 1 des neurokinines

NMDA: *N-methyl-D-aspartic acid*

NO: monoxyde d'azote

NOS: *nitric oxide synthase*

PAG: substance grise périaqueducale

PCR : *polymerase chain reaction*

P38 MAPK: *P38 mitogen-activated protein kinase*

PGE₂: prostaglandine E₂

PGI₂: prostacycline

PKC : protéine kinase C

PKG : protéine kinase G

PLA₂ : phospholipase A₂

PLC : phospholipase C

PLD : phospholipase D

P2X₄ : purinorécepteurs 4

RB₁: récepteur B₁ des kinines

RB₂: récepteur B₂ des kinines

SOD : superoxyde dismutase

SP: substance P

STZ: *streptozotocine*

TGF : *transforming growth factor*

TLR: *toll-like receptors*

TNF α : *tumor necrosis factor alpha*

TRPV1: *transient potential receptor vanilloid type 1*

VGCCs: *voltage gated calcium currents*

VR: *vanilloid receptor*

DÉDICACE

À mes très chers parents, Slim Chahmi et Najet Chahmi, qui ont toujours été là pour moi, et qui m'ont donné un magnifique modèle de labeur et de persévérance. J'espère qu'ils trouveront dans ce travail toute ma reconnaissance et tout mon amour.

À mon cher frère Tarek Chahmi pour son aide constante. Son attitude amicale et son soutien moral ont toujours été avec moi tout au long de mon mémoire.

À ma chère sœur: Aroua Chahmi

Je dédie ce mémoire.

REMERCIEMENTS

En préambule à ce mémoire, je souhaite adresser mes remerciements les plus sincères aux personnes qui m'ont apporté leur aide et qui ont contribué à l'élaboration de ce mémoire ainsi qu'à la réussite de ces formidables années.

Je tiens à remercier sincèrement **Dr Réjean Couture** qui, en tant que Directeur de recherche, s'est toujours montré à l'écoute et très disponible tout au long de la réalisation de ce mémoire, ainsi pour l'inspiration, l'aide et le temps qu'il a bien voulu me consacrer.

Je souhaiterais remercier Jacques Sénécal et Karim Lahjouji pour leur soutien technique et leur disponibilité.

Je tiens à remercier mes collègues de laboratoire Nejla Tidjane, Sébastien Talbot, Jenny Pena Dias pour leur amitié et pour avoir partagé leur connaissance. Ils ont été toujours disponibles pour répondre à mes questions, m'encourager et m'aider à résoudre les problèmes rencontrés avec gentillesse.

Mes remerciements s'adressent également à Joanne Payette (Technicienne en gestion des dossiers étudiants) et Nassima Feggous (Agente de secrétariat) pour le service de qualité qu'elles offrent aux étudiants.

Enfin, j'adresse mes plus sincères remerciements à tous mes proches et amis, qui m'ont toujours soutenue et encouragée au cours de la réalisation de ce mémoire. Merci à tous et à toutes.

CHAPITRE 1: RECENSION DE LA LITTÉRATURE

INTRODUCTION

1.1 Système kallibréine-kinines (SKK)

Le SKK a été découvert en 1909 par les chercheurs français (Abelous et Bardier) qui ont montré que l'injection d'urine humaine par voie intraveineuse conduit à une hypotension artérielle chez le chien (Oshima, 1994). Le SKK est un système peptidergique complexe comprenant des enzymes de synthèse, les kallibréines, leurs substrats, les kininogènes, les peptides formés, les kinines, leurs enzymes de dégradation, les kininases et les récepteurs B₁ et B₂. Les kinines sont des peptides vasoactifs formés localement après un traumatisme tissulaire ou après un stimulus inflammatoire (Chao et al., 1998). Ils contribuent à plusieurs aspects de l'homéostasie cardiovasculaire (Mazenot et al., 2001), à l'inflammation (Saxena et al., 2010) et à la nociception (Liu et al., 2010).

1.1.1 Les kininogènes

Les kininogènes, précurseurs des kinines, sont des macromolécules de plusieurs centaines d'acides aminés synthétisés par les hépatocytes. Sous l'action enzymatique des kallibréines, les kininogènes sont clivés pour libérer les kinines (Weisel et al., 1994). Les gènes des kininogènes diffèrent selon les espèces. Chez les êtres humains, les bovins et la souris, par exemple, on trouve un épissage alternatif du gène K, localisé sur le chromosome 3q26, qui code pour deux types de kininogènes: le kininogène de haut poids moléculaire (KHPM, 88 à 120 kDa) et le kininogène de bas poids moléculaire (KBPM, 50 à 68 kDa). Ces derniers circulent dans le plasma avec des concentrations respectives de 70 à 90 µg/ml et de 170 à 220 µg/ml (Adam et al., 1985). Chez le rat, on trouve le T-kininogène (68kDa) provenant de la duplication du gène T. Ce kininogène a deux isoformes protéiques, T-I et T-II avec 96% d'homologie entre elles.

Les kininogènes appartiennent à la famille 3 de la superfamille des cystatines et sont des

protéines multifonctionnelles possédant plusieurs domaines (Zhou et al., 2006). Indépendamment de leur rôle de précurseurs des kinines, les kininogènes inhibent de nombreux enzymes tels que la cathepsine, la calpaïne et la papaine.

1.1.2 Biosynthèse des kinines

La libération des kinines à partir du kininogène est liée à l'action des kallibréines (ou kininogénases). Il s'agit d'une famille de plusieurs enzymes protéolytiques comprenant la kallibréine tissulaire (synthétisée dans les cellules endothéliales et les cellules musculaires lisses des vaisseaux, les polynucléaires neutrophiles et le rein) et la kallibréine plasmatique (structurellement différente de la forme tissulaire). La distribution de ces kallibréines, protéases à sérine, se trouve sous forme inactive ou pré-kallibréine. Le clivage du kininogène de haut et de bas poids moléculaires par ces différentes kininogénases aboutit à la libération de plusieurs polypeptides, les kinines. La bradykinine (BK) et la kallidine (Lys-bradykinine) sont issues de deux voies biochimiques, l'une plasmatique (qui implique la kallibréine plasmatique) et l'autre tissulaire (qui implique la kallibréine tissulaire) (**Figure 1**).

La synthèse de la BK à partir de la kallibréine plasmatique: à la suite d'une lésion tissulaire, le sang entre en contact avec des surfaces possédant des charges négatives telle que les composantes de la matrice cellulaire (collagène, héparine et protéoglycan). Ceci permet à la pré-kallibréine plasmatique de s'associer au kininogène de haut poids moléculaire (KHPM, 110 kDa) et d'être convertie en kallibréine par la liaison et l'autoactivation du facteur de Hageman de la coagulation (facteur XII). Ceci libère la BK du KHPM (Kaplan et al., 1997; Gabra et al., 2003).

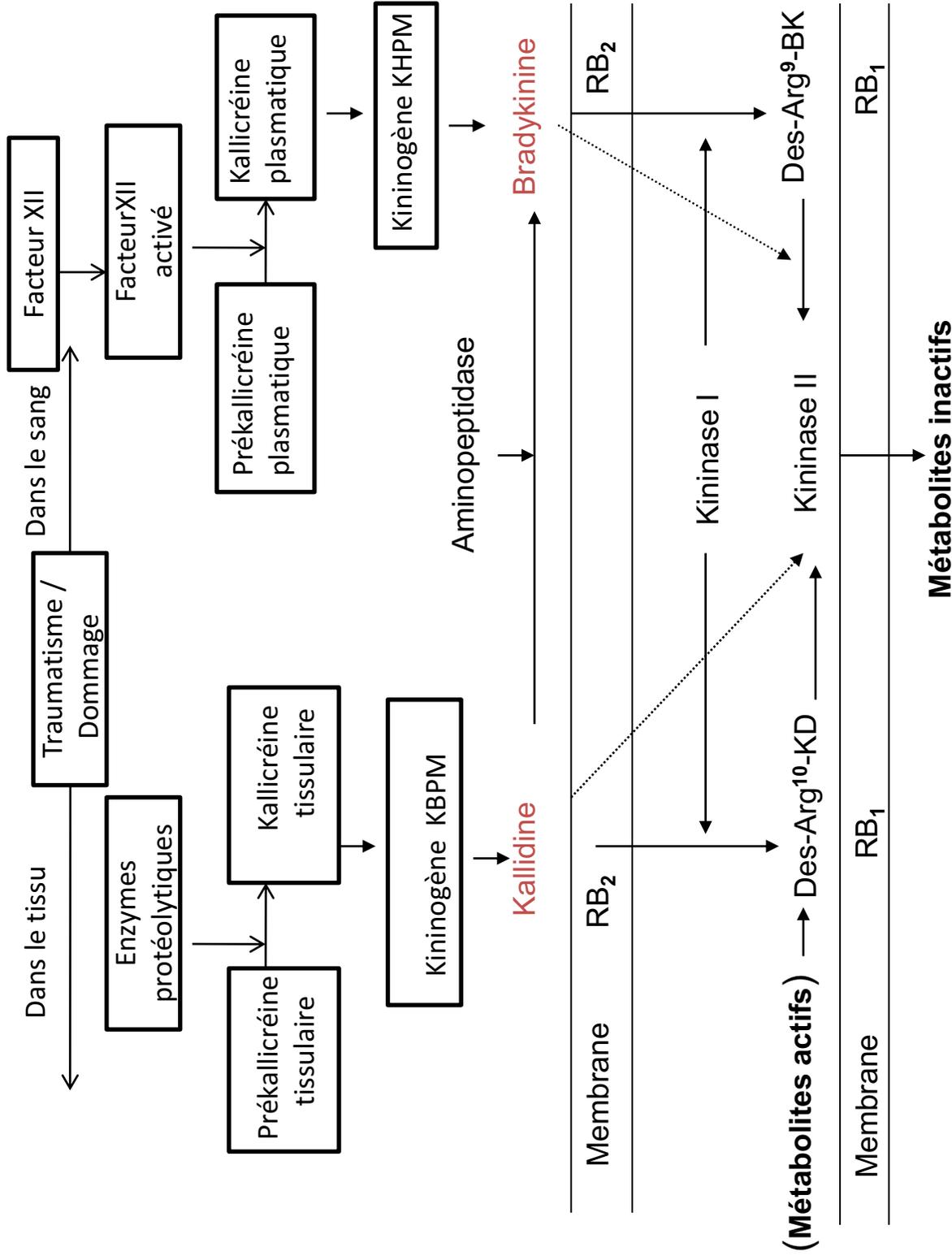


Figure 1. La synthèse et la dégradation des kinines. Adapté de Rodi et al., 2005

La synthèse de la KD à partir des kallibréines tissulaire : à la suite d'une inflammation, les enzymes protéolytiques sont libérés du tissu et activent la kallibréine tissulaire qui agit sur le kininogène de bas poids moléculaire (KBPM, 70 kDa) pour former la KD (Wines et al., 1989).

Les kinines ont une demie-vie très courte, entre 10 et 30 secondes, ce qui explique leur action essentiellement locale. De plus, les kinines sont stockées dans les neurones du système nerveux central où elles pourraient jouer le rôle de neuromédiateurs dans certaines fonctions cérébrales, en particulier dans le contrôle de la pression artérielle (Distler & Wolff, 1979; Couture & Lindsey, 2000) et des informations nociceptives (Talbot et al., 2010).

1.1.3 Le catabolisme des kinines

Au niveau tissulaire ou plasmatique, différents groupes d'enzymes amino-, carboxy- et endopeptidases sont susceptibles de dégrader et métaboliser les kinines (Gabra et al., 2003) (**Figure1-2**). Ce métabolisme permet d'expliquer la courte demie-vie de ces peptides et leur activité autocrine ou paracrine.

1.1.3.1 Les aminopeptidases

Les aminopeptidases sont des enzymes qui clivent les kinines en position N-terminale.

On connaît deux types d'aminopeptidases. L'aminopeptidase M clive la lysine en position N-terminale de la kallidine et de la des-Arg¹⁰-kallidine pour donner respectivement la BK et la des-Arg⁹-BK (Marceau & Bachvarov, 1998; Wolfrum et al., 1999). L'aminopeptidase P clive l'arginine en position N-terminale en brisant le pont Arg¹-Pro² pour donner la BK-(2-9) ou des-Arg¹-BK (Ryan et al., 1994).

1.1.3.2 Les carboxypeptidases

Les enzymes les plus importants dans la dégradation des kinines sont les carboxypeptidases. Ces derniers clivent les kinines en position C-terminale et comprennent les kininases I et les kininases II (**Figure 2**).

1.1.3.2.1 Les kininases I

Le groupe des kininases I comprend la carboxypeptidase N du plasma (CPN) et la carboxypeptidase M de la membrane cellulaire (CPM). Ces enzymes clivent le lien entre l'arginine en C-terminal (position 9) et la phénylalanine (position 8) pour former des métabolites actifs (soit la des-Arg⁹-BK à partir de la BK, la des-Arg¹⁰-KD à partir de la KD et la des-Arg¹¹-T-kinine à partir de la T-kinine) (Gabra et al., 2003).

Les kininases I désactivent faiblement les kinines car elles sont responsables de 10 % du métabolisme des kinines (Décarie et al., 1996). L'induction des carboxypeptidases M et N au site de l'inflammation participe à l'augmentation de métabolites actifs qui activent le récepteur B₁ (Couture et al., 2001).

1.1.3.2.2 Les kininases II

Le groupe des kininases II comprend l'endopeptidase neutre (EPN) (ou enképhalinase) et l'enzyme de conversion de l'angiotensine I (ECA). Les deux enzymes clivent le dipeptide Phe⁸-Arg⁹ en position carboxy-terminale de la BK pour produire le métabolite inactif BK-(1-7). L'ECA convertit l'angiotensine I (Ang I) en angiotensine II (Ang II) et enlève également le dipeptide Ser⁶-Pro⁷ de la BK-(1-7) pour donner la BK-(1-5), qui est le métabolite final de la BK et de la des-Arg⁹-BK. L'EPN peut également cliver la BK-(1-7) entre la Gly⁴-Phe⁵ pour donner la BK-(1-4) qui est un peptide inactif (Gabra et al., 2003).

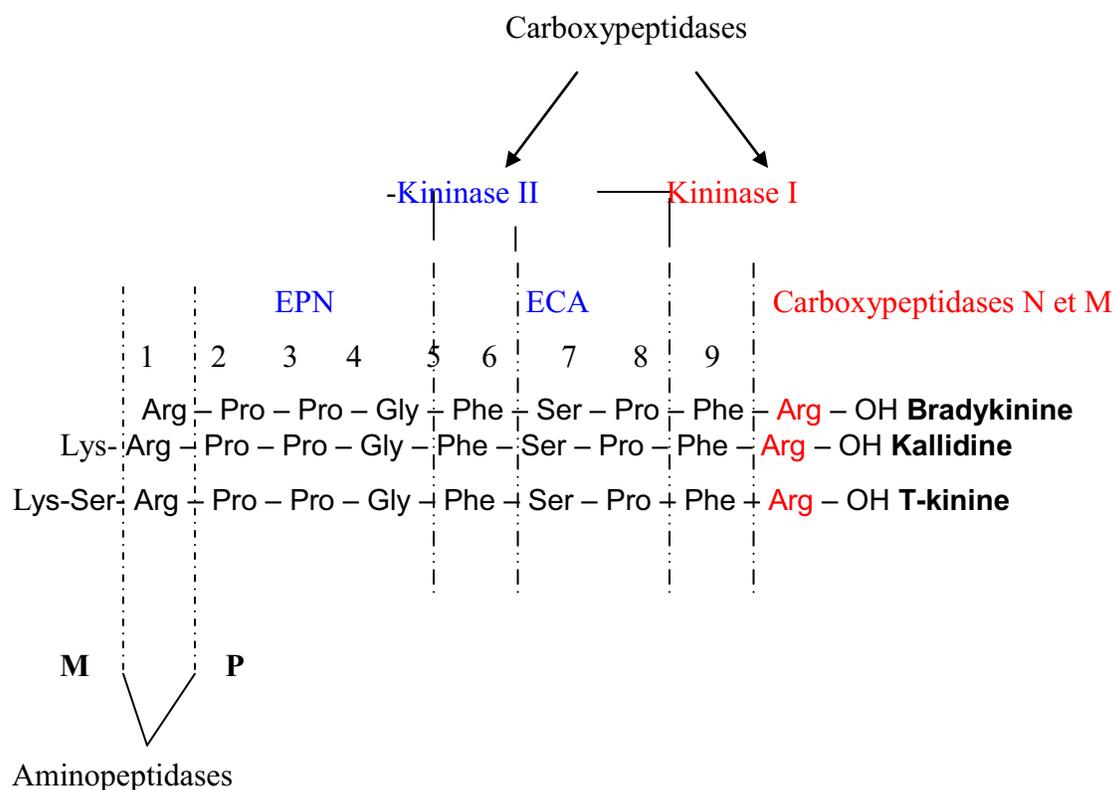


Figure 2. Sites d'action des enzymes catalytiques des kinines. Inspiré de Gabra et al., 2003.

1.1.4 Les récepteurs des kinines

Les effets des kinines et de leurs métabolites actifs sont relayés par deux types de récepteurs nommés B₁ et B₂, lesquels appartiennent à la grande famille des récepteurs à sept domaines transmembranaires couplés à une protéine G (G_{αq/11} et G_{αi}) (Prado et al., 2002). Les ligands sélectifs du RB₂ sont la bradykinine (BK), la lys-BK et la T-kinine. Les métabolites de ceux-ci, formés par la kininase I, produisent les ligands sélectifs du récepteur B₁ soit la des-Arg⁹-BK et la des-Arg¹⁰-KD (Couture et al., 2001). Chez l'humain, la séquence des acides aminés du récepteur B₁ (353 acides aminés) n'est identique qu'à seulement 36% de celle du récepteur B₂ (364 acides aminés), tandis que chez la souris l'homologie n'est que de 30 % entre les récepteurs B₂ (366 acides aminés)

et B₁ (334 acides aminés) (Couture & Lindsey, 2000; McLean et al., 2000). Il existe des différences remarquables au niveau de l'extrémité C-terminale et au niveau des boucles intracellulaires 2 et 3 entre les récepteurs B₁ et B₂ (Raidoo & Bhoola, 1998).

1.1.4.1 Le récepteur B₁

En général, l'expression constitutive du récepteur B₁ est faible dans les tissus sains. Ce récepteur est fortement induit au cours des maladies inflammatoires ou à la suite de lésions tissulaires (Couture et al., 2001; Kuhr et al., 2010).

Un grand nombre d'études *in vitro* et *in vivo* ont montré que l'induction du RB₁ est contrôlée par de nombreuses cytokines pro-inflammatoires dont l'interleukine (IL-1 β), le facteur de nécrose tumorale (TNF- α), et l'interféron gamma (Leeb-Lundberg et al., 2005). L'induction du RB₁ par ces facteurs est relayée par l'activation du facteur de transcription nucléaire NF- κ B et la MAP-kinase. Réciproquement, la stimulation du RB₁ active NF- κ B (Larrivée et al., 1998; Marin-Castano et al., 1998; Leeb-Lundberg et al., 2005). L'expression du RB₁ est induite aussi par le stress oxydatif (El Midaoui et al., 2005; Ismael et al., 2008). L'étude du gène du RB₁ a révélé la présence des éléments de régulation de l'IL1- β , TNF- α , NF- κ B et du lipopolysaccharide (LPS) (Ni et al., 1998a; Calixto et al., 2001).

Selon l'espèce, les deux agonistes endogènes, la des-Arg⁹-BK et la des-Arg¹⁰-KD ont une affinité distincte pour le récepteur B₁. Chez l'humain, l'affinité de la des-Arg¹⁰-KD est 2000 fois plus grande que celle de la des-Arg⁹-BK, tandis que chez le rat, la des-Arg⁹-BK a une plus grande affinité (Menke et al., 1994; Regoli et al., 2001).

Une fois activé par son ligand, le RB₁ n'est pas désensibilisé et démontre une internalisation lente (heure) et limitée (Mathis et al., 1996; McLean et al., 2000). Ceci est

déterminé par l'absence de la sérine ou de la thréonine au niveau de la queue C-terminale du RB₁ qui pourrait être phosphorylée pour faciliter son internalisation. De plus, la stimulation du RB₁ stabilise de manière transitoire le récepteur à la membrane et retarde son internalisation. Ceci ne se conforme pas avec la régulation traditionnelle des GPCR; ces derniers sont habituellement désensibilisés et internalisés après avoir été activés par leurs agonistes. Une fois internalisé, le RB₁ n'est pas recyclé, mais il est envoyé directement aux lysosomes pour être dégradé (Daaka et al., 1998; Ferguson, 2001; Prado et al., 2002; Enquist et al., 2007).

Le RB₁ joue un rôle dans la phase chronique de l'inflammation et de la douleur. Son activation chronique peut probablement être amplifiée par l'accumulation de la des-Arg⁹-BK au site de l'inflammation (Couture et al., 2001). La réponse inflammatoire relayée par les récepteurs B₁ est attribuée à la libération de la SP et du CGRP des fibres sensorielles, la production des prostaglandines et des cytokines et à la libération des médiateurs des mastocytes (Dray & Perkins, 1993; McLean et al., 1998).

1.1.4.2 Les antagonistes du RB₁

Le RB₁ est bloqué par deux types d'antagonistes: peptidique et non-peptidique. Les antagonistes non-peptidiques (LF-220542 ; SSR240612) sont très efficaces, de longue durée, et ont une bonne biodisponibilité contrairement aux antagonistes peptidiques (R-914, R-715) qui sont plus susceptibles à la dégradation enzymatique (Simard et al., 2002; Gougat et al., 2004; Porreca et al., 2006).

Les antagonistes du RB₁ non-peptidiques ont été développés à partir du composé alkylamino-5-sulfamoylbenzamide et seraient actifs sur la douleur inflammatoire (Ritchie et al., 2004). Notre projet porte sur le **SSR240612** qui présente une grande

affinité pour le RB₁ chez plusieurs espèces (rat, souris et humain). Des études ont démontré l'efficacité du SSR240612 par voie orale dans différents modèles, incluant la douleur inflammatoire et neuropathique (Gougat et al., 2004; Ritchie et al., 2004; Dias et al., 2007; 2010). En effet, le SSR240612 a prévenu le développement d'anomalies sensorielles (allodynie) dans des modèles de diabète de type 2 (Dias et al., 2007; 2010) et de type 1 (Talbot et al., 2010) ainsi que l'hyperalgésie thermique induite par une lésion du nerf sciatique chez le rat (Gougat et al., 2004).

Les antagonistes non-peptidiques passent la barrière hémato-encéphalique et agissent sur les RB₁ situés dans la moelle épinière contrairement aux antagonistes peptidiques qui ne passent pas la barrière et qui agissent seulement en périphérie.

1.1.4.3 Le récepteur B₂

Le RB₂ est distribué de façon ubiquitaire; il est présent sur les cellules endothéliales, les fibroblastes, les cellules musculaires lisses, les cellules épithéliales et mésangiales, certains neurones, les polynucléaires neutrophiles et les astrocytes (Bhoola et al., 1992; Bascands et al., 1993). La BK demeure l'agoniste du RB₂ le plus utilisé bien que d'autres agonistes soient plus puissants et sélectifs (Regoli et al., 1991). Après son activation par un agoniste, le RB₂ subit une désensibilisation et une internalisation rapide, causée par la phosphorylation de sa queue C-terminale et du recrutement d'une β -arrestine₂ qui diminue le nombre de RB₂ à la surface cellulaire (Leeb-Lundberg et al., 2001; 2005). Ce mécanisme explique l'implication du RB₂ surtout dans la phase aiguë de l'inflammation et de la douleur. La BK a des effets vasodilatateurs et protecteurs, lesquels sont généralement attribués aux prostaglandines et au monoxyde d'azote (NO). L'effet de la BK sur son récepteur cause l'inflammation neurogénique par l'activation des

fibres sensorielles de type C qui libèrent les médiateurs de la douleur, la SP et le CGRP. Ces derniers entraînent la libération des prostaglandines, les médiateurs des mastocytes (histamine et sérotonine) et des cytokines qui sont impliqués dans la vasodilatation et la perméabilité vasculaire (Couture et al., 2001).

1.1.4.4 Les mécanismes de signalisation des récepteurs des kinines

La des Arg⁹-BK et la BK exercent leurs effets biologiques à la suite de la stimulation du RB₁ et du RB₂. Ceci implique plusieurs voies de signalisation intracellulaire après l'activation des protéines G_{αq} et G_{αi} (Prado et al., 2002). La transduction des signaux pour les récepteurs des kinines est relayée par des systèmes de seconds messagers différents selon le type cellulaire (**Figure 3**).

Parmi les mécanismes de transduction de signaux, notons l'activation de la phospholipase C (PLC) qui stimule la formation d'inositol 1,4,5-triphosphate (IP₃) et du diacylglycérol (DAG), impliqués respectivement dans la libération du calcium intracellulaire et dans l'activation de la protéine kinase C (PKC). L'IP₃ cause une augmentation de la concentration du calcium intracellulaire via l'activation des canaux IP₃R situés sur le réticulum sarcoplasmique et active l'enzyme NOS favorisant la relâche du NO, lequel cause une vasodilatation par l'augmentation de la concentration du guanosine monophosphate cyclique (GMPc) dans le muscle lisse vasculaire (Gabra et al., 2003; Marceau, 1995). La PKC active par phosphorylation le RAF, ceci active la MAPK. (mitogen-activated protein kinase). L'acide arachidonique peut également être produit à partir des phospholipides membranaires, *via* l'activité de la phospholipase A₂ (PLA₂) et à partir du DAG sous l'action d'une lipase, ce qui conduit à la production de prostaglandines (PGE₂) et de prostacycline (PGI₂) par l'action de cyclooxygénases

(COX). Ces derniers augmentent la perméabilité vasculaire et causent une vasodilatation (Saunders et al., 1999; Yamasaki et al., 2000). De plus, la formation de l'adénosine monophosphate cyclique (AMPC) et du GMPc est produite respectivement par l'activation directe ou indirecte de l'adénylate cyclase et la guanylate cyclase. À la suite d'une dépolarisation cellulaire, le calcium augmente la production de l'AMPC et de la GMPc par ces enzymes. Outre ces voies classiques, des études récentes suggèrent que le RB₂ est également lié à d'autres voies de transduction de signaux par l'activation de la MAPK, suite à l'activation de la PKC et de RAF (sérine/thréonine kinase) ou suite à la phosphorylation de la tyrosine des récepteurs du facteur de croissance épidermique (EGF) suivi de l'activation de la RAS kinase (Gabra et al., 2003). De plus, le RB₂ pourrait emprunter des voies de signalisation indépendantes des protéines G.

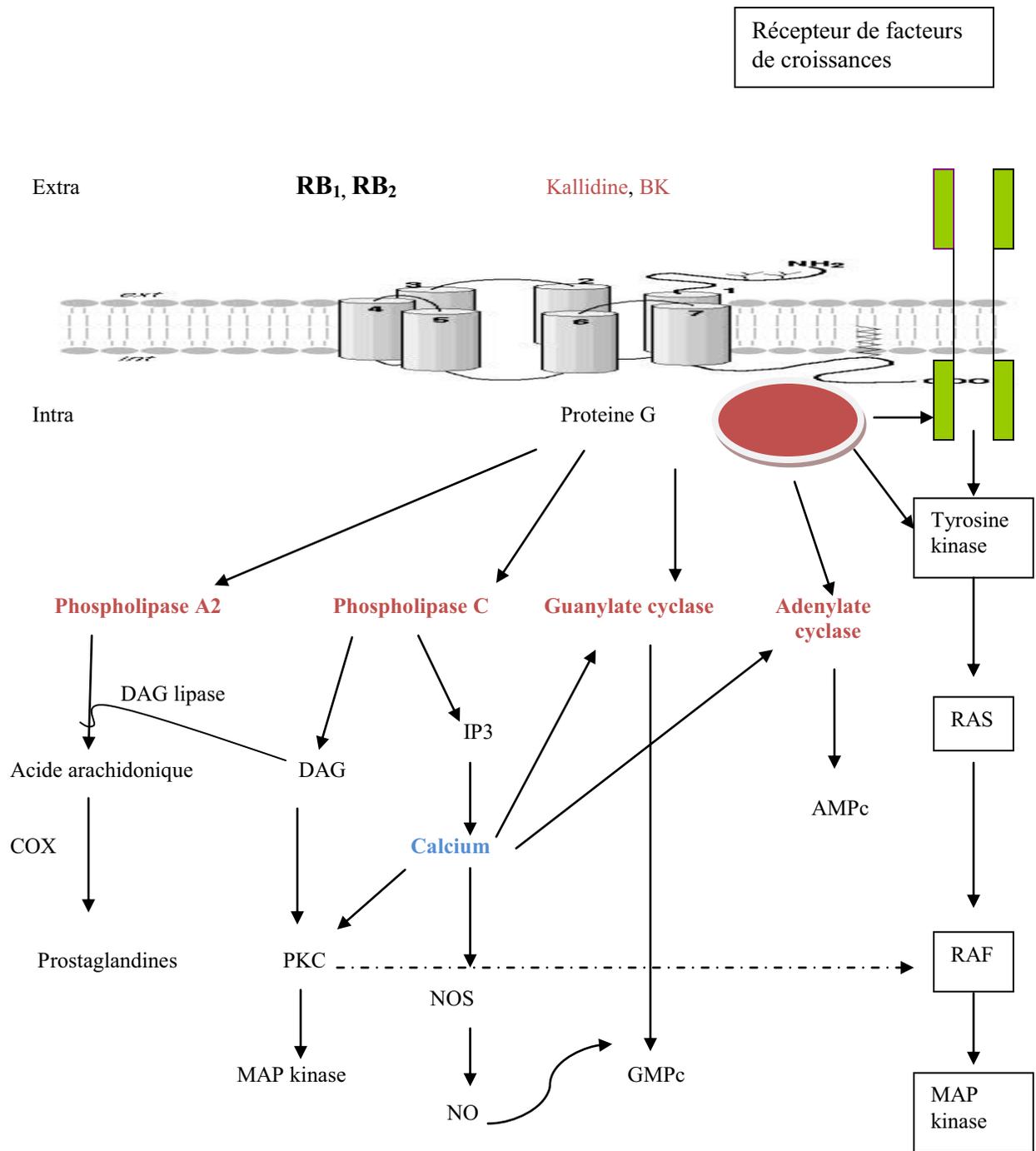


Figure 3. Mécanisme de signalisation des récepteurs B_1 et B_2 des kinines. Inspiré de Gabra et al. , 2003.

1.2 Le mécanisme de la régulation du RB₁ par le NF-κB

Le facteur de transcription nucléaire kappa B (*Nuclear Factor κB*, NF-κB) est non seulement crucial dans la régulation de l'expression de plusieurs gènes de médiateurs pro-inflammatoires (Ghosh et al., 2008), mais c'est également le principal facteur de transcription qui est responsable de l'induction du RB₁ dans l'inflammation (Ni et al., 1998b; Schanstra et al., 1999). Le rôle essentiel du NF-κB a été démontré la première fois dans les fibroblastes humains où l'inhibition du NF-κB a bloqué l'induction du RB₁. L'activation du RB₁ stimule aussi le NF-κB qui augmente la synthèse des cytokines pro-inflammatoires (Schanstra et al., 1998).

Le NF-κB est activé par divers stimuli extracellulaires comme les cytokines pro-inflammatoires, le stress oxydatif et les peptides vasoactifs (Pueyo et al., 2000; Mehta & Griendling, 2007) (**Figure 4**).

Il existe 5 protéines NF-κB chez les mammifères: RelA, RelB, Rel-c, NF-κB1 et NF-κB2 (Alberts, 2004). Le NF-κB est en partie régulé dans le cytoplasme de la cellule par un complexe protéique composé des protéines IKKα, IKKβ et de la protéine NEMO/ IKKδ. La NEMO est une protéine bifonctionnelle qui est nécessaire à l'assemblage d'ordre élevée et à l'activation par phosphorylation au niveau des résidus sérines de IKKα et IKKβ. Le NF-κB joue un rôle dans la répression ou l'activation des gènes, et il est retenu dans le cytoplasme par la protéine inhibitrice IκB-α. L'activation de la voie de signalisation du NF-κB repose sur l'induction de la phosphorylation de la protéine inhibitrice IκB-α par la protéine kinase IKK et l'ubiquitination de cette protéine par E3 ligase. En effet, la phosphorylation et l'ubiquitination sont reconnues par les protéasomes qui dégradent à leur tour l'IκB-α. Ceci est le résultat de la translocation du NF-κB

jusqu'au noyau et l'activation de la transcription des gènes cibles comme le RB₁ (Alberts, 2004).

1.2.1 Le NF- κ B comme cible thérapeutique

Une pléthore d'inhibiteurs de NF- κ B, agissant avec plus ou moins de spécificité, sont capables d'agir à des niveaux différents dans la voie de signalisation NF- κ B.

L'inhibiteur d'IKK : en raison de son rôle central, le complexe IKK est considéré comme l'une des cibles thérapeutiques les plus attrayantes pour générer de nouveaux inhibiteurs spécifiques de la voie de signalisation NF- κ B. Il intervient en effet très en amont de la voie de signalisation et intègre la plupart des stimuli conduisant à son activation. Un grand nombre d'anti-inflammatoires non-stéroïdiens (aspirine, salicylate de sodium, la sulphasalazine et ses dérivés) se sont également révélés capables d'agir, au moins en partie, sur IKK (Keifer et al., 2001).

L'inhibiteur du protéasome : il empêche la dégradation de I κ B- α , conduisant au maintien de NF- κ B dans le cytoplasme et à l'inhibition de son activation. Le protéasome reconnaît les protéines destinées à être dégradées grâce à la présence de chaînes d'ubiquitine fixées sur ces protéines (Ma et al., 2003; Yang et al., 2003).

Le peptide affectant la fonction de NEMO: il inhibe l'activation de IKK (May et al., 2000). En effet, la cible alternative au sein de IKK pourrait être la sous-unité régulatrice NEMO qui a un rôle essentiel dans le processus d'activation de IKK, fournissant des interfaces pour connecter IKK à un grand nombre de voies de signalisation.

L'inhibiteur de la translocation du NF- κ B : la translocation nucléaire de NF- κ B nécessite son interaction avec des protéines spécifiques comme l'importine α 3 et α 4 qui sont les deux principales isoformes impliquées dans la translocation nucléaire de l'hétérodimère p50/RelA induite par le TNF- α . Lorsque NF- κ B n'interagit plus avec I κ B- α , l'isoforme

$\alpha 3$ se lie directement à la séquence de localisation nucléaire (SLN) des protéines p50 et RelA (Fagerlund et al., 2005). Il est dès lors concevable de perturber ce processus avec des inhibiteurs adaptés, comme le peptide SN50 qui contient une séquence de localisation nucléaire de la sous-unité p50. L'inhibition de NF- κ B par ce peptide réduit la survie de cellules tumorales, comme dans le cas des cancers thyroïdiens, et potentialise les effets des traitements anti-néoplasiques (Torgerson et al., 1998). Cet inhibiteur sera utilisé dans notre étude.

Inhibiteur transcriptionnel : il a été montré que les glucocorticoïdes (anti-inflammatoires puissants) agissent sur NF- κ B. Un de leur principal mécanisme d'action est dû à l'interaction entre le récepteur des glucocorticoïdes et RelA. Cette interaction empêche la capacité transcriptionnelle de RelA directement ou en bloquant son interaction avec la TATA binding protein (Kagoshima et al., 2003).

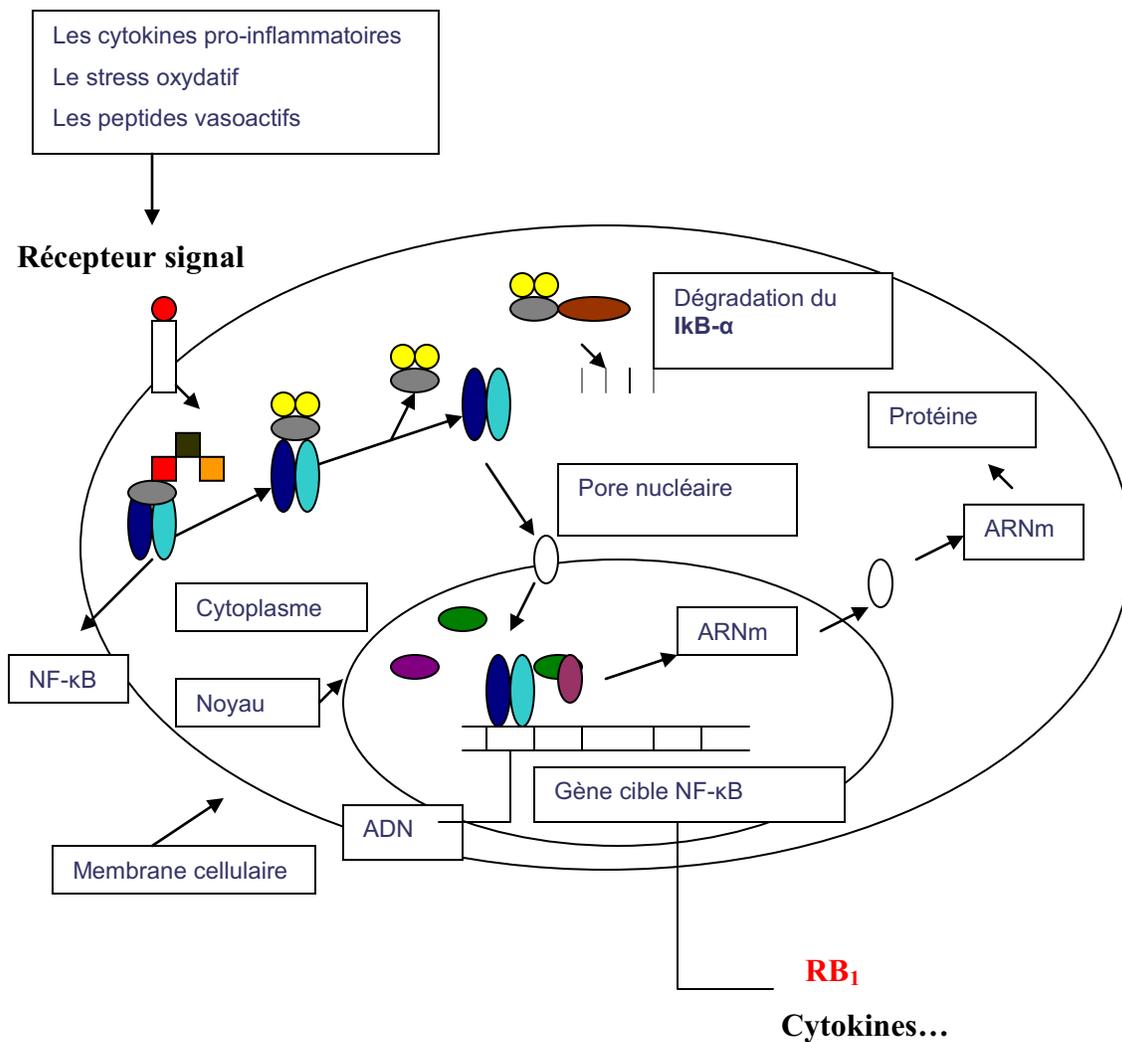


Figure 4. Mécanisme d'activation du facteur de transcription NF-κB.

Inspiré de <http://fr.wikipedia.org/wiki/NF-%CE%BAB>

Abréviations : NF-κB : facteur de transcription nucléaire kappa B.

Rel A P50 → sous-unités de NF-κB

Coactivateur ARN polymérase protéasome

IKKβ (IκB kinase) IKKα (Iκα kinase) NEMO

IκB-α (inhibiteur du NF-κB) p (phosphorylé)

1.3 Le stress oxydatif

Une cellule ou organisme est en situation de stress oxydatif lorsque le niveau de production d'espèces oxydantes excède les capacités anti-oxydantes de celle-ci (Lyle & Griendling, 2006). De manière générale et physiologique, la respiration aérobie, dépendante de l'oxygène, génère des radicaux libres tels que l'anion superoxyde ($O_2^{\bullet-}$). En effet, la mitochondrie, par le biais de la respiration cellulaire et de la chaîne d'électrons est la principale responsable de la génération des radicaux libres cellulaires. Les radicaux libres ayant pour base l'oxygène sont nommés espèces réactives oxygénées (ERO) tels l'anion superoxyde ($O_2^{\bullet-}$), le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), le peroxyde d'azote ($ONOO^-$), le radical hydroxyle (OH^\bullet) et le monoxyde d'azote (NO^\bullet). Ils sont caractérisés par leur très haute réactivité dû à la présence d'un de leurs électrons de valence non paillé (Cai & Kang, 2001; Alberts, 2004; Lyle & Griendling, 2006).

Le stress oxydatif, via la formation d'anion superoxyde, est un facteur primaire important dans le développement et l'évolution de la résistance à l'insuline, de l'hypertension et des complications diabétiques (De Champlain et al., 2004; Brownlee 2005; Haidara et al., 2006). De plus, le stress oxydatif est associé aux douleurs neuropathiques à la suite d'une lésion d'un nerf périphérique (Naik et al., 2006; Tanabe et al., 2009).

1.3.1 Fonctions des espèces réactives oxygénées (ERO)

Dans les conditions pathologiques, les ERO peuvent endommager et modifier la fonction de l'ARNm, de l'ADN ainsi que des protéines. Elles sont impliquées dans le processus normal de vieillissement des organismes.

Les ERO en particulier H_2O_2 et $O_2^{\bullet-}$ sont aussi considérées comme des messagers seconds qui affectent la signalisation intracellulaire de plusieurs systèmes (Lyle &

Griendling, 2006). Des études ont montré que le H₂O₂ exogène peut activer la cascade de ERK1/2 (Extracellular Signal-Regulated Kinases 1 and 2) dans divers types cellulaires (Ceolotto et al., 2006). De plus, l'O₂^{•-} est capable de changer l'activité enzymatique des tyrosine kinases et des sérine/thréonine kinases, produisant l'activation des facteurs de croissance qui augmentent l'expression de gènes dits « rédox-sensibles » comme le NF-κB (Taniyama & Griendling, 2003).

Les ERO ont une demie-vie très courte et sont impliquées dans la défense immunitaire de certaines cellules comme les neutrophiles et les macrophages. Les sources les plus importantes des ERO sont la NAD(P)H oxydase, la xanthine oxydase, la chaîne respiratoire des mitochondries et l'oxyde nitrique synthase (NOS) découplée (Tsutsui, 2004).

- La NAD(P)H oxydase est un complexe enzymatique capable de produire la majorité de l'anion superoxyde (O₂^{•-}) et tous les radicaux libres dérivés à partir de la nicotinamide adénine dinucléotide (NADH) et de la nicotinamide adénine dinucléotide phosphate (NADPH) (Wu et al., 2005) (**Figure 5**). L'activation de la NAD(P)H oxydase est une source intracellulaire importante de radicaux libres conduisant à l'activation d'une variété d'évènements de signalisation causant l'expression de cytokines pro-inflammatoires, l'hypertrophie, la transcription de gènes et la migration cellulaire (Impellizzeri et al., 2010; Kim et al., 2010). Dans des cas de douleurs neuropathiques accompagnées d'une lésion d'un nerf périphérique, la NAD(P)H oxydase peut être suractivée (Ibi et al., 2008; Kim et al., 2010), ce qui occasionne des effets délétères (dommages à l'ADN et aux protéines).

- La xanthine oxydase (XO) est une enzyme qui catalyse l'oxydation de l'hypoxanthine en xanthine dans la voie du métabolisme des purines (Puddu et al., 2008). La XO est activée par des médiateurs pro-inflammatoires et elle est augmentée par l'activité de la NAD(P)H oxydase (Puddu et al., 2008). L'activation de la XO peut aussi participer à la dysfonction de la signalisation rédox conduisant à la destruction de gènes et de protéines (Li & Shah, 2004).

- la chaîne respiratoire des mitochondries est caractérisée, dans les conditions normales, par le transport d'électrons qui produit de manière constitutive les ERO. Dans les conditions pathologiques, une mauvaise défense antioxydante peut conduire à la surproduction d'ERO par la mitochondrie. Par exemple, il a été démontré que les niveaux des ERO sont augmentés dans les neurones de la corne dorsale de la moelle épinière dans un modèle de neuropathie (Park et al., 2006).

- l'oxyde nitrique synthase existe sous trois isoformes: endothéliale (eNOS), neuronale (nNOS) et inductible (iNOS) (Ortiz & Garvin, 2003). Ces enzymes produisent le NO (vasodilatateur) en consommant de l'arginine (Lassegue & Griendling, 2004). Le NO réagit avec l'anion superoxyde et produit du peroxynitrite. Les NOS sont potentiellement impliqués dans l'entretien de la douleur neuropathique. Par exemple, des études ont démontré, dans un modèle de lésion d'un nerf périphérique, que le NO contribue à la douleur neuropathique par la voie NO-cGMP-PKG ainsi que par la voie NO-peroxynitrite (Tanabe et al., 2009).

De plus, une augmentation significative des niveaux de NO a été mesurée dans le nerf sciatique ligaturé (Naik et al., 2006).

1.3.2 Les antioxydants

L'utilisation de molécules antioxydantes a permis de réduire les niveaux d'ERO cellulaires de diverses manières, contribuant à ralentir ou même à renverser les douleurs neuropathiques. Le blocage du stress oxydatif par l'ajout à l'alimentation d'antioxydants tels que l'acide alpha-lipoïque (Maddux et al., 2001; Kamenova, 2006; Lungu et al., 2007), la N-acétyl-L-cystéine (NAC) (Zafarullah et al., 2003; Kockar et al., 2010), la vitamine C (acide ascorbique), la vitamine E (tocophérol) (Chen et al., 2001; Kockar et al., 2010) ou le resvératrol (vin rouge) (Kovacic & Somanathan, 2010) a montré des effets bénéfiques *in vitro* et *in vivo* sur le stress oxydatif et les douleurs neuropathiques. Dans notre laboratoire, le NAC a révélé un effet analgésique dans un modèle de neuropathie diabétique (Ismael et al., 2008). Suivant ce principe, le NAC a été utilisé dans notre projet afin de déterminer son effet sur les douleurs neuropathiques et l'expression du RB₁ après la ligature partielle du nerf sciatique.

Dans des conditions physiologiques, les ERO en excès sont détruits naturellement par des enzymes antioxydantes endogènes, ce qui permet de contrôler leur cascade de signalisation. Par contre, dans des cas de pathologies la production d'ERO n'est pas éliminée par la défense antioxydante endogène (situation de stress oxydatif), ce qui résulte en des réponses physiologiques anormales (Lyle & Griendling, 2006).

En effet, les ERO sont éliminées par des enzymes antioxydantes qui se trouvent dans les cellules, surtout dans la mitochondrie, tels que la catalase et la superoxyde dismutase (Zeman et al., 2006; Zhang & Qiu, 2007) (**Figure 5**).

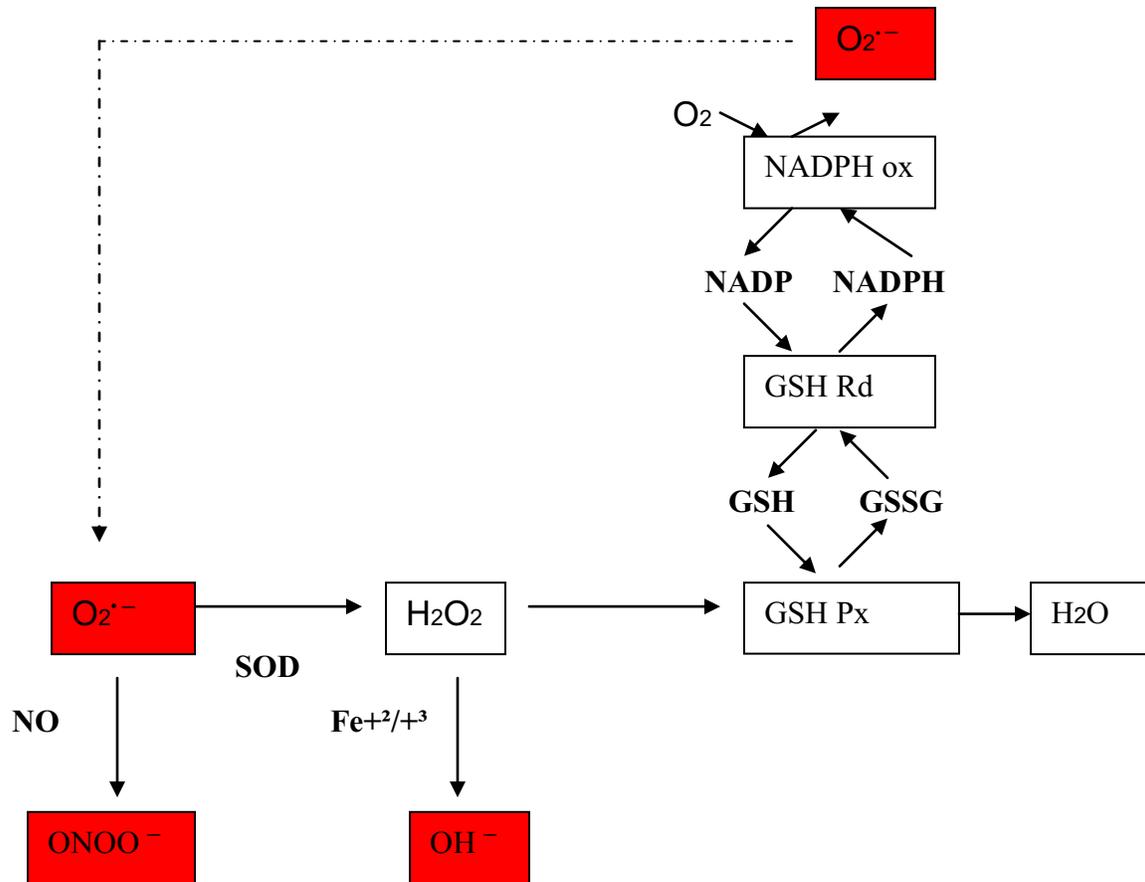


Figure 5. La formation et l'élimination des différentes espèces réactives oxygénées

Les ERO sont représentées en rouge. L'anion superoxyde $O_2^{\cdot-}$ est réduit par la superoxyde dismutase (SOD) pour former le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2). Il peut aussi réagir avec le monoxyde d'azote (NO) pour former le peroxinitrite ($ONOO^-$). Le H_2O_2 peut être oxydé par le Fer et devenir ainsi un radical hydroxyl ($OH^{\cdot-}$) ou bien il peut être reconverti en eau par la catalase ou par l'action catalytique de la glutathion peroxydase (GSH-Px). Au cours de la réaction catalytique de la GSH-Px, le glutathion réduit (GSH) est oxydé (GSSG) par la GSH-Px. Le GSH peut être régénéré par la glutathion réductase (GSH-Rd), qui utilise le nicotinamide adénine dinucléotide phosphate (NADP⁺) comme co-substrat, produisant ainsi du NADP⁺ réduit (NADPH). A l'état actif, le complexe NADPH oxydase génère des anions superoxyde grâce à un transfert d'électrons qui s'établit du NADPH vers l'oxygène moléculaire.

1.4 La douleur

Selon la définition de l'IASP (International Association for Study of Pain), la douleur est une expérience sensorielle et émotionnelle désagréable associée à un dommage tissulaire présent ou potentiel ou décrit en termes d'un tel dommage.

Elle est toujours subjective et peut varier d'un individu à l'autre. Chaque personne en apprend la signification par l'expérience dès les premiers moments de la vie.

La douleur comporte 2 composantes: 1- la composante somatique (la nociception) qui est un mécanisme neurophysiologique permettant le décodage de la qualité, de l'intensité, de la durée, et de la localisation de la douleur; 2- la composante affective-émotionnelle qui confère à la douleur sa tonalité désagréable, agressive et pénible. Ceci peut évoluer vers des états voisins de l'anxiété ou de la dépression.

Dépendant de la durée ou de son origine, la douleur peut être aiguë ou chronique. La douleur aiguë est un signal d'alarme qui permet de rechercher la cause; elle a un rôle protecteur. Elle est rapide et transitoire après l'application du stimulus nocif, mais souvent intense. La douleur chronique est une douleur qui persiste pendant plus de 3 mois et qui est associée à la destruction tissulaire. Etant donné que le patient éprouve la douleur sur une longue durée, ceci influence fortement son activité quotidienne et sa qualité de vie.

On classe la douleur chronique en douleur neuropathique (lésion du système nerveux périphérique et/ou central) et en douleur nociceptive, qui à son tour peut être viscérale ou somatique (lésion des tissus et des organes) (Porreca et al., 2002).

1.4.1 La nociception

Le phénomène de la douleur juxtapose plusieurs paramètres différents. De la périphérie aux centres nerveux supérieurs, l'information nociceptive chemine par quatre étapes principales marquées par une série de réactions chimiques et électriques: transduction sensorielle, transmission, modulation et perception (**Figure 6**). La transduction sensorielle correspond à la transformation des stimuli mécanique, thermique et chimique en signal chimio-électrique dans les terminaisons nerveuses sensorielles spécialisées. Ensuite la transmission de l'influx suit trois enchaînements: des nocicepteurs en périphérie aux neurones nociceptifs de 2^e ordre de la corne dorsale (ou leur équivalent pour les nerfs crâniens), puis aux neurones de 3^e ordre qui projettent du tronc cérébral ou du thalamus au cortex. La modulation se fait par les neurones qui modulent la transmission synaptique sur ce parcours avant que l'influx n'atteigne le cortex où se fait la perception qui est la sensation désagréable (l'expérience de la douleur). Le message nerveux reçu par le cerveau entraîne d'une part la perception de la douleur et initie des comportements et des réflexes autonomiques et moteurs (Marchand et al., 2005).

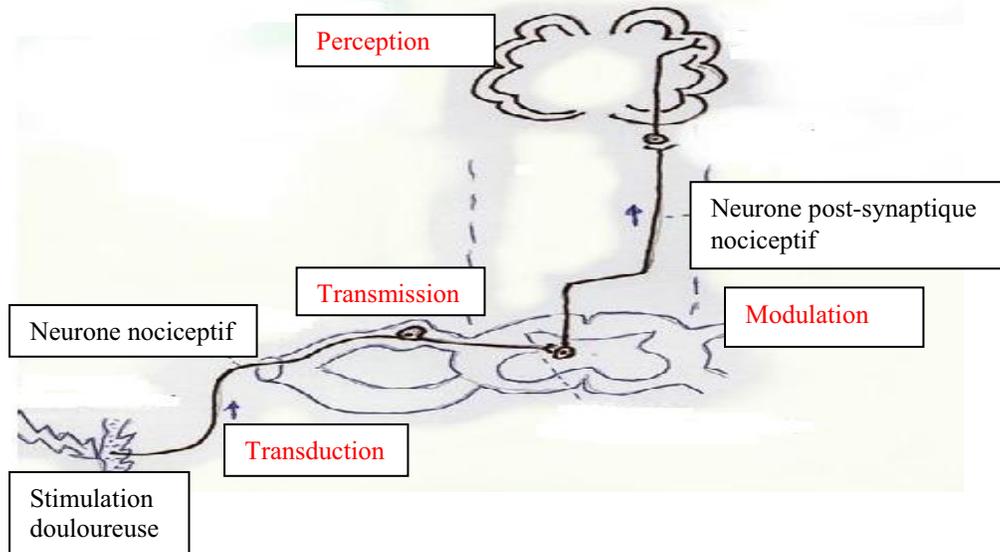


Figure 6. Physiologie des voies de la douleur. Inspiré de Marchand et al., 2005.

1.4.1.1 Les nocicepteurs

Chez les mammifères, les premiers intervenants de la transmission de la douleur sont les nocicepteurs, qui sont des terminaisons nerveuses libres disséminées un peu partout dans l'organisme (sur toute la surface du corps mais aussi dans les muscles, les tendons et les viscères) (Besson et al., 1982). Un nocicepteur est un récepteur sensoriel à haut seuil qui ne répond qu'à des stimulations fortes (nociceptive et dommageable), lesquelles provoquent une douleur (Besson et al., 1982). Fréquemment, les nocicepteurs sont définis par les propriétés des fibres nerveuses auxquelles ils sont reliés.

Il existe trois types de nocicepteurs : Les nocicepteurs mécaniques qui répondent à la piqûre, au pincement ou à la torsion de la peau avec une décharge qui dure tout le temps de la stimulation, sans adaptation. Les fibres afférentes sont essentiellement de type A delta. Les nocicepteurs thermiques répondent à des stimuli thermiques élevés ($> 45^{\circ} \text{C}$) ou bas ($< 10^{\circ} \text{C}$). Ils sont liés essentiellement à des fibres amyélinisées (fibres C). Les

nocicepteurs polymodaux répondent à la fois à des stimuli nociceptifs mécaniques, thermiques et chimiques. Ils sont liés à des fibres sensorielles de type C amyélinisées. Ces nocicepteurs constituent près de 70% des fibres sensorielles contenues dans un nerf cutané. Certains nocicepteurs sont dits “silencieux” (ne sont pas activés par des stimuli nocifs) car ils ne répondent que lorsque le système est sensibilisé, notamment en présence d’une inflammation (Julius & Basbaum, 2001).

1.4.1.2 Les fibres sensorielles (Afférences nociceptives)

Pour les nerfs spinaux, l’information recueillie par ces nocicepteurs périphériques est véhiculée dans un neurone primaire qui projette à la corne dorsale de la moelle épinière, en passant par le ganglion de la racine dorsale (GRD). Ce dernier contient les corps cellulaires des neurones sensitifs pseudo-unipolaires, c'est-à-dire qu’ils ne donnent naissance qu’à un seul axone qui bifurque pour aller d’un côté vers la périphérie et de l’autre vers la corne dorsale de la moelle (Milligan & Watkins, 2009) (**Figures 7-8**).

Il existe différents types de fibres nerveuses sensorielles ($A\alpha$, $A\beta$, $A\delta$ ou C) (Tamburin et al., 2011) (**tableau 1**). On distingue les fibres sensorielles selon leur diamètre et l’épaisseur de la gaine de myéline qui entoure leur axone. Ces deux facteurs influencent la vitesse de conduction de l’influx nerveux; plus le diamètre d’une fibre est grand et plus elle est myélinisée, plus cette fibre conduira l’influx nerveux rapidement.

- Les fibres $A\alpha$: sont les fibres myélinisées de gros diamètre. Ces fibres ont une sensibilité profonde consciente proprioceptive et pallesthésique (sensibilité vibratoire) et une sensibilité inconsciente à l’étirement et à la pression musculaire (Vleggeert-Lankamp et al., 2004). Ces fibres non cutanées ne sont pas nociceptives. Les organes tendineux de Golgi: situés dans les ligaments sont innervés par les fibres $A\alpha$ et renseignent sur la

position articulaire. Ils sont sensibles à la tension du muscle (proportionnelle à la force) et aux contraintes importantes et prolongées (Swett et al., 1964).

- Les fibres A β : sont de grosses fibres myélinisées à conduction rapide qui encodent les informations non nociceptives (comme le toucher, pression légère, vibration) à l'exception des fibres A β de la pulpe dentaire, lesquelles ont une fonction de nociception. Les fibres A β peuvent participer aussi à la modulation de la douleur dans les conditions pathologiques. Ces fibres projettent dans les couches III, IV, V de la corne dorsale et expriment le neurofilament des axones myélinisés NF200.

- Les fibres A δ : sont des fibres myélinisées de petit calibre responsables de la première douleur, rapide et bien localisée. Ces fibres contiennent la substance P et le CGRP qui sont régulés par le NGF (nerve growth factor). Elles expriment le NF200 et le récepteur TRPV1 (transient potential receptor vanilloid type 1) et projettent dans les couches I, III et IV.

- Les fibres C: sont de fines fibres amyélinisées responsables de la seconde douleur, plus tardive et diffuse, de type brûlure. Elles ont un rôle important pour ce qui est de l'intensité de la douleur ressentie. On classe les fibres C en deux types : a) les fibres C peptidergiques qui contiennent la substance P et le CGRP, régulés par le NGF. Ces fibres expriment le récepteur NK-1 de la substance P, le récepteur TRPV-1 et le récepteur TrkA (tyrosine kinase A) du NGF. Ces fibres projettent dans les couches I et II externe; b) les fibres C non-peptidergiques sont caractérisées par l'absence de peptides et par la présence de proto-oncogène tyrosine kinase Ret et des récepteurs GFR α -1 du GDNF (glial cell line-derived neurotrophic factor). Elles expriment le récepteur purinergique P2X3

et aussi le TRPV-1. Ces fibres possèdent un seuil plus élevé et projettent dans la couche II profonde.

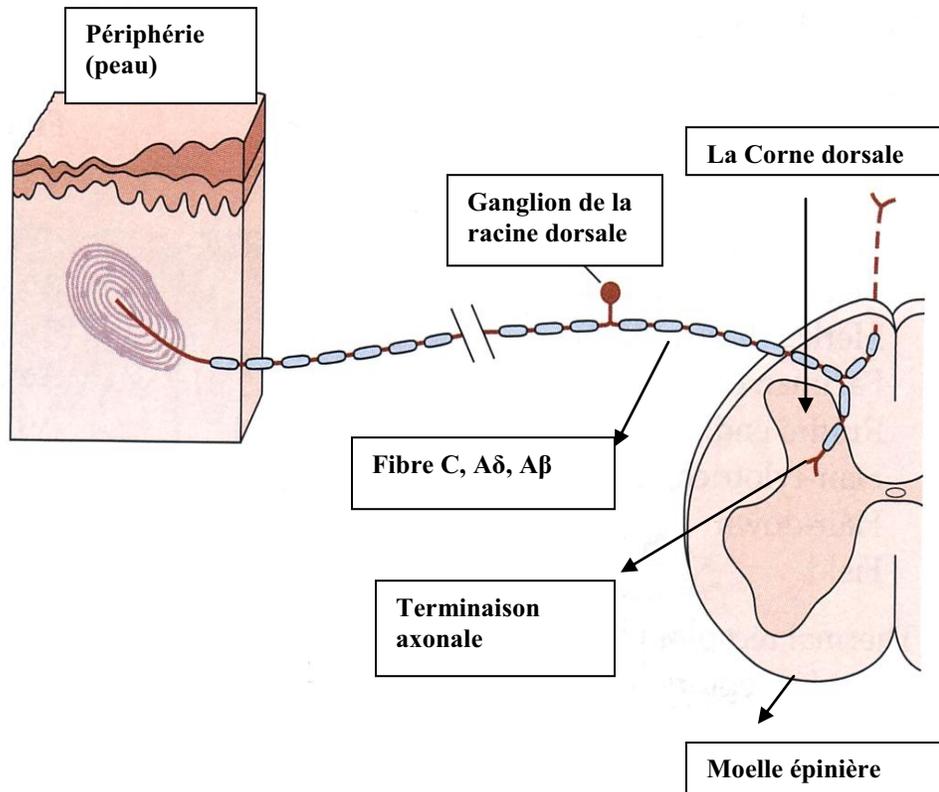


Figure 7. La transmission de l'influx nerveux par les fibres sensorielles primaires

Tableau 1 : Les caractéristiques des fibres sensorielles

Type de fibre sensorielle	Information véhiculée	Gaine de myéline	Diamètre(en micro-mètres)	Vitesse de conduction (en m /s)
Aβ	Toucher	myélinisée	6 – 12	35 - 90
Aδ	Douleur (mécanique et thermique)	myélinisée	1 – 5	5 - 40
C	Douleur (mécanique, thermique et chimique)	non–myélinisée	0.2 – 1.5	0,5 - 2

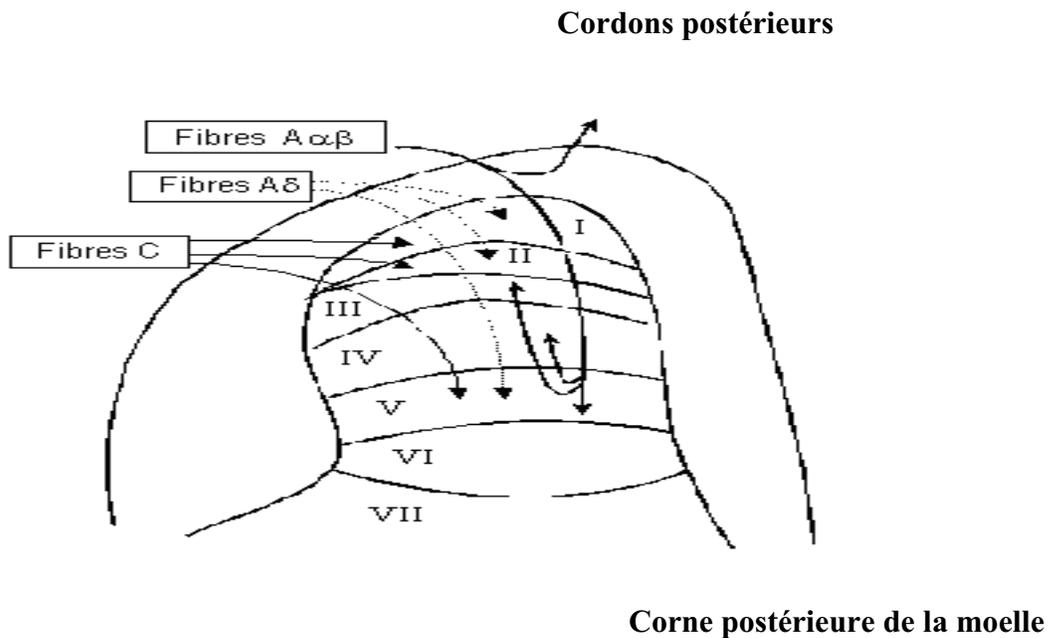


Figure 8. Les couches de la corne dorsale de la moelle épinière

1.4.2 Les voies ascendantes de la douleur

Dans la moelle, un neurone secondaire croise le plan sagittal et se prolonge dans la voie antéro-latérale jusqu'au thalamus. En effet la majorité des axones des neurones secondaires passe du côté opposé de la moelle pour former les principales voies ascendantes. Dans le thalamus, un troisième neurone envoie les informations nociceptives vers différentes régions du cortex et du système limbique (Jessell, 2000). Il existe trois voies principales qui peuvent véhiculer les informations nociceptives (Millan, 1999).

- La voie spinoréticulée

Origine : concerne les fibres C des couches VII et VIII, sans discrimination distincte de la douleur car les informations de cette voie sont reçues par des neurones à grand champ récepteur périphérique. Projection : les axones de ces fibres cheminent d'abord dans la formation réticulée au niveau du tronc cérébral (la medulla, le pons et le mésencéphale) où ils font synapse avec les neurones de 3^e ordre, qui à leur tour projettent dans le thalamus et l'hypothalamus (Willis & Westlund, 1997).

- La voie spinothalamique

1) Voie néospinothalamique : origine : concerne les fibres A δ (douleur rapide et aiguë) des couches I et V. Les neurones de cette voie ont de petits champs récepteurs qui permettent de localiser précisément d'où vient la douleur. Leurs axones projettent au noyau ventropostérolatéral du thalamus où ils font synapse avec les neurones de 3^e ordre, qui à leur tour projettent au cortex somatosensoriel du lobe pariétal (S1-S2) (Willis & Westlund, 1997)

2) Voie paléospinothalamique : origine : neurones de 2^e ordre des couches II, III, V recevant leur inputs des fibres C (douleur lente) et A δ . Les neurones de cette voie ont un

champ récepteur périphérique très vaste, ce qui rend difficile la localisation de la douleur. Leur axones projettent au noyau intralaminaire du thalamus où ils font synapse avec les neurones de 3^e ordre, qui à leur tour projettent au cortex préfrontal, au cortex cingulaire et à l'insula. Cette voie est associée à la perception émotionnelle et à l'aspect désagréable de la douleur.

- **La voie spinomésencéphalique** : origine des neurones des couches I et V.

Projection : la formation réticulée du mésencéphale et la substance grise périaqueducale.

Cette voie est aussi associée à la composante affective qui exprime la connotation pénible rattachée à la perception douloureuse (Lamont et al., 2000).

1.4.3 Les mécanismes de la douleur

1.4.3.1 Sensibilisation périphérique et centrale

Plusieurs médiateurs périphériques sont impliqués dans des cascades d'évènements comme l'inflammation, la transmission neuronale de la douleur et la sensibilisation périphérique des nocicepteurs (Guilbaud & Besson, 1997) (**Figure 9**). Certains médiateurs sont relâchés au site du dommage tissulaire dont les prostaglandines, l'histamine, la substance P, l'ATP, l'ADP, l'AMP, la bradykinine, le glutamate, les interleukines, les protons, le potassium et le TNF- α (facteur nécrosant de tumeur alpha) (Milligan & Watkins, 2009). Ces médiateurs stimulent les terminaisons nerveuses périphériques des fibres C, provoquent la production du NGF et la libération de neuropeptides (SP et CGRP). La SP active à son tour les mastocytes ou les neutrophiles. Leur dégranulation libère de l'histamine et de la sérotonine qui excitent directement les

Médiateurs périphériques

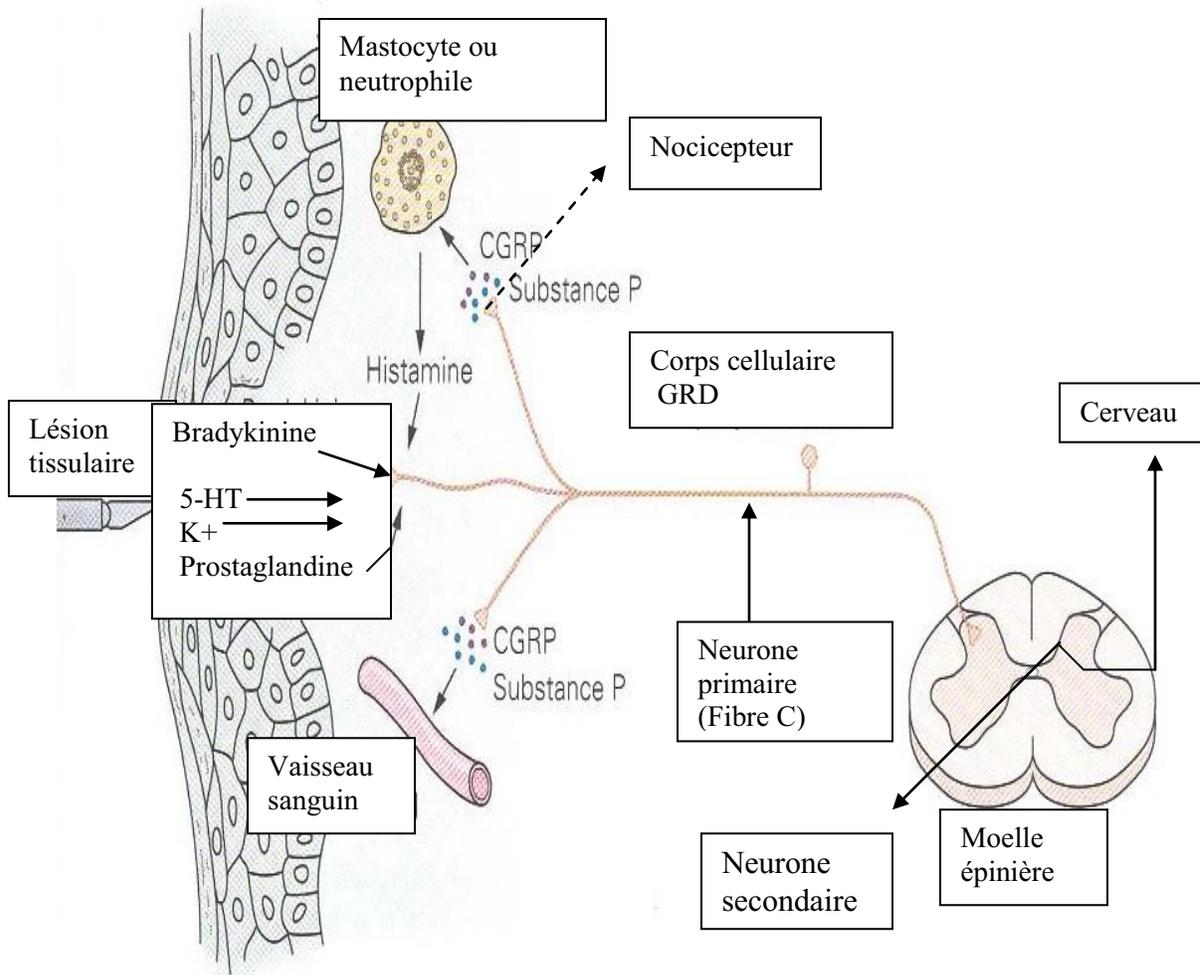


Figure 9. Les médiateurs périphériques impliqués dans la douleur inflammatoire.
Adapté d'après Lembeck et Gamse, 1982.

nocicepteurs. La relâche de la bradykinine et autres peptides vasoactifs mène à la libération des facteurs endothéliaux (NO, PGI₂, EDHF) qui sont capables de produire une vasodilatation, l'œdème et la sensibilisation des nocicepteurs (Lembeck & Gamse, 1982; Chuang et al., 2001; Couture et al., 2001; Webb et al., 2010).

La transmission synaptique entre les nocicepteurs et les neurones de la corne dorsale est relayée par les neurotransmetteurs peptidergiques et les acides aminés excitateurs présents dans les fibres de type C et A δ . Le glutamate est le neurotransmetteur excitateur prédominant dans tous les nocicepteurs. Il est présent en abondance dans la corne postérieure de la moelle mais on le trouve aussi en périphérie participant ainsi aux mécanismes périphériques et centraux. L'activation des fibres A δ et C avec de faibles stimuli douloureux mène à la relâche de glutamate des terminaisons nerveuses afférentes dans la corne dorsale de la moelle épinière. Le glutamate active alors les récepteurs AMPA/kainate. Le récepteur NMDA demeure silencieux en présence de faibles concentrations de glutamate à cause de l'ion Mg²⁺ présent en son centre. Le récepteur NMDA est un canal ionique qui permet l'entrée de Ca⁺² dans la cellule lorsqu'il s'ouvre en présence de fortes concentrations de glutamate qui délogent le Mg²⁺ (Woolf & Mannion 1999). La sensibilisation centrale survient après une stimulation répétée des nocicepteurs. La libération synaptique de SP intervient et active le récepteur NK-1 qui entraîne l'activation de la PKC. Ceci cause la phosphorylation du récepteur NMDA engendrant l'augmentation de l'influx de Ca²⁺ (Milligan & Watkins, 2009) (**Figure 10**). La douleur chronique implique aussi une augmentation de l'expression des récepteurs mentionnés.

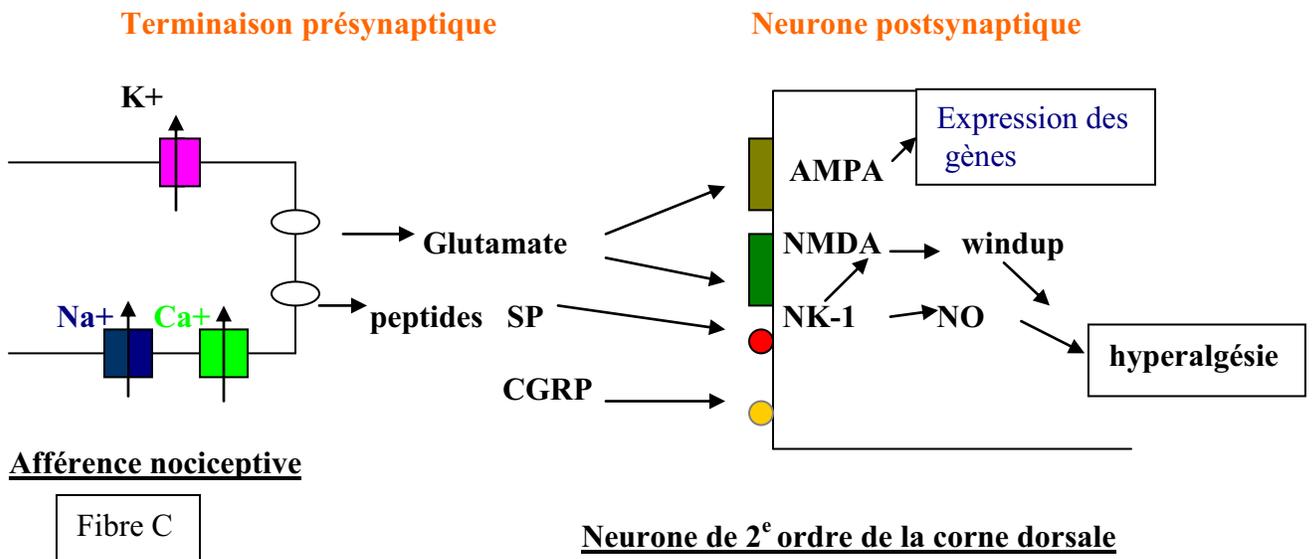


Figure 10. L'hyperalgésie et sensibilisation centrale. Inspiré de Marchand et al., 2005. Sensibilisation soutenue par l'augmentation de la relâche des médiateurs présynaptiques (Glutamate, SP, CGRP) de la fibre C. Ceux-ci agissent à leur tour sur les récepteurs post-synaptiques (NK-1, AMPA et NMDA) des neurones de 2^e ordre de la corne dorsale. Ce processus produit des modifications au niveau cellulaire (activation de gènes à expression rapide, la production du NO et l'hyperalgésie).

Le NGF (Nerve Growth Factor) joue un rôle prépondérant dans le processus de la sensibilisation à court et à long terme. Ce facteur de croissance stimule la synthèse et la libération des neuropeptides (SP et CGRP) et active directement ou indirectement les terminaisons nerveuses périphériques des fibres C via les cellules inflammatoires (Kidd & Urban, 2001). Le NGF est produit et libéré au site de l'inflammation puis il est transporté de façon rétrograde aux corps cellulaires des fibres C dans le GRD. Lors d'une lésion inflammatoire, la concentration de NGF augmente rapidement dans le corps cellulaire des fibres sensorielles (Donnerer & Amann, 1993). À long terme, le NGF est impliqué dans la régulation de l'expression de son récepteur TrkA, du RB₂ des kinases et

du récepteur TRPV1 (Bennett et al., 1996; Guilbaud & Besson, 1997; Amaya et al., 2004; Sango et al., 1994). Le NGF joue un rôle majeur dans la sensibilisation centrale qui est un phénomène d'hyperexcitabilité des neurones de la corne dorsale, caractérisé par la diminution du seuil d'activation et l'augmentation de la réponse à un même stimulus supraliminaire. Les symptômes de cette sensibilisation centrale (windup) peuvent demeurer au-delà de la guérison de la lésion et provoquer des douleurs chroniques ou une sensibilité particulière à la douleur (Mendell, 1966).

1.4.3.2 Prostaglandines dans les mécanismes de la douleur

Les prostaglandines sont des médiateurs lipidiques appartenant au groupe des eicosanoïdes qui sont issus du métabolisme d'acides gras polyinsaturés dont le principal est l'acide arachidonique produit par la phospholipase A₂ dans les membranes cellulaires. Par la suite, les cyclooxygénases-1 et -2 (COX-1 et COX-2) transforment l'acide arachidonique en endoperoxydes cycliques tels que la PGG₂ et la PGH₂ qui sont les précurseurs des PGs. L'expression de la COX-2 augmente en situation inflammatoire et cet enzyme est responsable de la formation accrue des prostaglandines. Ces médiateurs pro- inflammatoires exercent également des rôles physiologiques spécifiques en absence d'inflammation. Les effets thérapeutiques recherchés des anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS) sont liés à l'inhibition de la biosynthèse des prostaglandines via l'inhibition de la COX-1 pour la douleur aiguë d'origine inflammatoire (migraine) ou de l'inhibition de la COX-2 pour les douleurs chroniques (e.g. arthrite rhumatoïde). Récemment sont apparus sur le marché des inhibiteurs hautement sélectifs de la COX-2 tels que le célécoxib (Célébrex®) et le rofécoxib (Vioxx®) (Lane et al., 1997; Hawkey

et al., 1999). L'objectif du développement de ces nouveaux médicaments était de conserver une activité anti-inflammatoire et analgésique efficace tout en réduisant les risques de complications gastro-intestinales, hémorragiques et rénales des AINS.

1.4.4 Modulation de la douleur

En parallèle aux principales voies ascendantes qui conduisent les influx nociceptifs de la corne dorsale de la moelle épinière vers le thalamus (voie spinothalamique), le tronc cérébral (voie spinoréticulaire) et le mésencéphale (voie spinomésencéphalique), un système descendant de modulation (facilitatrice ou inhibitrice) contrôle la perception douloureuse (Millan, 2002). L'une des voies de modulation les mieux connues comprend le réseau décrit entre la substance grise périaqueducale (PAG), la médulla rostroventrale (MRV) et la moelle épinière. La PAG et aussi la MRV contiennent des neurones excitateurs et inhibiteurs, l'activation de ce système peut entraîner, selon les circonstances, une facilitation ou une inhibition de la sensation douloureuse (Tracey, 2007; Morgan et al., 2008). Plusieurs régions corticales et sous-corticales (les lobes frontaux, l'insula, l'amygdale et l'hypothalamus convergent vers le réseau PAG-RVM-moelle épinière et influencent la perception de la douleur (Tracey, 2007).

Selon le type de récepteurs et le site d'action, plusieurs médiateurs contribuent à ces voies descendantes: Le glutamate, le CGRP, la substance P, la cholécystokinine, les prostaglandines et l'histamine sont associés à une facilitation de la transmission dans les voies nociceptives alors que l'acide gamma amino-butyrique (GABA), la glycine et les cannabinoïdes endogènes sont souvent impliqués dans les modulations inhibitrices de la douleur. Les voies descendantes activent également des neurones enképhalinergriques dont l'action locale déclenche une profonde analgésie tant par l'inhibition des afférences

nociceptives que par l'inhibition post-synaptique des neurones de 2^e ordre au niveau spinal (Depaulis et al., 1987; Vaughan et al., 1997). Les opioïdes endogènes les plus importants libérés par ces neurones sont la β -endorphine, les enképhalines et la dynorphine agissant sur les récepteurs μ , δ et κ . En plus de l'effet antinociceptif, la dynorphine en agissant sur le récepteur κ possède un effet pro-nociceptif.

- L'action inhibitrice des voies sérotoninergiques descendantes s'exerce via les récepteurs 5-HT₃ et 5-HT_{1B} alors que l'action facilitatrice de ces mêmes voies s'exerce via les récepteurs 5-HT_{1A} (Zeitz et al., 2002). Plusieurs études tendent à montrer que les neurones porteurs de récepteurs NK-1 dans la lamina 1 de la moelle seraient à l'origine de la boucle impliquant la RVM et la voie descendante sérotoninergique qui contrôle l'excitabilité spinale et la sensibilité à la douleur (Mantyh et al., 1997; Suzuki et al., 2002).

- Les effets anti-et pro-nociceptif des voies descendantes noradrénergiques sont relayés par les récepteurs alpha-2 et alpha-1, respectivement.

- la dopamine a un effet antinociceptif via le récepteur D₂ ainsi que pro-nociceptif via le récepteur D₁ dans les neurones inhibiteurs de la moelle épinière.

- L'acétylcholine a un effet antinociceptif par l'amplification de la réponse alpha₂ noradrénergique et pro-nociceptif par l'excitation des afférences sensorielles primaires (Millan, 2002). Le monoxyde d'azote exerce aussi des effets anti- ou pro-nociceptifs.

1.4.5 La douleur neuropathique

La douleur neuropathique est la conséquence d'un dysfonctionnement du système nerveux central ou périphérique, généralement chronique et sévère. Elle se retrouve dans un grand nombre de situations pathologiques qui sont à l'origine des affections du

cerveau de la moelle épinière et des nerfs périphériques, incluant certaines maladies virales, le diabète, les cancers, les maladies auto-immunes, les complications après chimiothérapie ou radiothérapie ou interventions chirurgicales (Boulanger, 2005). La douleur neuropathique se manifeste par des symptômes variés pouvant aller du picotement à la sensation de brûlure désagréable, de souffrance, d'engourdissement ou la sensation de décharge électrique. Mais les deux grandes caractéristiques en matière de symptômes sont le développement d'allodynie et d'hyperalgésie. Ces deux paramètres sont les plus étudiés dans les différents modèles animaux de douleur neuropathique et peuvent s'exprimer d'une façon indépendante ou coexister (Nichols et al., 1999). Il est estimé que environ 1,5% de la population américaine souffre de douleur neuropathique et la prévalence augmente avec l'âge (Boulanger, 2005). La douleur neuropathique peut rester localisée ou s'étendre à différentes parties du corps. Les liens entre les étiologies, les symptômes et les mécanismes de cette douleur ne sont pas encore tous clarifiés.

1.4.5.1. Les signes cliniques de douleur neuropathique

La sémiologie des douleurs neuropathiques est riche. En effet, les patients décrivent des combinaisons variées de divers symptômes comprenant des douleurs spontanées, évoquées et de sensations anormales non douloureuses (Dubner, 1991; Truini et al., 2010).

Les douleurs spontanées causées en absence d'un stimulus peuvent être continues (souvent caractérisées comme des brûlures et rarement comme sensation de froid douloureuse et profonde) ou paroxystiques. Les douleurs évoquées sont des douleurs dépendantes d'une stimulation soit mécanique, chimique ou thermique.

Chez l'humain, plusieurs symptômes de la douleur neuropathique ont été relatés:

- Le paroxysme est une douleur produite normalement par un stimulus non douloureux qui est sous forme de choc électrique.
- La paresthésie (spontanée ou provoquée) est un trouble de la sensibilité, désagréable et non douloureux. Elle est générée par les fibres A β .
- La dysesthésie est une diminution ou exagération de la sensibilité (spontanée ou après stimulation).
- La douleur référée est causée par une douleur au niveau des tissus profonds ou des viscères.
- L'allodynie est une douleur produite normalement par un stimulus non douloureux (thermique ou tactile) qui est relayée par les fibres A δ et A β (Woolf et al., 1992; Nichols et al., 1999).
- L'hyperalgésie est une réponse exagérée à un stimulus douloureux (thermique, mécanique ou chimique) qui peut être primaire ou secondaire et elle est transmise par les fibres C (Baumann et al., 1991; Yeomans & Proudfit, 1996).

1.4.5.2 Le rôle des cellules gliales dans la douleur neuropathique

Les cellules gliales sont considérées comme des nouveaux acteurs dans la douleur neuropathique (Milligan & Watkins, 2009) et des médiateurs clés de la réponse immunitaire du système nerveux central (Austin & Noalem-Taylor, 2010).

Lors d'une inflammation chronique ou d'une lésion nerveuse, une sensibilisation centrale soutenue entraîne des changements transcriptionnels et des altérations des fonctions pour une période prolongée des neurones de la corne dorsale. Lorsque les neurones afférents relâchent de l'ATP, du glutamate et de la substance P, ces derniers stimulent les astrocytes et la microglie qui à leur tour relâchent de l'ATP et du glutamate, ce qui active

les neurones et les cellules gliales avoisinantes (Milligan & Watkins, 2009). En effet, les astrocytes et la microglie peuvent changer les fonctions synaptiques et l'excitabilité des neurones par différents mécanismes (Halassa et al., 2007; Pocock & Kettemmann, 2007).

- **Les astrocytes** : expriment les récepteurs NMDA et AMPA au glutamate et le récepteur NK-1 de la substance P (Porter et McCarthy, 1997). Les astrocytes répondent, lors d'une douleur, à une activité synaptique en mobilisant le calcium intracellulaire, ce qui induit la relâche des molécules pro-inflammatoires comme le glutamate, l'ATP qui se lie au récepteur P2X4, TNF- α , IL-1 β , l'IL-6, NO et la PGE₂ (Fellin et al., 2006; Parpura et al., 1994).

- **La microglie** : exprime des récepteurs Toll-Like (TLR-2,3 et 4) qui sont sensibles aux différentes substances inflammatoires endogènes libérées lors de douleur neuropathique et aussi à des signaux moléculaires exogènes (Obata et al., 2008; Reed-Geaghan et al., 2009). Une étude a montré que les cellules gliales (astrocytes et microglie) dans la moelle épinière expriment le RB₁ des kinines chez le rat STZ-diabétique. Dans ce modèle de douleur neuropathique, l'inhibition de la microglie avec le fluorocitrate et la minocycline a renversé l'hyperalgésie thermique et l'allodynie (tactile et au froid) (Talbot et al., 2010). De plus, les douleurs neuropathiques sont renversées par l'antagoniste du récepteur TLR-4 dans un modèle de lésion du nerf sciatique (Hutchinson et al., 2007). Les cellules gliales secrètent des cytokines pro-inflammatoires comme le TNF- α et l'IL-1 β qui contribuent à l'établissement de la douleur neuropathique en produisant une plus grande entrée de calcium et une plus grande production de PGE₂ et de NO à la suite de l'ouverture des canaux NMDA (Beattie et al., 2002; Stellwagen & Malenka, 2006). L'activation de la microglie et des astrocytes est maintenue respectivement par les

métalloprotéinases de matrice 9 (MMP9) et 2 (MMP2), qui causent la transformation de la pro-IL-1 β en IL-1 β qui active la p38 MAPK. Ce dernier conduit également à l'activation du facteur de transcription NF- κ B. Aussi, l'activation des astrocytes et de la microglie est produite par la fixation de l'IL-6 sur les récepteurs spécifiques des chémokines comme CCR2 (chemokine (C-C motif) receptor 2). Après une atteinte nerveuse, des protéines « heat shock » (HSPs) sont relâchées et peuvent se fixer aux récepteurs Toll-like (TLRs) exprimés sur les astrocytes et la microglie ainsi que sur les fibres C et A δ , contribuant d'autant plus à l'activation de ces types cellulaires (Milligan & Watkins 2009) (**Figures 11-12**).

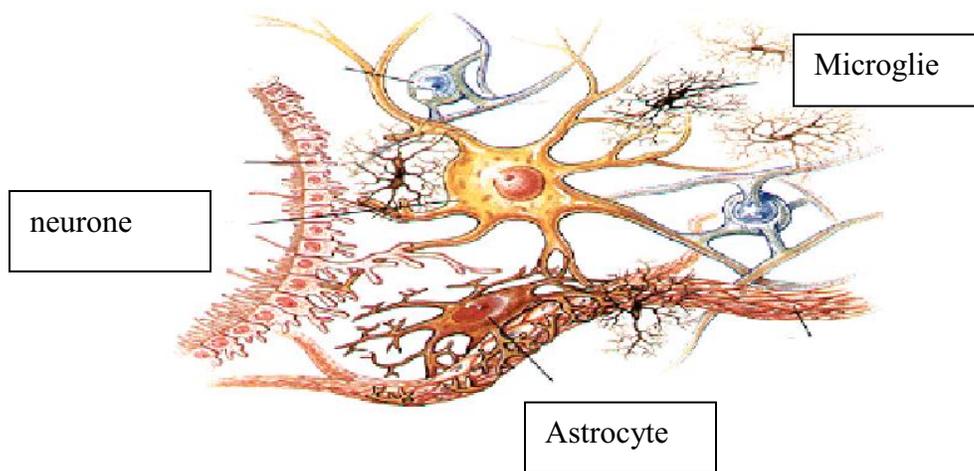


Figure 11. Organisation des cellules gliales autour des neurones. Inspiré de Qin et al., 2006

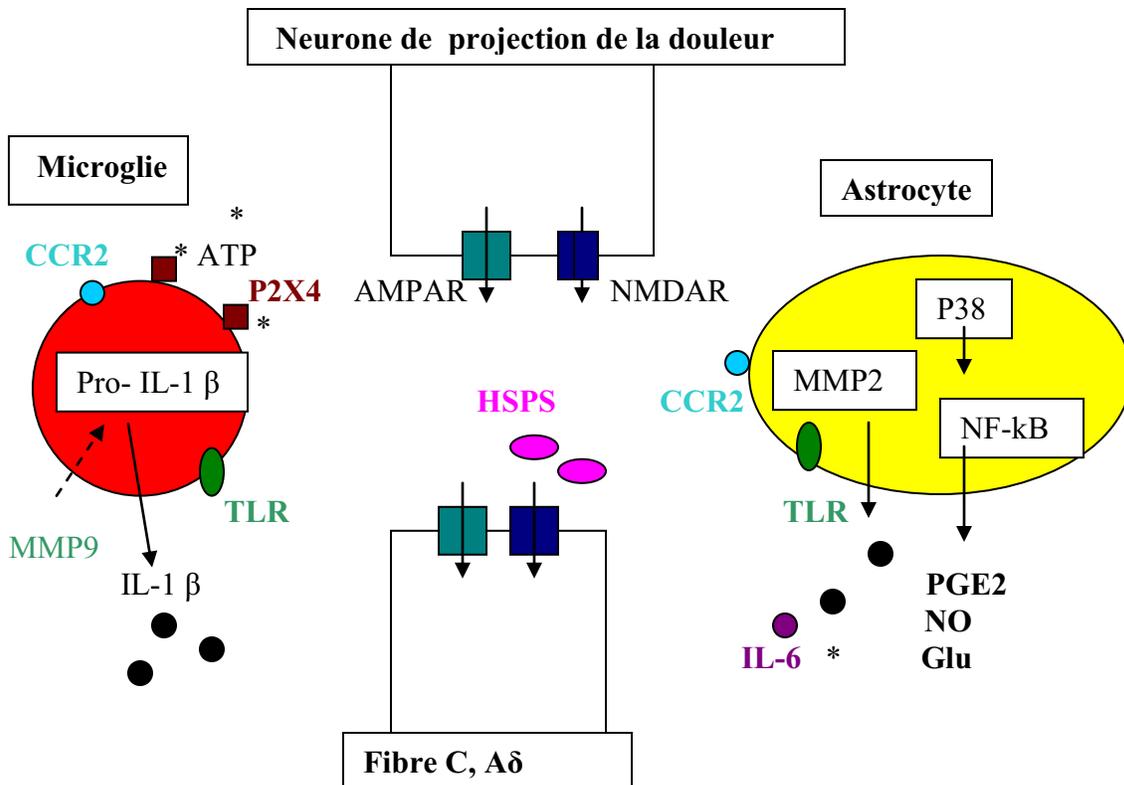


Figure 12. Implication de la microglie et des astrocytes dans la douleur neuropathique. Inspiré de Milligan & Watkins, 2009.

1.4.5.3 Le traitement de la douleur chronique

Bien que la recherche ait fait de considérables progrès dans la compréhension des voies de la douleur et de la topographie des récepteurs impliqués dans ce phénomène, le traitement de la douleur chronique associée aux différentes pathologies reste encore un problème majeur. Plusieurs classes de médicaments antalgiques et anti-inflammatoires sont utilisées pour diminuer ou supprimer la douleur agissant par voie centrale ou périphérique (Willis & Coggeshall, 2004).

Pour le traitement de la douleur neuropathique, plusieurs stratégies thérapeutiques incluant les anti-inflammatoires non stéroïdiens et les opioïdes ont été utilisées, et parfois même avec un recours à des traitements adjuvants comme les anticonvulsifs

(gabapentine, phénytoïne), les antidépresseurs (amitriptyline, chlorimipramine), les antispasmodiques, les corticoïdes, les anxiolytiques et les myorelaxants et ce en fonction de la pathologie sous-jacente. Malheureusement, malgré ces multiples approches thérapeutiques, la douleur neuropathique reste difficile à contrôler et les effets secondaires sont souvent inévitables. Donc le besoin de développer de nouvelles approches thérapeutiques devient une priorité. Et pour ce faire, il faut arriver à déterminer les acteurs impliqués dans chaque type de douleur, à savoir les récepteurs. Plusieurs antagonistes peuvent bloquer leurs effets tels les antagonistes des récepteurs TRPV1 (Pomonis et al., 2003; Suh et al., 2003), NMDA (Matsumoto et al., 2008; Leem et al., 2010), AMPA (Yoshimura & Yonehara, 2006) et des récepteurs B₁ et B₂ des kinines (Su et al., 2003; Gougat et al., 2004). De plus, l'utilisation de plusieurs antioxydants, en particulier l'acide α -lipoïque, a corrigé avec succès les polyneuropathies diabétiques chez l'homme (Ametov et al., 2003; Ziegler et al., 2004).

1.4.5.4 Modèle animaux de douleur neuropathique

Les modèles animaux utilisés en recherche nous permettent de mieux comprendre les mécanismes physiopathologiques impliqués dans les phénomènes douloureux et de tester l'efficacité de nouveaux composés thérapeutiques. Compte tenu de notre thème de recherche, notre choix de modèle de douleur neuropathique chronique est celui par blessure du nerf sciatique appelé le modèle de Seltzer (Seltzer et al., 1990). D'autres modèles animaux sont utilisés en recherche traitant aussi bien la douleur aiguë que chronique, comme les modèles de *paw pressure test* et *tail-flick test* pour la douleur aiguë et de CFA (complete Freund's adjuvant), capsaïcine et carragénine pour la douleur

inflammatoire chronique ainsi que les modèles de Bennett et Chung pour la douleur neuropathique chronique (Bennett & Xie, 1988).

La chimiothérapie, l'immunothérapie ainsi que des injections d'agents irritants par voie intradermique ou intrapéritonéale sont quant à elles utilisées afin de mimer des modèles de douleurs chroniques (**Figure 13**).

Techniques et modèles animaux de douleur neuropathique induite par la lésion du nerf sciatique

1) ligature partielle du nerf sciatique (*partial sciatic nerve ligation*- PSL)- le modèle de Seltzer par ligature partielle d'environ 30–50 % de la circonférence (Seltzer et al., 1990).

2) écrasement du nerf sciatique (*crush injury of the sciatic nerve*): tout le nerf ou uniquement des branches du nerf sciatique sont écrasées avec des pinces hémostatiques pendant 30 sec (Decosterd et al., 2004).

3) constriction chronique du nerf sciatique (*chronic constriction injury*- CCI) - le modèle de Bennett par 4 ligatures non serrées et espacées d'un mm autour du nerf sciatique (Bennett & Xie, 1988).

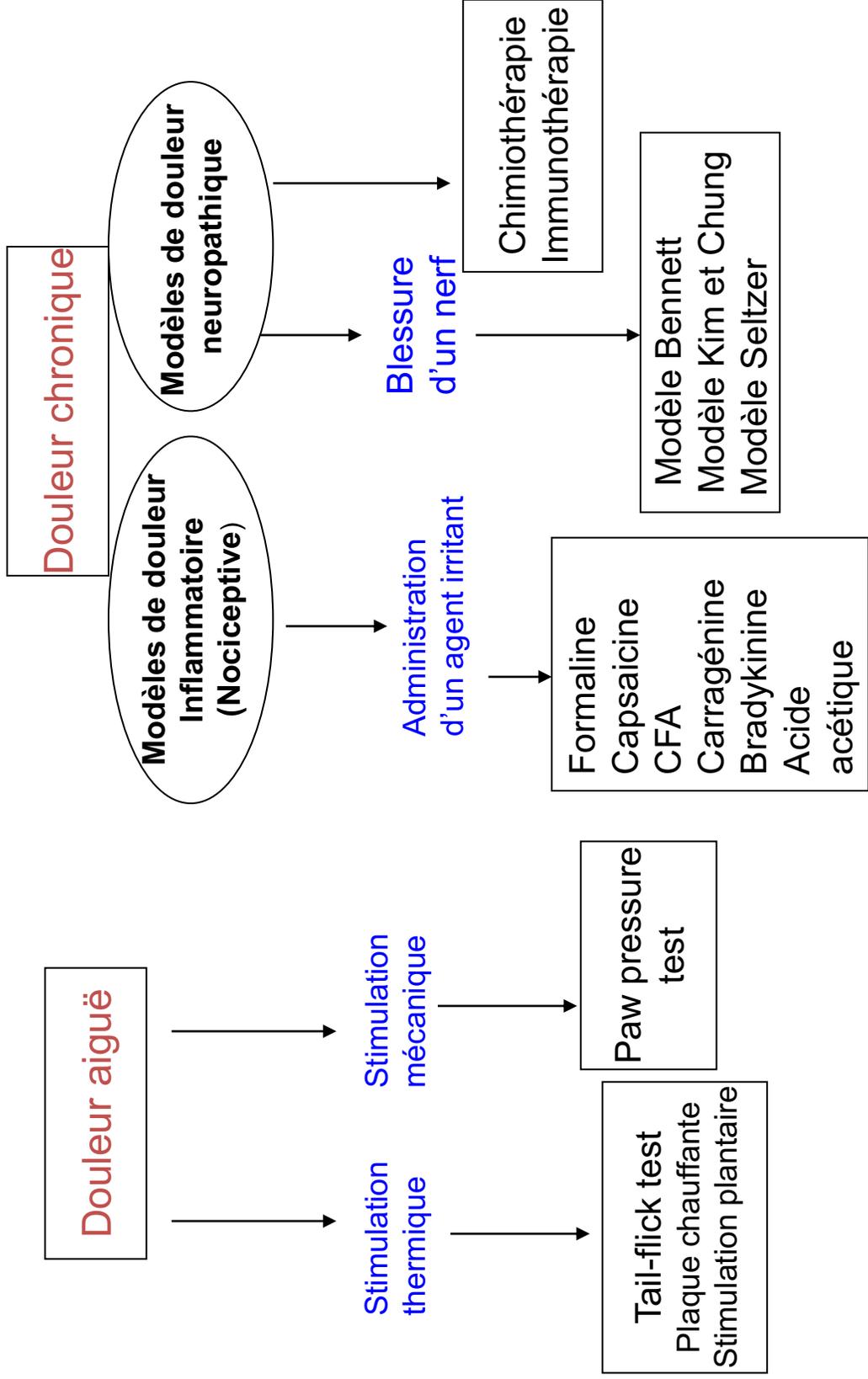


Figure 13. Modèles de douleur-classification

4) ligature spinale (*spinal nerve ligation*- SNL)- le modèle de Kim et Chung par ligature serrée des nerfs spinaux L5 et L6 (Kim & Chung, 1992).

5) «*spared nerve injury*» – le modèle Decosterd par ligature et axotomie des branches tibiales et péronières avec conservation de la branche surale (Decosterd & Woolf, 2000).

Le choix du modèle de Seltzer dans notre étude a été motivé par la simplicité de la technique chirurgicale occasionnant moins de traumatismes pour les animaux avec une excellente réponse post-opératoire comparativement à la méthode de Kim & Chung où la chirurgie est complexe et invasive pouvant avoir un impact sur l'induction du RB₁.

Quelques études ont utilisé des modèles de neuropathie diabétique qui manifestent l'allodynie et la perte de sensibilité (Lungu et al., 2007; Ismael et al., 2008; Dias et al., 2007; 2010; Talbot et al., 2009; 2010). Des évidences en biologie moléculaire ont démontré la présence du RB₁ dans la moelle épinière chez les rats diabétiques traités à la streptozotocine (STZ) (Ongali et al., 2004). Dans ce modèle, l'activation intraspinale du RB₁ induit une hyperalgésie thermique (Couture et al., 2001). De plus, les antagonistes ou la suppression du gène du RB₁ chez les souris STZ inhibent l'hyperalgésie thermique (Gabra et al., 2003, 2005). Des études ont aussi montré dans un modèle de résistance à l'insuline que l'utilisation d'un antioxydant (acide alpha-lipoïque) diminue les sites de liaison ou l'ARNm du RB₁ dans la moelle épinière (El Midaoui et al., 2005; Lungu et al., 2007).

1.4.5.5 Mécanismes physiopathologiques de la douleur neuropathique

Quelle que soit la cause, seulement 10% des lésions donnent lieu à des douleurs chroniques et il n'y a pas de facteurs prédictifs pour un patient donné. Un même mécanisme peut donner lieu à différents symptômes et un même symptôme peut relever de mécanismes différents. Plusieurs mécanismes, souvent variables avec le temps, peuvent être à l'œuvre chez un même patient.

Les mécanismes impliqués dans la douleur neuropathique sont de deux ordres: périphériques et centraux. La sensibilisation périphérique sollicite bien souvent le système nerveux sympathique avec une réduction du seuil à la stimulation thermo algésique (Xie et al., 1995). L'accumulation de canaux sodiques avec réduction des canaux potassiques sont observées au niveau des territoires nerveux affectés (Devor et al., 1994). Les données actuelles suggèrent que la douleur neuropathique implique d'avantage des mécanismes périphériques (Raja et al., 1999).

Au niveau central, les mécanismes sont plus complexes car ils impliquent une réorganisation structurelle de la corne dorsale de la moelle épinière avec bourgeonnement des fibres A β vers les cellules de la couche II, qui en temps normal reçoivent seulement les afférences C et A δ . Ceci a été démontré dans les modèles de constriction chronique et de ligature spinale du nerf sciatique (Woolf et al., 1992) et constitue à l'heure actuelle une des hypothèses pouvant expliquer l'allodynie accompagnant la douleur neuropathique. Des études plus récentes ont mis l'accent sur l'implication du stress oxydatif et la production d'espèces réactives oxygénées qui sont connues pour leur capacité à causer des dommages à l'ADN et à la fonction de divers récepteurs, enzymes et transporteurs des fibres nerveuses (Aruoma et al., 1989). Les dommages nerveux

induisent aussi une augmentation des réponses immunes impliquant l'infiltration des macrophages et l'activation des lymphocytes T avec une augmentation de l'expression des molécules pro-inflammatoires comme les cytokines. Une augmentation du NGF a été également observée dans les fibres intactes contrairement aux fibres nerveuses atteintes qui perdent l'influence de ces mêmes facteurs trophiques (Boucher & McMahon, 2001).

1.5 Transient Receptor Potential Vanilloid (TRPV)

Les TRPV sont des canaux ioniques classés selon leur action neurophysiologique (Caterina & Julius, 2001; Davis et al., 2000). Six sous-classes de TRPV ont été identifiées : TRPV1, TRPV2, TRPV3, TRPV4 ainsi que TRPV5 et TRPV6 qui sont un peu distincts des quatre premiers. Les paragraphes suivants n'aborderont que le TRPV1 qui est d'intérêt dans le cadre de ce mémoire.

1.5.1 Le TRPV1

Le *transient receptor potential vanilloid 1* (TRPV1) est un canal cationique non sélectif (Na^+ , Ca^{2+}). Ce canal est un intégrateur de stimuli douloureux chimiques et physiques. Il est activé par la chaleur (température supérieure à 43°C), un faible pH, certaines molécules endogènes lipidiques (anandamine), les produits de la lipoxygénase (leukotriènes) ainsi que par la capsaïcine (stimulus exogène) (**Figure 14**).

La capsaïcine est un composé lipophile à l'origine de la saveur piquante des extraits du piment (Conway, 2008).

Le TRPV1 est formé de protéines organisées en tétramère qui contient 4 sous-unités identiques dont chacune possède 6 domaines transmembranaires (Caterina et al., 1997). Selon un marquage spécifique du TRPV1, par autoradiographie, sa distribution la plus abondante se retrouve dans les couches superficielles de la corne dorsale de la moelle

épinière sur les terminaisons nerveuses des fibres C et A δ (Szallazi et al., 1994).

Des études récentes ont montré la surexpression du TRPV1 dans la moelle épinière chez le rat STZ-diabétique (Talbot et al., 2009) et le GRD dans un modèle de lésion d'un nerf périphérique (Ma et al., 2010).

Le récepteur TRPV1 impliqué dans la transmission du signal douloureux se trouve surexprimé sur les fibres sensorielles en périphérie lors de l'inflammation et ce phénomène contribue lui aussi à la sensibilisation des signaux nociceptifs (Milligan & Watkins, 2009). Le TRPV1 est connu pour son rôle dans l'hyperalgésie. La stimulation de ce récepteur en périphérie induit la dépolarisation de la fibre C, ce qui aboutit à la libération par exocytose de médiateurs de la douleur tels que la SP, le CGRP ainsi que la neurokinine A (NKA) et le glutamate (Lin et al., 2007b). Le stimulus inflammatoire entraîne l'activation du récepteur tyrosine kinase A (TrkA) par la fixation de son ligand NGF, puis son transport dans le GRD où il cause l'activation et la phosphorylation de la protéine p38. La p38 phosphorylée agit sur la traduction du TRPV1; une fois synthétisé, le TRPV1 est transporté principalement vers la terminaison nerveuse périphérique des fibres nociceptives et à un moindre degré vers l'extrémité nerveuse centrale (El-Hashim & Jaffal, 2009). L'augmentation de la synthèse de TRPV1 et son transport préférentiel sont à l'origine de l'augmentation de la sensibilité à la chaleur caractéristique de la douleur inflammatoire. De plus, la stimulation du TRPV1 augmente la production des espèces réactives oxygénées et des cytokines pro-inflammatoires dans un modèle de douleur neuropathique (Schaible et al., 2010).

Certains médiateurs de l'inflammation telles les prostaglandines ou la BK peuvent moduler l'activité du TRPV1 (Premkumar & Ahern, 2000; Chuang et al., 2001). La BK

module l'activité du TRPV1 par mécanisme de phosphorylation via la leucotriène B4 (Hwang et al., 2000). De plus, la BK via le RB2 peut activer la PKC qui induit alors la phosphorylation de l'extrémité C-terminale du canal ionique. Cette action réduit le seuil d'activation du TRPV1 qui peut alors être activé dans des conditions plus physiologiques.

1.5.2 TRPV1 comme cible thérapeutique

L'inhibition du récepteur TRPV1 s'avère une nouvelle avenue dans le traitement de la douleur chronique et inflammatoire. En effet, l'utilisation d'anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS) bloque la cascade enzymatique menant à l'activation du TRPV1 via les prostaglandines. L'administration d'un anticorps anti-NGF au cours de l'inflammation diminue la phosphorylation de p38 MAPK, l'augmentation de TRPV1 et l'hypersensibilité à la chaleur (Amaya et al., 2004) (**Figure 14**).

Les antagonistes du TRPV1 ont démontré des effets analgésiques contre la douleur découlant de l'inflammation et contre la douleur neuropathique (Caterina et al., 1997; Ohkubo & Shibata, 1997; Tominaga et al., 1998). Des études récentes ont montré des effets analgésiques favorables avec l'antagoniste du TRPV1, SB366791, dans un modèle murin de douleur due au cancer des os (Niiyama et al., 2009). Le SB366791 est un nouvel antagoniste sélectif du TRPV1. Il est utilisé dans notre projet de recherche afin d'évaluer son effet sur la douleur neuropathique (hyperalgésie et allodynie) dans le modèle de lésion du nerf sciatique.

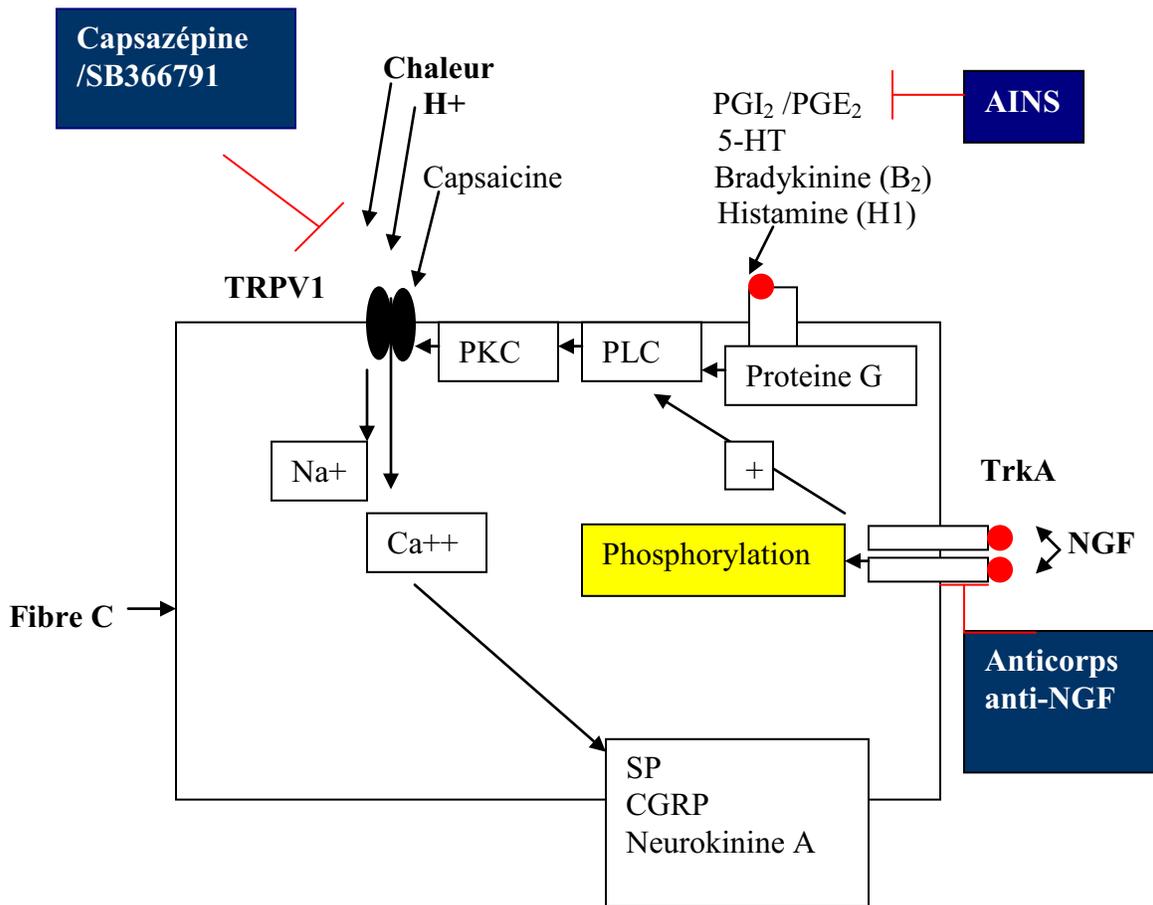


Figure 14. Résumé du mécanisme d'activation et d'inhibition du TRPV1

Les mécanismes de régulation du récepteur TRPV1 sont reliés par des mécanismes de phosphorylation et de déphosphorylation. Il existe un synergisme entre les différents médiateurs de l'inflammation. La phosphorylation du récepteur TRPV1 par BK, NGF et par d'autres médiateurs (Histamine, PGI₂ /PGE₂, 5-HT) cause une sensibilisation via la voie PKC qui abaisse le seuil d'excitabilité du canal. Plusieurs inhibiteurs permettent la désensibilisation des fibres sensibles périphériques (Fibre C) comme les antagonistes du TRPV1 (Capsazépine /SB366791), les AINS ainsi que les anticorps anti-NGF. Ceci réduit les peptides sensoriels comme la SP, le CGRP et la NKA dans la fibre C.

1.6 Les kinines dans l'inflammation et la douleur

Les premières études ont permis d'associer un rôle aux kinines dans l'inflammation, puisqu'elles reproduisent les quatre signes cardinaux de la réaction inflammatoire (douleur, chaleur, érythème et œdème) (Couture et al., 2001).

Le RB_2 est constitutif et est soumis à une désensibilisation et à une internalisation rapide compatible avec son rôle dans la phase aiguë de la douleur inflammatoire. Des sites de liaison du RB_2 ont été identifiés par autoradiographie dans la moelle épinière au niveau des couches superficielles de la corne dorsale, en particulier sur les terminaisons nerveuses des fibres sensorielles de types C et $A\delta$ (Lopes et al., 1995). La BK active le RB_2 et cause ainsi la douleur par stimulation directe de ces fibres nerveuses qui innervent les tissus. Cette stimulation permet aussi la libération antidromique des neuropeptides pro-inflammatoires tels que la SP et le CGRP par les terminaisons nerveuses de ces fibres en périphérie, contribuant au phénomène de l'inflammation neurogénique.

De plus, la BK peut sensibiliser les nocicepteurs par la stimulation de la formation d'autres médiateurs impliqués dans la douleur inflammatoire comme les prostaglandines, les cytokines et le NO. Les prostaglandines augmentent à leur tour la relâche de neuropeptides par les neurones sensoriels et contribuent ainsi à l'hyperalgésie induite par la BK. Des études récentes ont montré un effet anti-nociceptif avec les antagonistes du RB_2 ou par la suppression du gène du RB_2 dans des modèles aigus d'hyperalgésie d'origine inflammatoire (Calixto et al., 2000; Couture et al., 2001).

Il est suggéré que le RB_1 des kinines soit impliqué dans la phase chronique de la douleur inflammatoire (Couture et al., 2001). Ceci serait compatible avec sa désensibilisation et son internalisation limitée. Le RB_1 est, en général, absent dans les tissus sains. Des études

ont montré par autoradiographie une vaste distribution des sites de liaison du RB₁ dans la moelle épinière et dans le GRD chez le rat après lésion du nerf sciatique. Les antagonistes du RB₁ renversent l'hyperalgésie thermique à partir de la deuxième semaine de la lésion (Petcu et al., 2008; Truin et al., 2010).

Une récente étude a révélé la présence du RB₁ sur les fibres sensorielles de type C, les astrocytes et la microglie dans la moelle épinière des rats STZ-diabétiques (Talbot et al., 2009). Des cultures primaires de cellules microgliales de rats ayant subi une lésion du cortex ont révélé l'expression du RB₁ (Noda et al., 2003; Ifuku et al., 2007). Des études ont cependant montré une expression basale du RB₁ dans la moelle épinière et le GRD chez le rat contrôle sain (Couture et al., 2000 ; Ma & Heavens, 2001). Chez ces animaux, le RB₁ n'est toutefois pas fonctionnel. En effet, les agonistes de ce récepteur n'ont pas d'effet sur la nociception chez des rats normaux ou dans des modèles d'inflammation aiguë (Calixto et al., 2000). Aussi l'activation du RB₁ n'augmente pas la formation de seconds messagers, la relâche de neuropeptides ou la survenue d'événements électrophysiologiques dans des neurones sensoriels chez les rats sains (Dray, 1997; Couture et al., 2001). Le rôle du RB₁ dans le contrôle normal des informations douloureuses chez l'animal sain reste donc incertain.

La suppression du gène du RB₁, chez la souris, montre une réduction du phénomène de sensibilisation spinale aux stimuli nociceptifs et une altération de sensibilité aux stimuli chimiques et thermiques dans les tests comportementaux (Pesquero et al., 2000). De plus, l'hyperalgésie thermique est absente dans un modèle de douleur inflammatoire causée par le CFA chez la souris invalidée pour le gène du RB₁ (Ferreira et al., 2001).

Ainsi, une activation directe du RB_1 sur les neurones sensoriels par les kinines endogènes est possible; cet effet peut être facilité par l'action des prostaglandines ou de médiateurs libérés à partir d'autres cellules par l'activation de l'un ou l'autre type de récepteurs de la BK.

Les antagonistes pharmacologiques du RB_1 causent une analgésie uniquement dans des modèles animaux d'hyperalgésie mécanique et thermique persistante, d'origine inflammatoire ou dans la douleur viscérale soutenue. Ces résultats peuvent être expliqués par l'induction du RB_1 sur des cellules autres que les neurones sensoriels (macrophages, fibroblastes ou les cellules endothéliales) où ils peuvent être responsables de la libération de médiateurs (PG, cytokines et NO) qui sensibilisent et activent les nocicepteurs (Couture et al., 2001).

1.7 Hypothèse, objectifs et approches expérimentales

Hypothèse : Le RB₁ des kinines serait impliqué dans la douleur neuropathique. Il serait induit dans le système nerveux sensoriel en réponse au stress oxydatif qui apparaît lors du traumatisme d'un nerf périphérique. Il pourrait jouer un rôle dans l'hyperalgésie thermique après son expression sur les fibres sensorielles de type C. L'implication du TRPV1 dans l'hyperalgésie thermique et sa surexpression sur les fibres C suggèrent une interaction entre le RB₁ et le TRPV1. Le rôle du RB₁ dans l'allodynie tactile et au froid pourrait en partie dépendre d'un mécanisme central. Des études chez le rat diabétique STZ suggèrent que la microglie pourrait être un élément clé dans ce mécanisme.

Objectifs : En utilisant le modèle de ligature partielle du nerf sciatique (LPNS), cette étude vise à: 1- évaluer l'effet de traitements aigu et chronique avec le SSR240612 et le R-954 (antagonistes du RB₁) sur l'hyperalgésie thermique et les allodynies; 2- étudier l'implication du TRPV1 et du stress oxydatif dans la douleur neuropathique en relation avec le RB₁; 3- mesurer l'expression du RB₁ des kinines dans la moelle épinière, le GRD et le nerf sciatique; 4- évaluer la localisation cellulaire du RB₁ dans la moelle épinière.

Approches expérimentales: Les effets sur l'allodynie tactile (filaments de Von Frey) et au froid (application d'acétone qui produit une sensation de froid par évaporation) et l'hyperalgésie thermique (source radiante de chaleur) sont mesurés par le réflexe de retrait de la patte arrière. L'expression du RB₁ dans la moelle épinière lombaire, le GRD et le nerf sciatique est évaluée au moyen du PCR quantitatif en temps réel. La localisation cellulaire du RB₁ est évaluée par la microscopie confocale, deux semaines après la LPNS.

Cette étude a fait l'objet d'un article qui est présenté au **CHAPITRE II**

Emna Chahmi, Sébastien Talbot, Réjean Couture. **Contribution and spinal cellular localization of kinin B₁ receptor in a rat model of neuropathic pain.**
(en préparation pour Neuropeptides).

CHAPITRE 2 : ARTICLE SCIENTIFIQUE

**Contribution and spinal cellular localization of kinin B₁
receptor in a rat model of neuropathic pain**

Emna Chahmi, Sébastien Talbot, Réjean Couture*

Department of Physiology, Faculty of Medicine, Université de Montréal, C.P. 6128,
Succursale Downtown, Montréal, Québec, Canada, H3C 3J7

To submit to NEUROPEPTIDES

*Correspondence should be addressed to Dr Réjean Couture at the above address

Tel.: (514) 343-7060; fax. (514) 343-2111

Abstract

The kinin B₁ receptor (B₁R) is virtually absent in normal physiological situations, yet its expression is increased by tissue injury and the production of reactive oxygen species (ROS). TRPV-1 is also sensitive to ROS and contributes to neuropathic pain. This study aims at determining the relative contribution of B₁R, ROS and TRPV1 in neuropathic pain behavior after partial sciatic nerve ligation (PSNL) and the cellular localization of B₁R in the spinal cord. In Sprague-Dawley rats, the impact of PSNL was determined on thermal hyperalgesia (Hargreaves), tactile allodynia (von Frey filaments) and cold allodynia (acetone) before and after acute/prolonged treatments with antagonists/inhibitors for B₁R (R-954, 2 mg/kg s.c.; SSR240612, 10 mg/kg gavage), TRPV-1 (SB366791, 1mg/kg/day s.c. for 2 weeks) and ROS (N-acetyl-L-cysteine (NAC) 1g/kg/day gavage for 2 weeks). The expression of B₁R was studied by qRT-PCR and the cellular localization by confocal microscopy. Whereas R-954 and SSR240612 were effective in blocking thermal hyperalgesia when given acutely, tactile and cold allodynia could be reversed only by a 5-day treatment with SSR240612. SB366791 reversed thermal hyperalgesia and tactile allodynia only while NAC abolished tactile/cold allodynia and hyperalgesia. B₁R mRNA was significantly increased in the spinal cord, the sciatic nerve and dorsal root ganglion 2 weeks after PSNL and this was prevented by NAC and SB366791. The B₁R was co-localized with CGRP and Iba-1 in the spinal cord of PSNL rats. Data suggest that B₁R is upregulated by ROS in the spinal cord microglia and sensory C-fibers after PSNL and contributes to neuropathic pain with a larger spectrum than TRPV-1.

Keywords: bradykinin; cold allodynia; microglia, neuropathic pain; oxidative stress; sciatic nerve ligation; tactile allodynia; thermal hyperalgesia; TRPV-1.

1. Introduction

Neuropathic pain following peripheral nerve injury is a significant clinical problem without effective treatment. The development of animal models and the identification of new pharmacological targets are instrumental to further understand pathological mechanisms underlying spontaneous pain, hyperalgesia and allodynia ¹. Kinins are mediators of pain and inflammation (Calixto *et al.*, 2000; Couture *et al.*, 2001) and their receptors could represent relevant therapeutic targets in pain neuropathy. Kinin receptor antagonists displayed analgesic effects in acute and chronic models of inflammation (Perkins *et al.*, 1993; Correa *et al.*, 1993; Davis *et al.*, 1994; Sufka & Roach, 1996; Bélichard *et al.*, 2000; Fox *et al.*, 2003; Gougat *et al.*, 2004), in neuropathic pain models of sciatic nerve injury (Levy & Zochodne, 2000; Yamaguchi-Sase *et al.*, 2003; Gougat *et al.*, 2004; Petcu *et al.*, 2008) and after brachial plexus avulsion in mice ². Thermal hyperalgesia induced by partial ligation of the sciatic nerve was abolished in kinin B₁R knock-out mice (Ferreira *et al.*, 2005). These results are reminiscent of the blockade of thermal hyperalgesia under acute and chronic treatment with B₁R antagonists in type 1 and type 2 diabetic rats and mice (Gabra & Sirois, 2003a; 2003b; Gabra *et al.*, 2005; Lungu *et al.*, 2007; Dias *et al.*, 2007; 2010).

Discrepancies exist, however, regarding the role of kinin B₁R in allodynia following peripheral nerve injury. Using the non-peptide B₁R antagonist LF22-0542, some authors failed to reverse tactile and/or cold allodynia after sciatic nerve injury (Porreca *et al.*,

2006; Petcu *et al.*, 2008) which is consistent with the development of nerve-injury-induced tactile hypersensitivity in B₁R knock-out mice (Porreca *et al.*, 2006). In contrast, tactile allodynia was inhibited by a peptide B₁R antagonist after chronic constriction nerve injury in rat (Yamaguchi-Sase *et al.*, 2003) and also in B₁R knock-out mice after partial ligation of the sciatic nerve (Ferreira *et al.*, 2005). Tactile and cold allodynia were partially alleviated by a peptide B₁R antagonist in rats submitted to unilateral L5/L6 spinal nerve ligation injury (Werner *et al.*, 2007). These conflicting data regarding the putative role of B₁R in nerve-injury-induced allodynia remain unexplained at the present time.

Transient receptor potential vanilloid type 1 (TRPV-1) is also involved in inflammatory heat hyperalgesia (Niiyama *et al.*, 2009). TRPV-1 knockout mice did not manifest thermal hyperalgesia^{3,4}. TRPV-1 can be sensitized through the phosphorylation of its C-terminal end by protein kinases A and/or C^{5,6} in the presence of a variety of stimuli such as low pH^{7,8}, bradykinin⁹, nerve-growth factor⁹ and oxidative stress¹⁰. In turn, the stimulation of TRPV-1 can enhance the production of reactive oxygen species (ROS) and pro-inflammatory cytokines¹¹ that are known to enhance the expression of B₁R through the transcriptional nuclear factor NF-κB (Marceau & Regoli, 2004; Dias *et al.*, 2010). Peripheral nerve injury also increased the production of ROS and pro-inflammatory cytokines (Ibi *et al.*, 2008; Tanabe *et al.*, 2009; Kim *et al.*, 2010) that may explain the enhancing expression of TRPV-1 in the dorsal root ganglion (DRG)¹² and kinin B₁R in the DRG and spinal cord^{13,14} Rashid *et al.*, 2004; Petcu *et al.*, 2008). B₁R was found on neuronal and non-neuronal elements after peripheral nerve injury in mice (Rashid *et al.*,

2004) and on spinal dorsal horn microglia and sensory C-fibers in streptozotocin-diabetic rat (Talbot *et al.*, 2009). All this evidence suggests a functional interaction between TRPV-1, ROS and B₁R in neuropathic pain.

The classical model of neuropathic pain developed by Seltzer et al., (1990) was used in the present study to determine: 1- B₁R mRNA expression in the rat spinal cord, lumbar DRG and the sciatic nerve by qRT-PCR; 2- the impact of ROS and TRPV-1 inhibition on B₁R expression and neuropathic pain; 3- the impact of acute and prolonged treatment with B₁R antagonists on thermal hyperalgesia, tactile and cold allodynia; and 4- the cellular localization of B₁R in the spinal cord by confocal microscopy.

2. Materials and methods

2.1. Animals

All research procedures and the care of the animals were in compliance with the guiding principles for animal experimentation as enunciated by the International Association for the Study of Pain (IASP) and were approved by the Animal Care Committee of the University of Montreal. The experiments were performed on male Sprague-Dawley rats (225-250g, Charles River, St-Constant, Quebec, Canada). They were housed two per cage, in a room under controlled conditions of temperature (23°C), humidity (50 %) and lighting (12/12h light-dark cycle), with free access to normal chow diet (Charles River Rodent) and tap water.

2.2. Partial sciatic nerve ligation

The rats were subjected to partial sciatic nerve ligation (PSNL) according to the original method of Seltzer *et al.* (1990). Under inhaled anesthesia with isoflurane, the left sciatic nerve was exposed at the upper-thigh level and a tight ligation of the dorsal nerve (30-50%) was performed with 8-10 silk, distal to the insertion of the posterior biceps-semi-tendinosum muscle. Sham-operated rats had the same surgery, the left sciatic nerve was exposed but no ligation was made. Additional non-operated rats were used as controls.

2.3. Nociceptive behaviour

2.3.1. Tests for the measurement of sensory functions

The rats were tested a few days prior to ligation and during the 2-week period following the ligation of the sciatic nerve at a frequency of 2-3 times per week to determine the development of allodynia and the impact of various pharmacological treatments. In a previous study, we found that thermal sensitivity was not significantly affected prior to day 14 post-PSNL (Petcu *et al.*, 2008). This was confirmed in the present study in a separate group of rats. Therefore, this test was not carried out in parallel with allodynia testing during the first 2 weeks post-ligation. Nevertheless, to acclimatize the rat to handling and to determine baseline values, thermal sensitivity was recorded on the days prior to the experimental protocol.

2.3.2. Tactile allodynia

After PSNL, rats were placed in a transparent plastic cage with a wire mesh floor which allowed full access to the paws. After a period of habituation of 20–30 min, tactile allodynia was assessed by measuring the hind paw withdrawal threshold to the application of a calibrated series of 6 von Frey filaments (bending forces of 2, 4, 6, 8, 10 and 15 g) (Stoelting, Wood Dale, IL, USA) according to the method of Chaplan *et al.*¹⁵. The test was initiated with the filament of low strength (2 g); the filament was applied perpendicularly to the mid-plantar surface of the hind paw with adequate pressure to cause slender buckling. Each filament was applied 10 times (6–8 s per stimulation, with 1–2 min between stimulations to avoid sensitization). Five of ten rapid withdrawals (more than 50%) was measured as a positive response and the threshold in grams was

noted. Absence of a response (less than 5 withdrawals) prompted the use of the next graded filament of increasing stiffness. The cut-off of a 15 g filament was chosen as the upper limit for testing, since stiffer filaments tended to elevate the entire member rather than to buckle, substantially changing the nature of the stimulus. Neuropathic pain rat (allodynic) response was between 4 and 6 g while control rat response was between 12 and 15 g.

2.3.3. Cold allodynia

After PSNL, cold allodynia was assessed using the acetone drop method¹⁶. The rat was positioned under a transparent plastic box on a wire mesh floor, and acetone bubbles formed at the end of a tube connected to a syringe were applied 5 times (at 5 min intervals) to the plantar surface of the hind paw. Control rats either ignored the stimulus or infrequently responded with a small and short withdrawal. Allodynic rats responded with rapid paw withdrawal or escape behavior to acetone stimulation. The frequency of paw withdrawal was expressed as a percentage (the number of paw withdrawals / number of trials \times 100).

2.3.4. Thermal hyperalgesia

Thermal hypersensitivity related to neuropathic pain was measured using the paw-withdrawal latency according to the method described by Hargreaves *et al.* (1988) with minor modifications. Rats were placed within a Plexiglass enclosure on a transparent glass floor and allowed to adapt for 20-30 min. An infrared beam that constitutes the heat source (46 °C) was moved beneath the mid-plantar surface of the hind paw. Thermal

nociceptive threshold was defined as the latency (seconds) between the heat stimulus onset and paw withdrawal using a feedback-controlled shut-down unit. A cut-off time of 30 s was used to avoid tissue injury. Each paw was tested three times alternatively at minimum intervals of 3 min between stimulation to avoid sensitization of the hind paw. Mean values of each paw were used as the thermal threshold. Hyperalgesia was considered at values of 9 s or less.

2.4. Real time quantitative PCR

Two weeks after PSNL, rats were anesthetised with CO₂ inhalation and then decapitated. Lumbar spinal cords (segments L4 to L6) were rapidly removed after dorsal laminectomy and put in RNA*later* stabilization reagent (QIAGEN, Valencia, CA, USA) with a piece of the sciatic nerve (central to the ligation) and dorsal root ganglia (L4-L6) and then stored at -80 °C until use. Total RNA was extracted from tissue according to the manufacturer's instructions. First-strand cDNA synthesized from 400 ng total RNA with random hexamer primers was used as the template for each reaction with the QuantiTect Rev Transcription Kit (QIAGEN). Real-time quantitative PCR using Mx3000p device for signal detection (Stratagene, La Jolla, CA, USA) was performed in SYBR Green Master mix (QIAGEN) with 300 nM of each primer¹⁷. The primer pairs were designed by Vector NTI software (Table 1). PCR conditions were as follows: 95°C for 15 min, followed by 46 cycles at 94°C for 15 s, 60°C for 30 s and 72°C for 30 s. The specificity of PCR amplification for each gene was examined by melting curve. Expression levels were calculated against a standard curve using serial dilutions of total RNA. Analyses were performed in duplicate for each sample. For standardization and quantification, rat

18S was amplified simultaneously (Lin *et al.*, 2010). The cycle threshold (Ct) value represents the cycle number at which a fluorescent signal rises statistically above background. The relative quantification of gene expression was analyzed by the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method¹⁸.

2.5. Confocal microscopy on spinal cord

Two weeks after PSNL, the lumbar spinal cords (segments L4 to L6) were removed after dorsal laminectomy and frozen in 2-methylbutane (cooled at -40°C following exposure to liquid nitrogen) and stored at -80°C. A few days later, spinal cords were mounted in gelatin blocks and serially cut into 20- μ m thick coronal sections with a cryostat (between -10 to -14 °C). Sections were then thaw-mounted on Fisherbrand Superfrost disposable microscope slides (Fisher Scientific, ON, Canada) and kept at -80 °C for up to 1 month to allow the adhesion of sections to the coverslip glasses.

On the day of labeling, sections were thawed at room temperature for 10 min to enhance adhesion of the sections. They were pre-incubated for 10 min in phosphate buffered saline (PBS). Slides were washed three times (5 min) and then exposed to 1 M of glycine for 90 min to eliminate autofluorescence from aldehyde-fixed tissue. Tissues were permeabilized for 45 min in PBS with 0.5% Triton X-100. Slides were incubated with a blocking buffer (PBS supplemented with 0.5% Triton X-100, 3% bovine serum albumin (BSA) and 3% donkey serum) to prevent non-specific labeling. Antibodies were diluted in blocking buffer. Antibody directed against B₁R was produced in rabbit and diluted 1:1500 (Lin *et al.*, 2010). Rabbit anti-Ionized calcium binding adapter molecule-1 (anti-

Iba-1, Wako, Richmond, VA, USA) at a concentration of 2 µg/ml was used to label microglia^{19,20}. Chicken anti-Glial fibrillary acidic protein (anti-GFAP) at a concentration of 1:500 was used as a specific marker of astrocytes (Krum *et al.*, 1999). Rabbit anti-calcitonin-gene-related peptide (CGRP) at a concentration of 1:2000 was used as marker of sensory C-fibers (Chaudhry *et al.*, 2006). Secondary antibodies were cy5 anti-chicken 1:500 and rhodamine anti-rabbit 1:500. Primary and secondary antibodies were from Chemicon, Hornby, ON, Canada. Slides were washed 3 times (5 min), mounted with coverslip, fixed with Vectashield (Invitrogen) 12 h at room temperature and stored at -4°C for up to 1 month. The examination was limited to the dorsal horn under confocal microscope (Leica Confocal microscope, Richmond Hill, ON, Canada) using the krypton laser (568 nm).

2.6. Drugs

Two kinin B₁R antagonists were used: R-954 (Ac-Orn-[Oic²,^α (Me)Phe⁵, D-βNal⁷, Ile⁸]des-Arg⁹-BK) (Gobeil *et al.*, 1999) which does not cross the blood-brain barrier and the non-peptide SSR240612((2R)2[((3R)3(1,3benzodioxol5yl)3)[[(6methoxy2naphthyl)sulfonyl]amino]propanoyl)amino]3(4[[2R,6S)2,6dimethylpiperidinyl]methyl]phenyl)-N-isopropyl-N methylpropanamide hydrochloride] which has readily access to the brain and spinal cord after peripheral administration⁽²¹⁾. SSR240612 was kindly provided by Sanofi-Aventis R&D (Montpellier, France) and was administered by gavage (10 mg/kg) in volume of 1 ml by 100 g of rat body weight acutely or chronically (for 5 days). The acute treatment with the antagonist at this dose blocked allodynia in a rat model of insulin resistance (Dias *et al.*, 2007). SB366791 (1 mg/kg, s.c.) is a selective and potent TRPV-1

antagonist that blocked inflammatory heat hyperalgesia in a murine model of bone cancer^{22,23}. The antioxidant N-acetyl-L-cysteine (NAC; 1g/kg/day, gavage) blocked cold and tactile allodynia in a rat model of insulin resistance (Ismael *et al.*, 2008). NAC was administered with the same regimen initiated 4 days before PSNL continuously up to the end of the experiment protocol at 14 days post-PSNL.

SB366791 (Biomol International, Plymouth Meeting, PA, USA) and NAC (Sigma-Aldrich-Canada, Oakville, ON) were dissolved in 100% dimethyl sulphoxide (DMSO) and diluted in physiological saline. SSR240612 was dissolved in DMSO (0.5%), and then ethanol (5%) and Tween-80 (5%) were added in this sequence^{24,25}. The solution was completed in distilled water. R-954 was diluted in physiological saline and kindly supplied by Dr Fernand Gobeil (Department of Pharmacology, Université de Sherbrooke, Sherbrooke, Que, Canada).

2.7. Statistical analysis of data

Data were expressed as the means \pm S.E.M. obtained from n rats. Statistical significance was determined with Student's t -test for paired samples. For multiple comparisons a one-way or two-way analysis of variance (ANOVA) was used followed by post-hoc Bonferonni test. Data for allodynia were analysed with the non-parametric Mann-Witney test. Only probability (P) values less than 0.05 were considered to be statistically significant.

3. Results

3.1. Development of tactile and cold allodynia after PSLN

The development of tactile and cold allodynia from 2 to 14 days after PSLN is shown in Fig.1. Tactile allodynia was significant from 4 to 14 days post-ligation when compared to the contralateral intact paw and reached a maximum at 6 days (Fig. 1-A). Cold allodynia was significant from 2 to 14 days post-operation in comparison with the contralateral intact paw; the frequency of responses to acetone application on the ipsilateral paw varied between 79% (day 2) to 95% (day 14) (Fig. 1-B). Sham-operated rats (ipsi) did not show significant changes versus the contralateral intact paw throughout the period of 14 days to Von Frey filament and acetone stimulation. Moreover, no statistical difference were found between the sham-operated rats (ipsi) and the PSLN (contralateral intact paw), excluding any effect of the surgery.

3.2. Acute effects of B₁R antagonists on allodynia and thermal hyperalgesia

Two B₁R antagonists were given acutely 14 days post-PSNL when allodynia and thermal hyperalgesia were well established on the ipsilateral paw in comparison with the contralateral intact paw (Figures 2-3). R-954 (2 mg/kg, s.c.) failed to alter tactile and cold allodynia at 1, 3, 6 and 24h post-injection (Fig. 2-A and 2-B). The same treatment, however, blocked thermal hyperalgesia at 1 and 6 h post-injection and the inhibition was over 24h post-injection. At 3h the difference was no longer significant between contralateral and ipsilateral sides, suggesting inhibition by the antagonist as well (Fig.2-C). Likewise, SSR240612 (10 mg/kg, p.o.) failed to affect tactile allodynia from 3 to 24h post-injection (Fig. 3-A) and blocked thermal hyperalgesia (Fig. 3-C). However,

contrarily to R-954, the inhibition of thermal hyperalgesia by SSR240612 was still complete at 24h post-treatment and cold allodynia was significantly reduced at 3, 6 and 24 h post-gavage (Fig. 3-B). However, this antagonist also significantly reduced the response frequency on the contralateral paw at 3 and 24h post-injection (Fig. 3-B). The enhancing effect of SSR240612 on the contralateral side was significant at 3h but not at 6 and 24h post-treatment (Fig. 3-C).

3.3. Chronic effect of SSR240612 on tactile and cold allodynia

To determine whether a more prolonged blockade of B₁R with SSR240612 could inhibit allodynia, SSR240612 (10 mg/kg, p.o.) was given from day 15 to day 20 post-PSNL. As illustrated in Figure 4, on day 7 and day 14 post-PSNL, tactile and cold allodynia were highly significant on the ipsilateral paw in comparison to the contralateral paw. Whereas SSR240612 had no significant effect on both allodynia on day 17, it abolished cold allodynia and lessened tactile allodynia on day 20 as the difference of withdrawal threshold between the ipsilateral and contralateral sides was almost eliminated. This prolonged treatment with SSR240612 also abolished thermal hyperalgesia as did acute treatment (data not shown).

3.4. Chronic effects of SB366791 on allodynia and thermal hyperalgesia

The specific TRPV-1 antagonist SB366791 (1 mg/kg, s.c.) was administered daily for 2 weeks starting immediately after PSNL to determine its impact on allodynia and thermal hyperalgesia (Figs. 5-6). Data show that this treatment reversed tactile allodynia on day 8 to day 14 as time-course values were not significantly different between ipsilateral and

contralateral paw. However, the difference between ipsilateral paw in rats treated with SB366791 and the ipsilateral paw in rats not treated with SB366791 was highly significant at 8 days but not at 24h, suggesting a transient inhibition only (Fig. 5-A). In contrast, SB366791 had no influence on cold allodynia throughout the experimental protocol (Fig. 5-B). Thermal hyperalgesia caused by PSNL was abolished after two weeks of treatment with SB366791 (Fig. 6).

3.5. Chronic effects of NAC on allodynia and thermal hyperalgesia

The antioxidant NAC was given by gavage (1g/kg) daily as preventive treatment starting 4 days prior to PSNL and throughout the 14 days period post-PSNL. This treatment brought back to control values tactile and cold allodynia progressively from day 6-8 to day 14 post-PSNL. Nevertheless, the inhibitory effect was faster on cold allodynia than on tactile allodynia and occurred at 6 and 8 days, respectively (Fig. 7-A and 7-B). Likewise, thermal hyperalgesia induced by PSNL on day 14 was abolished by 2 weeks treatment with NAC (Fig. 7-C). The same prolonged treatment with NAC had no significant effect on nociceptive baseline values in control rats (data not shown).

3.6. Chronic effects of NAC and TRPV-1 antagonist on B₁R gene expression

Quantitative real time PCR data showed increased levels of B₁R mRNA ($P < 0.05$) in the spinal cord (1.6-fold), sciatic nerve (19-fold) and dorsal root ganglion (1.9-fold) of rats subjected to PSNL 2 weeks earlier (Fig. 8). B₁R mRNA levels in the three tissues were not detectable in PSNL rats pre-treated with NAC for 2 weeks (data not shown). Similarly, 2-week treatment with the TRPV-1 antagonist SB366791 reduced significantly

($P < 0.05$) B₁R mRNA level in the spinal cord (from 19.33 to 3.2-fold increase) while B₁R mRNA was not detectable in DRG and the sciatic nerve.

3.7. Cellular localization of B₁R in rat spinal cord dorsal horn

No co-localization was detected between the immunomarker of astrocytes (GFAP) and the labeling of B₁R, suggesting that B₁R is not present on astrocytes in spinal cord of PSNL-rats. However, B₁R was detected on CGRP-peptidergic C-fibers (Fig. 9) and on microglia as identified with the immunomarker Iba-1 (Fig. 10).

4. Discussion

Kinins are known to sensitize polymodal nociceptors and promote hyperalgesia during inflammatory pain through the activation of B₂R (Dray & Perkins, 1993; Julius & Basbaum, 2001; Ferreira *et al.*, 2004), which is constitutively expressed in primary sensory neurons (Lopes *et al.*, 1995). This involves the phosphorylation of TRPV-1 on sensory C-fibers (Chuang *et al.*, 2001). Whether such phenomenon occurs between B₁R and TRPV-1 is still unknown. Herein, we showed that B₁R is also present on sensory C-fibers and is up-regulated in the sciatic nerve and dorsal root ganglion after peripheral nerve injury as previously documented for TRPV-1 (Chen *et al.*, 2009; Ma *et al.*, 2010). This is congruent with the expression of B₁R on primary sensory afferents which was recently demonstrated in the model of neuropathic pain in STZ-diabetic rats (Talbot *et al.*, 2009). Basal expression of B₁R was also reported in the rat sensory nervous system in the absence of pathology²⁶. The presence of constitutive B₁R in control rats remained, however, elusive as the B₁R is not functional in physiological condition (Couture *et al.*, 2001). Contrarily to control rats, the up-regulated B₁R in the rat subjected to partial sciatic nerve ligation is functional and contributes to thermal hyperalgesia and tactile/cold allodynia as revealed by a prolonged treatment with SSR240612. However, acute treatment with SSR240612 and R-954 had little impact on allodynia as reported in other studies using the highly potent non-peptide B₁R antagonist LF22-0542 (Porreca *et al.*, 2006; Petcu *et al.*, 2008). The greater efficacy of B₁R antagonists to inhibit thermal hyperalgesia is consistent with the expression of B₁R on afferent C-fibers which are known to mediate thermal hyperalgesia produced by partial nerve injury²⁷. The total blockade of thermal hyperalgesia achieved with a B₁R antagonists (R-954) which does

not cross the blood-brain barrier points to a peripheral mechanism on heat-nociceptive C-fibers.

The role of B₁R in allodynia may be related to its expression on other cells in the sensory system as suggested by the expression of B₁R on myelinated DRG neurons and non-neuronal satellite cells after peripheral nerve injury in mice (Rashid *et al.*, 2004). Alternatively, a central mechanism can be proposed to take into account the microglial expression of B₁R and the inhibition of allodynia by SSR240612, which passes the blood-brain barrier but not by R-954 which does not. Indeed, spinal dorsal horn microglia is a crucial component of allodynia in neuropathic pain models of sciatic or spinal nerve injury (Milligan *et al.*, 2003; Ledebøer *et al.*, 2005; Lin *et al.*, 2007; Mika *et al.*, 2007; Wen *et al.*, 2009) and in diabetic peripheral neuropathy (Tsuda *et al.*, 2008; Wodarski *et al.*, 2009; Talbot *et al.*, 2010).

The use of preventive treatment with alpha-lipoic acid prior to sciatic nerve injury showed protective effects after injury by decreasing oxidative stress (Senoglu *et al.*, 2009). This antioxidant also provided neuroprotection from ischemia-reperfusion injury of peripheral nerves (Mitsui *et al.*, 1999). Recent studies showed that tactile and cold allodynia are alleviated by treatments with alpha-lipoic acid and NAC in a rat model of insulin resistance that displays pain neuropathy. This was associated with the suppression of B₁R expression in the spinal cord (Lungu *et al.*, 2007; Ismael *et al.*, 2008). Thermal hyperalgesia was also corrected by NAC after peripheral nerve injury²⁸. In agreement with these studies, we showed that NAC prevented the induction of B₁R in the spinal

cord and peripheral sensory system in parallel with the inhibition of allodynia and thermal hyperalgesia. These findings support a role for the oxidative stress in the induction of the pro-nociceptive B₁R and provide evidence that the inhibition of kinin B₁R gene expression may contribute to the therapeutic effect of antioxidants in neuropathic pain.

TRPV-1 and B₁R have some features in common which might suggest possible interaction in neuropathic pain. For instance, TRPV-1 is expressed selectively in a subpopulation of C- and A-delta fibres which also express NGF receptors, substance P, neurokinin A and CGRP (Szallazi *et al.*, 1994; Lin *et al.*, 2007). Peripheral nerve injury enhanced the expression of TRPV-1 in the DRG ¹². TRPV-1 is involved in inflammatory heat hyperalgesia (Niiyama *et al.*, 2009) and TRPV-1 knockout mice are insensitive to thermal hypersensitivity ^{3,4}. Likewise, B₁R knockout mice failed to develop STZ-induced thermal hyperalgesia (Gabra *et al.*, 2005). TRPV-1 can enhance the release of neurotransmitters from spinal cord glia in mouse models of pain ²⁹ and the ROS production ¹¹. The TRPV-1-induced ROS production is thought to be mediated by increased cytosolic calcium influx and activation of NADPH oxidase ³⁰. Moreover, it was suggested that TRPV-1 inhibition reduced the pro-oxidant capacity of microglial NADPH oxidase ³¹. Interestingly, B₁R activation enhances the production of ROS through the activation of vascular NADPH oxidase in diabetic rats (Dias *et al.*, 2010) and finally, B₁R expression on microglia of STZ-diabetic rats contributes to pain neuropathy (Talbot *et al.*, 2010). Therefore, one can suggest that TRPV-1 could contribute to the formation of ROS and thereby to B₁R induction in the model of PSNL. To support this hypothesis, we

reported herein that a 2-week treatment with the TRPV-1 antagonist SB366791 significantly blunted B₁R expression in the spinal cord and the sensory system. Thus, the inhibition of B₁R induction could be a putative mechanism by which SB366791 inhibits PSNL-induced tactile allodynia and thermal hyperalgesia. However, it could not explain the inefficacy of SB366791 to prevent cold allodynia, suggesting that the residual expression of B₁R in the spinal cord (presumably microglia) can allow the full expression of cold allodynia in this model of PSNL.

In conclusion, the present findings suggest that the induction and up-regulation of B₁R in the spinal cord and peripheral sensory system of PSNL-rats is mediated by the oxidative stress. Treatment with the antioxidant NAC prevented the induction of B₁R and the symptoms associated with neuropathic pain. While peripherally acting B₁R antagonists blocked thermal hyperalgesia, prolonged treatment with centrally acting B₁R alleviated tactile and cold allodynia through a mechanism which is compatible with the presence of B₁R in the spinal dorsal horn microglia. Since B₁R antagonists block both thermal hyperalgesia and allodynia, these molecules appear more promising than TRPV-1 antagonists in the treatment of pain neuropathy.

Acknowledgements

This work was supported by a Grant-in-aid from the Canadian Institutes of Health Research (CIHR) to RC (MOP-79471). ST received a Studentship from CIHR (Frederick Banting and Charles Best Canada Graduate Scholarships-Doctoral Award).

Competing interests

The authors have no competing interests to declare

5.0. Reference

Belichard P, Landry M, Faye P, Bachvarov DR, Bouthillier J, Pruneau D, Marceau F (2000). Inflammatory hyperalgesia induced by zymosan in the plantar tissue of the rat: effect of kinin receptor antagonists. *Immunopharmacology* **46**, 139-47.

Calixto JB, Cabrini DA, Ferreira J, & Campos MM (2000). Kinins in pain and inflammation. *Pain* **87**,1-5.

Caterina MJ, Leffler A, Malmberg AB, Martin WJ, Trafton J, Petersen-Zeitz KR, Koltzenburg M, Basbaum AI, Julius D (2000). Impaired nociception and pain sensation in mice lacking the capsaicin receptor. *Science* **14**, 306-13.

Chaplan SR, Bach FW, Pogrel JW, Chung JM & Yaksh TL (1994). Quantitative assessment of tactile allodynia in the rat paw. *J Neurosci Methods* **53**, 55-63.

Chaudhry N, de Silva U, Smith GM (2006). Cell adhesion molecule LI modulates nerve-growth-factor-induced CGRP-IR fiber sprouting. *Exp Neurol* **202**, 238-49.

Chen Y, Willcockson HH & Valtschanoff JG (2009). Influence of the vanilloid receptor TRPV1 on the activation of spinal cord glia in mouse models of pain. *Exp Neurol* **220**, 383-390.

Choi Y, Yoon YW, Na HS, Kim SH & Chung JM (1994). Behavioral signs of ongoing pain and cold allodynia in a rat model of neuropathic pain. *Pain* **59**, 369-376.

Chuang HH, Lin S (2009). Oxidative challenges sensitize the capsaicin receptor by covalent cysteine modification. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**, 20097-102.

Chuang HH, Prescott ED, Kong H, Shields S, Jordt SE, Basbaum AI, Chao MV, & Julius D (2001). Bradykinin and nerve growth factor release the capsaicin receptor from PtdIns(4,5)P2-mediated inhibition. *Nature* **411**, 957-962.

Correa CR, Calixto JB. Evidence for participation of B1 and B2 kinin receptors in formalin-induced nociceptive response in the mouse (1993). *Br J Pharmacol* **110**, 1938-8.

Couture R, Harrisson M, Vianna RM & Cloutier F (2001). Kinin receptors in pain and inflammation. *Eur J Pharmacol* **429**, 161-176.

Davis, A.J., and Perkins, M.N (1994). The involvement of bradykinin B1 and B2 receptor mechanisms in cytokine-induced mechanical hyperalgesia in the rat. *Br J Pharmacol* **113**, 63-68.

Dias JP, Ismael MA, Pilon M, de Champlain J, Ferrari B, Carayon P & Couture R (2007). The kinin B1 receptor antagonist SSR240612 reverses tactile and cold allodynia in an experimental rat model of insulin resistance. *Br J Pharmacol* **152**, 280-287.

Dias JP, Talbot S, Senecal J, Carayon P, & Couture R (2010). Kinin B1 receptor enhances the oxidative stress in a rat model of insulin resistance: outcome in hypertension, allodynia and metabolic complications. *PLoS One* **5**, e12622.

Dray, A., and Perkins, M (1993). Bradykinin and inflammatory pain. *Trends Neurosci* **16**, 99-104.

Ferreira J, Beirith A, Mori MA, Araujo RC, Bader M, Pesquero JB & Calixto JB (2005). Reduced nerve injury-induced neuropathic pain in kinin B1 receptor knock-out mice. *J Neurosci* **25**, 2405-2412.

Ferreira J, da Silva GL, Calixto JB (2004). Contribution of vanilloid receptors to the overt nociception induced by B2 kinin receptor activation in mice. *Br J Pharmacol* **141**, 787-94.

Fox A, Wotherspoon G, McNair K, Hudson L, Patel S, Gentry C, Winter J (2003). Regulation and function of spinal and peripheral neuronal B1 bradykinin receptors in inflammatory mechanical hyperalgesia. *Pain* **104**, 683-91.

Gabra BH, Couture R, & Sirois P (2003)a. [Functional duality of kinin receptors in pathophysiology]. *Med Sci (Paris)* **19**, 1101-1110.

Gabra BH, Merino VF, Bader M, Pesquero JB, Sirois P (2005). Absence of diabetic hyperalgesia in bradykinin B1 receptor-knockout mice. *Regul Pept* **127**, 245-8.

Gabra BH, Sirois P (2003)b. Beneficial effect of chronic treatment with the selective bradykinin B1 receptor antagonists, R-715 and R-954, in attenuating streptozotocin-diabetic thermal hyperalgesia in mice. *Peptides* **24**, 1131-1139.

Gobeil F Jr, Charland S, Filteau C, Perron SI, Neugebauer W, Regoli D (1999). Kinin B1 receptor antagonists containing alpha-methyl-L-phenylalanine: in vitro and in vivo antagonistic activities. *Hypertension* **33**, 823-9.

Gougat J, Ferrari B, Sarran L, Planchenault C, Poncelet M, Maruani J, Alonso R, Cudennec A, Croci T, Guagnini F, Urban-Szabo K, Martinolle JP, Soubrie P, Finance O

& Le Fur G (2004). SSR240612 [(2R)-2-[[[(3R)-3-(1,3-benzodioxol-5-yl)-3-[[[(6-methoxy-2-naphthyl)sulfonyl]amino]propanoyl]amino]-3-(4-[[2R,6S)-2,6-dimethyl piperidinyl]methyl]phenyl)-N-isopropyl-N-methylpropanamidehydrochloride], a new non peptide antagonist of the bradykinin B1 receptor: biochemical and pharmacological characterization. *J Pharmacol Exp Ther* **309**, 661-669.

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

Hu F, Sun WW, Zhao XT, Cui ZJ, Yang WX (2008). TRPV1 mediates cell death in rat synovial fibroblasts through calcium entry-dependent ROS production and mitochondrial depolarization. *Biochem Biophys Res Commun* **369**, 989-93.

Ibi M, Matsuno K, Shiba D, Katsuyama M, Iwata K, Kakehi T, Nakagawa T, Sango K, Shirai Y, Yokoyama T, Kaneko S, Saito N, & Yabe-Nishimura C (2008). Reactive oxygen species derived from NOX1/NADPH oxidase enhance inflammatory pain. *J Neurosci* **28**, 9486-9494.

Ismael MA, Talbot S, Carbonneau CL, Beausejour CM & Couture R (2008). Blockade of sensory abnormalities and kinin B(1) receptor expression by N-acetyl-L-cysteine and ramipril in a rat model of insulin resistance. *Eur J Pharmacol* **589**, 66-72.

Jensen TS, Gottrup H, Sindrup SH, Bach FW (2001). The clinical picture of neuropathic pain. *Europ. J. Pharmacol* **429**, 1-13.

Jordt SE, Tominaga M, Julius D (2000). Acid potentiation of the capsaicin receptor determined by a key extracellular site. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 8134-9.

Julius D & Basbaum AI (2001). Molecular mechanisms of nociception. *Nature* **413**, 203-210.

Kanazawa H, Ohsawa K, Sasaki Y, Kohsaka S & Imai Y (2002). Macrophage/microglia-specific protein Iba1 enhances membrane ruffling and Rac activation via phospholipase C-gamma -dependent pathway. *J Biol Chem* **277**, 20026-20032.

Kehlet H, Jensen TS & Woolf CJ (2006). Persistent postsurgical pain: risk factors and prevention. *Lancet* **367**, 1618-1625.

Kim D, You B, Jo EK, Han SK, Simon MI, & Lee SJ (2010). NADPH oxidase 2-derived reactive oxygen species in spinal cord microglia contribute to peripheral nerve injury-induced neuropathic pain. *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**, 14851-14856.

Krum JM, Rosenstein JM (1999). Transient coexpression of nestin, GFAP, and vascular endothelial growth factor in mature reactive astroglia following neural grafting or brain wounds. *Exp Neurol* **160**, 348-60.

Ledeboer A, Sloane EM, Milligan ED, Frank MG, Mahony JH, Maier SF & Watkins LR (2005). Minocycline attenuates mechanical allodynia and proinflammatory cytokine expression in rat models of pain facilitation. *Pain* **115**, 71-83.

Levy D & Zochodne DW (2000). Increased mRNA expression of the B1 and B2 bradykinin receptors and antinociceptive effects of their antagonists in an animal model of neuropathic pain. *Pain* **86**, 265-271.

Lin CS, Tsaur ML, Chen CC, Wang TY, Lin CF, Lai YL, Hsu TC, Pan YY, Yang CH & Cheng JK (2007). Chronic intrathecal infusion of minocycline prevents the development of spinal-nerve ligation-induced pain in rats. *Reg Anesth Pain Med* **32**, 209-216.

Lin JC, Talbot S, Lahjouji K, Roy JP, Sénécal J, Couture R, Morin A (2010). Mechanism of cigarette smoke-induced kinin B(1) receptor expression in rat airways. *Peptides* **31**, 1940-5.

Livak KJ & Schmittgen TD (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C(T)}$ Method. *Methods* **25**, 402-408.

Lopes P, Kar S, Chretien L, Regoli D, Quirion R, & Couture R (1995). Quantitative autoradiographic localization of [125I-Tyr8]bradykinin receptor binding sites in the rat spinal cord: effects of neonatal capsaicin, noradrenergic deafferentation, dorsal rhizotomy and peripheral axotomy. *Neuroscience* **68**, 867-881.

Lungu C, Dias JP, Franca CE, Ongali B, Regoli D, Moldovan F, & Couture R (2007). Involvement of kinin B1 receptor and oxidative stress in sensory abnormalities and arterial hypertension in an experimental rat model of insulin resistance. *Neuropeptides* **41**, 375-387.

Ma F, Zhang L, Westlund KN (2009). Reactive oxygen species mediate TNFR1 increase after TRPV1 activation in mouse DRG neurons. *Mol Pain* **5**, 31.

Ma QP, Hill R & Sirinathsinghji D (2000). Basal expression of bradykinin B1 receptor in peripheral sensory ganglia in the rat. *Neuroreport* **11**, 4003-4005.

Ma W, Chabot JG, Vercauteren F & Quirion R (2010). Injured nerve-derived COX2/PGE2 contributes to the maintenance of neuropathic pain in aged rats. *Neurobiol Aging* **31**, 1227-1237.

Marceau F & Regoli D (2004). Bradykinin receptor ligands: therapeutic perspectives. *Nat Rev Drug Discov* **3**, 845-852.

Mika J, Osikowicz M, Makuch W & Przewlocka B (2007). Minocycline and pentoxifylline attenuate allodynia and hyperalgesia and potentiate the effects of morphine in rat and mouse models of neuropathic pain. *Eur J Pharmacol* **560**, 142-149.

Milligan ED, Twining C, Chacur M, Biedenkapp J, O'Connor K, Poole S, Tracey K, Martin D, Maier SF & Watkins LR (2003). Spinal glia and proinflammatory cytokines mediate mirror-image neuropathic pain in rats. *J Neurosci* **23**, 1026-1040.

Mitsui Y, Schmelzer JD, Zollman PJ, Kihara M, Low PA (1999). Hypothermic neuroprotection of peripheral nerve of rats from ischaemia-reperfusion injury. *Brain* **122**, 161-169.

Moriyama T, Iida T, Kobayashi K, Higashi T, Fukuoka T, Tsumura H, Leon C, Suzuki N, Inoue K, Gachet C, Noguchi K, Tominaga M (2003). Possible involvement of P2Y2 metabotropic receptors in ATP-induced transient receptor potential vanilloid receptor 1-mediated thermal hypersensitivity. *J Neurosci* **23**, 6058-62.

Naik AK, Tandan SK, Dudhgaonkar SP, Jadhav SH, Kataria M, Prakash VR & Kumar D (2006). Role of oxidative stress in pathophysiology of peripheral neuropathy and modulation by N-acetyl-L-cysteine in rats. *Eur J Pain* **10**, 573-579.

Niiyama Y, Kawamata T, Yamamoto J, Furuse S & Namiki A (2009). SB366791, a TRPV1 antagonist, potentiates analgesic effects of systemic morphine in a murine model of bone cancer pain. *Br J Anaesth* **102**, 251-258.

Numazaki M, Tominaga T, Toyooka H, Tominaga M (2002). Direct phosphorylation of capsaicin receptor VR1 by protein kinase Cepsilon and identification of two target serine residues. *J Biol Chem* **277**, 13375-8.

Perkins MN, Campbell E, Dray A (1993). Antinociceptive activity of the bradykinin B1 and B2 receptor antagonists, des-Arg9, [Leu8]-BK and HOE 140, in two models of persistent hyperalgesia in the rat. *Pain* **53**, 191-197.

Petcu M, Dias JP, Ongali B, Thibault G, Neugebauer W & Couture R (2008). Role of kinin B1 and B2 receptors in a rat model of neuropathic pain. *Int Immunopharmacol* **8**, 188-196.

Petersen M, Eckert AS, Segond von Banchet G, Heppelmann B, Klusch A & Kniffki KD (1998). Plasticity in the expression of bradykinin binding sites in sensory neurons after mechanical nerve injury. *Neuroscience* **83**, 949-959.

Porreca F, Vanderah TW, Guo W, Barth M, Dodey P, Peyrou V, Luccarini JM, Junien JL & Pruneau D (2006). Antinociceptive pharmacology of N-[[4-(4,5-dihydro-1H-imidazol-

2-yl)phenyl)methyl]-2-[2-[[[4-methoxy-2,6-dimethylphenyl) sulfonyl] methyl amino] ethoxy]-N-methylacetamide, fumarate (LF22-0542), a novel nonpeptidic bradykinin B1 receptor antagonist. *J Pharmacol Exp Ther* **318**, 195-205.

Premkumar LS & Ahern GP (2000). Induction of vanilloid receptor channel activity by protein kinase C. *Nature* **408**, 985-990.

Quintao NL, Passos GF, Medeiros R, Paszcuk AF, Motta FL, Pesquero JB, Campos MM & Calixto JB (2008). Neuropathic pain-like behavior after brachial plexus avulsion in mice: the relevance of kinin B1 and B2 receptors. *J Neurosci* **28**, 2856-2863.

Rashid MH, Inoue M, Matsumoto M & Ueda H (2004). Switching of bradykinin-mediated nociception following partial sciatic nerve injury in mice. *J Pharmacol Exp Ther* **308**, 1158-1164.

Schaible HG, von Banchet GS, Boettger MK, Brauer R, Gajda M, Richter F, Hensellek S, Brenn D & Natura G (2010). The role of proinflammatory cytokines in the generation and maintenance of joint pain. *Ann N Y Acad Sci* **1193**, 60-69.

Schilling T, Eder C (2009). Importance of the non-selective cation channel TRPV1 for microglial reactive oxygen species generation. *Neuroimmunol* **216**, 118-21.

Seltzer Z, Dubner R & Shir Y (1990). A novel behavioral model of neuropathic pain disorders produced in rats by partial sciatic nerve injury. *Pain* **43**, 205-218.

Senoglu M, Nacitarhan V, Kurutas EB, Senoglu N, Altun I, Atli Y, & Ozbag D (2009). Intraperitoneal Alpha-Lipoic Acid to prevent neural damage after crush injury to the rat sciatic nerve. *J Brachial Plex Peripher Nerve Inj* **4**, 22.

Simard AR, Rivest S (2006). Neuroprotective properties of the innate immune system and bone marrow stem cells in Alzheimer's disease. *Mol Psychiatry* **11**, 327-35.

Sufka KJ, Roach JT (1996). Stimulus properties and antinociceptive effects of selective bradykinin B1 and B2 receptor antagonists in rats. *Pain* **66**, 99-103.

Szallasi A, Blumberg PM, Nilsson S, Hokfelt T, & Lundberg JM (1994). Visualization by [³H]resiniferatoxin autoradiography of capsaicin-sensitive neurons in the rat, pig and man. *Eur J Pharmacol* **264**, 217-221.

Talbot S, Chahmi E, Pena Dias J & Couture R (2010). Key role for spinal dorsal horn microglial kinin B1 receptor in early diabetic pain neuropathy. *J Neuroinflammation* **7**, 36.

Talbot S, Theberge-Turmel P, Liazoghli D, Senecal J, Gaudreau P & Couture R (2009). Cellular localization of kinin B1 receptor in the spinal cord of streptozotocin-diabetic rats with a fluorescent [Nalpha-Bodipy]-des-Arg9-bradykinin. *J Neuroinflammation* **6**, 11.

Tanabe M, Nagatani Y, Saitoh K, Takasu K, & Ono H (2009). Pharmacological assessments of nitric oxide synthase isoforms and downstream diversity of NO signaling in the maintenance of thermal and mechanical hypersensitivity after peripheral nerve injury in mice. *Neuropharmacology* **56**, 702-708.

Tominaga M, Wada M, Masu M (2001). Potentiation of capsaicin receptor activity by metabotropic ATP receptors as a possible mechanism for ATP-evoked pain and hyperalgesia. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 6951-6.

Tsuda M, Ueno H, Kataoka A, Tozaki-Saiton H, Inoue K (2008). Activation of dorsal horn microglia contributes to diabetes-induced tactile allodynia via extracellular signal-regulated protein kinase signaling. *Glia* **56**, 378-86.

Vatine JJ, Argov R & Seltzer Z (1998). Brief electrical stimulation of c-fibers in rats produces thermal hyperalgesia lasting weeks. *Neurosci Lett* **246**, 125-128.

Wen YR, Suter MR, Ji RR, Yeh GC, Wu YS, Wang KC, Kohno T, Sun WZ, Wang CC. (2009). Activation of p38 mitogen-activated protein kinase in spinal microglia contributes to incision-induced mechanical allodynia. *Anesthesiology* **110**, 155-65.

Werner MF, Kassuya CA, Ferreira J, Zampronio AR, Calixto JB, Rae GA (2007). Peripheral kinin B(1) and B(2) receptor-operated mechanisms are implicated in neuropathic nociception induced by spinal nerve ligation in rats. *Neuropharmacology* **53**, 48-57.

Wodarski R, Clark AK, Grist J, Marchand F, Malcangio M (2009). Gabapentin reverses microglial activation in the spinal cord of streptozotocin-induced diabetic rats. *Eur J Pain* **13**,807-11.

Woolf CJ & Mannion RJ (1999). Neuropathic pain: aetiology, symptoms, mechanisms, and management. *Lancet* **353**, 1959-1964.

Wotherspoon G, Winter J (2000). Bradykinin B1 receptor is constitutively expressed in the rat sensory nervous system. *Neurosci Lett* **12**, 175-8.

Yamaguchi-Sase S, Hayashi I, Okamoto H, Nara Y, Matsuzaki S, Hoka S & Majima M (2003). Amelioration of hyperalgesia by kinin receptor antagonists or kininogen deficiency in chronic constriction nerve injury in rats. *Inflamm Res* **52**, 164-169.

Table 1: Primer pairs used in this study

		Sequences	Position	Gen Bank
18S Forward	5'	TCA ACT TTC GAT GGT AGT CGC CGT	3' 363 - 386	X01117
18S Reverse	5'	TCC TTG GAT GTG GTA GCC GTT TCT	3' 470 - 447	
B1 Receptor Forward	5'	GCA GCG CTT AAC CAT AGC GGA AAT	3' 367 - 391	NM_030851
B1 Receptor Reverse	5'	CCA GTT GAA ACG GTT CCC GAT GTT	3' 478 - 454	

Figure legends

Figure 1. Effects of unilateral partial sciatic nerve ligation (PSNL) on the development of tactile allodynia (A) and cold allodynia (B). Statistical significance between ipsi- and contralateral intact sides (*) and between PSNL-contralateral and Sham-contralateral sides (+) are indicated by *+P<0.05; **++P<0.01; ***P<0.001; n=8 rats per group.

Figure 2. Acute effects of the B₁R antagonist R-954 (2mg/kg, s.c.) on tactile allodynia (A), cold allodynia (B) and thermal hyperalgesia (C), 14 days after partial sciatic nerve ligation. Statistical comparison between contralateral (open columns) and ipsilateral (black columns) sides (*) or before and after R-954 administration on the ipsilateral side (+) is indicated by *+P<0.05; **P<0.01; n=6 rats.

Figure 3. Acute effects of the B₁R antagonist SSR240612 (10 mg/kg, gavage) on tactile allodynia (A), cold allodynia (B) and thermal hyperalgesia (C), 14 days after partial sciatic nerve ligation. Statistical comparison between contralateral (open columns) and ipsilateral (black columns) sides (*) or before and after SSR240612 administration on the contralateral side (†) and ipsilateral side (+) is indicated by *+†P<0.05; **++††P<0.01; ***+++P<0.001; n=8 rats.

Figure 4. Prolonged effects of the B₁R antagonist SSR240612 (10 mg/kg daily between 15 and 20 days post-PSLN, gavage) on tactile allodynia (A) and cold allodynia (B), after partial sciatic nerve ligation. Statistical comparison between contralateral (open columns)

and ipsilateral (black columns) sides (*) or before surgery (time 0h) and after PSNL (+) is indicated by +*P<0.05; **++P<0.01; n=6 rats.

Figure 5. Time-course effect of 2-week treatment with TRPV-1 antagonist (SB366791, 1 mg/kg, s.c.) on tactile allodynia **(A)** and cold allodynia **(B)** induced by partial sciatic nerve ligation. Statistical significance between ipsi- and contra-lateral sides is indicated by ***P<0.001; n=6 rats.

Figure 6. Time-course effect of 2-week treatment with TRPV-1 antagonist (SB366791, 1 mg/kg, s.c.) on thermal hyperalgesia induced by partial sciatic nerve ligation. Statistical significance between ipsi- and contralateral sides (*) or between sham and PSNL (+) is indicated by +P<0.05; **P<0.01; n=6 rats.

Figure 7. Time-course effect on tactile allodynia **(A)** cold allodynia **(B)** and thermal hyperalgesia **(C)** of treatment with NAC (1 g/kg, gavage) administered 4 days before and during 14 days after PSNL. Statistical comparison between ipsi-PSNL in the absence and presence of NAC (*) or between sham and PSNL (+) is indicated by **++P<0.01; ***P<0.001; n=6 rats.

Figure 8. Levels of B₁R mRNA in the spinal cord, dorsal root ganglion (DRG) and sciatic nerve of sham-operated (open columns) and PSNL-operated (black columns) rats. Statistical comparison is indicated by *P<0.05; n=6 rats.

Figure 9. Picture by confocal microscopy showing the immunostaining of B₁R (A) astrocytes (B) and afferent C-fibers (C) in the lumbar spinal cord dorsal horn isolated from 14-day PSNL-rat. Co-localization of the three markers is shown in panel (D). B₁R secondary antibody dye is green (ext: 505 nm/em: 515 nm), GFAP secondary antibody dye is blue (ext: 642 nm/em: 661 nm), CGRP secondary antibody dye is red (ext: 550 nm/em: 570 nm). Scale bar = 31.75 μ m. Pictures are representative of a minimum of 4 sections per rat from 4 different rats.

Figure 10. (A), Picture by confocal microscopy showing the immunostaining of B₁R (A) and microglia (B). Co-localization of the two markers is shown in panel (C). B₁R secondary antibody dye is green (ext: 505 nm/em: 515 nm) while Iba-1 secondary antibody dye is red (ext: 550 nm/em: 570 nm). Scale bar = 20 μ m. Pictures presented are representative of a minimum of 4 sections per rat from 4 different rats.

Figure 1

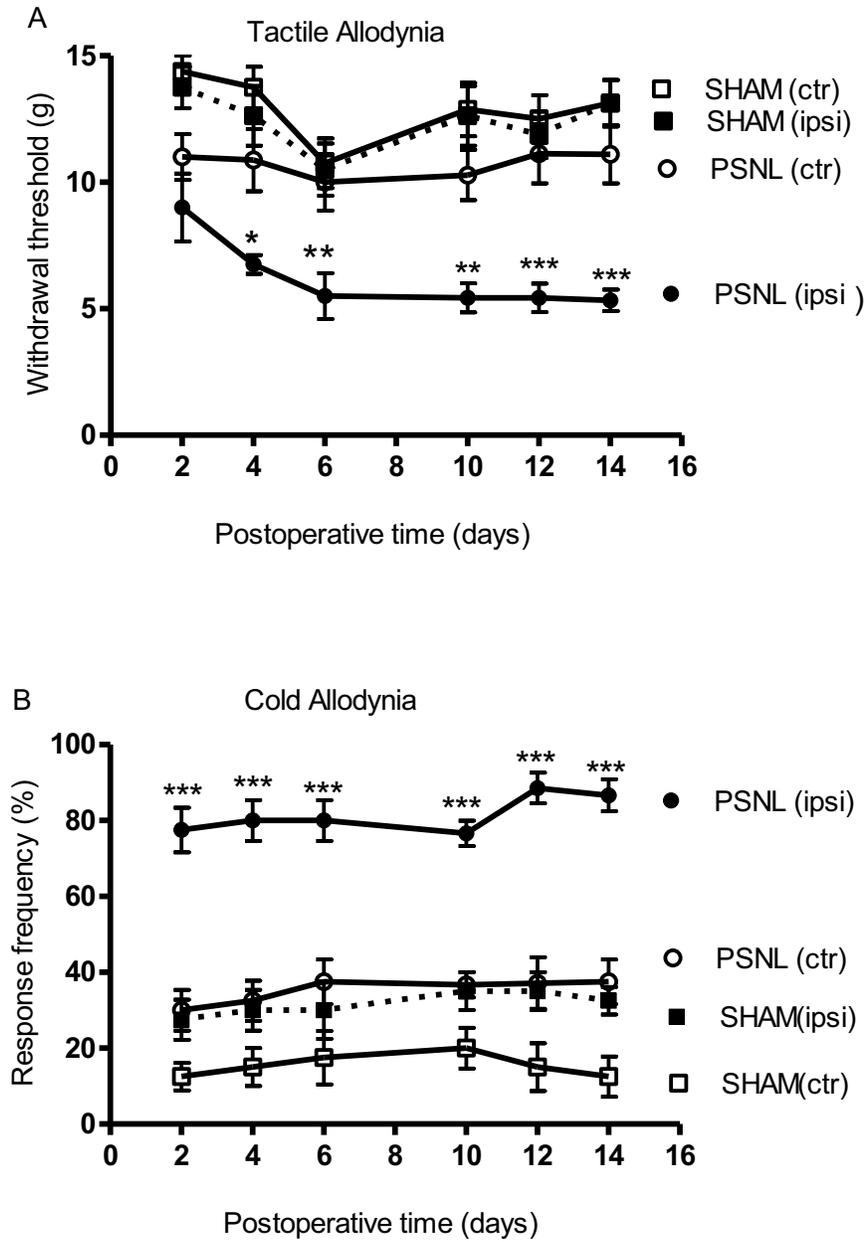


Figure 2

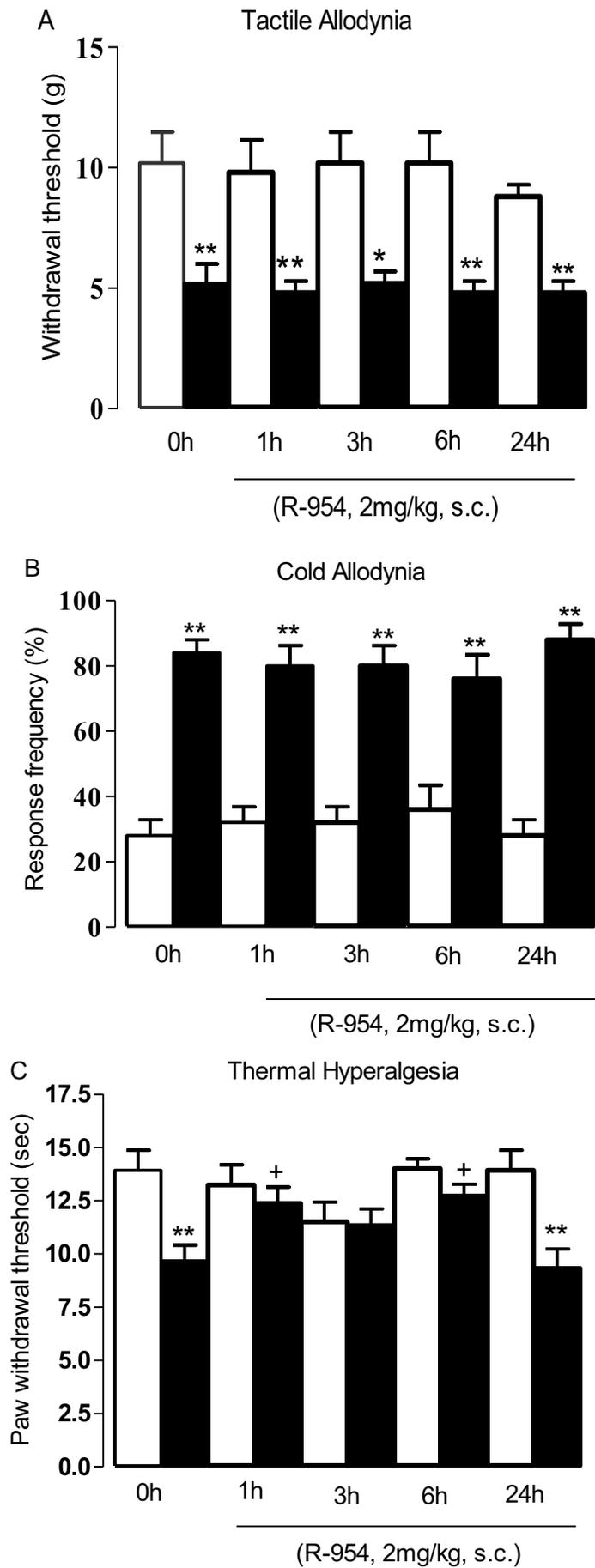


Figure 3

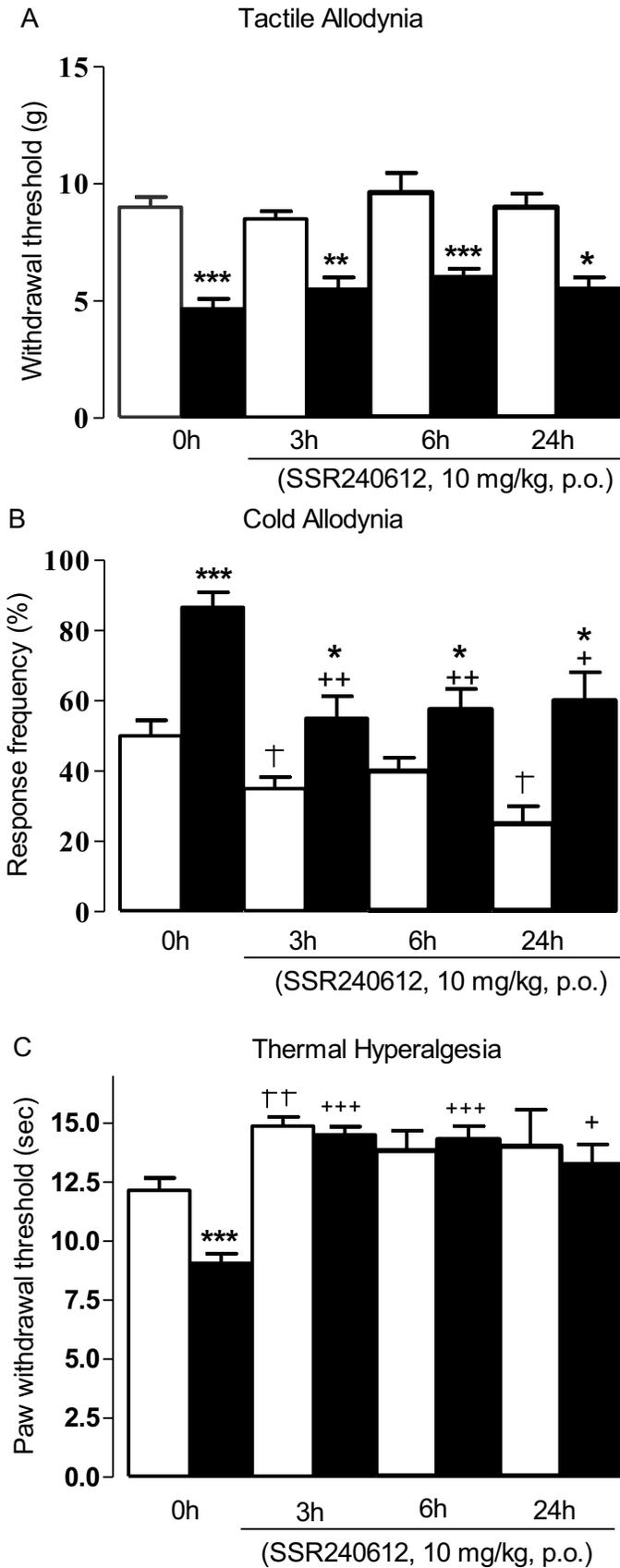


Figure 4

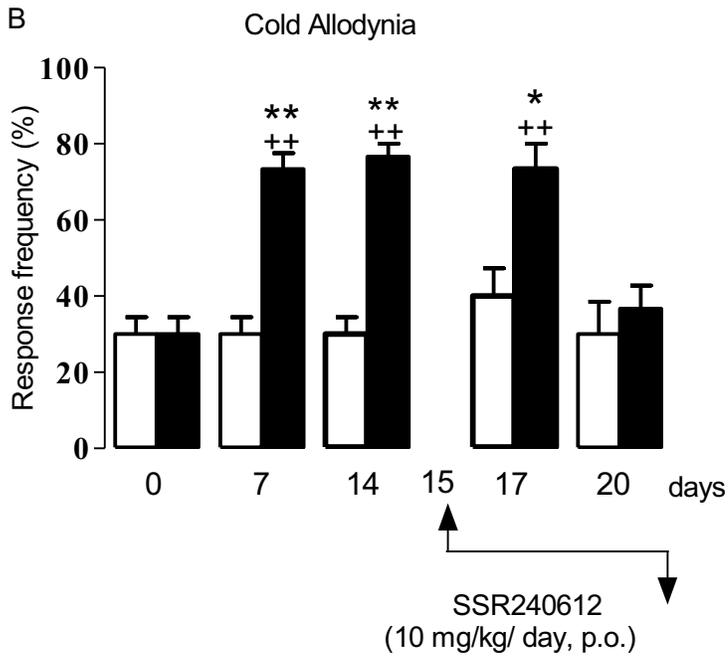
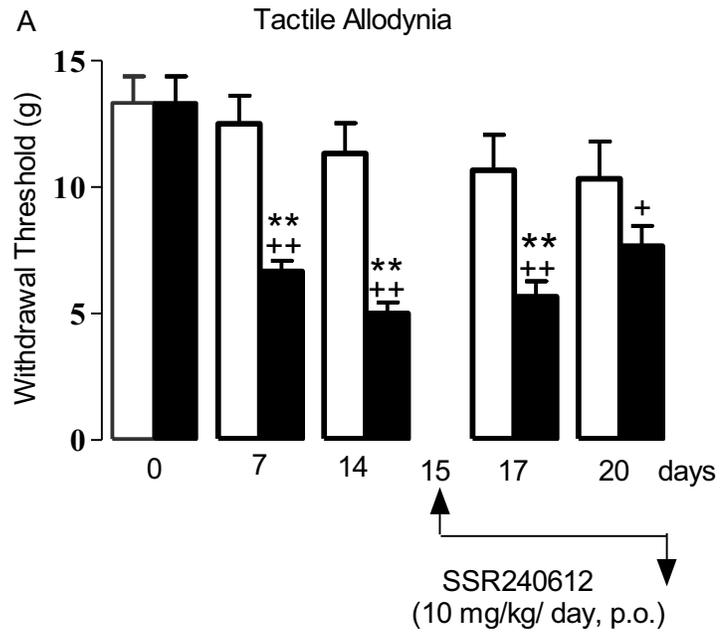


Figure 5

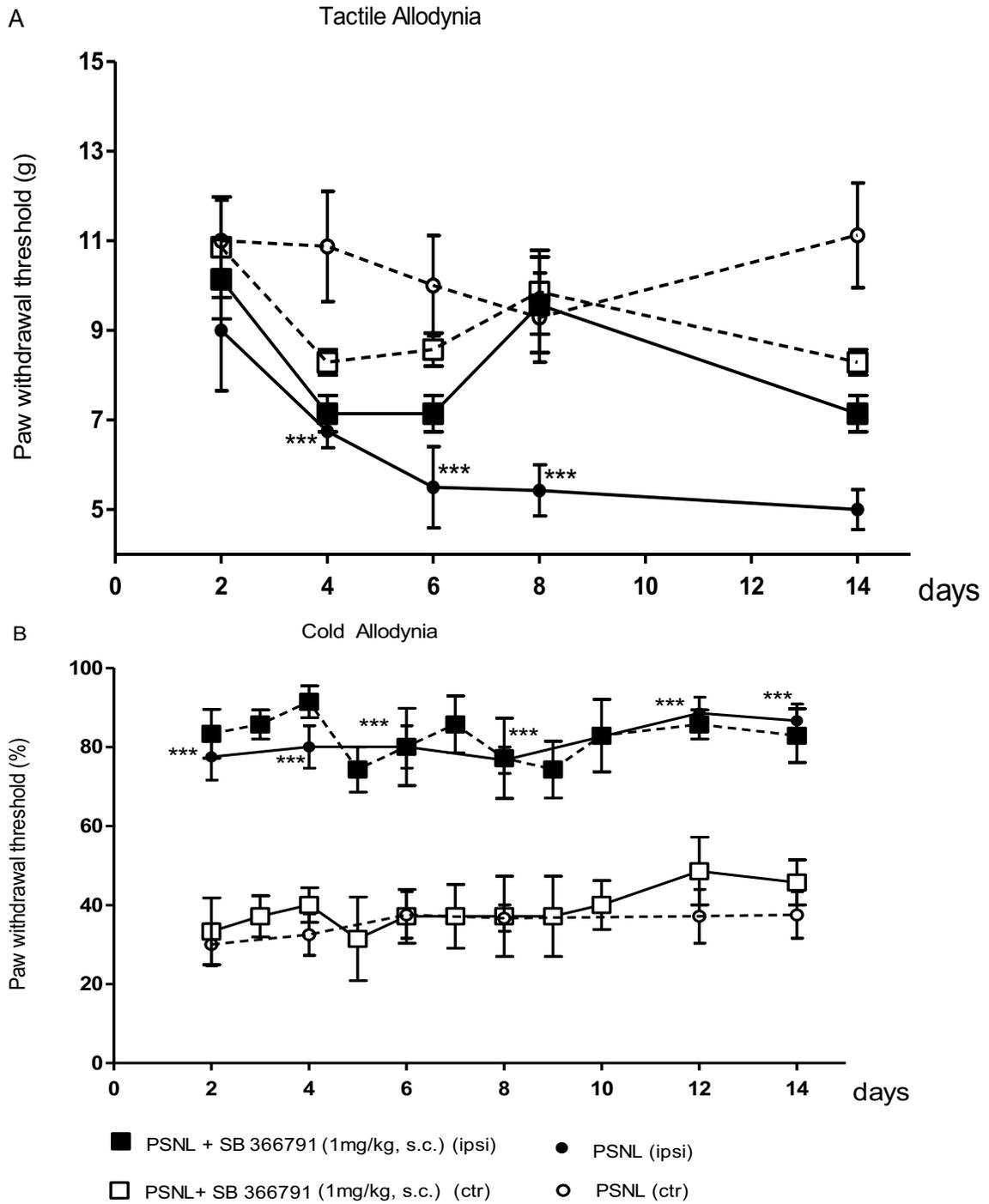


Figure 6

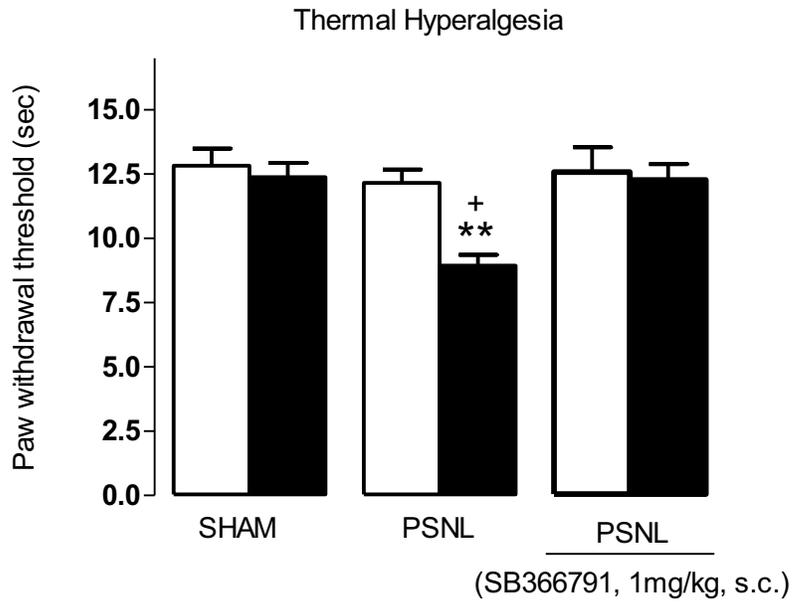


Figure 7

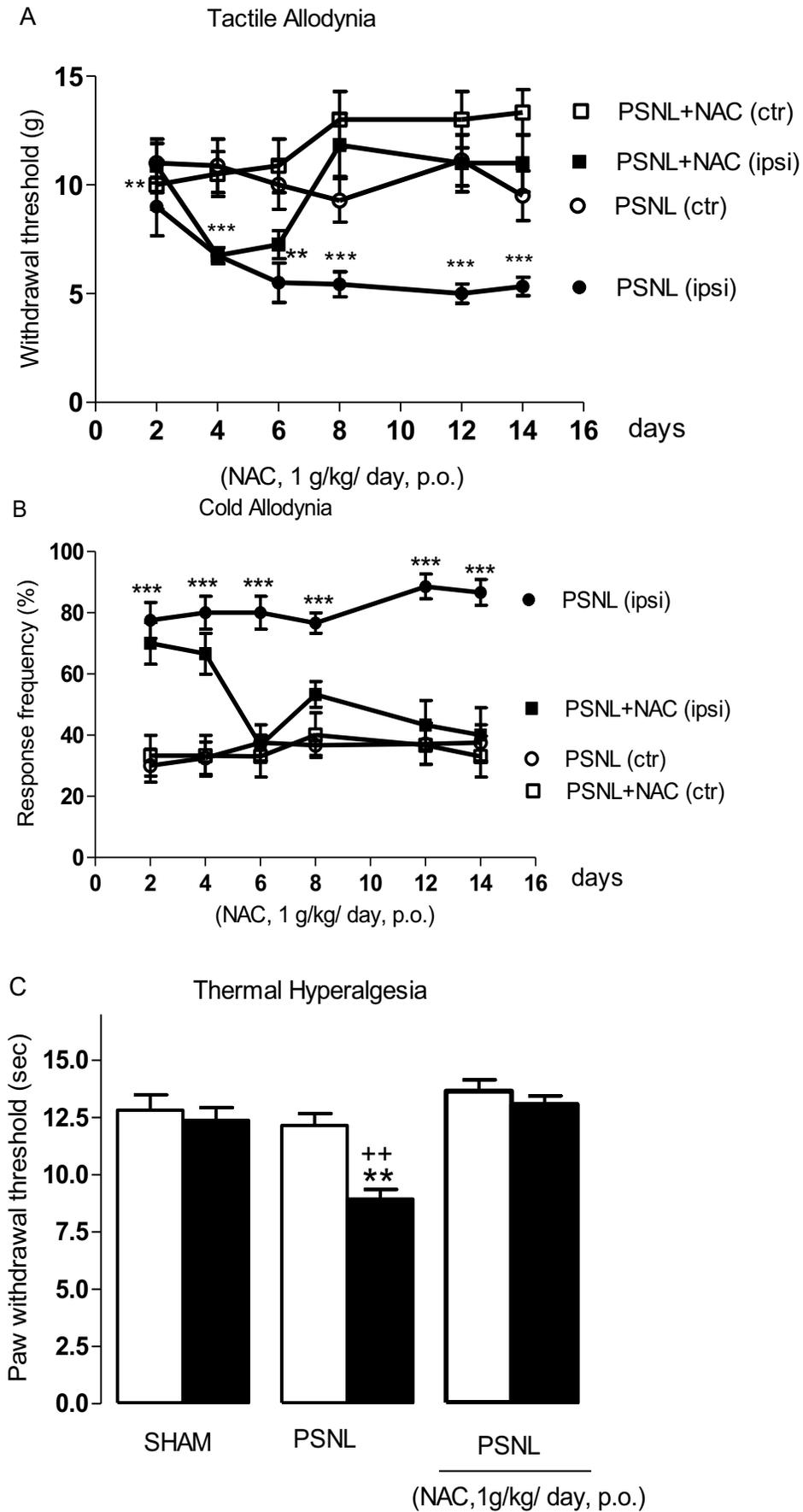


Figure 8

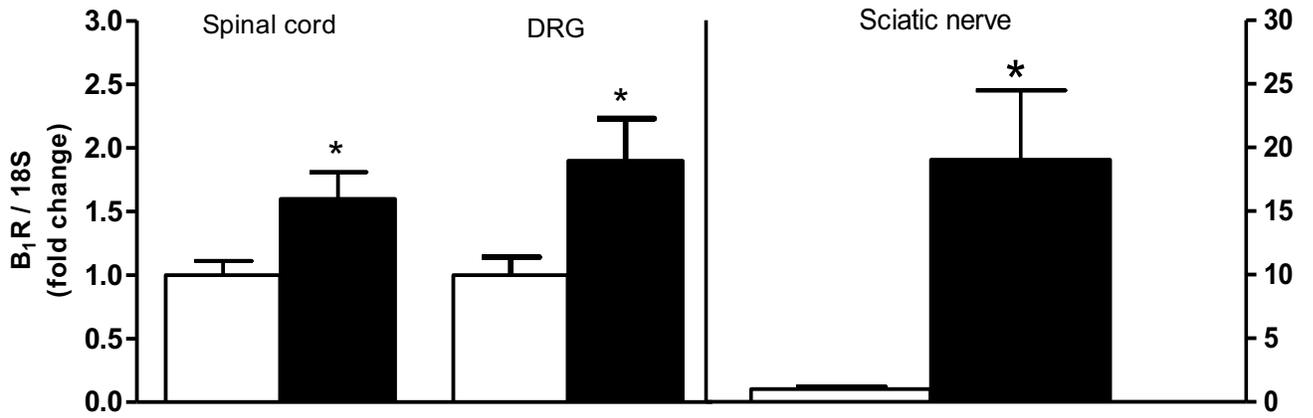


Figure 9

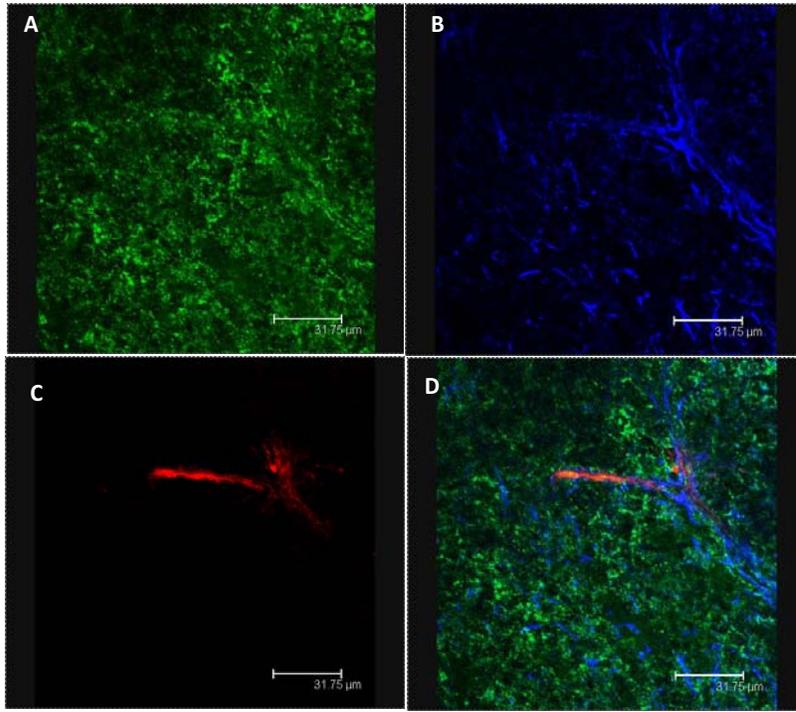
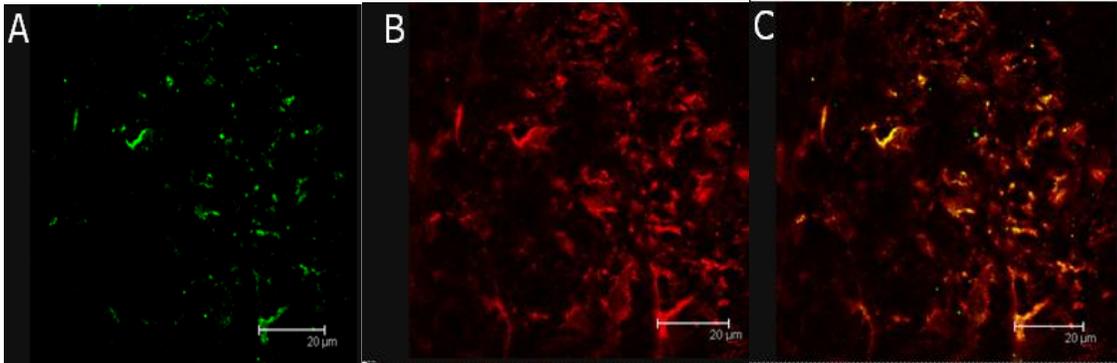


Figure 10



CHAPITRE 3 : D'AUTRES ÉTUDES

3.0 Hypothèse

Le facteur de transcription nucléaire kappa B (NF-κB) joue un rôle majeur dans la régulation de l'expression de plusieurs gènes de médiateurs pro-inflammatoires. On sait que le NF-κB est associé à la douleur neuropathique. Ainsi, l'administration intraspinale d'un antagoniste du NF-κB devrait prévenir l'hyperalgésie thermique et l'allodynie tactile et au froid chez les rats ayant subi la ligature partielle du nerf sciatique (LPNS).

3.1 Objectif

Évaluer la contribution du facteur de transcription NF-κB dans les anomalies sensorielles (hyperalgésie thermique et allodynies) chez le rat ayant subi une LPNS, 2 semaines plus tôt.

3.2 Approche expérimentale

L'antagoniste du facteur de transcription NF-κB (SN50, 100 µg/µl)³² est administré par voie intrathécale (i.t) en aigu deux semaines après la LPNS. Le SN50 a été obtenu de US Biological Swampscott, Massachusetts et a été dissout dans le liquide cérébro-spinal artificiel (aCSF).

L'hyperalgésie thermique et les allodynies tactile et au froid ont été mesurées tel que décrit au chapitre 2.

3.3 Résultats

3.3.1 Effet de l'antagoniste du NF- κ B, SN50, sur l'allodynie tactile

Deux semaines après la LPNS, l'injection intrathécale (i.t) du SN50 à une dose de 100 μ g/ μ l n'affecte pas l'allodynie tactile à 1, 3, 6, et 24 h post-injection (**Figure 15**).

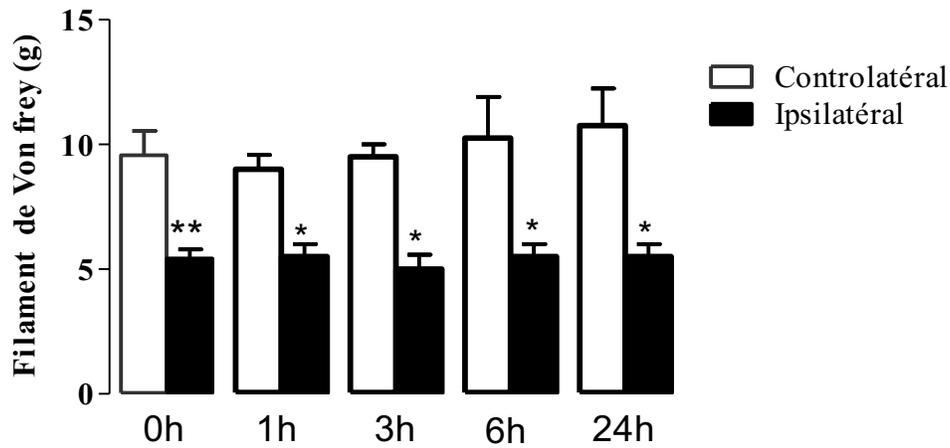


Figure 15

Les données sont exprimées selon la moyenne \pm écart-type (n=4). Les comparaisons statistiques par rapport au côté controlatéral ont été réalisées au moyen du test «*Mann-Witney*» et sont indiquées par *P < 0.05; **P < 0.01.

3.3.2 Effet de l'antagoniste du NF- κ B, SN50, sur l'allodynie au froid

Deux semaines après la LPNS, l'injection intrathécale (i.t) du SN50 à une dose de 100 μ g/ μ l renverse l'allodynie au froid à 1, 3 et 6h post-injection. L'inhibition est réversible à 24h post-injection (**Figure 16**).

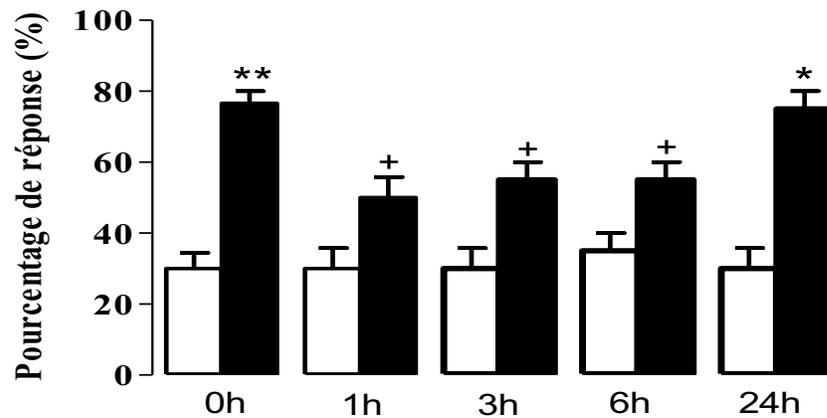


Figure 16 :

Les données sont exprimées selon la moyenne \pm écart-type (n=4). Les comparaisons statistiques avec le côté controlatéral (*) ou ipsilatéral avant le traitement (+) ont été réalisées au moyen du test «*Mann-Witney*». ⁺/*P < 0.05; **P < 0.01.

3.3.3 Effet de l'antagoniste du NF- κ B, SN50, sur l'hyperalgésie thermique

Deux semaines après la LPNS, l'injection intrathécale (i.t) du SN50 à une dose de 100 μ g/ μ l renverse l'hyperalgésie thermique à 1, 3 et 6h post-injection. L'inhibition est réversible à 24h post-injection (**Figure 17**).

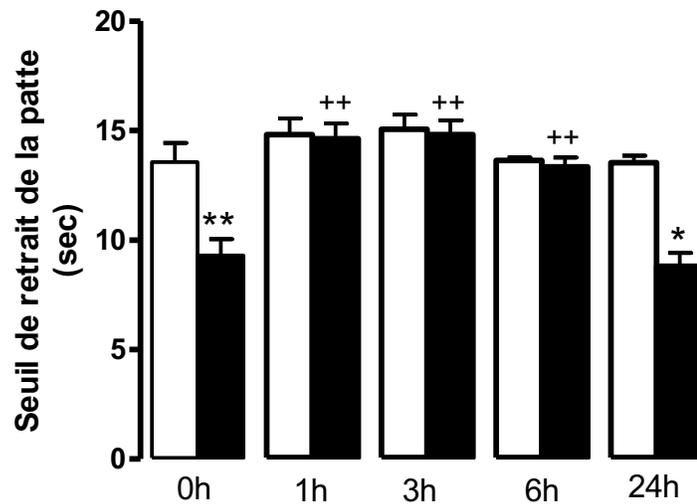


Figure 17

Les données sont exprimées selon la moyenne \pm écart-type (n=4). Les comparaisons statistiques avec le côté controlatéral (*) ou ipsilatéral avant le traitement ($^+$) ont été réalisées au moyen du test «*Mann-Witney*». *P < 0.05; $^{++}$ / **P < 0.01.

CHAPITRE 4 : DISCUSSION ET CONCLUSION

4.0 Discussion générale

La douleur neuropathique est causée par une lésion ou un dysfonctionnement du système de conduction des informations nociceptives au niveau des nerfs, de la moelle épinière ou du cerveau. Elle est ressentie comme des décharges électriques, des élancements, des sensations de froid et des picotements dans le territoire du nerf atteint. C'est le type de douleur que ressentent les amputés et qu'on appelle le membre fantôme. On estime que plus de six millions de Canadiens souffrent de douleur neuropathique dont les traitements ne sont pas encore très efficaces.

4.1 Modèles classiques de douleur neuropathique (lésion du nerf sciatique)

Les modèles animaux les plus utilisés pour évaluer les mécanismes physiopathologiques impliqués dans la douleur neuropathique et pour tester divers composés sont les modèles de lésion du nerf sciatique. Ces modèles reproduisent très bien les pathologies traumatiques et inflammatoires du système nerveux périphérique chez l'homme. Les modèles les plus connus sont la constriction chronique du nerf sciatique (modèle Bennett), la ligature spinale (modèle Chung) et la ligature partielle du nerf sciatique (**modèle Seltzer**) (Bennett et al., 1998; Seltzer et al., 1990; Kim et Chung, 1992). Le modèle Seltzer de douleur neuropathique a été utilisé dans notre projet de recherche afin de déterminer le rôle du récepteur B₁ des kinines.

L'allodynie et l'hyperalgésie mécanique ou thermique et la douleur spontanée sont les symptômes les plus courants à la suite d'une lésion du nerf sciatique. Ceci résulte de l'inflammation au site de la lésion et d'une atteinte neuronale.

Les mécanismes pathologiques qui se trouvent à la base de ces manifestations sont au niveau des systèmes nerveux périphérique et central. En ce qui concerne le système nerveux périphérique, il s'agit d'une sensibilisation périphérique résultant d'accumulation de canaux sodiques, d'une baisse de canaux potassiques, d'une sensibilisation du système nerveux sympathique, de la croissance des fibres intactes dans les territoires cutanés dénervés et de décharges ectopiques des axones altérés. Et ce qui concerne le système nerveux central, il s'agit d'une sensibilisation centrale résultant d'une réduction des mécanismes inhibiteurs et de la réorganisation structurelle des fibres sensibles de la corne dorsale (Woolf et al., 1992; Shortland et al., 1997; Zimmermann, 2001).

En effet, le degré de dommage du nerf paraît jouer un rôle important dans l'amplitude des manifestations cliniques. Une très grande perte de neurones peut avoir comme résultat une perte de la sensibilité dans les territoires innervés.

4.2 Les récepteurs des kinines sont surexprimés dans la moelle épinière et le GRD dans le modèle de lésion du nerf sciatique

Plusieurs études ont montré dans le modèle de la ligature du nerf sciatique que les sites de liaison ou l'ARNm des récepteurs B₁ et B₂ des kinines sont augmentés au niveau de la moelle épinière et du GRD du côté ipsilatéral de la lésion (Petersen et al., 1998; Eckert et al., 1999; Levy & Zochodne, 2000). Par ailleurs, des études en autoradiographie ont également montré une augmentation des sites de liaison pour les RB₁ et RB₂ au niveau du GRD et de la moelle épinière à 2 et 14 jours du côté ipsilatéral et controlatéral après la ligature partielle du nerf sciatique (LPNS) chez le rat (Petcu et al., 2008). Chez les souris, le RB₂ est principalement exprimé dans les neurones myélinisés du GRD avec une très

faible présence du RB₁. Après la ligature partielle du nerf sciatique, le RB₁ a été induit sur les neurones myélinisés du GRD (Rashid et al., 2004). Ces résultats confirment notre présente étude qui montre par PCR-quantitatif une surexpression significative de l'ARNm du RB₁ au niveau de la moelle épinière lombaire et du GRD dans le modèle LPNS. De plus, notre étude a montré une expression accrue de l'ARNm du RB₁ dans le nerf sciatique du côté ipsilatéral chez les rats ayant subi la LPNS.

4.3 Allodynie

L'allodynie est définie comme une perception douloureuse des stimuli non douloureux. Les mécanismes sous-jacents au développement de l'allodynie restent à identifier. Par contre, il semble que l'allodynie tactile est relayée par les fibres sensorielles A β (Woolf et al., 1992) et que l'allodynie au froid serait relayée par les fibres A δ (Khan et al., 2002). De façon générale, leur développement semble résulter de la formation de prolongements collatéraux dans la corne dorsale de la moelle épinière faisant de nouvelles synapses avec des interneurons inhibiteurs ou avec des neurones de 2^e ordre. Ces derniers reçoivent normalement un "input" monosynaptique des fibres sensorielles de type C (Pitcher & Henry, 2000). Ainsi, les fibres sensibles au toucher et au froid peuvent stimuler des neurones de 2^e ordre normalement associés aux sensations douloureuses. De plus, ces fibres sensorielles non-nociceptives adoptent un phénotype pro-inflammatoire caractérisé par leur nouvelle capacité à synthétiser et libérer des peptides pro-inflammatoires (SP et le CGRP) (Pitcher & Henry, 2000).

L'objectif des présents travaux était de déterminer la contribution du RB₁ des kinines dans le développement et la persistance de l'allodynie tactile et au froid chez le rat LPNS.

Nos résultats suggèrent premièrement que ces rats développent l'allodynie tactile et au froid du 2^e au 14^e jour post-lésion, confirmant de précédents travaux réalisés au laboratoire (Petcu et al., 2008). Aussi, en accord avec les travaux de Petcu (2008), nous avons démontré que les allodynies tactile et au froid ne sont pas bloquées par l'administration aiguë du SSR240612 ou du R-954. En effet, les niveaux d'allodynie tactile et au froid chez les rats LPNS n'ont pas changé après l'administration aiguë et systémique (voie sous-cutanée) des antagonistes du RB₁ (LF22-0542) et du RB₂ (LF16-0687) dans l'étude de Petcu et al., (2005). Toutefois, nos données montrent que l'administration chronique (5 jours) du SSR240612 renverse les allodynies chez les rats LPNS. Ceci est en conformité avec l'observation qu'un traitement chronique avec le SSR240612 renverse les allodynies présentes chez les rats diabétiques de type 2 (Dias et al., 2010). Mentionnons que l'administration systémique d'un antagoniste peptidique du RB₁ (des-Arg⁹-Leu⁸-BK) réduit l'hyperalgésie thermique et l'allodynie mécanique produite par la constriction du nerf sciatique chez le rat (Levy & Zochodne, 2000; Yamaguchi-Sase et al., 2003). De plus, l'allodynie mécanique a été significativement réduite chez des souris LPNS invalidées pour le gène du RB₁ (Ferreira et al., 2005).

En conclusion, il semble qu'un traitement chronique avec l'antagoniste du RB₁ (SSR240612) ou l'invalidation du récepteur renverse le développement de l'allodynie tactile et au froid chez les animaux LPNS. Ces données contrastent avec l'effet aigu de l'antagoniste, ce qui peut s'expliquer par 1- les propriétés physico-chimiques du composé non-peptidique SSR240612 (suggérant un site d'action spinal/supraspinal); 2- l'effet du SSR240612 sur l'inhibition de l'expression du RB₁ lorsqu'administré en chronique (Dias

et al., 2010) et/ou 3- les niveaux de stress oxydatif, composante essentielle au développement des neuropathies chez les rats LPNS (Tanabe et al., 2009).

En effet, l'administration chronique du SSR240612 renverse le stress oxydatif chez le rat diabétique (Dias et al., 2010). L'inhibition du stress oxydatif prévenait l'induction du RB₁ chez le rat diabétique (Lungu et al., 2007; Ismael et al., 2008). Le traitement avec le NAC a aussi renversé l'induction du RB₁ à la suite de la LPNS, suggérant que le stress oxydatif est impliqué dans l'induction du RB₁ dans notre modèle de douleur neuropathique. L'inhibition de l'expression du RB₁ de même que la prévention des allodynies et de l'hyperalgésie thermique par le NAC supporte donc d'avantage un rôle du RB₁ dans ces réponses.

4.4 L'hyperalgésie thermique

L'hyperalgésie thermique est relayée par les fibres A δ et les afférences primaires de petit diamètre qui comprennent à la fois les fibres C peptidergiques et non-peptidergiques. Des études ont montré que les récepteurs des kinines sont impliqués dans le maintien de l'hyperalgésie thermique dans différents modèles de douleur neuropathique, incluant la LPNS et le diabète de types 1 et 2 (Yamaguchi-Sase et al., 2003; Petcu et al., 2008; Dias et al., 2007; Talbot et al., 2009). L'hyperalgésie thermique observée après stimulation intraspinale du RB₁ dépendrait de la libération de la substance P (récepteur NK-1), du glutamate (récepteur NMDA), des prostaglandines (Cox-2) et du monoxyde d'azote (NO) puisque les inhibiteurs de ces médiateurs par voie intrathécale prévient la réponse hyperalgésique d'un agoniste B₁ et de la substance P (Couture et al., 2001).

L'hyperalgésie thermique dans un modèle de diabète de type 1 chez la souris est bloquée par un traitement systémique avec les antagonistes sélectifs du RB₁ (R-715 et R-954)

(Gabra et al., 2003a; 2003b) ou encore chez la souris invalidée pour le gène du RB₁(Gabra et al., 2005). De plus, dans un modèle de lésion du nerf sciatique, l'hyperalgésie thermique a été bloquée à la suite de l'administration orale du SSR240612 ou chez la souris invalidée pour le gène du RB₁ (Gougat et al., 2004; Ferreira et al., 2005).

Ces études appuient donc nos résultats qui montrent le renversement de l'hyperalgésie thermique à la suite de l'administration des antagonistes peptidique (R-954) et non-peptidique (SSR240612) du RB₁ dans le modèle LPNS. L'efficacité des antagonistes peptidiques qui ne traversent pas la barrière hémato-encéphalique supporte un mécanisme périphérique sur les fibres de type C.

4.5 Implication des cellules gliales dans la douleur neuropathique

Des recherches récentes ont montré que les cellules gliales sont fortement activées dans la neuropathie et peuvent influencer le développement de l'allodynie et de l'hyperalgésie (Milligan & Watkins, 2009). Leur activation aboutit à la libération de plusieurs médiateurs pro-nociceptifs, incluant les prostaglandines, le glutamate et les cytokines (Watkins et al., 2003). L'inhibition de la microglie ou des astrocytes par le fluorocitrate ou la minocycline renverse la douleur neuropathique (allodynie ou hyperalgésie thermique) chez les rats ayant subi une lésion du nerf sciatique ou spinale (Milligan et al., 2003; Ledebor et al., 2005; Lin et al., 2007a; Mika et al., 2007) et chez les rats atteints du diabète de type 1 (Talbot et al., 2009).

Une étude a montré que le RB₁ est principalement exprimé sur les neurones du GRD, colocalisé avec le CGRP, un marqueur des fibres C (Ma et al., 2001). Mais ce n'est que récemment que la présence du RB₁ a été montrée sur les fibres sensorielles de type C, les

astrocytes et la microglie dans la moelle épinière chez les rats atteints du diabète de type 1 (Talbot et al., 2009). Les inhibiteurs de la microglie renversent la surexpression du gène du RB₁, de l'IL-1beta, du TNF-alpha, du TRPV1, ainsi que les augmentations des sites de liaison du RB₁ et de l'immunoréactivité de Iba-1 (marqueur de la microglie) chez les rats diabétiques (Talbot et al., 2010). La surexpression du RB₁ a aussi été rapportée dans la microglie en culture primaire après la stimulation avec la BK (Noda et al., 2003). L'agoniste du RB₁ (des-Arg⁹-BK) augmente le calcium intracellulaire dans les astrocytes en culture (Gimpl et al., 1992). Ces études élaborent ainsi une nouvelle piste et un éventuel mécanisme impliqué dans l'apparition de la douleur. Notre étude a révélé, par microscopie confocale, la surexpression du RB₁ sur les fibres C et les cellules microgliales mais non sur les astrocytes dans le modèle de LPNS. Nos données suggèrent que le RB₁ sur la microglie contribue davantage aux allodynies, lesquelles sont sensibles aux antagonistes du RB₁ qui traversent la barrière hémato-encéphalique.

4.6 Le rôle du TRPV1 dans la douleur neuropathique périphérique

Le TRPV1 est surexprimé en général sur les fibres C et A δ et son rôle est connu dans l'hyperalgésie thermique (Szallasi et al., 1994). La stimulation de ce récepteur libère des neuropeptides tels que la substance P, la neurokinine A et le CGRP (Lin et al., 2007b). L'hyperalgésie thermique produite par la lésion partielle du nerf sciatique semble être contrôlée par des nocicepteurs thermiques (TRPV1) localisés sur les fibres C (Bölskei et al., 2005). Une surexpression du gène du TRPV1 dans la moelle épinière et le GRD a été documentée dans un modèle de douleur neuropathique produit par lésion du nerf sciatique (Chen et al., 2009; Ma et al., 2010) ainsi que dans un modèle de diabète de type 1 induit par la STZ (Talbot et al., 2009). Nos travaux ont montré l'efficacité d'un

traitement chronique avec l'antagoniste du TRPV1 (SB366791) sur les douleurs neuropathiques. Ceci a été démontré par l'administration par voie sous-cutanée du SB366791, injecté un jour avant et pendant les deux premières semaines après la ligature. Ce traitement a renversé l'hyperalgésie thermique et l'allodynie tactile du côté de la patte ipsilatérale, mais pas l'allodynie au froid. Puisque ce traitement a prévenu l'induction du RB₁, il semble qu'une partie de l'effet thérapeutique de l'antagoniste TRPV1 soit due à une interférence avec l'action pro-nociceptive du RB₁.

4.7 Le stress oxydatif est associé à la douleur neuropathique

Dans un modèle de ligature du nerf sciatique ou spinale, l'injection intrathécale ou systémique du phenyl N-tert butylnitron (PNB) (un éboueur puissant des radicaux libres) a amélioré l'hypersensibilité thermique et mécanique. Cette étude montre l'importance des ERO incluant le NO et le superoxyde d'hydrogène dans le maintien de la douleur neuropathique (Kim et al., 2004; Tanabe et al., 2009). Dans un modèle de ligature serrée des nerfs rachidiens en L5, les ERO sont impliquées dans l'activation des récepteurs NMDA, une étape essentielle dans la sensibilisation centrale et dans la contribution à l'hyperalgésie (Gao et al., 2007).

D'autres études ont montré le rôle bénéfique des antioxydants dans différents modèles de douleur neuropathique comme la N-acetyl-L-cysteine (NAC) et l'acide alpha-lipoïque.

L'acide alpha-lipoïque est un puissant antioxydant universel actif à la fois en milieu aqueux et lipidique; il est aussi capable de protéger tous les compartiments des cellules de l'organisme. Il est notamment capable de neutraliser la production excessive de radicaux libres à l'intérieur des mitochondries et d'inverser certaines détériorations

mitochondriales provoquées par les lésions oxydatives. Il est considéré comme un antioxydant neuroprotecteur métabolique (Packer et al., 1997). De nombreuses publications confirment ses multiples effets bénéfiques pour la santé et, notamment, le rôle vital qu'il joue dans la protection des mitochondries, dans la prévention et le traitement du diabète et de ses complications ou dans le traitement des lésions des nerfs périphériques (Lungu et al., 2007; Senoglu et al., 2009). Cet antioxydant permet la neuroprotection des lésions d'ischémie-reperfusion des nerfs périphériques (Mitsui et al., 1999).

Certains essais préliminaires ont permis de constater que le NAC pouvait contrer les effets nocifs d'une perte de cystéine et d'une déficience en glutathion (Droge & Breitkreutz, 1999; 2000). Le NAC est également un neuroprotecteur pour plusieurs cellules neuronales contre une variété de stimuli nocifs (Naik et al., 2006). De plus, le NAC peut inhiber l'activation de la kinase c-Jun N-terminal, la p38 MAP kinase et le facteur de transcription nucléaire kappa B (facteur ayant une activité de régulation de nombreux gènes). Cet antioxydant peut également empêcher l'apoptose et promouvoir la survie cellulaire en activant la voie extracellulaire de la régulation du signal kinase, un concept utile pour traiter certaines maladies dégénératives (Zafarullah et al., 2003).

Un traitement chronique avec le NAC a renversé l'allodynie tactile et au froid chez le rat atteint d'un diabète de type 2 (Ismael et al., 2008). Aussi l'administration intrapéritonéale du NAC a entraîné une réduction considérable de l'hyperalgésie induite par la lésion du nerf sciatique chez le rat (Naik et al., 2006).

Notre étude a démontré dans le modèle de LPNS qu'un traitement chronique avec le NAC, 4 jours avant et pendant les deux semaines post-ligature, renverse l'hyperalgésie à

partir du 14^e jour et l'allodynie à partir de la deuxième semaine ainsi que l'expression du RB₁ dans la moelle épinière et le nerf sciatique. Ceci confirme que le stress oxydatif joue un rôle majeur dans la douleur neuropathique et l'induction du RB₁. D'autres études supportent le concept que l'induction du RB₁ est liée au stress oxydatif. Dans un modèle de diabète de type 1 induit par la streptozotocine, le traitement d'une semaine avec le NAC a prévenu l'augmentation de l'ARNm du RB₁ dans la rétine chez le rat (Abdoun et al., 2008). Des études ont montré qu'une alimentation enrichie en acide alpha-lipoïque atténue la densité des sites de liaison et l'ARNm du RB₁ dans la moelle épinière et dans plusieurs tissus périphériques ainsi que la production vasculaire d'anion superoxyde vasculaire chez les rats atteints de diabète de type 2 (El Midaoui et al., 2005; Lungu et al., 2007). Par ailleurs, l'acide alpha-lipoïque peut inhiber l'activation du NF-κB (Ying et al., 2010).

En effet, des études montrent que le facteur NF-κB est activé dans plusieurs modèles de douleur neuropathique (Sun et al., 2006; Fu et al., 2010). Ce facteur de transcription est connu également pour induire l'expression du RB₁ (Marceau & Bachvarov, 1998; Schanstra et al., 1998; Zhou et al., 1998; Campos et al., 1999; Medeiros et al., 2004) dans différentes conditions pathologiques. Réciproquement, la stimulation du RB₁ active le NF-κB (Larrivée et al., 1998). Dans notre étude, l'inhibition du NF-κB par l'injection intrathécale de SN50 a bloqué l'hyperalgésie thermique et l'allodynie au froid suggérant la contribution de ce facteur dans l'action du RB₁ dans la douleur neuropathique.

Perspective

Des études réalisées dans notre laboratoire ont montré que le blocage sélectif de la microglie avec le fluorocitrate et la minocycline prévient la surexpression du RB₁ dans la moelle épinière chez le rat diabétique de type 1. De plus, ce blocage prévient l'hyperalgésie thermique et l'allodynie tactile causées par l'agoniste du RB₁ (Talbot et al., 2010). Notre laboratoire avait déjà montré que l'hyperalgésie thermique causée par l'activation intraspinale du RB₁ est relayée par la relâche intraspinale de SP, NO et de glutamate (Couture et al., 2001). On peut donc émettre l'hypothèse que la stimulation du RB₁ microglial induit la libération de médiateurs pro-inflammatoires. Ainsi, il serait intéressant de vérifier si l'inhibition de la microglie par le fluorocitrate et la minocycline réduit l'hyperalgésie thermique et l'allodynie de même que la surexpression du RB₁ des kinines dans notre modèle.

Comme autre perspective, il sera important de confirmer le site d'action du RB₁. Ceci peut être établi par des injections périphérique et intrathécale d'antagonistes du RB₁ qui ne traversent pas la barrière hémato-encéphalique (R-954). Ainsi, cette expérience permettrait de préciser le rôle du RB₁ microglial dans la douleur neuropathique, et en particulier, l'allodynie.

Conclusion

Le modèle de douleur neuropathique obtenu à la suite d'une lésion du nerf sciatique amène la surexpression du RB₁ des kinines au niveau de la moelle épinière, du GRD et du nerf sciatique. Le RB₁ est également surexprimé sur les fibres de type C et la microglie, ce qui pourrait contribuer à la douleur neuropathique chez le rat. Cette surexpression a été documentée au moyen du PCR quantitatif en temps réel et par immunohistochimie en microscopie confocale.

En utilisant une source radiante de chaleur, des filaments de Von Frey et la technique de l'évaporation de l'acétone appliquée à la surface plantaire du rat, nous avons pu démontrer qu'un traitement prolongé avec l'antagoniste non-peptidique du RB₁ (SSR240612) renverse l'allodynie tactile et au froid ainsi que l'hyperalgésie thermique. De plus, un traitement chronique avec l'antagoniste du TRPV1 (SB366791) ou avec l'antioxydant N-acétyl-L-cystéine renverse l'hyperalgésie thermique, l'allodynie et la surexpression du RB₁.

Ces travaux renforcent l'idée que le RB₁ peut être considéré comme une cible thérapeutique dans le traitement de la douleur neuropathique. Le stress oxydatif et le TRPV1 pourraient être impliqués dans l'induction et la surexpression du RB₁.

BIBLIOGRAPHIE

Bibliographie

Abdouh M, Talbot S, Couture R, & Hassessian HM (2008). Retinal plasma extravasation in streptozotocin-diabetic rats mediated by kinin B(1) and B(2) receptors. *Br J Pharmacol* **154**, 136-143.

Adam A, Albert A, Calay G, Closset J, Damas J, & Franchimont P (1985). Human kininogens of low and high molecular mass: quantification by radioimmunoassay and determination of reference values. *Clin Chem* **31**, 423-426.

Alberts, B. (2004). *Biologie moléculaire de la cellule*. (4e éd.). Paris: Flammarion Médecine-Sciences.

Amaya F, Shimosato G, Nagano M, Ueda M, Hashimoto S, Tanaka Y, Suzuki H, & Tanaka M (2004). NGF and GDNF differentially regulate TRPV1 expression that contributes to development of inflammatory thermal hyperalgesia. *Eur J Neurosci* **20**, 2303-2310.

Ametov AS, Barinov A, Dyck PJ, Hermann R, Kozlova N, Litchy WJ, Low PA, Nehrdich D, Novosadova M, O'Brien PC, Reljanovic M, Samigullin R, Schuette K, Stokov I, Tritschler HJ, Wessel K, Yakhno N, & Ziegler D (2003). The sensory symptoms of diabetic polyneuropathy are improved with alpha-lipoic acid: the SYDNEY trial. *Diabetes Care* **26**, 770-776.

Aruoma OI, Halliwell B, Gajewski E, & Dizdaroglu M (1989). Damage to the bases in DNA induced by hydrogen peroxide and ferric ion chelates. *J Biol Chem* **264**, 20509-20512.

Austin PJ, Moalem-Taylor G (2010). The neuro-immune balance in neuropathic pain: Involvement of inflammatory immune cells, immune-like glial cells and cytokines. *J Neuroimmunol* **229**, 26-50.

Bascands J.L., Pecher C., Rouaud S., Emond C., Leung Tack J., Bastie M.J., Burch R., Regoli D., Girolami J.P (1993). Evidence for existence of two distinct bradykinin receptors on rat mesangial cells. *Am. J. Physiol* **264**, 548-56.

Baumann TK, Simone DA, Shain CN, LaMotte RH (1991). Neurogenic hyperalgesia: the search for the primary cutaneous afferent fibers that contribute to capsaicin-induced pain and hyperalgesia. *J Neurophysiol* **66**, 212-27

Beattie MS, Hermann GE, Rogers RC, & Bresnahan JC (2002). Cell death in models of spinal cord injury. *Prog Brain Res* **137**, 37-47.

Bennett DL, Averill S, Clary Do, Priestley JV, Mc Mahon SB (1996). Postnatal changes in the expression of the trkA high-affinity NGF receptor in primary sensory neurons. *Eur J Neurosci* **8**, 2204-8.

Bennett GJ & Xie YK (1988). A peripheral mononeuropathy in rat that produces disorders of pain sensation like those seen in man. *Pain* **33**, 87-107.

Besson JM, Guilbaud G, Abdelmoumene M, & Chaouch A (1982). [Physiology of nociception]. *J Physiol (Paris)* **78**, 7-107.

Bhoola KD, Figueroa CD, & Worthy K (1992). Bioregulation of kinins: kallikreins, kininogens, and kininases. *Pharmacol Rev* **44**, 1-80.

Bölcskei K, Helyes Z, Szabó A, Sándor K, Elekes K, Németh J, Almási R, Pintér E, Petho G, Szolcsányi J (2005). Investigation of the role of TRPV1 receptors in acute and chronic nociceptive processes using gene-deficient mice. *Pain* **117**, 368-76.

Boucher T J, McMahon S B (2001). Neurotrophic factors and neuropathic pain. *Curr Opin Pharmacol* **1**, 66-72.

Boulanger A (2005). Approche et traitement de la douleur neuropathique. Dans : Pharmacologie de la douleur P. Beaulieu. Les Presses de l'Université de Montréal, Québec, Canada.

Brownlee M (2005). The pathobiology of diabetic complications: a unifying mechanism. *Diabetes* **54**, 1615-1625.

Cai L & Kang YJ (2001). Oxidative stress and diabetic cardiomyopathy: *a brief review*. *Cardiovasc Toxicol* **1**, 181-193.

Calixto JB, Cabrini DA, Ferreira J, & Campos MM (2000). Kinins in pain and inflammation. *Pain* **87**, 1-5.

Calixto JB, Cabrini DA, Ferreira J, & Campos MM (2001). Inflammatory pain: kinins and antagonists. *Curr Opin Anaesthesiol* **14**, 519-526.

Campos MM, Souza GE, Calixto JB (1999). In vivo B1 kinin-receptor up regulation. Evidence for involvement of protein kinases and nuclear factor kappa B pathways. *Br. J. Pharmacol* **127**, 1851-1859.

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

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

Ceolotto G, Papparella I, Lenzini L, Sartori M, Mazzoni M, Iori E, Franco L, Gallo A, de Kreutzenberg SV, Tiengo A, Pessina AC, Avogaro A, & Semplicini A (2006). Insulin generates free radicals in human fibroblasts ex vivo by a protein kinase C-dependent mechanism, which is inhibited by pravastatin. *Free Radic Biol Med* **41**, 473-483.

Chao J, Zhang JJ, Lin KF, & Chao L (1998). Adenovirus-mediated kallikrein gene delivery reverses salt-induced renal injury in Dahl salt-sensitive rats. *Kidney Int* **54**, 1250-1260.

Chen, X., Touyz, R. M., Park, J. B., et Schiffrin, E. L. (2001). Antioxidant effects of vitamins C and E are associated with altered activation of vascular NADPH oxidase and superoxide dismutase in stroke-prone SHR. *Hypertension* **38**, 606-611.

Chen Y, Willcockson HH, & Valtschanoff JG (2009). Influence of the vanilloid receptor TRPV1 on the activation of spinal cord glia in mouse models of pain. *Exp Neurol* **220**, 383-390.

Christopher J, Velarde V, Zhang D, Mayfield D, Mayfield RK, & Jaffa AA (2001). Regulation of B(2)-kinin receptors by glucose in vascular smooth muscle cells. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **280**, H1537-H1546.

Chuang HH, Prescott ED, Kong H, Shields S, Jordt SE, Basbaum AI, Chao MV, & Julius D (2001). Bradykinin and nerve growth factor release the capsaicin receptor from PtdIns(4,5)P2-mediated inhibition. *Nature* **411**, 957-962.

Conway SJ (2008). TRPping the switch on pain: an introduction to the chemistry and biology of capsaicin and TRPV1. *Chem Soc Rev* **37**, 1530-1545.

Couture R, Harrisson M, Vianna RM, & Cloutier F (2001). Kinin receptors in pain and inflammation. *Eur J Pharmacol* **429**, 161-176.

Couture R & Lindsey CJ (2000). Brain kallikrein-kinin system: from receptors to neural pathways and physiological functions. In: Quirion, R., Bjorklund, A., Hokfelt, T. (Eds), *Handbook of Chemical Neuroanatomy. Peptide Receptors, Part 1, vol.16, Elsevier Science B.V., Amsterdam, the Netherlands* **16**, 241-300.

Daaka Y, Luttrell LM, Ahn S, Della Rocca GJ, Ferguson SS, Caron MG, & Lefkowitz RJ (1998). Essential role for G protein-coupled receptor endocytosis in the activation of mitogen-activated protein kinase. *J Biol Chem* **273**, 685-688.

Davis JB, Gray J, Gunthorpe MJ, Hatcher JP, Davey PT, Overend P, Harries MH, Latcham J, Clapham C, Atkinson K, Hughes SA, Rance K, Grau E, Harper AJ, Pugh PL, Rogers DC, Bingham S, Randall A, & Sheardown SA (2000). Vanilloid receptor-1 is essential for inflammatory thermal hyperalgesia. *Nature* **405**, 183-187.

de Champlain J, Wu R, Girouard H, Karas M, EL Midaoui, Laplante MA, & Wu L (2004). Oxidative stress in hypertension. *Clin Exp Hypertens* **26**, 593-601.

Decarie A, Raymond P, Gervais N, Couture R, & Adam A (1996). Serum interspecies differences in metabolic pathways of bradykinin and [des-Arg⁹]BK: influence of enalaprilat. *Am J Physiol* **271**, H1340-H1347.

Decosterd I, Allchorne A, & Woolf CJ (2004). Differential analgesic sensitivity of two distinct neuropathic pain models. *Anesth Analg* **99**, 457-63.

Decosterd I & Woolf CJ (2000). Spared nerve injury: an animal model of persistent peripheral neuropathic pain. *Pain* **87**, 149-158.

Depaulis A, Morgan MM, & Liebeskind JC (1987). GABAergic modulation of the analgesic effects of morphine microinjected in the ventral periaqueductal gray matter of the rat. *Brain Res* **436**, 223-228.

Devor M, Janig W, & Michaelis M (1994). Modulation of activity in dorsal root ganglion neurons by sympathetic activation in nerve-injured rats. *J Neurophysiol* **71**, 38-47.

Dias JP, Ismael MA, Pilon M, de Champlain J, Ferrari B, Carayon P, & Couture R (2007). The kinin B1 receptor antagonist SSR240612 reverses tactile and cold allodynia in an experimental rat model of insulin resistance. *Br J Pharmacol* **152**, 280-287.

Dias JP, Talbot S, Senecal J, Carayon P, & Couture R (2010). Kinin B1 receptor enhances the oxidative stress in a rat model of insulin resistance: outcome in hypertension, allodynia and metabolic complications. *PLoS One* **5**, e12622.

Distler A & Wolff HP (1979). [Renal kallikrein-kinin system and control of blood pressure (author's transl)]. *Klin Wochenschr* **57**, 1037-1045.

Donnerer J & Amann R (1993). The inhibition of neurogenic inflammation. *Gen Pharmacol* **24**, 519-529.

Dray A (1997). Kinins and their receptors in hyperalgesia. *Can J Physiol Pharmacol* **75**, 704-12.

Dray A & Perkins M (1993). Bradykinin and inflammatory pain. *Trends Neurosci* **16**, 99-104.

Droge W & Breitkreutz R (1999). N-acetyl-cysteine in the therapy of HIV-positive patients. *Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care* **2**, 493-498.

Droge W & Breitkreutz R (2000). Glutathione and immune function. *Proc Nutr Soc* **59**, 595-600.

Dubner R (1991). A call for more science, not more rhetoric, regarding opioids and neuropathic pain. *Pain* **47**, 1-2.

Eckert A, Segond von BG, Sopper S, & Petersen M (1999). Spatio-temporal pattern of induction of bradykinin receptors and inflammation in rat dorsal root ganglia after unilateral nerve ligation. *Pain* **83**, 487-497.

El Midaoui A, Ongali B, Petcu M, Rodi D, de Champlain J, Neugebauer W, & Couture R (2005). Increases of spinal kinin receptor binding sites in two rat models of insulin resistance. *Peptides* **26**, 1323-1330.

El-Hashim AZ & Jaffal SM (2009). Nerve growth factor enhances cough and airway obstruction via TrkA receptor- and TRPV1-dependent mechanisms. *Thorax* **64**, 791-797.

Enquist J, Skroder C, Whistler JL, & Leeb-Lundberg LM (2007). Kinins promote B2 receptor endocytosis and delay constitutive B1 receptor endocytosis. *Mol Pharmacol* **71**, 494-507.

Fagerlund R, Kinnunen L, Kohler M, Julkunen I, & Melen K (2005). NF- κ B is transported into the nucleus by importin α 3 and importin α 4. *J Biol Chem* **280**, 15942-15951.

Fellin T, Sul JY, D'Ascenzo M, Takano H, Pascual O, & Haydon PG (2006). Bidirectional astrocyte-neuron communication: the many roles of glutamate and ATP. *Novartis Found Symp* **276**, 208-217.

Ferguson SS (2001). Evolving concepts in G protein-coupled receptor endocytosis: the role in receptor desensitization and signaling. *Pharmacol Rev* **53**, 1-24.

Ferreira J, Beirith A, Mori MA, Araujo RC, Bader M, Pesquero JB, & Calixto JB (2005). Reduced nerve injury-induced neuropathic pain in kinin B1 receptor knock-out mice. *J Neurosci* **25**, 2405-2412.

Ferreira J, Campos MM, Pesquero JB, Araujo RC, Bader M, & Calixto JB (2001). Evidence for the participation of kinins in Freund's adjuvant-induced inflammatory and nociceptive responses in kinin B1 and B2 receptor knockout mice. *Neuropharmacology* **41**, 1006-1012.

Fu ES, Zhang YP, Sagen J, Candiotti KA, Morton PD, Liebl DJ, Bethea JR, Brambilla R (2010). Transgenic inhibition of glial NF-kappa B reduces pain behavior and inflammation after peripheral nerve injury. *Pain* **148**, 509-18.

Gabra BH, Couture R, & Sirois P (2003)a. Functional duality of kinin receptors in pathophysiology. *Med Sci (Paris)* **19**, 1101-1110.

Gabra BH, Merino VF, Bader M, Pesquero JB, Sirois P (2005). Absence of diabetic hyperalgesia in bradykinin B1 receptor-knockout mice. *Regul Pept* **127**, 245-8.

Gabra BH, Sirois P (2003)b. Beneficial effect of chronic treatment with the selective bradykinin B1 receptor antagonists, R-715 and R-954, in attenuating streptozotocin-diabetic thermal hyperalgesia in mice. *Peptides* **24**, 1131-1139.

Gao X, Kim HK, Chung JM, & Chung K (2007). Reactive oxygen species (ROS) are involved in enhancement of NMDA-receptor phosphorylation in animal models of pain. *Pain* **131**, 262-271.

Ghosh CC, Vu HY, Mujo T, & Vancurova I (2008). Analysis of nucleocytoplasmic shuttling of NF kappa B proteins in human leukocytes. *Methods Mol Biol* **457**, 279-292.

Gimpl G, Walz W, Ohlemeyer C, & Kettenmann H (1992). Bradykinin receptors in cultured astrocytes from neonatal rat brain are linked to physiological responses. *Neurosci Lett* **144**, 139-142.

Gougat J, Ferrari B, Sarran L, Planchenault C, Poncelet M, Maruani J, Alonso R, Cudennec A, Croci T, Guagnini F, Urban-Szabo K, Martinolle JP, Soubrie P, Finance O, & Le FG (2004). SSR240612 [(2R)-2-(((3R)-3-(1,3-benzodioxol-5-yl)-3-[[[(6-methoxy-2-naphthyl)sulfonyl]amino]propanoyl]amino]-3-(4-[[2R,6S)-2,6-dimethylpiperidinyl]methyl]phenyl)-N-isopropyl-N-methylpropanamide hydrochloride], a new nonpeptide antagonist of the bradykinin B1 receptor: biochemical and pharmacological characterization. *J Pharmacol Exp Ther* **309**, 661-669.

Guilbaud G, Besson J (1997). Physiologie du circuit de la douleur. Paris, France, Maloine. Douleurs, bases fondamentales, pharmacologie, douleur aiguës, douleurs chroniques, thérapeutiques, 7-22.

Haidara MA, Yassin HZ, Rateb M, Ammar H, & Zorkani MA (2006). Role of oxidative stress in development of cardiovascular complications in diabetes mellitus. *Curr Vasc Pharmacol* **4**, 215-227.

Halassa MM, Fellin T, Takano H, Dong JH, & Haydon PG (2007). Synaptic islands defined by the territory of a single astrocyte. *J Neurosci* **27**, 6473-6477.

Hawkey CJ (1999). COX-2 inhibitors. *Lancet* **253**,370-4.

Hwang SW, Cho H, Kwak J, Lee SY, Kang CJ, Jung J, Cho S, Min KH, Suh YG, Kim D, Oh U (2000). Direct activation of capsaicin receptors by products of lipoxygenases: endogenous capsaicin-like substances. *Proc Natl Acad Sci U S A* **23**, 6155-60.

Hutchinson MR, Bland ST, Johnson KW, Rice KC, Maier SF, Watkins LR (2007). Opioid-induced glial activation: mechanisms of activation and implications for opioid analgesia, dependence and reward. *ScientificWorld J* **7**, 98–111.

Ibi M, Matsuno K, Shiba D, Katsuyama M, Iwata K, Kakehi T, Nakagawa T, Sango K, Shirai Y, Yokoyama T, Kaneko S, Saito N, & Yabe-Nishimura C (2008). Reactive oxygen species derived from NOX1/NADPH oxidase enhance inflammatory pain. *J Neurosci* **28**, 9486-9494.

Ifuku M, Farber K, Okuno Y, Yamakawa Y, Miyamoto T, Nolte C, Merrino VF, Kita S, Iwamoto T, Komuro I, Wang B, Cheung G, Ishikawa E, Ooboshi H, Bader M, Wada K, Kettenmann H, & Noda M (2007). Bradykinin-induced microglial migration mediated by B1-bradykinin receptors depends on Ca²⁺ influx via reverse-mode activity of the Na⁺/Ca²⁺ exchanger. *J Neurosci* **27**, 13065-13073.

Impellizzeri D, Mazzon E, Esposito E, Paterniti I, Bramanti P, & Cuzzocrea S (2010). Effect of Apocynin, an inhibitor of NADPH oxidase, in the inflammatory process induced by an experimental model of spinal cord injury. *Free Radic Res*.

Ismael MA, Talbot S, Carbonneau CL, Beausejour CM, & Couture R (2008). Blockade of sensory abnormalities and kinin B(1) receptor expression by N-acetyl-L-cysteine and ramipril in a rat model of insulin resistance. *Eur J Pharmacol* **589**, 66-72.

Jessell TM (2000). Neuronal specification in the spinal cord: inductive signals and transcriptional codes. *Nat Rev Genet* **1**, 20-29.

Julius D & Basbaum AI (2001). Molecular mechanisms of nociception. *Nature* **413**, 203-210.

Kagoshima M, Ito K, Cosio B, & Adcock IM (2003). Glucocorticoid suppression of nuclear factor-kappa B: a role for histone modifications. *Biochem Soc Trans* **31**, 60-65.

Kamenova P (2006). Improvement of insulin sensitivity in patients with type 2 diabetes mellitus after oral administration of alpha-lipoic acid. *Hormones (Athens)* **5**, 251-258.

Kaplan AP, Joseph K, Shibayama Y, Reddigari S, Ghebrehiwet B, & Silverberg M (1997). The intrinsic coagulation/kinin-forming cascade: assembly in plasma and cell surfaces in inflammation. *Adv Immunol* **66**, 225-272.

Keifer JA, Guttridge DC, Ashburner BP, & Baldwin AS, Jr. (2001). Inhibition of NF-kappa B activity by thalidomide through suppression of IkappaB kinase activity. *J Biol Chem* **276**, 22382-22387.

Khan G M, Chen S R, Pan H L (2002). Role of primary afferent nerves in allodynia caused by diabetic neuropathy in rats. *Neuroscience* **114**: 291-299

Kidd BL, Urban LA (2001). Mechanisms of inflammatory pain. *Br J Anaesth* **87**, 3-11.

Kim D, You B, Jo EK, Han SK, Simon MI, & Lee SJ (2010). NADPH oxidase 2-derived reactive oxygen species in spinal cord microglia contribute to peripheral nerve injury-induced neuropathic pain. *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**, 14851-14856.

Kim HK, Park SK, Zhou JL, Taglialatela G, Chung K, Coggeshall RE, & Chung JM (2004). Reactive oxygen species (ROS) play an important role in a rat model of neuropathic pain. *Pain* **111**, 116-124.

Kim SH, Chung JM (1992). An experimental model for peripheral neuropathy produced by segmental spinal nerve ligation in the rat. *Pain* **50**, 355-63.

Kirchner A, Koedel U, Fingerle V, Paul R, Wilske B & Pfister HW (2000). Upregulation of matrix metalloproteinase-9 in the cerebrospinal fluid of patients with acute Lyme neuroborreliosis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* **68**, 368-371.

Koçkar MC, Nazıroğlu M, Celik O, Tola HT, Bayram D, Koyu A (2010). N-acetylcysteine modulates doxorubicin-induced oxidative stress and antioxidant vitamin concentrations in liver of rats. *Cell Biochem Funct* **28**, 673-7.

Kovacic P, Somanathan R (2010). Multifaceted approach to resveratrol bioactivity: Focus on antioxidant action, cell signaling and safety. *Oxid Med Cell Longev* **3**, 86-100.

Kuhr FK, Zhang Y, Brovkovich V, & Skidgel RA (2010). Beta-arrestin 2 is required for B1 receptor-dependent post-translational activation of inducible nitric oxide synthase. *FASEB J* **24**, 2475-2483.

Lane NE (1997). Pain management in osteoarthritis: The role of COX-2 inhibitors. *J Rheumatol* **24**, 20-4.

Larrivéé JF, Bachvarov DR, Houle F, Landry J, Huot J, & Marceau F (1998). Role of the mitogen-activated protein kinases in the expression of the kinin B1 receptors induced by tissue injury. *J Immunol* **160**, 1419-1426.

Lassegue B & Griendling KK (2004). Reactive oxygen species in hypertension; An update. *Am J Hypertens* **17**, 852-860.

Ledeboer A, Sloane EM, Milligan ED, Frank MG, Mahony JH, Maier SF, & Watkins LR (2005). Minocycline attenuates mechanical allodynia and proinflammatory cytokine expression in rat models of pain facilitation. *Pain* **115**, 71-83.

Leeb-Lundberg LM, Kang DS, Lamb ME, & Fathy DB (2001). The human B1 bradykinin receptor exhibits high ligand-independent, constitutive activity. Roles of residues in the fourth intracellular and third transmembrane domains. *J Biol Chem* **276**, 8785-8792.

Leeb-Lundberg LM, Marceau F, Muller-Esterl W, Pettibone DJ, & Zuraw BL (2005). International union of pharmacology. XLV. Classification of the kinin receptor family: from molecular mechanisms to pathophysiological consequences. *Pharmacol Rev* **57**, 27-77.

Leem JW, Kim HK, Hulsebosch CE, & Gwak YS (2010). Ionotropic glutamate receptors contribute to maintained neuronal hyperexcitability following spinal cord injury in rats. *Exp Neurol* **224**, 321-324.

Lembeck F & Gamse R (1982). Substance P in peripheral sensory processes. *Ciba Found Symp* **35**-54.

Levy D & Zochodne DW (2000). Increased mRNA expression of the B1 and B2 bradykinin receptors and antinociceptive effects of their antagonists in an animal model of neuropathic pain. *Pain* **86**, 265-271.

Li J, Simone DA, & Larson AA (1999). Windup leads to characteristics of central sensitization. *Pain* **79**, 75-82.

Li JM & Shah AM (2004). Endothelial cell superoxide generation: regulation and relevance for cardiovascular pathophysiology. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* **287**, R1014-R1030.

Lin CS, Tsaur ML, Chen CC, Wang TY, Lin CF, Lai YL, Hsu TC, Pan YY, Yang CH, & Cheng JK (2007a). Chronic intrathecal infusion of minocycline prevents the development of spinal-nerve ligation-induced pain in rats. *Reg Anesth Pain Med* **32**, 209-216.

Lin Q, Li D, Xu X, Zou X, & Fang L (2007b). Roles of TRPV1 and neuropeptidergic receptors in dorsal root reflex-mediated neurogenic inflammation induced by intradermal injection of capsaicin. *Mol Pain* **3**, 30.

Liu B, Linley JE, Du X, Zhang X, Ooi L, Zhang H, & Gamper N (2010). The acute nociceptive signals induced by bradykinin in rat sensory neurons are mediated by inhibition of M-type K⁺ channels and activation of Ca²⁺-activated Cl⁻ channels. *J Clin Invest* **120**, 1240-1252.

Lopes P, Kar S, Chretien L, Regoli D, Quirion R, & Couture R (1995). Quantitative autoradiographic localization of [125I-Tyr8]bradykinin receptor binding sites in the rat spinal cord: effects of neonatal capsaicin, noradrenergic deafferentation, dorsal rhizotomy and peripheral axotomy. *Neuroscience* **68**, 867-881.

Lungu C, Dias JP, Franca CE, Ongali B, Regoli D, Moldovan F, & Couture R (2007). Involvement of kinin B1 receptor and oxidative stress in sensory abnormalities and arterial hypertension in an experimental rat model of insulin resistance. *Neuropeptides* **41**, 375-387.

Lamont LA, Tranquilli WJ, Grimm KA (2000). Physiology of pain. *Vet Clin North Am Small Anim Pract* **30**, 703-728.

Lyle AN & Griendling KK (2006). Modulation of vascular smooth muscle signaling by reactive oxygen species. *Physiology (Bethesda)* **21**, 269-280.

Ma MH, Yang HH, Parker K, Manyak S, Friedman JM, Altamirano C, Wu ZQ, Borad MJ, Frantzen M, Roussos E, Neeser J, Mikail A, Adams J, Sjak-Shie N, Vescio RA, & Berenson JR (2003). The proteasome inhibitor PS-341 markedly enhances sensitivity of multiple myeloma tumor cells to chemotherapeutic agents. *Clin Cancer Res* **9**, 1136-1144.

Ma QP & Heavens R (2001). Basal expression of bradykinin B(1) receptor in the spinal cord in humans and rats. *Neuroreport* **12**, 2311-2314.

Ma W, Chabot JG, Vercauteren F, & Quirion R (2010). Injured nerve-derived COX2/PGE2 contributes to the maintenance of neuropathic pain in aged rats. *Neurobiol Aging* **31**, 1227-1237.

Maddux BA, See W, Lawrence JC, Jr., Goldfine AL, Goldfine ID, & Evans JL (2001). Protection against oxidative stress-induced insulin resistance in rat L6 muscle cells by micromolar concentrations of alpha-lipoic acid. *Diabetes* **50**, 404-410.

Mantyh PW, Rogers SD, Honore P, Allen BJ, Ghilardi JR, Li J, Daughters RS, Lappi DA, Wiley RG, & Simone DA (1997). Inhibition of hyperalgesia by ablation of lamina I spinal neurons expressing the substance P receptor. *Science* **278**, 275-279.

Marceau F (1995). Kinin B1 receptors: a review. *Immunopharmacology* **30**, 1-26.

Marceau F & Bachvarov DR (1998). Kinin receptors. *Clin Rev Allergy Immunol* **16**, 385-401.

Marchand F, Perretti M, & McMahon SB (2005). Role of the immune system in chronic pain. *Nat Rev Neurosci* **6**, 521-532.

Marin-Castano ME, Schanstra JP, Praddaude F, Pesquero JB, Ader JL, Girolami JP, & Bascands JL (1998). Differential induction of functional B1-bradykinin receptors along the rat nephron in endotoxin induced inflammation. *Kidney Int* **54**, 1888-1898.

Mathis SA, Criscimagna NL, & Leeb-Lundberg LM (1996). B1 and B2 kinin receptors mediate distinct patterns of intracellular Ca²⁺ signaling in single cultured vascular smooth muscle cells. *Mol Pharmacol* **50**, 128-139.

Matsumoto M, Xie W, Ma L, & Ueda H (2008). Pharmacological switch in A-beta fiber stimulation-induced spinal transmission in mice with partial sciatic nerve injury. *Mol Pain* **4**, 25.

May MJ, D'Acquisto F, Madge LA, Glockner J, Pober JS, & Ghosh S (2000). Selective inhibition of NF-kappaB activation by a peptide that blocks the interaction of NEMO with the I-kappaB kinase complex. *Science* **289**, 1550-1554.

Mazenot C, Loufrani L, Henrion D, Ribuot C, Muller-Esterl W, & Godin-Ribuot D (2001). Endothelial kinin B(1)-receptors are induced by myocardial ischaemia-reperfusion in the rabbit. *J Physiol* **530**, 69-78.

McLean PG, Perretti M, & Ahluwalia A (2000). Kinin B(1) receptors and the cardiovascular system: regulation of expression and function. *Cardiovasc Res* **48**, 194-210.

McLean PG, Picard C, Garcia-Villar R, Ducos de LR, More J, Fioramonti J, & Bueno L (1998). Role of kinin B1 and B2 receptors and mast cells in post intestinal infection-induced hypersensitivity to distension. *Neurogastroenterol Motil* **10**, 499-508.

Medeiros R, Cabrini DA, Ferreira J, Fernandes ES, Mori MA, Pesquero JB, Bader M, Avellar MC, Campos MM, & Calixto JB (2004). Bradykinin B1 receptor expression induced by tissue damage in the rat portal vein: a critical role for mitogen-activated protein kinase and nuclear factor-kappaB signaling pathways. *Circ Res* **94**, 1375-1382.

Mehta PK & Griendling KK (2007). Angiotensin II cell signaling: physiological and pathological effects in the cardiovascular system. *Am J Physiol Cell Physiol* **292**, C82-C97.

Mendell LM (1966). Physiological properties of unmyelinated fiber projection to the spinal cord. *Exp Neurol* **16**, 316-332

Menke JG, Borkowski JA, Bierilo KK, MacNeil T, Derrick AW, Schneck KA, Ransom RW, Strader CD, Linemeyer DL, & Hess JF (1994). Expression cloning of a human B1 bradykinin receptor. *J Biol Chem* **269**, 21583-21586.

Mika J, Osikowicz M, Makuch W, & Przewlocka B (2007). Minocycline and pentoxifylline attenuate allodynia and hyperalgesia and potentiate the effects of morphine in rat and mouse models of neuropathic pain. *Eur J Pharmacol* **560**, 142-149.

Millan MJ (1999). The induction of pain: an integrative review. *Prog Neurobiol* **57**, 1-164.

Millan MJ (2002). Descending control of pain. *Prog Neurobiol* **66**, 355-474.

Milligan ED, Twining C, Chacur M, Biedenkapp J, O'Connor K, Poole S, Tracey K, Martin D, Maier SF, & Watkins LR (2003). Spinal glia and proinflammatory cytokines mediate mirror-image neuropathic pain in rats. *J Neurosci* **23**, 1026-1040.

Milligan ED & Watkins LR (2009). Pathological and protective roles of glia in chronic pain. *Nat Rev Neurosci* **10**, 23-36.

Morgan MM, Whittier KL, Hegarty DM, & Aicher SA (2008). Periaqueductal gray neurons project to spinally projecting GABAergic neurons in the rostral ventromedial medulla. *Pain* **140**, 376-386.

Mitsui Y, Schmelzer JD, Zollman PJ, Kihara M, Low PA (1999). Hypothermic neuroprotection of peripheral nerve of rats from ischaemia-reperfusion injury. *Brain* **122**, 161-169.

Naidu PS, Velarde V, Kappler CS, Young RC, Mayfield RK, & Jaffa AA (1999). Calcium-calmodulin mediates bradykinin-induced MAPK phosphorylation and c-fos induction in vascular cells. *Am J Physiol* **277**, H1061-H1068.

Naik AK, Tandan SK, Dudhgaonkar SP, Jadhav SH, Kataria M, Prakash VR, & Kumar D (2006). Role of oxidative stress in pathophysiology of peripheral neuropathy and modulation by N-acetyl-L-cysteine in rats. *Eur J Pain* **10**, 573-579.

Ni A, Chai KX, Chao L, & Chao J (1998a). Molecular cloning and expression of rat bradykinin B1 receptor. *Biochim Biophys Acta* **1442**, 177-185.

Ni A, Chao L, & Chao J (1998b). Transcription factor nuclear factor kappaB regulates the inducible expression of the human B1 receptor gene in inflammation. *J Biol Chem* **273**, 2784-2791.

Nichols ML, Allen BJ, Rogers SD, Ghilardi JR, Honore P, Luger NM, Finke MP, Li J, Lappi DA, Simone DA, & Mantyh PW (1999). Transmission of chronic nociception by spinal neurons expressing the substance P receptor. *Science* **286**, 1558-1561.

Niiyama Y, Kawamata T, Yamamoto J, Furuse S, & Namiki A (2009). SB366791, a TRPV1 antagonist, potentiates analgesic effects of systemic morphine in a murine model of bone cancer pain. *Br J Anaesth* **102**, 251-258.

Noda M, Kariura Y, Amano T, Manago Y, Nishikawa K, Aoki S, & Wada K (2003). Expression and function of bradykinin receptors in microglia. *Life Sci* **72**, 1573-1581.

Obata K, Katsura H, Miyoshi K, Kondo T, Yamanaka H, Kobayashi K, Dai Y, Fukuoka T, Akira S, & Noguchi K (2008). Toll-like receptor 3 contributes to spinal glial activation and tactile allodynia after nerve injury. *J Neurochem* **105**, 2249-2259.

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

Ongali B, Campos MM, Petcu M, Rodi D, Cloutier F, Chabot JG, Thibault G, & Couture R (2004). Expression of kinin B1 receptors in the spinal cord of streptozotocin-diabetic rat. *Neuroreport* **15**, 2463-2466.

Ortiz PA & Garvin JL (2003). Trafficking and activation of eNOS in epithelial cells. *Acta Physiol Scand* **179**, 107-114.

Oshima K (1994). [A review on the development of Kallikrein (Kallidinogenase)]. *Yakushigaku Zasshi* **29**, 498-507.

Park ES, Gao X, Chung JM, & Chung K (2006). Levels of mitochondrial reactive oxygen species increase in rat neuropathic spinal dorsal horn neurons. *Neurosci Lett* **391**, 108-111.

Parpura V, Basarsky TA, Liu F, Jeftinija K, Jeftinija S, & Haydon PG (1994). Glutamate-mediated astrocyte-neuron signalling. *Nature* **369**, 744-747.

Pesquero JB, Araujo RC, Heppenstall PA, Stucky CL, Silva JA, Jr., Walther T, Oliveira SM, Pesquero JL, Paiva AC, Calixto JB, Lewin GR, & Bader M (2000). Hypoalgesia and altered inflammatory responses in mice lacking kinin B1 receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 8140-8145.

Petcu M, Dias JP, Ongali B, Thibault G, Neugebauer W, & Couture R (2008). Role of kinin B1 and B2 receptors in a rat model of neuropathic pain. *Int Immunopharmacol* **8**, 188-196.

Petcu M, Ongali B, El MA, de CJ, & Couture R (2005). Effects of alpha-lipoic acid on kinin B1 and B2 receptor binding sites in the spinal cord of chronically angiotensin-treated rats. *Peptides* **26**, 1331-1338.

Petersen M, Eckert AS, Segond von BG, Heppelmann B, Klusch A, & Kniffki KD (1998). Plasticity in the expression of bradykinin binding sites in sensory neurons after mechanical nerve injury. *Neuroscience* **83**, 949-959.

Pitcher G M, Henry J L (2000). Cellular mechanisms of hyperalgesia and spontaneous pain in a spinalized rat model of peripheral neuropathy: changes in myelinated afferent inputs implicated. *Eur J Neurosci* **12**, 2006-2020.

Pocock JM & Kettenmann H (2007). Neurotransmitter receptors on microglia. *Trends Neurosci* **30**, 527-535.

Pomonis JD, Harrison JE, Mark L, Bristol DR, Valenzano KJ, & Walker K (2003). N-(4-Tertiarybutylphenyl)-4-(3-cholorphyridin-2-yl)tetrahydropyrazine -1(2H)-carbox-amide (BCTC), a novel, orally effective vanilloid receptor 1 antagonist with analgesic properties: II. in vivo characterization in rat models of inflammatory and neuropathic pain. *J Pharmacol Exp Ther* **306**, 387-393.

Porreca F, Ossipov MH, Gebhart GF (2002). Chronic pain and medullary descending facilitation. *Trends Neurosci* **25**, 319-25.

Porreca F, Vanderah TW, Guo W, Barth M, Dodey P, Peyrou V, Luccarini JM, Junien JL, & Pruneau D (2006). Antinociceptive pharmacology of N-[[4-(4,5-dihydro-1H-imidazol-2-yl)phenyl]methyl]-2-[2-[[[(4-methoxy-2,6-dimethylphenyl) sulfonyl]methylamino]ethoxy]-N-methylacetamide, fumarate (LF22-0542), a novel nonpeptidic bradykinin B1 receptor antagonist. *J Pharmacol Exp Ther* **318**, 195-205.

Porter JT & McCarthy KD (1997). Astrocytic neurotransmitter receptors in situ and in vivo. *Prog Neurobiol* **51**, 439-455.

Prado GN, Taylor L, Zhou X, Ricupero D, Mierke DF, & Polgar P (2002). Mechanisms regulating the expression, self-maintenance, and signaling-function of the bradykinin B2 and B1 receptors. *J Cell Physiol* **193**, 275-286.

Premkumar LS & Ahern GP (2000). Induction of vanilloid receptor channel activity by protein kinase C. *Nature* **408**, 985-990.

Puddu P, Puddu GM, Cravero E, Rosati M, & Muscari A (2008). The molecular sources of reactive oxygen species in hypertension. *Blood Press* **17**, 70-77.

Pueyo ME, Gonzalez W, Nicoletti A, Savoie F, Arnal JF, & Michel JB (2000). Angiotensin II stimulates endothelial vascular cell adhesion molecule-1 via nuclear factor-kappaB activation induced by intracellular oxidative stress. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **20**, 645-651.

Qin M, Wang JJ, Cao R, Zhang H, Duan L, Gao B, Xiong YF, Chen LW, Rao ZR (2006). The lumbar spinal cord glial cells actively modulate subcutaneous formalin induced hyperalgesia in the rat *Neurosci Res* **55**, 442-50.

Raja SN, Meyer RA, Ringkamp M, Campbell JN 1999. Peripheral neural mechanisms of nociception. In *Textbook of pain*, Wall PD, Melzack R (eds). *Edinburgh: Churchill Livingstone*; **11**-57.

Raidoo DM & Bhoola KD (1998). Pathophysiology of the kallikrein-kinin system in mammalian nervous tissue. *Pharmacol Ther* **79**, 105-127.

Rashid MH, Inoue M, Matsumoto M, & Ueda H (2004). Switching of bradykinin-mediated nociception following partial sciatic nerve injury in mice. *J Pharmacol Exp Ther* **308**, 1158-1164.

Reed-Geaghan EG, Savage JC, Hise AG, Landreth GE (2009). CD14 and toll-like receptors 2 and 4 are required for fibrillar A β -stimulated microglial activation *J Neurosci* **29**, 11982-92

Regoli D, Rhaleb NE, Tousignant C, Rouissi N, Nantel F, Jukic D, & Drapeau G (1991). New highly potent bradykinin B2 receptor antagonists. *Agents Actions* **34**, 138-141.

Regoli D, Rizzi A, Perron SI, & Gobeil F, Jr. (2001). Classification of kinin receptors. *Biol Chem* **382**, 31-35.

Ritchie TJ, Dziadulewicz EK, Culshaw AJ, Muller W, Burgess GM, Bloomfield GC, Drake GS, Dunstan AR, Beattie D, Hughes GA, Ganju P, McIntyre P, Bevan SJ, Davis C, & Yaqoob M (2004). Potent and orally bioavailable non-peptide antagonists at the human bradykinin B(1) receptor based on a 2-alkylamino-5-sulfamoylbenzamide core. *J Med Chem* **47**, 4642-4644.

Rodi D, Couture R, Ongali B, Simonato M (2005). Targeting kinin receptors for the treatment of neurological diseases. *Curr Pharm Des* **11**, 1313-26.

Ryan JW, Berryer P, Chung AY, & Sheffy DH (1994). Characterization of rat pulmonary vascular aminopeptidase P in vivo: role in the inactivation of bradykinin. *J Pharmacol Exp Ther* **269**, 941-947.

Sango K, Verdes JM, Hikawa N, Horie H, Tanaka S, Inoue S, Sotelo JR, Takenaka T. (1994). Nerve growth factor (NGF) restores depletions of calcitonin gene-related peptide and substance P in sensory neurons from diabetic mice in vitro. *J Neurol Sci* **126**, 1-5.

Saunders MA, Belvisi MG, Cirino G, Barnes PJ, Warner TD, & Mitchell JA (1999). Mechanisms of prostaglandin E2 release by intact cells expressing cyclooxygenase-2: evidence for a 'two-component' model. *J Pharmacol Exp Ther* **288**, 1101-1106.

Saxena P, Thompson P, d'Udekem Y, & Konstantinov IE (2010). Kallikrein-Kinin System: A Surgical Perspective in Post-Aprotinin Era. *J Surg Res*.

Schaible HG, von Banchet GS, Boettger MK, Brauer R, Gajda M, Richter F, Hensellek S, Brenn D, & Natura G (2010). The role of proinflammatory cytokines in the generation and maintenance of joint pain. *Ann N Y Acad Sci* **1193**, 60-69.

Schanstra JP, Bataille E, Marin Castano ME, Barascud Y, Hirtz C, Pesquero JB, Pecher C, Gauthier F, Girolami JP, & Bascands JL (1998). The B1-agonist [des-Arg10]-kallidin activates transcription factor NF-kappaB and induces homologous upregulation of the bradykinin B1-receptor in cultured human lung fibroblasts. *J Clin Invest* **101**, 2080-2091.

Schanstra JP, Marin-Castano ME, Alric C, Pesquero JB, Claire M, Girolami JP, & Bascands JL (1999). Homologous and heterologous induction of the human bradykinin B1-receptor and B1-receptor localisation along the rat nephron. *Immunopharmacology* **45**, 29-34.

Schaible, H.G., et al. (2010). The role of proinflammatory cytokines in the generation and maintenance of joint pain. *Ann N Y Acad Sci* **1193**, 60-69.

Seltzer Z, Dubner R, & Shir Y (1990). A novel behavioral model of neuropathic pain disorders produced in rats by partial sciatic nerve injury. *Pain* **43**, 205-218.

Senoglu M, Nacitarhan V, Kurutas EB, Senoglu N, Altun I, Atli Y, & Ozbag D (2009). Intraperitoneal Alpha-Lipoic Acid to prevent neural damage after crush injury to the rat sciatic nerve. *J Brachial Plex Peripher Nerve Inj* **4**, 22.

Shortland P, Kinman E, & Molander C (1997). Sprouting of A-fibre primary afferents into lamina II in two rat models of neuropathic pain. *Eur J Pain* **1**, 215-227.

Simard B, Gabra BH, & Sirois P (2002). Inhibitory effect of a novel bradykinin B1 receptor antagonist, R-954, on enhanced vascular permeability in type 1 diabetic mice. *Can J Physiol Pharmacol* **80**, 1203-1207.

Stellwagen D & Malenka RC (2006). Synaptic scaling mediated by glial TNF- α . *Nature* **440**, 1054-1059.

Su DS, Markowitz MK, DiPardo RM, Murphy KL, Harrell CM, O'Malley SS, Ransom RW, Chang RS, Ha S, Hess FJ, Pettibone DJ, Mason GS, Boyce S, Freidinger RM, & Bock MG (2003). Discovery of a potent, non-peptide bradykinin B1 receptor antagonist. *J Am Chem Soc* **125**, 7516-7517.

Suh YG, Lee YS, Min KH, Park OH, Seung HS, Kim HD, Park HG, Choi J, Lee J, Kang SW, Oh UT, Koo JY, Joo YH, Kim SY, Kim JK, & Park YH (2003). Novel non-vanilloid VR1 antagonist of high analgesic effects and its structural requirement for VR1 antagonistic effects. *Bioorg Med Chem Lett* **13**, 4389-4393.

Sun T, Song WG, Fu ZJ, Liu ZH, Liu YM, & Yao SL (2006). Alleviation of neuropathic pain by intrathecal injection of antisense oligonucleotides to p65 subunit of NF- κ B. *Br J Anaesth* **97**, 553-558.

Suzuki R, Morcuende S, Webber M, Hunt SP, & Dickenson AH (2002). Superficial NK1-expressing neurons control spinal excitability through activation of descending pathways. *Nat Neurosci* **5**, 1319-1326.

Swett JE, Bourassa CM, Inoue S (1964). Effects of cutaneous and muscle sensory nerve volleys in awake cats: a study in perception. *Science* **145**, 1071-3.

Szallasi A, Blumberg PM, Nilsson S, Hokfelt T, & Lundberg JM (1994). Visualization by [³H]resiniferatoxin autoradiography of capsaicin-sensitive neurons in the rat, pig and man. *Eur J Pharmacol* **264**, 217-221.

Talbot S, Chahmi E, Dias JP, & Couture R (2010). Key role for spinal dorsal horn microglial kinin B1 receptor in early diabetic pain neuropathy. *J Neuroinflammation* **7**, 36.

Talbot S, Theberge-Turmel P, Liazoghli D, Senecal J, Gaudreau P, & Couture R (2009). Cellular localization of kinin B1 receptor in the spinal cord of streptozotocin-diabetic rats with a fluorescent [Nalpha-Bodipy]-des-Arg9-bradykinin. *J Neuroinflammation* **6**, 11.

Tamburin S, Cacciatori C, Praitano ML, Cazzaroli C, Foscatto C, Fiaschi A, Zanette G (2011). Median nerve small- and large-fiber damage in carpal tunnel syndrome: a quantitative sensory testing study. *J Pain* **12**, 205-12.

Tanabe M, Nagatani Y, Saitoh K, Takasu K, & Ono H (2009). Pharmacological assessments of nitric oxide synthase isoforms and downstream diversity of NO signaling in the maintenance of thermal and mechanical hypersensitivity after peripheral nerve injury in mice. *Neuropharmacology* **56**, 702-708.

Taniyama Y & Griendling KK (2003). Reactive oxygen species in the vasculature: molecular and cellular mechanisms. *Hypertension* **42**, 1075-1081.

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

Torgerson TR, Colosia AD, Donahue JP, Lin YZ, & Hawiger J (1998). Regulation of NF-kappa B, AP-1, NFAT, and STAT1 nuclear import in T lymphocytes by noninvasive delivery of peptide carrying the nuclear localization sequence of NF-kappa B p50. *J Immunol* **161**, 6084-6092.

Tracey I (2007). Neuroimaging of pain mechanisms. *Curr Opin Support Palliat Care* **1**, 109-116.

Truini A, Biasiotta A, La Cesa S, Di Stefano G, Galeotti F, Petrucci MT, Inghilleri M, Cartoni C, Pergolini M, Cruccu G (2010). Mechanisms of pain in distal symmetric polyneuropathy: a combined clinical and neurophysiological study. *Pain*, **150**, 516-21.

Truin M, van KM, Linderorth B, Smits H, Janssen SP, & Joosten EA (2010). Increased efficacy of early spinal cord stimulation in an animal model of neuropathic pain. *Eur J Pain*.

Tsutsui M (2004). Neuronal nitric oxide synthase as a novel anti-atherogenic factor. *J Atheroscler Thromb* **11**, 41-48.

Vaughan CW, Ingram SL, Connor MA, & Christie MJ (1997). How opioids inhibit GABA-mediated neurotransmission. *Nature* **390**, 611-614.

Vleggeert-Lankamp CL, van den Berg RJ, Feirabend HK, Lakke EA, Malessy MJ, Thomeer RT (2004). Electrophysiology and morphometry of the Aalpha- and Abeta-fiber populations in the normal and regenerating rat sciatic nerve. *Exp Neurol* **187**, 337-49

Watkins LR, Milligan ED, & Maier SF (2003). Glial proinflammatory cytokines mediate exaggerated pain states: implications for clinical pain. *Adv Exp Med Biol* **521**, 1-21.

Webb JG, Tan Y, Jaffa MA, & Jaffa AA (2010). Evidence for prostacyclin and cAMP upregulation by bradykinin and insulin-like growth factor 1 in vascular smooth muscle cells. *J Recept Signal Transduct Res* **30**, 61-71.

Weisel JW, Nagaswami C, Woodhead JL, DeLa Cadena RA, Page JD, & Colman RW (1994). The shape of high molecular weight kininogen. Organization into structural domains, changes with activation, and interactions with prekallikrein, as determined by electron microscopy. *J Biol Chem* **269**, 10100-10106.

Willis WD, Coggeshall RE (2004). *Sensory Mechanisms of the Spinal Cord*. Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York.

Willis WD, Westlund KN (1997). Neuroanatomy of the pain system and of the pathways that modulate pain. *J Clin Neurophysiol.* **14**, 2-31.

Wines DR, Brady JM, Pritchett DB, Roberts JL, & MacDonald RJ (1989). Organization and expression of the rat kallikrein gene family. *J Biol Chem* **264**, 7653-7662.

Wolfrum S, Dendorfer A, & Dominiak P (1999). Identification of kallidin degrading enzymes in the isolated perfused rat heart. *Jpn J Pharmacol* **79**, 117-120.

Woolf CJ (1996). Windup and central sensitization are not equivalent. *Pain* **66**, 105-108.

Woolf CJ, Mannion RJ (1999). Neuropathic pain: aetiology, symptoms, mechanisms, and management. *The Lancet.* **353**, 1959-1964.

Woolf CJ, Shortland P, & Coggeshall RE (1992). Peripheral nerve injury triggers central sprouting of myelinated afferents. *Nature* **355**, 75-78.

Wu R, Laplante MA, & de Champlain J (2005). Cyclooxygenase-2 inhibitors attenuate angiotensin II-induced oxidative stress, hypertension, and cardiac hypertrophy in rats. *Hypertension* **45**, 1139-1144.

Xie Y, Zhang J, Petersen M, & LaMotte RH (1995). Functional changes in dorsal root ganglion cells after chronic nerve constriction in the rat. *J Neurophysiol* **73**, 1811-1820.

Yamaguchi-Sase S, Hayashi I, Okamoto H, Nara Y, Matsuzaki S, Hoka S, Majima M (2003). Amelioration of hyperalgesia by kinin receptor antagonists or kininogen deficiency in chronic constriction nerve in rats. *Inflamm Res* **52**, 164-169.

Yamasaki S, Sawada S, Komatsu S, Kawahara T, Tsuda Y, Sato T, Toratani A, Kono Y, Higaki T, Imamura H, Tada Y, Akamatsu N, Tamagaki T, Tsuji H, & Nakagawa M (2000). Effects of bradykinin on prostaglandin I(2) synthesis in human vascular endothelial cells. *Hypertension* **36**, 201-207.

Yang Y, Yu X (2003). Regulation of apoptosis: the ubiquitous way. *FASEB J* **17**, 790-9.

Yeomans DC, Proudfit HK (1996). Nociceptive responses to high and low rates of noxious cutaneous heating are mediated by different nociceptors in the rat: electrophysiological evidence. *Pain* **68**, 141-150.

Ying Z, Kherada N, Farrar B, Kampfrath T, Chung Y, Simonetti O, Deiluiis J, Desikan R, Khan B, Villamena F, Sun Q, Parthasarathy S, & Rajagopalan S (2010). Lipoic acid effects on established atherosclerosis. *Life Sci* **86**, 95-102.

Yoshimura M & Yonehara N (2006). Alteration in sensitivity of ionotropic glutamate receptors and tachykinin receptors in spinal cord contribute to development and maintenance of nerve injury-evoked neuropathic pain. *Neurosci Res* **56**, 21-28.

Zafarullah M, Li WQ, Sylvester J, & Ahmad M (2003). Molecular mechanisms of N-acetylcysteine actions. *Cell Mol Life Sci* **60**, 6-20.

Zeitz KP, Guy N, Malmberg AB, Dirajlal S, Martin WJ, Sun L, Bonhaus DW, Stucky CL, Julius D, & Basbaum AI (2002). The 5-HT₃ subtype of serotonin receptor contributes to nociceptive processing via a novel subset of myelinated and unmyelinated nociceptors. *J Neurosci* **22**, 1010-1019.

Zeman RJ, Peng H, Feng Y, Song H, Liu X, & Etlinger JD (2006). Beta2-adrenoreceptor agonist-enhanced recovery of locomotor function after spinal cord injury is glutathione dependent. *J Neurotrauma* **23**, 170-180.

Zhang ZC & Qiu BS (2007). Reactive oxygen species metabolism during the cadmium hyperaccumulation of a new hyperaccumulator *Sedum alfredii* (Crassulaceae). *J Environ Sci (China)* **19**, 1311-1317.

Zhou X, Polgar P, Taylor L (1998). Roles for interleukin-1 beta, phorbol ester and a post-transcriptional regulator in the control of bradykinin B1 receptor gene expression. *Biochem. J.* **330**, 361-366.

Zhou Z, Yang H, Xu X, Wang X, & Lai R (2006). The first report of kininogen from invertebrates. *Biochem Biophys Res Commun* **347**, 1099-1102.

Ziegler D, Nowak H, Kempler P, Vargha P, & Low PA (2004). Treatment of symptomatic diabetic polyneuropathy with the antioxidant alpha-lipoic acid: a meta-analysis. *Diabet Med* **21**, 114-121.

Zimmermann M (2001). Pathobiology of neuropathic pain. *Eur J Pharmacol* **429**, 23-37.

Réalisations au plan scientifique

1- Talbot S, **Chahmi E**, Pena Dias J, Couture R (2010). Key role for spinal dorsal horn microglial kinin B₁ receptor in early diabetic pain neuropathy. J Neuroinflammation. 29, 7-36.

2- **Chahmi E**, Talbot S, Couture R. Studies on the contribution and spinal cellular localization of kinin B₁ receptor in a rat model of neuropathic pain. (en préparation pour Neuropeptides).

PRÉSENTATION ORALE

Emna Chahmi, Sébastien Talbot, Réjean Couture. Rôle et localisation intraspinale du récepteur B₁ des kinines dans la douleur neuropathique. 52^e RÉUNION DU CLUB DE RECHERCHES CLINIQUES DU QUÉBEC. 23th-25th September 2010, Château Bromont, Canada.

PRÉSENTATIONS PAR AFFICHE

1- Talbot S, **Chahmi E**, Dias JP et Couture R. Key role for spinal microglial kinin B₁ receptor in diabetic pain neuropathy. The 5th INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON PEPTIDE RECEPTORS. 26th-30th June 2009, Québec, Canada

2- Talbot S, **Chahmi E**, Dias JP, Gaudreau P et Couture R. Rôle clé du récepteur B₁ microglial dans les neuropathies diabétiques. 51^e RÉUNION DU CLUB DE RECHERCHES CLINIQUES DU QUÉBEC. 24th-26th September 2009, Lac Delage, Canada

3- Talbot S, **Chahmi E**, Dias JP, Gaudreau P et Couture R. Key role for spinal dorsal horn microglial kinin B₁ receptor in early diabetic pain neuropathy. 39th annual meeting of SOCIETY FOR NEUROSCIENCE. 17-21th October 2009, Chicago, IL, USA

4- Talbot S, **Chahmi E**, Dias JP, Gaudreau P et Couture R. Key role for spinal dorsal horn microglial kinin B₁ receptor in early diabetic pain neuropathy. 16th World Congress of Basic and Clinical Pharmacology. 17-23th July 2010, Copenhagen, Denmark.