

Université de Montréal

**Rôle du récepteur TRPV1 dans l'induction du récepteur
B1 des kinines dans un modèle de douleur neuropathique**

Par
Veronica Cernit

Département de Pharmacologie et Physiologie
Faculté de Médecine

Mémoire présenté
en vue de l'obtention du grade de Maître ès Sciences (M.Sc.)
en Physiologie moléculaire, cellulaire et intégrative

Avril 2018

©Veronica Cernit, 2018

Université de Montréal

**Rôle du récepteur TRPV1 dans l'induction du récepteur
B1 des kinines dans un modèle de douleur neuropathique**

présenté par :
Veronica Cernit

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes:

Pierre Beaulieu
Président-rapporteur

Réjean Couture
Directeur de recherche

Daniel Lamontagne
Membre du jury

Mémoire accepté le :

Résumé

Le récepteur B1 (RB1) des kinines et le TRPV1 (transient receptor potential vanilloid 1) sont deux récepteurs membranaires qui jouent un rôle essentiel dans le développement de la douleur neuropathique (DN). Nous émettons l'hypothèse qu'ils agissent simultanément et interfèrent directement ou indirectement au travers des cytokines pro-inflammatoires (TNF α et IL-1 β). Le but de cette étude était d'évaluer dans un modèle de DN le type d'interaction entre ces récepteurs en mesurant l'impact d'un traitement avec un antagoniste du RB1 (SSR240612, 10 mg/kg i.p.) ou du TRPV1 (SB366791, 1 mg/kg i.p.) sur les réponses comportementales nociceptives, sur l'expression (ARNm par qRT-PCR) et sur la distribution (immunofluorescence) spinale du RB1, du TRPV1 et des deux cytokines. Des rats Sprague-Dawley ont été soumis à une ligature unilatérale partielle du nerf sciatique (LPNS) et les antagonistes ont été administrés à chaque jour pendant une semaine à compter du 14^e jour après la chirurgie. Les deux antagonistes ont été capables de bloquer l'hyperalgésie thermique du côté ipsilatéral et contralatéral à la LPNS. Les allodynies mécanique et au froid ont été inhibées d'une façon transitoire par l'antagoniste du TRPV1 et non pas par l'antagoniste du RB1. L'antagoniste du RB1 a renversé l'astroglie et a bloqué la surexpression du RB1 et du TRPV1 dans la moelle épinière, tandis que l'antagoniste du TRPV1 a amplifié la surexpression du RB1 et a accentué l'astroglie. Les deux antagonistes ont augmenté les taux d'ARNm de l'IL-1 β sans affecter ceux du TNF α . Le RB1 et l'IL-1 β ont été colocalisés sur les astrocytes alors que le TRPV1 était exprimé uniquement sur les fibres sensorielles peptidergiques et non peptidergiques. Ces données fournissent un support pour une interaction indirecte entre le RB1 et le TRPV1 via possiblement la libération de l'IL-1 β des astrocytes. L'IL-1 β serait

responsable du maintien de l'allodynie et de la régulation à la hausse du RB1. Cette étude met en perspective la possibilité que l'inhibition seule du TRPV1 puisse être compensée par l'augmentation de l'expression et de la fonction pronociceptive du RB1 dans la DN. Il est donc suggéré qu'un traitement combiné d'inhibiteurs du RB1 et du TRPV1 puisse offrir une meilleure avenue thérapeutique.

Mots-clés : douleur neuropathique, récepteurs des kinines, TRPV1, allodynie, hyperalgésie, astroglie, cytokines pro-inflammatoires, moelle épinière, astrocytes, fibres sensorielles.

Abstract

The kinin B1 receptor (B1R) and the TRPV1 (transient receptor potential vanilloid 1) are two membrane receptors which play an essential role in the development of neuropathic pain (NP). We hypothesize that they act concurrently and interact directly or indirectly through pro-inflammatory cytokines (TNF α and IL-1 β). The aim of this study was to evaluate in a model of NP the kind of interaction between these receptors by measuring the impact of a treatment with an antagonist of B1R (SSR240612, 10 mg/kg i.p.) or TRPV1 (SB366791, 1 mg/kg i.p.) on the behavioural nociceptive responses, the expression (mRNA by qRT-PCR) and the distribution (immunofluorescence) of B1R, TRPV1 and the two cytokines in the spinal cord. Sprague-Dawley rats were subjected to a unilateral partial sciatic nerve ligation (PSNL) and the antagonists were administered daily for a week starting 14 days after surgery. Both antagonists were able to block thermal hyperalgesia on the ipsilateral and contralateral side of the PSNL. The mechanical and cold allodynia were transiently inhibited by the TRPV1 antagonist, but remained unaffected by the B1R antagonist. Whereas SSR240612 reversed astrogliosis and blocked B1R and TRPV1 gene overexpression in the spinal cord, SB366791 further enhanced the expression of B1R and astrogliosis. Both antagonists also enhanced the mRNA levels of IL-1 β without affecting those of TNF α . B1R and IL-1 β were found colocalised on astrocytes while TRPV1 was exclusively expressed in peptidergic and non peptidergic primary sensory fibers. These data provide support for an indirect interaction between B1R and TRPV1 through possibly the release of IL-1 β from astrocytes. IL-1 β would be responsible to maintain allodynia and to cause the upregulation of B1R. This study highlights the possibility that the exclusive inhibition of TRPV1 can be shadowed by the increase expression and pronociceptive function of B1R in NP. Hence, it is suggested that a

combined treatment with B1R and TRPV1 inhibitors can afford a better therapeutic perspective.

Keywords : neuropathic pain, kinin receptors, TRPV1, allodynia, hyperalgesia, astrogliosis, pro-inflammatory cytokines, spinal cord, astrocytes, primary sensory fibers.

Table des matières

Résumé.....	i
Abstract.....	iii
Table des matières.....	v
Liste des tableaux.....	ix
Liste des figures.....	x
Liste des abréviations.....	xii
Remerciements.....	xv
CHAPITRE I.....	1
INTRODUCTION.....	1
1.1 Définition de la douleur.....	1
1.2 Types de douleur.....	2
1.2.1 Douleur nociceptive.....	2
1.2.2 Douleur inflammatoire.....	3
1.2.3 Douleur neuropathique.....	3
1.3 Nocicepteurs.....	5
1.4 Fibres sensorielles.....	7
1.4.1 Caractère biphasique de la perception douloureuse.....	9
1.5 Le réflexe spinal de retrait.....	10
1.6 Douleur neuropathique : brève revue de l'essentiel.....	10
1.6.1 Types d'hypersensibilité en lien avec la douleur neuropathique.....	11
1.6.2 Pathobiologie de la douleur neuropathique périphérique.....	12
1.6.2.1 Sensibilisation périphérique et centrale.....	14
1.6.2.2 Les médiateurs inflammatoires.....	16
1.6.2.3 Les canaux sodiques voltages dépendants.....	17
1.6.2.4 Les récepteurs purinergiques.....	18
1.6.2.5 Les cellules immunes.....	19

1.6.2.6 Rôle de la glie dans la douleur neuropathique.....	20
1.7 La microglie.....	20
1.8 Les cytokines proinflammatoires TNF α et IL-1 β	24
1.9 Les astrocytes.....	25
1.10 Le système kallibréine-kinines.....	27
1.10.1 Les kinines.....	27
1.10.2 Les récepteurs des kinines.....	30
1.10.3 La signalisation intracellulaire des récepteurs des kinines.....	31
1.10.5 Récepteur B1 des kinines.....	33
1.10.6 Le récepteur B1 des kinines dans la douleur neuropathique.....	36
1.11 Le TRPV1.....	38
1.11.1 L'activation du TRPV1.....	40
1.11.2 L'inactivation (désensibilisation) du TRPV1.....	42
1.11.3 Le TRPV1 dans la douleur neuropathique.....	44
1.11.4 Interaction entre le TRPV1 et les récepteurs des kinines dans la douleur neuropathique.....	46
1.12 Modèles animaux de douleur neuropathique.....	48
1.12.1 Modèle de Seltzer (ligature partielle du nerf sciatique).....	50
CHAPITRE II.....	51
ARTICLE SCIENTIFIQUE.....	51
Hypothèse de travail.....	52
Objectifs de l'étude.....	52
Approche expérimentale.....	52
ARTICLE.....	54
Interaction between TRPV1 and Kinin B1 receptor in a rat neuropathic pain model.....	54
Background and Purpose.....	55
Experimental Approach.....	55
Key Results.....	55
Conclusions and Implications.....	55
1.0 Introduction.....	57

2.0 Materials and methods	59
2.1 <i>Animals</i>	59
2.2 <i>Partial sciatic nerve ligation (PSNL)</i>	60
2.3 <i>Behavioral assessment</i>	61
2.3.1 <i>Tactile allodynia test</i>	61
2.3.2 <i>Cold allodynia test</i>	62
2.3.3 <i>Thermal hyperalgesia test</i>	62
2.4 <i>Pharmacological treatment</i>	62
2.5 <i>qRT-PCR</i>	63
2.6 <i>Immunohistochemical and immunofluorescence procedures</i>	64
2.7 <i>Densitometric analysis</i>	67
2.8 <i>Statistical analysis of data</i>	67
3.0 Results.....	68
3.1 <i>Changes of nociceptive behaviour after PSNL</i>	68
3.1.1 <i>Effect of the BIR antagonist on PSNL-induced nociceptive behavior</i>	68
3.1.2 <i>Effect of the TRPV1 antagonist on PSNL-induced nociceptive behaviour</i>	69
3.1.3 <i>Effect of BIR and TRPV1 antagonists on spinal mRNA levels</i>	70
3.1.4 <i>Effect of BIR and TRPV1 antagonists on mRNA levels in DRG</i>	71
3.4 <i>BIR protein expression in the ipsilateral dorsal horn</i>	71
3.5 <i>Localization of BIR in the ipsilateral Dorsal Horn (iDH) and DRG (iDRG)</i>	72
4.0 Discussion	73
4.0.1 <i>BIR in neuropathic pain</i>	73
4.0.2 <i>TRPV1 in neuropathic pain</i>	76
4.2 Conclusion	77
References.....	79
List of tables.....	86
Figures legend.....	89
CHAPITRE III	99
D'AUTRES ÉTUDES	99
3.0 Hypothèse de travail	100

3.1 Objectif	100
3.2 Approches expérimentales	100
3.3 Résultats	100
CHAPITRE IV	107
DISCUSSION	107
4.1 Discussion générale	108
4.2 La pertinence du modèle animal de LPNS parmi d'autres modèles de DN	110
4.3 La pertinence de l'approche pharmacologique	111
4.4 Le rôle du RB1 dans la DN produite par une LPNS	113
4.4.1 <i>Le RB1 dans d'autres observations</i>	116
4.5 Les cytokines proinflammatoires dans la régulation du RB1 et du TRPV1	117
4.5.1 <i>L'IL-1β</i>	117
4.5.2 <i>Le TNFα</i>	118
4.6. Le TRPV1 dans la douleur causée par la LPNS	119
4.7. L'interaction du RB1 et du TRPV1	122
4.8. Perspectives.....	125
Conclusion	126
Bibliographie.....	127

Liste des tableaux

Chapitre I

Tableau 1.1. Localisation des nocicepteurs et leur projection vers les structures centrales.....	6
Tableau 1.2. Types de nocicepteurs.....	7
Tableau 1.3. Séquence primaire des kinines.....	28
Tableau 1.4. Les effets de l'activation du récepteur B2 des kinines.....	33
Tableau 1.5. Principaux modèles expérimentaux de douleur neuropathique.....	49

Chapitre II

Table 2.1. List of primer pairs used in qRT-PCR analysis.....	86
Table 2.2. Expression of TNF α and IL-1 β genes in the Spinal Cord after treatment with B1R antagonist (SSR240612) and TRPV1 antagonist (SB366791).....	87
Table 2.3. Expression of TNF α and IL-1 β genes in the DRG after treatment with B1R antagonist (SSR240612) and TRPV1 antagonist (SB366791).....	88

Liste des figures

Chapitre I

Figure 1.1. Types de douleur.....	5
Figure 1.2. Classification des fibres nerveuses sensorielles (adapté de Sauleau).....	8
Figure 1.3. La perception biphasique de la douleur aiguë.....	9
Figure 1.4. Perception douloureuse en fonction de l'intensité du stimulus.....	12
Figure 1.5. Étiologie de la douleur neuropathique.....	13
Figure 1.6. Contribution de la microglie dans les mécanismes de la DN.....	23
Figure 1.7. Les voies de formation des kinines et leurs récepteurs cibles.....	29
Figure 1.8. L'avènement des antagonistes du RB1 depuis la découverte des kinines.....	36

Chapitre II

Figure 2.1. Nociceptive behaviour after treatment with B1R antagonist.....	92
Figure 2.2. Nociceptive behaviour after treatment with TRPV1 antagonist.....	93
Figure 2.3. Expression of B1R and TRPV1 in the SC after treatment with SSR240612	94
Figure 2.4. Distribution and quantitative assessment of B1R protein expression in the ipsilateral dorsal horn of the spinal cord.....	95
Figure 2.5. Localization of B1R in the ipsilateral Dorsal Horn (iDH) of lumbar SC of PSNL rats.....	96
Figure 2.6. Localization of B1R in the ipsilateral lumbar DRG (iDRG) of PSNL rats	98

Chapitre III

Figure 3.1. Distribution du TRPV1 dans la corne ipsilatérale de la moelle épinière lombaire.....	101
Figure 3.2. Distribution du TRPV1 et de l'IL-1 β dans la moelle épinière.....	103
Figure 3.3. Colocalisation du TRPV1 dans la corne ventrale de la moelle épinière.....	104
Figure 3.4. Distribution du RB1 versus TRPV1 dans la moelle épinière.....	105

Chapitre IV

Figure 4.1. L'interaction RB1-TRPV1 dans la douleur neuropathique.....	124
---	-----

Liste des abréviations

- AMPC : adénosine monophosphate cyclique
- ATP : adénosine triphosphate
- BK : bradykinine
- BDNF : *brain-derived neurotrophic factor*
- CaMK II : Ca^{2+} /*calmodulin-dependent protein kinase II*
- CCN : constriction chronique du nerf sciatique
- CGRP : *calcitonin gene-related peptide*
- CFA : *complete Freund's adjuvant*
- DN : douleur neuropathique
- DRG : *dorsal root ganglia*
- DxTx : *double-knot toxin*, toxine de tarantule
- GFAP : *glial fibrillary acidic protein*
- GDNF : *glial cell line-derived neurotrophic factor*
- HMWK : *high molecular weight kininogen*
- IASP : *International Association for the Study of Pain*
- Iba1 : *ionized calcium binding adaptor molecule*
- IB4+ : isolectine B4
- iDH : *ipsilateral dorsal horn*
- iDRG : *ipsilateral dorsal root ganglia*
- iRTX : iodo-résinifératoxine
- IL-1 β : interleukine-1 beta
- IP3 : inositol triphosphate

KD : kallidine

LMWK : *low molecular weight kininogen*

LPNS (PSNL) : ligature partielle du nerf sciatique

MAPK : *mitogen-activated protein kinase*

MMP9 : *Matrix metalloproteinase 9*

mRNA (ARMm) : *messenger ribonucleic acid*

NF- κ B : *nuclear factor-kappa B*

NGF : *nerve growth factor*

NO : monoxyde d'azote

PiP2 : phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate

PKC : protéine kinase C

PKA : protéine kinase A

RB1 (B1R) : récepteur B1 des kinines

RB2 (B2R) : récepteur B2 des kinines

SP : substance P

TLR : *tool-like receptor*

TNF α : *tumor necrosis factor alpha*

TNFR1 : récepteur du TNF α

TTX : tétrodotoxine

TRPV1 : *transient receptor potential vanilloid type1*

VaTx : toxine d'araignée

Per aspera ad astra

*À ma famille et tous mes proches pour leur soutien moral et
leur appui, à mon charmant nouveau pays pour son baptême
dans ma nouvelle vie*

Remerciements

De tout mon cœur, je remercie mon mentor Dr Réjean Couture pour son accueil et son incroyable soutien dans mon parcours académique. C'est grâce à lui que j'ai découvert la beauté du monde de la science moléculaire. Je le remercie également pour sa contribution intellectuelle, sa patience et la confiance qu'il m'a témoignée depuis le début de notre collaboration.

C'était un grand plaisir de travailler à vos côtés, Mon Professeur.

Je tiens à adresser mes remerciements sincères à M. Jacques Sénécal, le technicien de notre laboratoire, pour son expertise et son excellente assistance technique sans lesquelles ce travail n'aurait pu se réaliser.

J'aimerais également adresser des remerciements sincères et cordiaux à mes parrains Dr Rémy Sauvé et Dr Sébastien Talbot pour leurs judicieux conseils sur mon travail de recherche.

Je souhaite remercier mes collègues Youssef Haddad, Rahmeh Othman et Soumaya Hachana pour leur amitié, leur soutien psychologique et leur aide dans mon encadrement à la maîtrise.

Également, je remercie Mme Nicole Allard (TGDE) et M. Michel Brunet (technicien informatique) pour leur assistance technique dans la réussite de mon parcours universitaire.

Je tiens à adresser mes remerciements aux Instituts de Recherche en Santé du Canada (IRSC) pour avoir financé notre projet, ainsi que la Faculté des Études supérieures et

postdoctorales de l'UdeM (FESP) pour la bourse de recrutement, la bourse de fin d'études et la bourse d'excellence aux études « famille Auclair ».

Finalement, je remercie énormément mes parents extraordinaires, mon adorable fils, mon beau conjoint, ma charmante sœur et mes chers amis pour leurs encouragements et leur soutien extraordinaire dans les jours difficiles.

CHAPITRE I

INTRODUCTION

1.1 Définition de la douleur

À l'époque d'Aristote, la douleur comportait à la fois une dimension émotionnelle et somatosensorielle. La douleur était perçue comme une souffrance de l'âme, car toute douleur corporelle génère un mauvais état mental, et les tourments émotionnels s'accompagnent souvent de douleurs physiques. Ultérieurement, Descartes a passé outre l'aspect psychoémotionnel de la douleur en la caractérisant comme un *“système d'alarme, dont la seule fonction est de signaler une lésion corporelle.”* Le côté émotionnel de la douleur n'a été reconnu qu'à l'époque de Freud lorsque le concept de l'interaction entre le psychique et le physique a été accepté et il demeure encore en application aujourd'hui. À la suite de la proposition de Merskey (1979), l'Association Internationale de L'Étude de la Douleur (IASP) définit présentement la douleur comme «une expérience sensorielle et émotionnelle désagréable associée à un dommage tissulaire existant ou potentiel ou décrite en termes d'un tel dommage» Récemment, Williams et Craig ont revisité et mis à jour la définition de la douleur comme suit : « une expérience angoissante associée à des lésions tissulaires réelles ou potentielles avec des composantes sensorielles, émotionnelles, cognitives et sociales ». (Williams and Craig 2016). Plusieurs affections somatiques sont déclenchées ou augmentées par l'état psychoaffectif d'une personne sous stress chronique, surtout lors d'une maladie dégénérative. La cinétique complexe des interactions entre la psyché et le physique attribue une forme dynamique à la douleur lorsque les stimuli douloureux perçus par les terminaisons nerveuses libres sont soumis à une modulation et une intégration active à tous les niveaux du système nerveux, suivi d'une réponse appropriée à la stimulation nociceptive. Globalement, la douleur est conçue à des fins bénéfiques dont le but est d'éviter une éventuelle lésion

potentiellement nocive. C'est une réaction d'adaptation importante de l'organisme qui a la signification d'un signal d'alarme.

1.2 Types de douleur

La douleur est déclenchée sous l'influence réelle ou potentielle d'un stimulus pathogène. Ces stimuli peuvent causer des changements d'une intensité variable selon l'état physiologique ou pathologique. Les sensations douloureuses portent un caractère subjectif qui est fonction du seuil de sensibilité individuel à la douleur. La douleur est une composante active de la pathogenèse de diverses maladies comme les radiculalgies, les névralgies, les maladies inflammatoires et métaboliques, les cancers ainsi que les états liés à une activation du système immunitaire et les traumatismes post-chirurgicaux. Selon son étiologie, la douleur peut être classée en trois grands types: la douleur nociceptive, la douleur inflammatoire et la douleur neuropathique (Woolf 2010).

1.2.1 Douleur nociceptive

La douleur nociceptive est vue comme un phénomène physiologique qui porte un caractère adaptatif. Ce type de douleur est plutôt identifié comme un système d'alarme dont le rôle primordial est de détecter et de minimiser l'impact du stimulus nociceptif. La douleur nociceptive est causée par des stimuli nuisibles d'origine mécanique, thermique ou chimique, lesquels sont capables de produire une lésion tissulaire, en menaçant potentiellement l'intégrité physique du corps. La douleur nociceptive est donc une réaction physiologique de signalisation manifestée par une réponse réflexe de protection contre un stimulus potentiellement dommageable. L'importance cruciale de la douleur nociceptive est révélée chez les enfants nés avec une carence des nocicepteurs, ou dans le cas d'une mutation au

niveau de la sous-unité alpha du canal voltage-dépendant $Na_v1.7$ qui résulte en une insensibilité congénitale à la douleur. Ces enfants sont constamment blessés et peuvent mourir de complications d'infections ou de traumatismes (Geoffrey 2007).

1.2.2 Douleur inflammatoire

La douleur inflammatoire est causée par des conditions associées à une lésion tissulaire directe (entraînant la libération du contenu intracellulaire des cellules lésées) ou indirecte (suite à la libération de médiateurs inflammatoires à partir de cellules immunes). Au cours de l'inflammation, les fibres afférentes sensorielles sont sensibilisées par des médiateurs inflammatoires cellulaires et humoraux tels que la bradykinine (BK), l'histamine, la sérotonine, les cytokines, les interleukines, l'ATP et les eicosanoïdes (Myers, Campana et al. 2006, Jardin, Lopez et al. 2017). Cette sensibilisation abaisse le seuil d'excitabilité des nocicepteurs polymodaux de façon que même les stimuli anodins sont capables d'évoquer une sensation douloureuse. Notez que les neurotransmetteurs sensoriels dont le CGRP (calcitonin-gene-related peptide) et la substance P agissent, également, comme des médiateurs pro-inflammatoires, en favorisant la douleur liée à l'inflammation neurogénique (Vardeh, Mannion et al. 2016). Les médiateurs inflammatoires au site périphérique d'inflammation sont capables d'induire des modifications dans le système nerveux central (Vardeh, Wang et al. 2009).

1.2.3 Douleur neuropathique

La douleur neuropathique (DN) est une forme de douleur pathologique résultant d'un fonctionnement anormal du système nerveux en raison de dommages irréversibles à ses structures centrales ou périphériques (Bouhassira 2008, Finnerup, Haroutounian et al. 2016, Colloca, Ludman et al. 2017). Cette douleur est définie par l'IASP comme une “*douleur*

secondaire à une lésion ou une maladie affectant le système somatosensoriel”, qui peut se produire au niveau des nerfs, de la moelle épinière ou du cerveau. La DN peut être engendrée également lors d’une affection qui n’est pas liée à une inflammation, ou à une lésion du système nerveux (Bouhassira 2008). Dans de nombreuses situations, les douleurs neuropathiques et les douleurs inflammatoires peuvent coexister ou se compléter. Il s’agit des douleurs “mixtes” qui accompagnent les malaises associés, par exemple, à un traumatisme médullaire ou la sclérose en plaques. Toutefois, pour éviter la confusion qui peut être prêtée par ces termes, les douleurs accompagnées d’une lésion du système nerveux périphérique ou central sont considérées comme des douleurs neuropathiques (Freyenhagen, Baron et al. 2006).

Les étapes clés de l'évolution des trois types de douleur sont illustrées à la Figure 1.1.

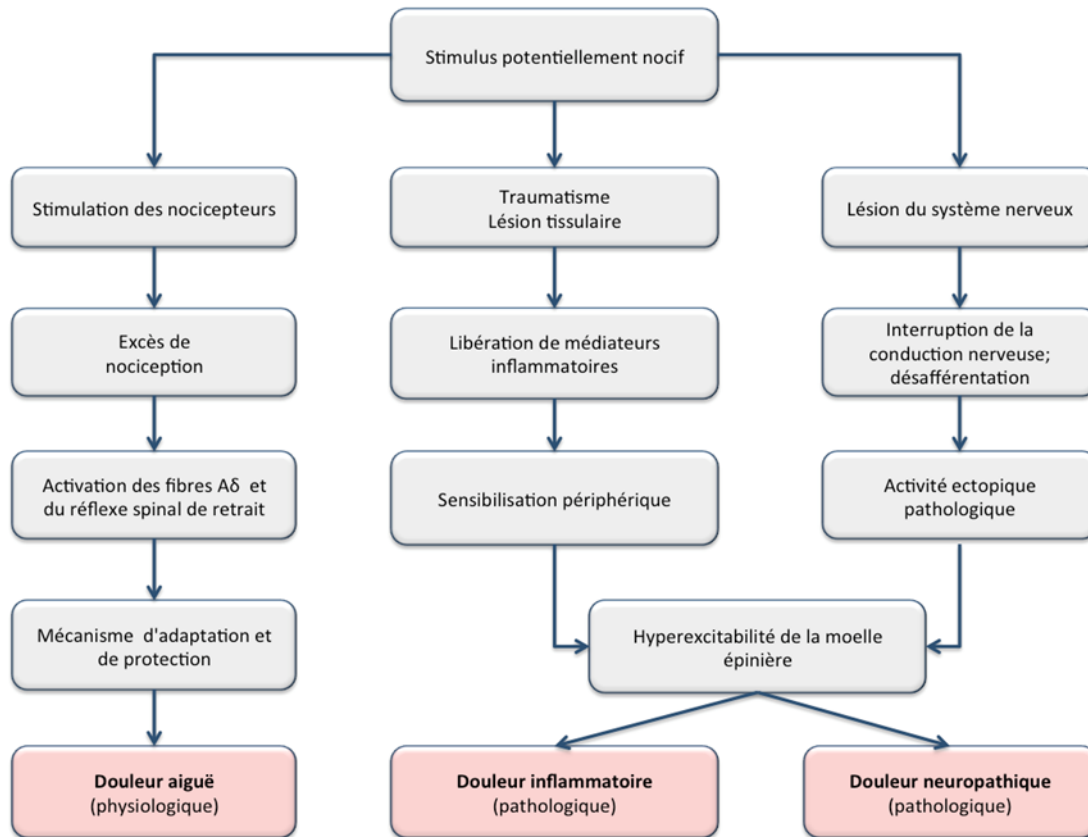


Figure 1.1. Types de douleur

1.3 Nocicepteurs

Les stimuli nociceptifs sont détectés par les *nocicepteurs* retrouvés dans les terminaisons nerveuses dendritiques périphériques des fibres sensorielles non myélinisées ou faiblement myélinisées. Selon IASP, les nocicepteurs sont définis comme “des neurones préférentiellement sensibles à un stimulus nocif, ou à un stimulus qui deviendrait nocif si il est prolongé.” Les nocicepteurs sont présents sur les fibres sensorielles innervant la peau, les muscles, les tendons et les viscères (Woolf and Ma 2007) et leurs corps cellulaires résident dans l'un des trois emplacements présentés au Tableau 1.1 (Caterina and Julius 2001). Ainsi, on retrouve les nocicepteurs mécaniques, mécaniques et thermiques et polymodaux (voir

Tableau 1.2), dont les mécano-nocicepteurs sont spécialisés dans la détection des stimuli mécaniques à intensité élevée (ex: pincement) et potentiellement néfastes, étant impliqués dans la douleur aiguë. Les mécano-thermo-nocicepteurs sont activés par des stimuli mécaniques à intensité élevée et par des températures supérieures à 42 °C ou inférieures à 15°C. Cependant, les nocicepteurs polymodaux constituent la majorité des fibres sensorielles de type C, associées à la douleur chronique (Basbaum and Woolf 1999). Ces nocicepteurs transmettent les stimuli mécaniques, thermiques et chimiques associés à la douleur et possèdent des seuils ou des sensibilités caractéristiques qui les distinguent des autres fibres nerveuses sensorielles (Basbaum, Bautista et al. 2009).

Les tissus intacts possèdent une population de récepteurs polymodaux *silencieux* qui, dans des conditions physiologiques, restent insensibles à des stimuli mécaniques ou thermiques. Au cours de l'inflammation, les récepteurs silencieux sont sensibilisés en quelques minutes et deviennent réceptifs à la stimulation nociceptive mécanique, thermique et chimique (Schaible, Schmelz et al. 2006). Notez que la stimulation chimique est primordiale pour la perception douloureuse car les médiateurs humoraux (BK, ATP, ions H⁺ et K⁺) et cellulaires (histamine, sérotonine, dérivés de l'acide arachidonique et enzymes protéolytiques) activent principalement les nocicepteurs polymodaux (Zhang, Cavanaugh et al. 2013)

Tableau 1.1. Localisation des nocicepteurs et leur projection vers les structures centrales

Localisation du nocicepteur	Structures innervées	Projections aux centres supérieurs
ganglions de la racine dorsale	tronc, membres, viscères	corne dorsale
ganglions trigéminaux	tête, cavité buccale, cou	le noyau trigéminal du tronc cérébral
ganglion inférieur du nerf vague (X)	tissus viscéraux	plancher du quatrième ventricule

Tableau 1.2. Types de nocicepteurs

Nocicepteurs	Type de fibres sensorielles	Type de stimuli nociceptifs
Mécaniques	A δ	piqûres, pincements, morsures, coupure
Thermiques	C, A δ	températures élevées(>42°C) ou basses(<15°C)
Polymodaux	C	tous les types de stimuli

1.4 Fibres sensorielles

Les stimuli nociceptifs et non nociceptifs sont transmis à la moelle épinière par des fibres à seuil élevé (fibres C non myélinisées et fibres A δ myélinisées de petite et moyenne taille) et des fibres à seuil bas (fibres A β hautement myélinisées et de grande taille impliquées dans la proprioception) (Marchand 2008, Berger, Knaepen et al. 2011, Xu and Yaksh 2011). Les profils de terminaison de ces fibres dans la corne dorsale de la moelle épinière sont très organisés (Berger, Knaepen et al. 2011). Les nocicepteurs (fibres peptidergiques et non peptidergiques) innervent spécifiquement les lamina superficielles (lamina I et lamina interne et externe II) et les lamina profondes (lamina V et VI), tandis que les fibres A δ innervent sélectivement les lames profondes de la corne dorsale (lamina III et inférieures). De plus, la lamina II (substance gélatineuse) abrite des interneurones inhibiteurs et excitateurs qui modulent la signalisation nociceptive. De plus, la stimulation nociceptive est modulée au niveau de la corne dorsale profonde (lamina V) qui contient des neurones de projection à large spectre dynamique (WDR neurons) (Berger, Knaepen et al. 2011).

Les fibres qui innervent les régions de la tête et du corps proviennent respectivement des corps cellulaires des ganglions trigéminaux et des racines dorsales de la moelle épinière (GRD) et

peuvent être classées, selon des critères anatomiques et fonctionnels, en 4 catégories ($A\alpha$, $A\beta$, $A\delta$ et C) (Basbaum and Woolf 1999, Julius and Basbaum 2001) (Figure 1.2).

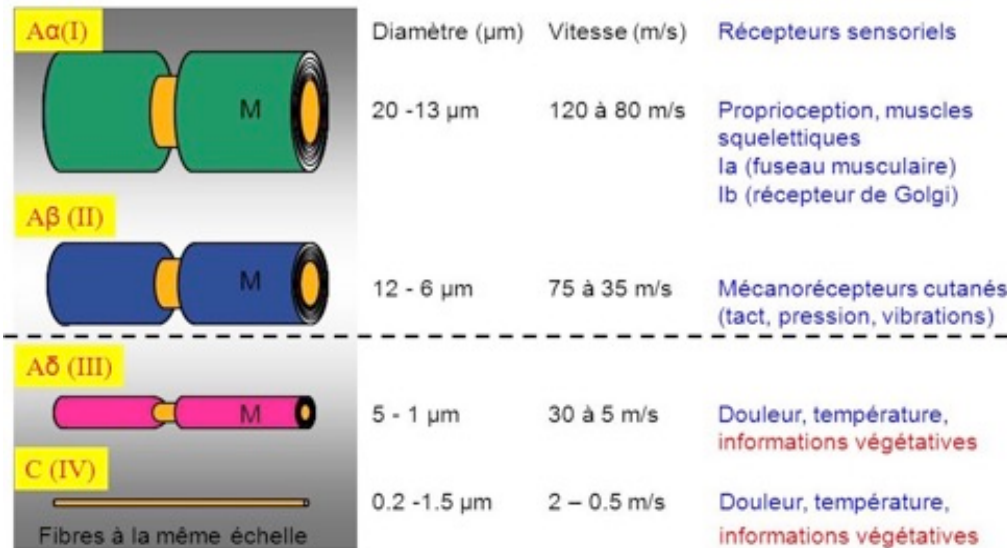


Figure 1.2. Classification des fibres nerveuses sensorielles (adapté de Sauleau) (<http://slideplayer.fr/slide/9679165/>)

Les fibres C appartiennent à deux catégories : une population contient des peptides pro-inflammatoires tels que la substance P et le CGRP, étant régulée par le facteur de croissance nerveux (NGF), et l'autre population qui n'est pas de nature peptidergique et peut être identifiée par les sites de liaison $IB4^+$, et nécessite pour la régulation un facteur neurotrophique dérivé de la lignée cellulaire gliale (GDNF) (Ernsberger 2008). Les fibres C représentent 75% de l'apport sensoriel afférent et elles sont principalement associées aux nocicepteurs polymodaux (Stander, Steinhoff et al. 2003, Wooten, Weng et al. 2014); elles sont impliquées dans la douleur seconde (après la perception de la 1^{er} douleur transmise par les fibres $A\delta$) et dans la douleur chronique caractérisée par la perception de sensations diffuses sous forme de brûlure ou d'élanement. Bien que les fibres $A\delta$ puissent détecter les stimuli nociceptifs, elles

sont adaptées pour la détection des stimuli mécaniques et thermiques qui ne sont pas reliés à la nociception d'origine cutanée, étant impliquées à la fois dans la thermo-sensation et le toucher (Beissner, Brandau et al. 2010, Dubin and Patapoutian 2010).

1.4.1 Caractère biphasique de la perception douloureuse

La vitesse inégale de transmission des excitations nerveuses par les fibres A δ et C donne un caractère hautement discriminatif à la perception douloureuse. La douleur est perçue d'abord par les fibres légèrement myélinisées A δ , qui transmettent rapidement les stimuli nociceptifs vers les centres médullaires en déclenchant une douleur aiguë et bien localisée ; il s'agit d'une *première douleur*. La première sensation de douleur aiguë est suivie par une autre sensation de douleur de nature moins intense et mal localisée. Cette douleur, connue comme la *deuxième douleur*, est transmise par les fibres non myélinisées de type C (Marchand 2008). De ce point de vue, la douleur porte une expression biphasique : la première phase possède un caractère vif et aigu, tandis que la deuxième phase est lente, moins intense et diffuse (Figure 1.3).

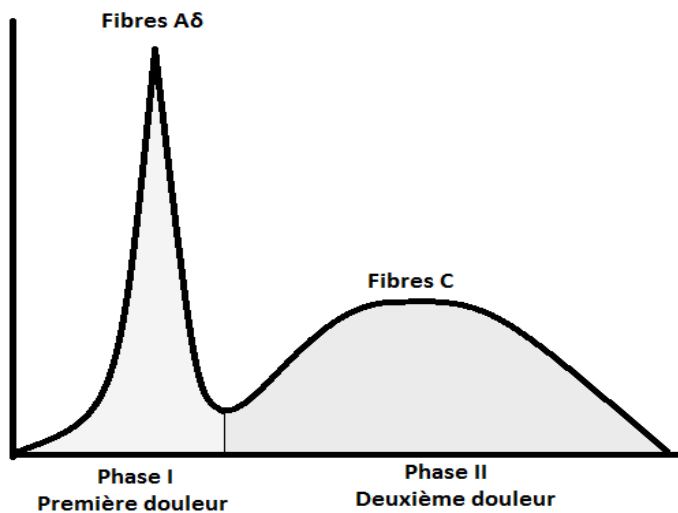


Figure 1.3. La perception biphasique de la douleur aiguë.

Notez, que la douleur viscérale n'a pas de composantes rapide et lente, étant souvent mal localisée (Sikandar and Dickenson 2012). Elle résulte d'une distension excessive d'organes ou d'une ischémie, et n'est pas associée à une lésion tissulaire (Basbaum, Bautista et al. 2009).

1.5 Le réflexe spinal de retrait

La réponse comportementale associée à une douleur aiguë provoque un *réflexe spinal de retrait* qui est une réaction involontaire. Ce réflexe est induit par les fibres A δ qui stimulent les interneurons spinaux puis à leur tour les motoneurons lors d'une stimulation nociceptive. Le réflexe spinal de retrait remplit le rôle de protection, car il conduit au retrait du membre de la source du danger.

1.6 Douleur neuropathique : brève revue de l'essentiel

Une étude épidémiologique des symptômes de la douleur neuropathique chez les adultes canadiens a démontré que la prévalence de la douleur neuropathique varie de 6,9% à 10% (VanDenKerkhof et al. 2016). Le manque d'une médication adéquate rend les patients profondément déprimés à cause des douleurs éprouvées et des contraintes à effectuer leurs activités quotidiennes ou leur travail. Le traitement de la DN est difficile en raison de la faible efficacité des opioïdes (Dworkin, O'Connor et al. 2010). Les analgésiques couramment utilisés sont les antidépresseurs, les antiépileptiques, les antagonistes du récepteur NMDA du glutamate, les anesthésiques locaux topiques et les stabilisateurs de membrane cellulaire (Mika, Zychowska et al. 2013, Tsuda, Koga et al. 2017). Ces médicaments se sont avérés inefficaces dans bien des cas et sont souvent associés à des effets aggravants sur l'état moral et physique du patient neuropathique. Puisque de nombreuses tentatives pour trouver le remède

idéal pour le soulagement de la DN ont été sans succès, une compréhension des mécanismes de génération de cette douleur aux niveaux cellulaire et moléculaire est impérative.

1.6.1 Types d'hypersensibilité en lien avec la douleur neuropathique

Les manifestations cliniques et comportementales de la DN sont exprimées par une sensibilité accrue à des stimuli mécaniques ou thermiques, qui peuvent persister longtemps après la disparition de la cause initiale de la douleur. Ces symptômes peuvent se manifester par une allodynie et/ou une hyperalgésie et représentent des réponses adaptatives. L'allodynie est définie comme une réponse douloureuse à un stimulus non nociceptif (Loeser and Treede 2008) tandis que l'hyperalgésie est une douleur disproportionnée par rapport à l'intensité du stimulus nociceptif (Coutaux, Adam et al. 2005). Cependant, ces définitions ne sont pas applicables dans les conditions cliniques. L'évaluation clinique de l'allodynie et de l'hyperalgésie comprend un examen des points de déclenchement, la cartographie de la zone d'anomalie et la détermination de l'intensité de l'hypersensibilité (Backonja, Attal et al. 2013). Généralement, les variétés suivantes d'hypersensibilité sont décrites: l'allodynie mécanique dynamique évoquée par le toucher léger, l'allodynie ponctuée et l'hyperalgésie évoquée par la stimulation de la peau avec un monofilament et l'allodynie statique et l'hyperalgésie provoquée par la pression sur la peau ou les tissus profonds (Ochoa and Yarnitsky 1993). Les substances allogènes libérées lors d'une lésion nerveuse suscitent une activité ectopique spontanée à la fois le long des fibres sensorielles et dans les terminaisons nerveuses. Ces changements engendrent un abaissement du seuil de la douleur de sorte que les stimuli anodins ou les stimuli douloureux d'une faible intensité produisent une sensibilité accrue exprimée par une douleur exagérée (Jensen and Finnerup 2014) (Figure 1.4). D'autres mécanismes peuvent, également, précipiter la DN, y compris le changement phénotypique des fibres A β ,

lorsqu'elles commencent à exprimer des neuropeptides sensoriels (CGRP, substance P ou BDNF) et la surexpression du transducteur de stimuli nociceptifs TRPV1 sur les fibres sensorielles (von Hehn, Baron et al. 2012).

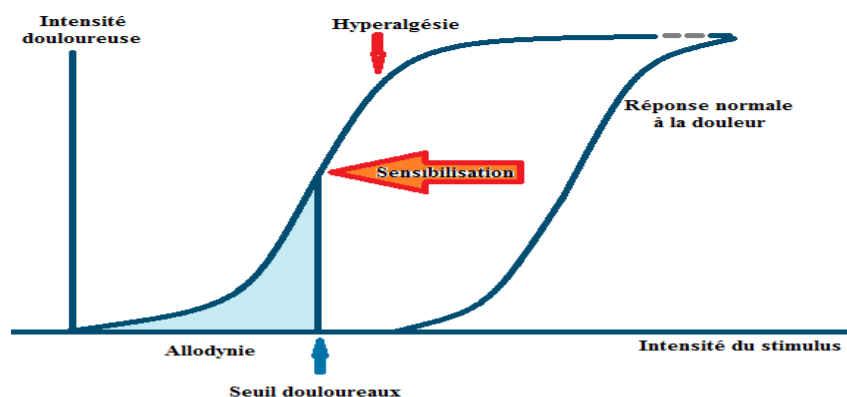


Figure 1.4. Perception douloureuse en fonction de l'intensité du stimulus

1.6.2 Pathobiologie de la douleur neuropathique périphérique

La DN est causée par une insulte primaire ou secondaire (associée à une maladie) au système nerveux central ou périphérique (Zimmermann 2001, Woolf and Ma 2007). Elle est maintenue à la fois par une nociception accrue et persistante provenant du site périphérique pathologique et par un déséquilibre entre les mécanismes excitateurs et inhibiteurs de la modulation douloureuse à différents niveaux dans le système nerveux central. La DN peut survenir après une lésion du système nerveux central, mais elle se produit de préférence lors d'une atteinte du système nerveux périphérique (Myers, Campana et al. 2006). La neuropathie, causée par une lésion du nerf périphérique, est souvent associée à des symptômes tels que la faiblesse, l'engourdissement et la douleur, habituellement aux mains et aux pieds; mais elle peut également affecter d'autres zones du corps en ayant un caractère poignardant, brûlant ou

picotant. Les causes les plus fréquentes qui peuvent aboutir à une DN sont présentées dans la Figure 1.5 (Zimmermann 2001).

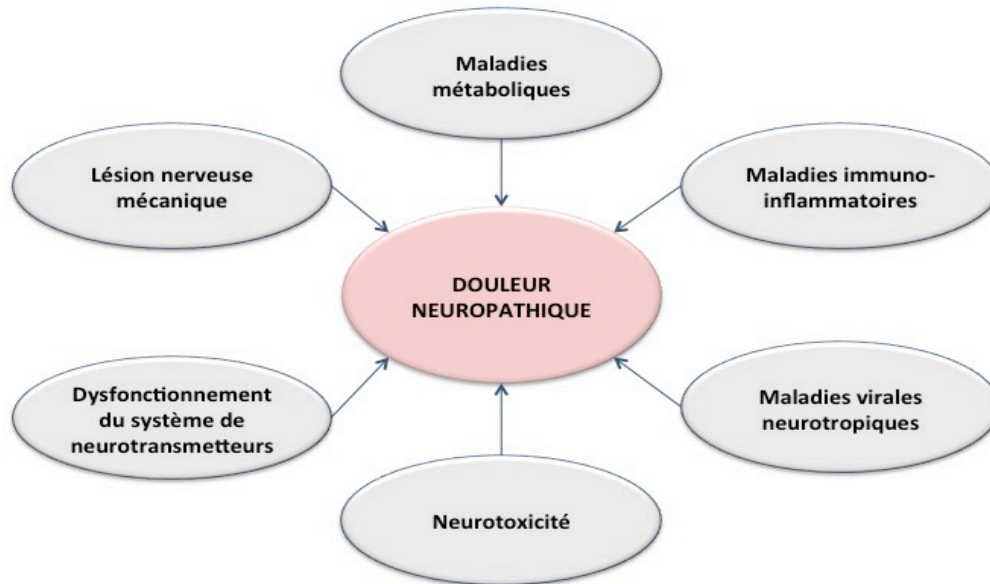


Figure 1.5. Étiologie de la douleur neuropathique

La lésion d'un nerf périphérique génère des signaux qui affectent les neurones du ganglion de la racine dorsale et qui contrôlent les événements aboutissant à la régénération du nerf endommagé. Il existe quatre phases de régénération du nerf: phase précoce (secondes à minutes), phase intermédiaire (heures à jours), phase tardive (jours à semaines) et phase d'achèvement du processus de régénération du nerf (Ambron and Walters 1996). Les signaux de la phase précoce et de la phase intermédiaire (émergents de la dégénérescence axonale) sont liés au développement d'états douloureux neuropathiques. Notez que les signaux de la phase précoce sont principalement des signaux électrophysiologiques et entraînent une libération aiguë de neurotransmetteurs (comme la substance P et CGRP) (Myers, Campana et al. 2006). Ces phénomènes électrophysiologiques peuvent dénaturer les voies de signalisation

intraneuronales au niveau des fibres C et de la corne dorsale médullaire, entraîner la surexpression rapide des gènes via les mécanismes *c-fos* et *c-jun* et augmenter l'expression en aval de gènes alternatifs, capables d'initier l'apoptose neuronale ou la régénération du nerf. Les fibres A β n'expriment pas le gène *c-fos*, contrairement aux conditions pathologiques, lorsque le gène est exprimé lors d'une stimulation des mécanorécepteurs. L'expression du *c-fos* est un phénomène général initié par une stimulation nociceptive (Zimmermann 2001).

1.6.2.1 Sensibilisation périphérique et centrale

Les nocicepteurs comprennent un grand nombre de canaux impliqués dans la transduction des messages nociceptifs. Lors d'une lésion nerveuse, les médiateurs proinflammatoires (BK, prostaglandines, cytokines, neurotrophines, neuropeptides) agissent sur les terminaisons sensorielles nociceptives en activant les systèmes de seconds messagers qui modulent le degré d'expression des récepteurs et des canaux spécifiques (canaux ionophores, canaux ioniques voltage dépendant ou des canaux TRP tel que le TRPV1 (transient receptor potential vanilloid I)). Ces changements incitent le développement d'une sensibilité anormale au niveau de la membrane neuronale et suscitent une activité spontanée pathologique au niveau des fibres sensorielles (Baron 2006, Schaible, Schmelz et al. 2006). Ces modifications aboutissent à une *sensibilisation périphérique*. Lors d'une lésion nerveuse, les messages nociceptifs sont véhiculés vers la corne dorsale de la moelle épinière suscitant des changements dans l'excitabilité de neurones médullaires. Ces changements induisent un traitement erroné de l'information sensorielle résultant en une réponse mal adaptée et une sensibilisation neuronale à long terme, accompagnée d'un déséquilibre entre les mécanismes excitateurs et inhibiteurs endogènes conduisant à la sensibilisation centrale. Ce type de neuroplasticité abaisse le seuil d'excitation des

nocicepteurs et produit des réponses hyperalgésiques et allodyniques qui peuvent persister même après la régénération du nerf (Marchand 2008). La *sensibilisation centrale* est basée à la fois sur les changements pathologiques dans les fibres C et sur la réponse accrue des nocicepteurs à des stimuli nocifs d'une faible intensité ou d'une intensité normale. Ces changements génèrent une hyperexcitabilité neuronale associée à une expansion des champs réceptifs neuronaux et à la propagation de l'hyperexcitabilité spinale à d'autres segments intacts (connu comme phénomène de *wind-up*) (Herrero, Laird et al. 2000, Baron 2006). Par la suite, les neurones spinaux sont sensibilisés par l'action de la substance P sur les récepteurs NK-1 et par l'entremise de l'activation des récepteurs NMDA du glutamate (Woolf and Salter 2000). Le glutamate libéré par les fibres C sensibilisées active la voie de signalisation intracellulaire MAP kinase-dépendante (Ji and Woolf 2001). En outre, l'influx des ions Ca^{2+} par les récepteurs NMDA et par les canaux voltage-dépendants cause l'activation de la kinase Ca^{2+} -dépendante et par la suite la phosphorylation des récepteurs NMDA, amplifiant la sensibilisation centrale. Notez que la libération du glutamate, de la substance P et du CGRP est également facilitée par l'activation des canaux sodiques voltage-dépendants (Voisin 2010). Une fois la sensibilisation centrale établie, des changements au niveau des fibres $A\delta$ et $A\beta$ se produisent de façon que les stimuli tactiles inoffensifs sont perçus comme douloureux. Chez certains patients qui ont subi une lésion nerveuse, une désafférentation cutanée profonde se développe et cause une insensibilité aux stimuli allodyniques. Ces patients souffrent d'un fort sentiment de douleur (le phénomène de *l'anesthesia dolorosa*) qui peut être expliqué par une activité intrinsèque accompagnée de décharges spontanées au niveau de la corne dorsale de la moelle épinière (Fields,

Rowbotham et al. 1998). Notez que dans des conditions physiologiques, la corne dorsale est contrôlée strictement par les neurones inhibiteurs GABA-ergiques en concert avec la glycine et les peptides opioïdes (Voisin 2010). Dans la DN, ces mécanismes inhibiteurs sont absents et l'excitation au glutamate est alors exagérée. De plus, la lésion du nerf périphérique précipite l'apoptose sélective des neurones inhibiteurs et favorise l'influx excessif des informations nociceptives. D'autre part, la libération de l'acide γ -aminobutyrique inhibiteur à partir d'interneurones intraspinaux exerce un effet excitateur dans la DN (Coull, Boudreau et al. 2003). Ce phénomène paradoxal renforce la sensibilisation centrale et la DN. Les mécanismes de sensibilisation décrits au niveau des synapses de la corne dorsale sont essentiels dans la DN et ils sont étroitement liés à l'activation de la microglie (Voisin 2010) (voir 1.6.2.6).

1.6.2.2 Les médiateurs inflammatoires

Les médiateurs proinflammatoires sont capables de sensibiliser les nocicepteurs en quelques minutes selon la nature du stimulus nociceptif et l'ampleur de l'inflammation (Schaible, Schmelz et al. 2006). Les médiateurs inflammatoires, sécrétés par des cellules non neurales et des cellules immuno-inflammatoires recrutées au foyer de l'inflammation, peuvent exercer une action directe ou indirecte sur les nocicepteurs. Par exemple, la BK, qui est un médiateur 'classique', lorsqu'appliquée directement sur un nerf, génère des potentiels d'action. Toutefois, la BK peut accroître indirectement l'excitabilité des neurones en abaissant le seuil de la douleur de sorte qu'un stimulus mécanique non nociceptif est perçu comme un stimulus douloureux (Schaible, Schmelz et al. 2006). D'ailleurs, ces propriétés de la BK suscitent un intérêt accru pour les récepteurs B1 et B2 de la BK, car ils sont impliqués dans la sensibilisation des fibres sensorielles A δ et C en

contribuant au développement de l'hyperalgésie thermique et de l'allodynie mécanique et au froid (Couture, Harrisson et al. 2001). Outre les médiateurs classiques de l'inflammation, les cytokines sont de petites protéines libérées au cours de l'inflammation qui ont des effets spécifiques sur la communication intercellulaire (Myers, Campana et al. 2006). Une lésion du nerf stimule la libération de cytokines par les cellules de Schwann, les mastocytes, les fibroblastes, la microglie, les astrocytes et d'autres cellules gliales. Le TNF α est la première cytokine libérée après une lésion nerveuse qui stimule la libération d'autres cytokines telles que l'IL-1 β . Ces cytokines induisent une activité électrophysiologique spontanée dans les fibres nociceptives causant l'excitation neuronale et l'activation des cellules gliales (Shubayev and Myers 2001). La sensibilisation des fibres nociceptives par la bradykinine et les cytokines, produit une expression accrue des transducteurs de la douleur, dont les canaux TRPV1, reconnus pour leur rôle intégrateur des stimuli nociceptifs et qui fonctionnent en tandem avec le TNF α (Nickel, Seifert et al. 2012).

1.6.2.3 Les canaux sodiques voltages dépendants

La réponse accrue des nocicepteurs ou leur sensibilisation implique l'activation de canaux ioniques responsables de la propagation du potentiel d'action et de la transduction du stimulus algogène. Parmi les neuf types des canaux sodiques (Na_v1.1 – Na_v1.9.), un rôle particulier dans la perception douloureuse est détenu par les canaux Na_v1.7 – Na_v1.9. Une augmentation de l'expression des canaux sodiques Na_v1.7 et Na_v1.8 sur les fibres A δ et C provoque leur décharge spontanée et contribue à des paresthésies douloureuses et à des douleurs lancinantes (Nickel, Seifert et al. 2012). Des drogues telles que carbamazépine, phénytoïne ou lidocaïne peuvent réduire la douleur neuropathique liée à l'infection au

VIH, au diabète ou à la suite d'un AVC, en bloquant les canaux sodiques voltage-dépendants (Gilron, Baron et al. 2015). Les neurones sensitifs expriment des canaux sodiques sensibles (S) et résistants (R) à la tétrodotoxine (TTX) (Tan, Piekarz et al. 2014). Une concentration accrue des TTX-R ($Na_v1.8$, $Na_v1.9$) est détectée, particulièrement dans des états nociceptifs pathologiques (Woolf and Mannion 1999). Les canaux de tétrodotoxine sont impliqués dans les décharges ectopiques des fibres sensorielles A δ et C par l'augmentation de l'influx des ions Na^+ . Ces décharges mènent à une hyperexcitabilité neuronale dans la moelle épinière (Schaible, Schmelz et al. 2006) associée à des symptômes tels que les paresthésies et les dysesthésies (Nickel, Seifert et al. 2012). Notez que le $TNF\alpha$ peut augmenter la densité des canaux résistants à la tétrodotoxine dans les nocicepteurs en agissant sur le récepteur du TNF (TNFR1) et en activant un mécanisme p38MAPK-dépendant (Woolf and Ma 2007). L'implication des canaux résistants à la tétrodotoxine dans la DN est renforcée par les travaux montrant que les souris invalidées pour le gène des ceux canaux sont affligées d'une hypoalgésie persistante à des stimuli mécaniques (Schaible, Schmelz et al. 2006).

1.6.2.4 Les récepteurs purinergiques

Le fonctionnement normal des neurones des ganglions de la racine dorsale implique l'activation des récepteurs purinergiques P2 qui possèdent une affinité sélective pour l'ATP. Les nocicepteurs comportent majoritairement les sous-unités des récepteurs P2X2 et P2X3, tandis que la sous-unité P2Y est exprimée par un nombre infime de neurones sensoriels (Kobayashi, Fukuoka et al. 2006, Woolf 2010). La libération de l'ATP se produit de deux façons : passivement, à partir du tissu endommagé et par la voie active, à partir de fibres intactes lors d'une stimulation. L'agoniste de P2X suscite une

augmentation de l'activité et de la sensibilité des nocicepteurs, en partie par le canal sodique voltage-dépendant TTX-R $Na_v1.9$ (Amaya, Wang et al. 2006). Les antagonistes de P2X2, de P2X3 et de P2X7 réduisent l'activité nociceptive des fibres C et A δ et l'hyperalgésie évoquée par des stimuli mécanique ou thermique par l'entremise d'une libération diminuée des cytokines proinflammatoires comme IL-1 β (Woolf 2010). Notez que les récepteurs purinergiques sont exprimés également sur des cellules non neuronales (cellules satellites) et sur les cellules immunes (macrophages, B-lymphocytes) (Khakh 2001, Bradman, Arora et al. 2010) renforçant la sensibilisation centrale et la DN.

1.6.2.5 Les cellules immunes

Une lésion nerveuse périphérique provoque une réponse accrue des cellules immunitaires et des cellules gliales. Lors d'un dommage à un nerf périphérique, les macrophages sont les premiers à être libérés dans la phase initiale de l'inflammation. Les macrophages sont des cellules dérivées de monocytes circulants dont la réponse accrue est détectée 3 jours après la lésion et se poursuit pendant plusieurs semaines (Kim and Moalem-Taylor 2011). Ces cellules partagent de nombreuses propriétés fonctionnelles et immunes avec la microglie (Woolf and Ma 2007). Un autre type de cellules immunitaires activées dans la phase précoce de l'inflammation sont les neutrophiles. Ces cellules sont attirées au foyer inflammatoire sous l'action du NGF, des chimiokines et des leucotriènes et infiltrent le voisinage immédiat du site de la lésion. Ensuite, les cytokines libérées par les neutrophiles peuvent renforcer le recrutement des macrophages au site de lésion, en particulier, au cours des premières 24h (Kim and Moalem-Taylor 2011). Aussi, les lymphocytes T et B, les principaux composants cellulaires de la réponse immunitaire adaptative humorale infiltrent les nerfs endommagés de 3 à 14 jours après la lésion. Le

recrutement des lymphocytes est fonction du profil des cytokines; le niveau accru de l'interféron γ augmentant l'hypersensibilité douloureuse (Moalem, Xu et al. 2004). La signalisation dépendante des cellules T dans la moelle épinière est considérée comme un contributeur majeur à l'hypersensibilité douloureuse issue d'une lésion d'un nerf périphérique.

1.6.2.6 Rôle de la glie dans la douleur neuropathique

Comme évoqué précédemment, lors d'une lésion d'un nerf périphérique une série d'événements, visant la régénération du tissu endommagé, est initiée. Les mécanismes de régénération initiés au niveau du nerf lésé impliquent, également, l'activation de la microglie et des astrocytes (Figure 1.6). Premièrement, les cellules microgliales subissent un changement morphologique; les astrocytes étant additionally soumis à une prolifération active. Ensuite, les cellules gliales changent leur profil de sécrétion et de recaptage de molécules (McMahon and Malcangio 2009). Ces changements, finalement, participent directement ou indirectement à la modification de l'excitabilité neuronale et au maintien de la DN (voir 1.7 et 1.8).

1.7 La microglie

La microglie, dérivée de cellules myéloïdes en périphérie, représente des cellules immunes résidentes du SNC (Woolf and Ma 2007). La microglie constitue 20% du SNC (Woolf and Ma 2007) et reste dans un état dormant en condition physiologique. La microglie est activée au cours des premières 24 h après la lésion du nerf (Mika, Zychowska et al. 2013). Elle subit une transformation de son état ramifié à une forme amiboïde par la rétraction des processus, et devient hypertrophique en augmentant en

épaisseur (Tsuda, Ueno et al. 2008, Tsuda, Koga et al. 2017). Cette transformation est accompagnée par une surexpression de divers récepteurs membranaires, une activation accrue des voies de signalisation intracellulaires (phosphorylation de p38 MAPK, JNK, ERK et SFK) (Tsuda, Ueno et al. 2008, Tsuda 2015) suivie par une hyperproduction des médiateurs inflammatoires (TNF α , IL-1 β , IL-6, TGF β , le facteur inhibiteur de la leucémie, facteur neurotrophique ciliaire) (Suzumura 2013, Tsuda and Inoue 2016). Certains chercheurs affirment que le p38 est uniquement exprimé par la microglie (Svensson, Marsala et al. 2003, Ji and Suter 2007), tandis que d'autres sont enclins à l'idée que les neurones et les astrocytes peuvent également l'exprimer. Notez que l'activation du p38 est essentielle pour la production de cytokines (Clark, Gruber-Schoffnegger et al. 2015); la microglie étant considérée comme la source majeure des cytokines proinflammatoires (Tsuda 2015).

La microglie fait preuve d'une plasticité prononcée en exprimant *de novo* certaines molécules (Shemer, Erny et al. 2015) parmi lesquelles on retrouve les espèces réactives de l'oxygène (ERO), le monoxyde d'azote (NO), le peroxyde d'azote, les prostaglandines, le COX-2, la NO synthase inductible (iNOS) et le facteur neurotrophique dérivé du cerveau (BDNF) (Wang, McDowell et al. 2014, Yamamoto, Terayama et al. 2015). D'ailleurs, le BDNF est une importante molécule de signalisation de la douleur, pertinente pour la communication entre la microglie et les neurones. Le BDNF est responsable des changements dans le gradient anionique neuronal et le maintien de la DN (Coull, Beggs et al. 2005). L'activation du BDNF se fait par l'intermédiaire du récepteur purinergique P2X4 qui a une affinité accrue pour l'ATP (Schomberg and Olson 2012). Les récepteurs purinergiques sont des régulateurs de l'activité microgliale dans la DN (Tsuda,

Shigemoto-Mogami et al. 2003, Tsuda, Tozaki-Saitoh et al. 2012). La microglie partage de nombreuses similitudes et des propriétés fonctionnelles avec les macrophages. Par exemple, immédiatement après une lésion nerveuse, les cellules microgliales forment des amas denses autour des neurones lésés, de même que les macrophages entourent les neurones sensoriels lésés en périphérie (Schomberg and Olson 2012, Schomberg, Miranpuri et al. 2015). Cependant, la microglie diffère des macrophages par une expression membranaire réduite de la glycoprotéine CD45 et par une faible propriété de présentation de l'antigène à d'autres cellules immunocompétentes (Jeong, Ji et al. 2013) bien que la microglie exprime le complexe majeur d'histocompatibilité de classe II (MHCII) (Kuric and Ruscher 2014). D'un autre côté, les cellules microgliales sont capables de reconnaître les antigènes par l'entremise des récepteurs immuns innés TLR (tool-like receptors), qui, à leur tour, activent la microglie (Schomberg and Olson 2012). De cette manière, suite à une lésion du nerf périphérique, de concert avec d'autres molécules (cytokines, ATP, fractalkine) (Yamamoto, Terayama et al. 2015), la microglie est activée par le récepteur TLR3 (Facci, Barbierato et al. 2014). De plus, la communication entre la microglie et les neurones dans la nociception est tributaire des chimokines produites par les neurones sensoriels qui assurent la migration des cellules et des molécules vers les cibles (Graeber and Christie 2012). Les substances neuroactives produites par la microglie activée favorisent le développement de la sensibilisation centrale (Woolf and Ma 2007) et donc, de l'hypersensibilité douloureuse (Schomberg and Olson 2012, Yamamoto, Terayama et al. 2015) (Figure 1.6). Le rôle primordial de la microglie dans le développement de la sensibilisation centrale et de la DN a été confirmé par l'administration d'inhibiteurs de la microglie. Notamment, la minocycline inhibe la

microglie en réduisant l'expression des médiateurs proinflammatoires comme les cytokines, les chimiokines ou les prostaglandines par l'inhibition de la *p38MAPK* (Zhuang, Wen et al. 2006, Mika, Osikowicz et al. 2009).

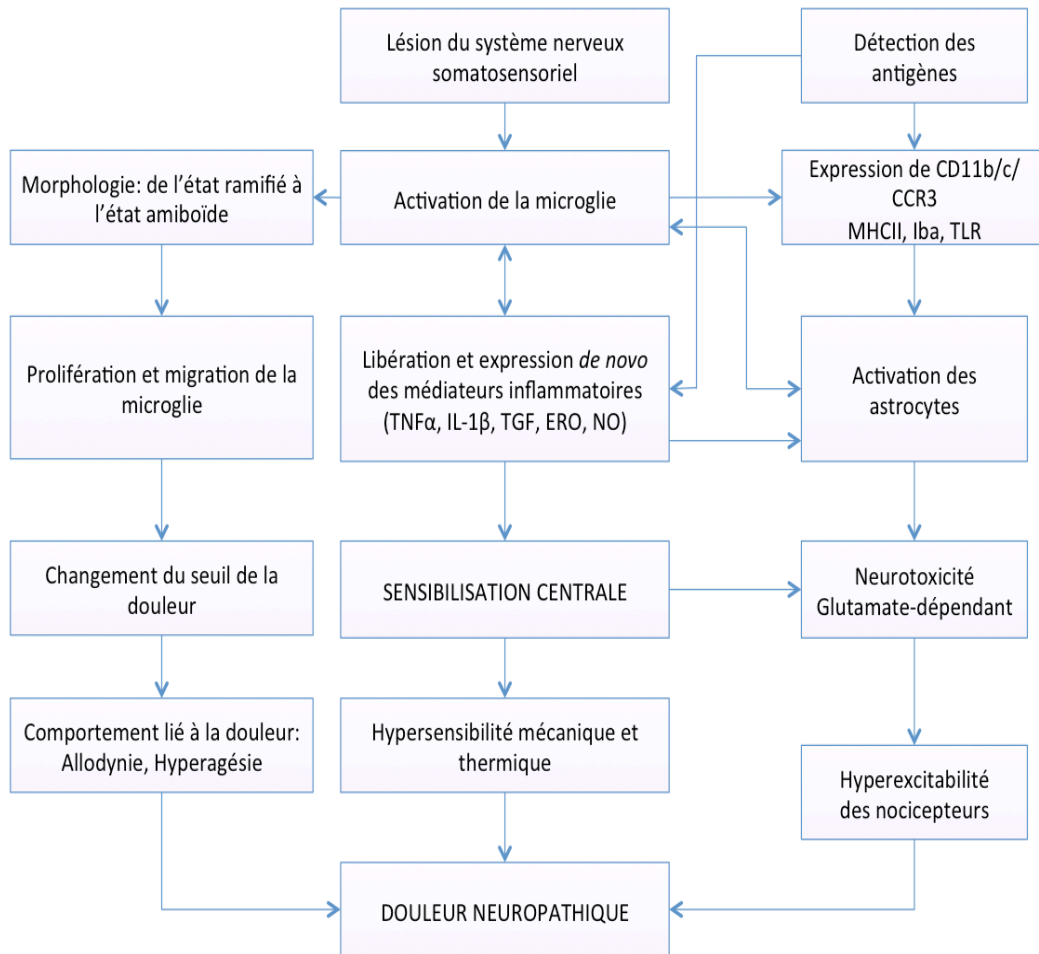


Figure 1.6. Contribution de la microglie dans les mécanismes de la douleur neuropathique

1.8 Les cytokines proinflammatoires TNF α et IL-1 β

Les cytokines proinflammatoires TNF α , IL-1 β dans le SNC sont principalement issues de la microglie active (Hanisch and Kettenmann 2007). Les deux cytokines sont activées durant les 15 premières minutes après la lésion nerveuse et contribuent à la progression de la DN qui est en forte corrélation avec le niveau de TNF α dans le SNC (Fregnan, Muratori et al. 2012, Schomberg and Olson 2012). La cytokine IL-1 β est également en cause dans la réponse inflammatoire par la modulation du seuil des nocicepteurs aux stimuli mécaniques et thermiques et par l'amplification de l'effet excitateur dans les fibres sensorielles mécano- et thermosensibles (Fregnan, Muratori et al. 2012, Holló, Ducza et al. 2017). TNF α et IL-1 β suscitent l'activation des récepteurs TRPV1 associés à une sensibilisation des afférences sensorielles nociceptives et engendrent la transduction du TRPV1 dans les ganglions de la racine dorsale (GRD) (Obreja, Rathee et al. 2002). Notez que le TRPV1 d'origine neuronale contribue à l'activation à la fois de la microglie et des astrocytes (Chen, Willcockson et al. 2009). Bien que la microglie soit impliquée davantage dans la génération des cytokines, les astrocytes sont aussi impliqués dans la libération de l'IL-1 β . La cytokine IL-1 β est exprimée dans les astrocytes et les cellules satellites des GRD qui possèdent tout l'arsenal d'activation des voies de signalisation intracellulaire (*p38*MAPK-dépendante) pour la synthèse de l'IL-1 β (Huang, Smith et al. 2011, Berta, Liu et al. 2012). En outre, les deux cytokines sont subordonnées à l'activation du facteur nucléaire NF- κ B (Hartung, Eskew et al. 2015). L'activité proinflammatoire du TNF α et de l'IL-1 β contribue à la sensibilisation centrale en augmentant l'excitabilité neuronale et renforce l'hypersensibilité thermique et mécanique associée à la DN (Tsuda, Inoue et al. 2005).

1.9 Les astrocytes

Les astrocytes sont des participants essentiels dans la neuroinflammation et dépendent de l'interaction avec la microglie et les neurones (Colombo and Farina 2016). De nombreuses études ont indiqué que les astrocytes apportent une contribution majeure au comportement lié à la douleur après une lésion nerveuse périphérique (Lo, Zhao et al. 2011, Mika, Zychowska et al. 2013). L'injection intrathécale des astrocytes activés déclenche une astrogliose réactive marquée par une augmentation de la protéine fibrillaire gliale (GFAP), qui est un indicateur de l'activation astrocytaire (Walters 2014). Simultanément avec la microglie, les astrocytes contribuent en grande partie et de façon significative à l'apparition et au développement de la DN (Voisin 2010). Suite à une lésion au système nerveux périphérique ou central, la sensibilisation centrale suscite une activation astrocytaire (astrogliose), qui s'exprime par des changements morphologiques et fonctionnels des astrocytes (Pekny and Pekna 2014, Sofroniew 2015). L'ampleur de l'astrogliose est en étroite corrélation avec les symptômes douloureux et résulte de plusieurs mécanismes d'activation (Colburn, Rickman et al. 1999). D'abord, étant donné que les astrocytes, normalement, font partie de la synapse tripartite (constituée par un élément présynaptique, un élément post-synaptique et l'astrocyte) et puisque les prolongements astrocytaires expriment les récepteurs membranaires de la plupart des neurotransmetteurs (Fellin, Pascual et al. 2006), il est fort probable que les astrocytes soient activés par l'activité électrique véhiculée le long des afférences sensorielles (Chen, Lue et al. 2010). Certes, une stimulation électrique d'un nerf périphérique aboutit à une expression élevée du GFAP (Senger, Verge et al. 2018). Ensuite, les médiateurs inflammatoires délivrés à partir de la microglie, dont les cytokines sont la source la plus

puissante d'activation astrocytaire (Colombo and Farina 2016). L'hypersensibilité douloureuse produite par l'astrogliose peut être appuyée par des cytokines proinflammatoires (IL-1 β , CCL-2) issues des astrocytes eux-mêmes (Gao and Ji 2010). Une fois activés, les astrocytes diminuent l'expression du transporteur glutamatergique GLT-1 et abaissent la capture du glutamate de la fente synaptique menant ainsi à une hyperexcitabilité neuronale conditionnée par la concentration accrue de glutamate. Finalement, l'hyperexcitabilité neuronale causée par l'astrogliose renforce la sensibilisation centrale et la dimension de la DN (Voisin 2010). Certaines études suggèrent que les astrocytes sont activés indépendamment de l'influence microgiale et que l'activation microgiale entraîne une astrogliose secondaire (Rohl, Lucius et al. 2007). En outre, les astrocytes seraient activés directement par l'activité neuronale, car lors d'une douleur inflammatoire, l'expression du GFAP augmente jusqu'à 300% lors des premières 30 min après la lésion (Guo, Wang et al. 2007).

Généralement, les astrocytes sont considérés jouer un rôle plus vaste que la microglie dans la progression de la DN (Walters 2014). L'inhibition de l'activation de la microglie affaiblit, mais n'inhibe pas, l'hypersensibilité douloureuse mécanique ou thermique, suggérant l'implication de la microglie dans la phase précoce de la DN (Wen, Tan et al. 2011, Carniglia, Ramírez et al. 2017). Les astrocytes détiendraient la primauté dans l'avancement de la phase tardive de la DN (Tsuda, Kohro et al. 2011, Graeber and Christie 2012) par la libération de cytokines (en particulier IL-1 β), de prostaglandines, du NO et des acides aminés excitateurs (Mika, Zychowska et al. 2013). Les astrocytes, de concert avec la microglie, favorisent donc l'apparition et la progression de la douleur

neuropathique par la libération des médiateurs inflammatoires et par l'expression des récepteurs impliqués dans la modulation du signal douloureux.

1.10 Le système kallibréine-kinines

Le système kallibréine-kinines (SKK) est un système endogène peptidergique complexe constitué d'une famille de 15 sérines protéases de type trypsine ou chymotrypsine hautement conservées (Gakuba and Gaberel 2017). Le SKK est donc un système multienzymatique présent dans la plupart des tissus et des fluides corporels (Couture, Blaes et al. 2014). Bien que les deux composantes du SKK (tissulaire et plasmique) aient des propriétés différentes et des fonctions biologiques spécifiques, de facto, il existe une corrélation étroite entre ces deux composantes. Le SKK peut, également, être défini comme une cascade multiprotéique, dont l'activation conduit au déclenchement de l'hydrolyse enzymatique des kininogènes ayant pour conséquence la libération de peptides apparentés à la BK (Couture, Blaes et al. 2014). Le SKK est composé de kininogènes (substrats de kinines), de kallibréines (enzymes de synthèse) et de kinines (métabolites actifs) (Leeb-Lundberg, Marceau et al. 2005). L'importance du SKK est démontrée par son rôle dans les processus tels que l'inflammation, la coagulation, la réactivité vasculaire et la douleur aiguë et chronique (Couture, Blaes et al. 2014, Desposito, Zadigue et al. 2017).

1.10.1 Les kinines

Le SKK, une fois activé, génère une famille de peptides autacoïdes, appelés *kinines*, composée de 9-11 acides aminés, qui exercent des activités biologiques variables (Couture and Lindsey 2000). Les kinines comprennent la BK et la kallidine (Lys-BK ou

KD) et leurs métabolites respectifs, des-Arg⁹-BK (DABK) et des-Arg¹⁰-kallidine (Couture and Lindsey 2000, Campbell 2013) (Tableau 1.3). La T-kinine a été identifiée exclusivement chez le rat. Les kinines ont été isolées du cafard de Madère *Leucophaea maderae*, bien que la première preuve de la présence du SKK soit apparue au début du XXe siècle, lorsqu'une injection d'urine humaine chez le lapin a conduit à une hypotension (Wong 2016).

Tableau 1.3. Séquence primaire des kinines

Kinine	Séquence d'acides aminés
Bradykinine (BK)	Arg-Pro-Pro-Gly-Phe-Ser-Pro-Phe-Arg
Kallidine (KD)	Lys-Arg-Pro-Pro-Gly-Phe-Ser-Pro-Phe-Arg
[des-Arg ⁹] BK	Arg-Pro-Pro-Gly-Phe-Ser-Pro-Phe
[des-Arg ¹⁰] KD	Lys-Arg-Pro-Pro-Gly-Phe-Ser-Pro-Phe
T-kinine	Arg-Met-Lys-Arg-Pro-Pro-Gly-Phe-Ser-Pro-Phe-Arg

Tel qu'observé à la Figure 1.7, la cascade de formation des kinines plasmatiques est amorcée par des facteurs de dommage tissulaire. L'activation du facteur de Hageman (facteur de coagulation XII) a lieu après le contact du plasma avec des surfaces chargées négativement telles que le collagène, les protéoglycans, le cholestérol ou les lipopolysaccharides (Gabra, Couture et al. 2003). Les kinines tissulaires sont formées sous l'action des enzymes protéolytiques produites au sein d'une lésion (Couture and Lindsey 2000, Couture, Blaes et al. 2014, Hopp and Albert-Weissenberger 2015). Le facteur XII et les protéases agissent respectivement sur la prékallitréine plasmatique et sur la prokallitréine tissulaire pour produire respectivement les kallitréines plasmatique et tissulaire. Ensuite, les kallitréines convertissent les kininogènes de haut (HMWK) et bas poids moléculaires (LMWK) en BK et KD (Couture and Lindsey 2000). Finalement,

le clivage de l'acide aminé *arginine* en C-terminal des kinines sous l'action des carboxypeptidases N et M (kininase I), aboutit à la production des métabolites actifs des-Arg⁹-BK et des-Arg¹⁰-KD (Figure 1.7). Les kinines circulantes ont une très courte demi-vie et sont rapidement métabolisées en peptides inactifs par les peptidases telles que l'enzyme de conversion de l'angiotensine (kininase II) (Marceau and Regoli 2004, Gobeil, Fortier et al. 2006, Regoli and Gobeil 2017).

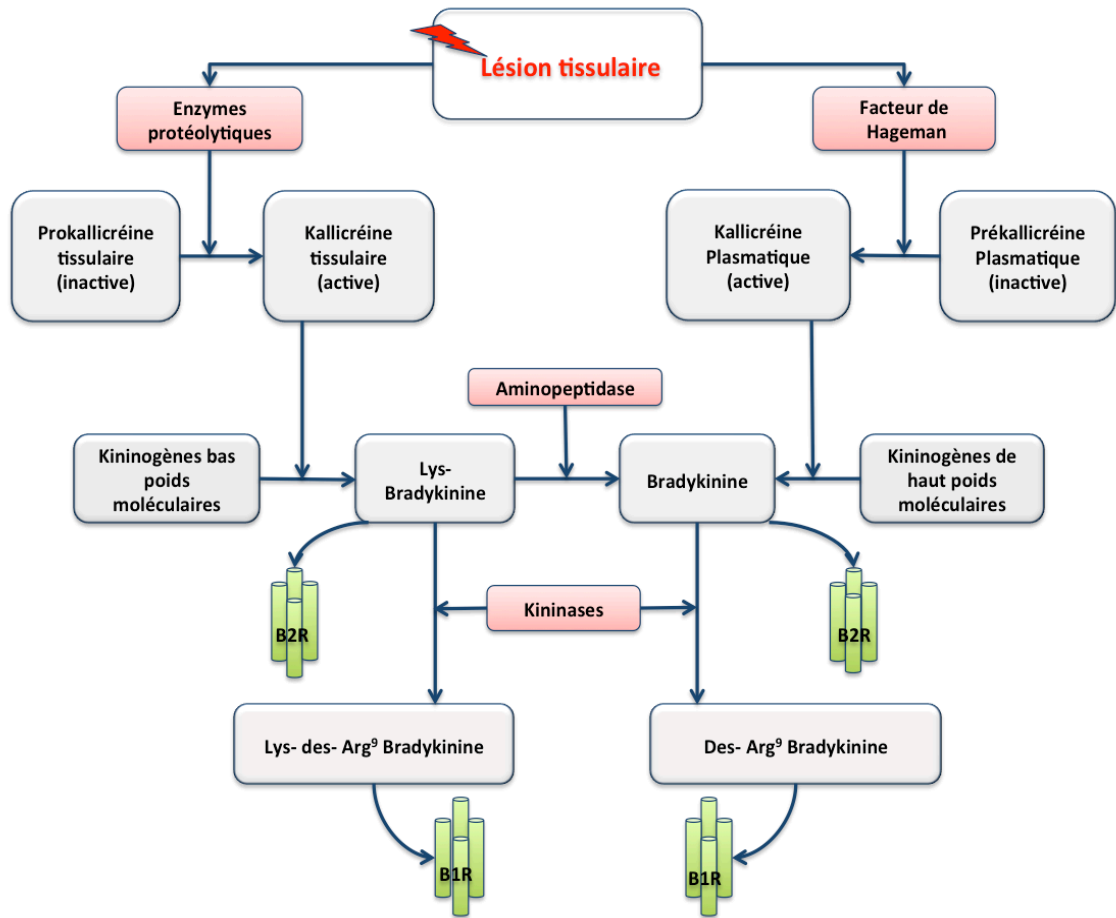


Figure 1.7. Les voies de formation des kinines et leurs récepteurs cibles

1.10.2 Les récepteurs des kinines

Les kinines exercent leurs actions biologiques par le biais des *récepteurs B1* (RB1) et *B2* (RB2) (Regoli and Gobeil 2016). Ces récepteurs appartiennent à la superfamille des récepteurs de la rhodopsine couplés aux protéines G (GPCR). Le RB1 et le RB2 sont des récepteurs à 7 domaines transmembranaires qui activent les protéines régulatrices $G\alpha_q/11$ et $G\alpha_i$, bien que la protéine $G\alpha_{12/13}$ soit également activée selon le type cellulaire (Leeb-Lundberg, Kang et al. 2001) (voir 1.10.3). Les récepteurs des kinines présentent une similarité structurelle et activent les mêmes voies de signalisation intracellulaires (Leeb-Lundberg, Marceau et al. 2005). L'affinité variable pour les différents agonistes a servi de base à la classification initiale des récepteurs. La BK et la KD agissent de préférence sur le RB2, tandis que leurs métabolites, des-Arg⁹-BK et des-Arg¹⁰-KD sont les ligands endogènes du RB1. L'activation du RB1 peut conduire à des réponses plus soutenues, alors que l'activation du RB2 est associée à des réponses rapides. Ces événements sont causés par différents mécanismes de désensibilisation et d'internalisation des récepteurs. Le RB2 est soumis à une désensibilisation et internalisation rapide, tandis que le RB1 est assujéti à une désensibilisation et internalisation lente (Couture and Lindsey 2000, Couture, Harrisson et al. 2001). Le RB1 est quasi absent en situation physiologique et il est induit en conditions physiopathologiques, notamment lors des lésions tissulaires et l'inflammation. La plupart des actions des kinines en situation physiologique sont relayées par le RB2 (Marceau, Larrivée et al. 1999). Toutefois, ce concept pourrait être réévalué car la régulation positive du RB1 semble être secondaire à la régulation négative du RB2 tel que démontré chez des souris invalidées pour le gène de ce récepteur. Aussi, la stimulation avec les agonistes RB1 et RB2 cause l'induction du RB1 (Campos, Mata et al. 1995, Phagoo, Reddi et al. 2001, Calixto, Medeiros et al. 2004).

1.10.3 La signalisation intracellulaire des récepteurs des kinines

La signalisation cellulaire repose sur des interactions protéiques bien coordonnées qui suscitent la transmission et la propagation des signaux extracellulaires vers la cellule (Scott and Pawson 2009). L'activation des récepteurs des kinines stimule le métabolisme des phospholipides membranaires. Ainsi, les récepteurs des kinines activent la protéine Gαq couplée à la phospholipase C (PLC), qui convertit le phosphatidylinositol-4-5-biphosphate en 1,2,5-triphosphate (IP3) et en diacylglycérol (DAG) (Walker, Perkins et al. 1995). L'IP3 active le récepteur IP3R et augmente la concentration cytoplasmique de Ca²⁺ issue du réticulum endoplasmique tandis que le DAG active la protéine kinase C (Couture and Girolami 2004, Scharfstein, Ramos et al. 2017). Les niveaux accrus de Ca²⁺ suscitent l'activation calmoduline-dépendante des monoxyde d'azote synthases impliquant différentes voies de signalisation. Les synthases, eNOS (contrôlée par la voie Gαq dépendante), iNOS (contrôlée par la voie Gαi dépendante) et nNOS (dépendante du domaine de PDZ) conduisent à la production de NO (Gabra, Couture et al. 2003, Kuhr, Lowry et al. 2010) qui active le GMPc dans le muscle lisse vasculaire sous-jacent et induit une vasodilatation (Couture, Blaes et al. 2014). La libération prolongée de NO, dépendant de la voie iNOS, ERK/MAPK et *Scr*, produit les effets délétères du RB1 par l'entremise du peroxy-nitrite (ONOO⁻) lors d'une inflammation systémique (Haddad and Couture 2016). La production du peroxy-nitrite (liaison de NO avec l'anion superoxyde) est renforcée par la production d'anion superoxyde lors de l'activation de la NADPH oxydase par le RB1 (Haddad and Couture 2017).

L'activation des RB1 et RB2 conduit aussi à la libération d'acide arachidonique à partir des phospholipides membranaires par une activation directe, Ca²⁺-dépendante, des PLA2 et du DAG (Raidoo and Bhoola 1997). Ensuite, l'acide arachidonique est métabolisé par

la prostaglandine H (PGH) synthase en prostaglandines (PGE2 et PGI2) (Levant, Levy et al. 2006, Rapoport 2008). Les prostaglandines augmentent l'adénosine monophosphate cyclique (AMPC) qui module l'activité neuronale. La GMPc entraîne une altération de la perméabilité des canaux ioniques dans les neurones, alors que l'AMPC et le NO augmentent la perméabilité de la barrière hémato-encéphalique. (Murphy 2015).

1.10.4 Récepteur B2 des kinines

Le RB2 des kinines est exprimé de façon ubiquitaire dans la plupart des tissus et il est impliqué dans des processus physiologiques, notamment la vasodilatation, la natriurèse et la diurèse. Toutefois, le RB2 joue aussi un rôle dans l'œdème angiogénique et l'inflammation neurogénique, en augmentant la perméabilité vasculaire, et dans la néovascularisation par un mécanisme impliquant l'endothélium vasculaire (Terzuoli, Morbidelli et al. 2018). Le RB2 est impliqué dans des états pathologiques dont l'asthme, la pancréatite, la colite, l'arthrite et la cataracte. Pourtant, la BK, et non pas ses métabolites, détient un rôle protecteur dans le SNC en réduisant la mort neuronale induite par l'inflammation lors de l'endotoxémie (Tableau 1.4). Ceci résulte de ses propriétés anti-inflammatoires surtout dans le stade tardif de l'inflammation, car elle inhibe la libération de TNF- α et d'IL-1 β induite par le LPS à partir de la microglie in vitro (Noda, Sasaki et al. 2007). Plusieurs antagonistes sélectifs ont été développés : Icatibant (HOE 140), FR-167344, FR-173657, et le Bradyzide, certains étant actifs par voie orale (Heitsch 2003). Les antagonistes tels que le Compound 38, CP2522, Substituted 1,4-dihydropyridines ont été conçus pour bloquer le RB2 humain. À noter que l'antagoniste HOE 140 (Icatibant; D-Arg-[Hyp³, Thi⁵, D-Tic⁷, Oic⁸]-BK) a été mis sous la formulation

de gouttes nasales à des fins de traitement de la rhinite aiguë, de l'asthme ou du stade précoce de l'inflammation chez les humains (Sharma 2014). Une étude portant sur l'administration d'Icatibant par voie intranasale montre que ce dernier entraîne une réduction significative du blocage nasal à la suite de l'action de l'antigène acarien retrouvé dans la poussière domestique (Austin, Foreman et al. 1994). Également, l'utilisation d'Icatibant (Firazyr) a été approuvée pour le traitement de l'angioedème héréditaire (Charignon, Peter et al. 2012). Bien que ce soit les seuls exemples d'utilisation clinique d'un antagoniste des récepteurs des kinines, ce succès encourage la création de nouveaux algorithmes de traitement.

Effets pathologiques	<ul style="list-style-type: none"> • vasodilatation • libération de médiateurs pro-inflammatoires • augmentation de la perméabilité vasculaire • néovascularisation rétinienne • activation des fibres sensorielles de type C
Effets bénéfiques potentiels lors d'une pathologie	<ul style="list-style-type: none"> • Vasodilatation • antihypertenseur • antifibrotique • antiprolifératif • antithrombotique

Tableau 1.4. Les effets de l'activation du récepteur B2 des kinines

1.10.5 Récepteur B1 des kinines

Le RB1 des kinines est synthétisé *de novo* dans des conditions pathologiques telles que l'inflammation, les traumatismes tissulaires, les brûlures, le choc septique et les allergies. Le RB1 est induit par les cytokines pro-inflammatoires (TNF α , IL-1 β et INF γ), certains facteurs de croissance, le stress oxydant et l'hyperglycémie via le facteur de

transcription nucléaire NF- κ B et la MAP-kinase. Il est responsable de l'hyperalgésie, l'hyperperméabilité vasculaire et l'infiltration cellulaire (Couture and Girolami 2004). Par exemple, l'inactivation du gène du RB1 chez la souris protège contre l'hypotension induite par le LPS, réduit la douleur neuropathique et la douleur en réponse à des stimuli thermiques ou chimiques (Zhang, Tan et al. 2011). L'antagonisme du RB1 exerce une action anti-diabétique en empêchant l'infiltration des cellules immunitaires dans le pancréas et en préservant l'intégrité des cellules β des îlots de Langerhans (Tidjane, Gaboury et al. 2016). De plus, l'antagoniste du RB1 fournit un effet protecteur contre les dommages aux organes en supprimant l'inflammation induite par le RB1 et l'agrégation plaquettaire (Tidjane, Hachem et al. 2015). Étant donné que le RB1 active la NADPH oxydase pour augmenter la formation d'ERO qui à leur tour sont directement impliquées dans l'induction du RB1, l'inhibition de l'effet pro-oxydant du RB1 avec le SSR240612 entraîne la suppression de l'expression du RB1 (Tidjane, Hachem et al. 2015).

Le RB1 est un GPCR atypique par son patron d'induction qui ressemble davantage aux récepteurs liés à la tyrosine-kinase (Calixto, Medeiros et al. 2004). Le RB1 active les voies de signalisation intracellulaires liées aux protéines $G_{\alpha q/11}$ et $G_{\alpha i}$; l'expression du RB1 est modulée par différents facteurs transcriptionnels (Schanstra, Bataillé et al. 1998, Angers, Salahpour et al. 2002). L'expression constitutive du RB1 est également retrouvée sur les neutrophiles humains, certaines cellules neuronales et les cellules tumorales.

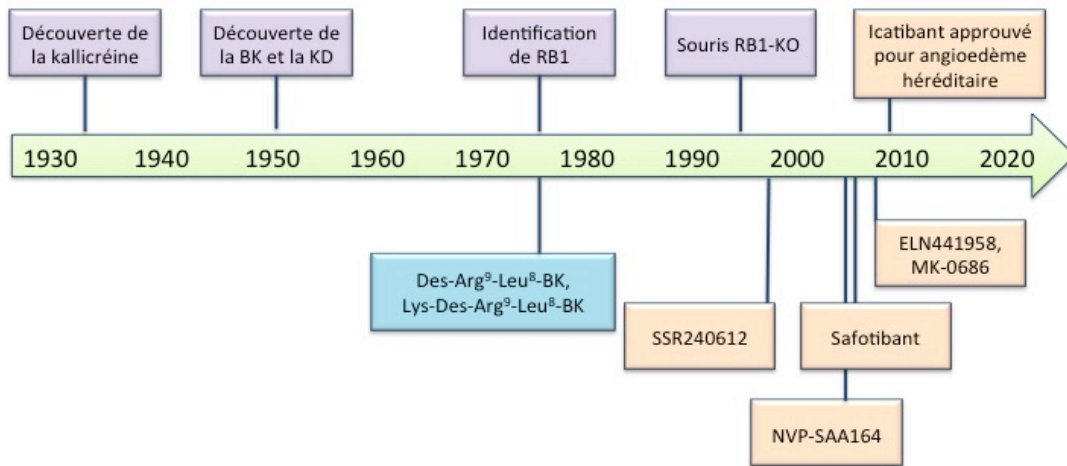
Le RB1 exerce aussi des effets bénéfiques (Marceau, Hess et al. 1998, Whalley, Figueroa et al. 2012). En outre, il démontre des effets bénéfiques sur le rein, en réduisant les lésions d'ischémie-reperfusion (Kakoki, Sullivan et al. 2010), sur le cœur en favorisant la réduction de la taille de l'infarctus (Potier 2014), sur les vaisseaux, en soutenant la

vasodilatation et l'angiogenèse (Moniwa, Agata et al. 2006), sur le cerveau en améliorant le déficit neurologique lors d'une lésion ischémie-reperfusion chez les rongeurs diabétiques (Desposito, Zadigue et al. 2017). Les mécanismes de ces fonctions restent peu clairs mais peuvent être liés à l'activation endothéliale associée à la libération d'anticoagulants, d'agents pro-fibrinolytiques et de vasodilatateurs (Desposito, Zadigue et al. 2017). L'activation du RB1 peut avoir un rôle important dans la protection du cœur contre les dommages induits par l'infarctus du myocarde en augmentant la production de NO et en supprimant l'infiltration des cellules inflammatoires, l'expression de la protéine TGFβ1 et la phosphorylation de ERK1/2 (Xu, Carretero et al. 2013). Le RB1 peut également contribuer à améliorer la réponse contre la progression de mélanome en réduisant la prolifération et la vascularisation des métastases (Maria, Dillenburg-Pilla et al. 2016).

Les souris dépourvues du RB1 ont une amélioration des déficits neurologiques et moteurs par rapport aux souris de type sauvage, et une réduction de la production d'IL-1β (Thornton, McColl et al. 2010), inférant ainsi que l'absence du RB1 assure la neuroprotection (Austinat, Braeuninger et al. 2009).

Ainsi, l'impact de l'activation du RB1 dans différentes maladies est difficile à prédire. Les différences de réponse peuvent être expliquées par le niveau d'expression du récepteur à la membrane et à son degré d'internalisation. Il est judicieux de noter que l'expression du RB1 à la membrane augmente en présence de son agoniste (autoinduction), contrairement à l'internalisation et à la désensibilisation que subissent la plupart des récepteurs couplés aux protéines G. Le ligand déclenche le mouvement du RB1 vers la membrane cellulaire et augmente le nombre de récepteurs disponibles pour

une réponse prolongée (Enquist, Skroder et al. 2007). Compte tenu de la vaste implication du RB1 dans de nombreux troubles et maladies, un intérêt considérable pour le développement des antagonistes en tant qu'agents thérapeutiques est apparu au cours des deux dernières décennies. Comme le montre la Figure 1.8, différents antagonistes du RB1, de nature peptidique et non peptidique, ont été conçus à ce jour. Ainsi, plusieurs essais cliniques ont été réalisés avec ces antagonistes du RB1 mais aucun n'a encore été mis sur le marché (Whalley, Figueroa et al. 2012).



Bleu -antagonistes peptidiques, jaune - antagonistes non peptidiques

Icatibant (antagoniste de RB2) est inclut dans le schéma comme le seul antagoniste ayant une application clinique.

Figure 1.8. L'avènement des antagonistes du RB1 depuis la découverte des kinines (schéma inspiré de *Whalley, 2012*).

1.10.6 Le récepteur B1 des kinines dans la douleur neuropathique

La lésion nerveuse est accompagnée par des réactions inflammatoires associées à une production élevée de plusieurs médiateurs pronociceptifs, y compris les kinines (Cui,

Holmin et al. 2000, Moalem and Tracey 2006). Dans le SNC, les kinines fonctionnent comme des neuromédiateurs, leurs effets étant traduits par l'activation de récepteurs impliqués dans la transmission et la perception douloureuse (Couture and Lindsey 2000, Wang and Woolf 2005, Couture, Blaes et al. 2014). Ainsi, la BK exerce ses actions par l'entremise du RB2 qui est exprimé d'une façon constitutive dans le système nerveux central et périphérique, son activation étant reliée à une hypersensibilité mécanique ou thermique à des stimuli nociceptifs (Calixto, Medeiros et al. 2004, Costa, Motta et al. 2011, Dutra, Bento et al. 2013). La BK, en agissant sur le RB2 est capable de susciter des potentiels d'action dans les terminaisons nerveuses nociceptives, alors que les agonistes du RB1 ne sont pas capables d'évoquer de tels effets (Dutra, Bento et al. 2013). De plus, l'expression du RB1 sur les fibres sensorielles a été remise en question car de plus, les études fonctionnelles avec des antagonistes du RB1 n'ont pas montré d'effets sur les neurones sensoriels périphériques (Fox, Wotherspoon et al. 2003, Calixto, Medeiros et al. 2004).

Une étude sur l'inflammation aiguë évoquée par la formaline montre que le RB1 n'est pas induit dans les neurones sensoriels périphériques (Rupniak, Boyce et al. 1997) et que l'action des kinines dans la douleur neuropathique se fait à partir du RB1 exprimé sur les cellules non neuronales (Petcu, Dias et al. 2008).

Pourtant, une étude montra une expression du RB1 sur des neurones sensoriels CGRP positifs (60%) et IB4+ positifs (25%) après section du nerf sciatique chez le rat (Ma 2001). Cette étude suggéra que l'expression du RB1 dépend du NGF. Une autre étude montra une induction de ~20% du RB1 sur les neurones IB4+ positifs fraîchement isolés du GRD de souris ou de rats néonataux prétraités avec le GDNF. Ainsi, en présence du

GDNF, et non pas du NGF, l'agoniste du RB1, des-Arg⁹-BK, appliqué aux neurones sensoriels induit une translocation de la PKC ϵ associée à l'augmentation du courant ionique dépendant de la chaleur. Les auteurs suggèrent que l'induction du RB1 n'est pas causée par des processus intrinsèques aux neurones, mais par la libération du GDNF par les tissus environnants en réponse à l'inflammation ou à une blessure. Ainsi, la hybridation *in situ* a montré que après huit heures d'incubation avec le GDNF, le niveau d'ARNm du RB1 augmente de 0 à 20.4% dans la population neuronale. Les neurones qui ont exprimé le RB1 fonctionnel n'ont pas été réceptifs au CGRP et à la substance P (Vellani, Zachrisson et al. 2004). Certains rapports suggèrent l'existence d'une coopération mutuelle entre les RB1 et RB2 dans la douleur neuropathique, par le fait que la stimulation persistante du RB2 peut causer une surexpression du RB1 (Phagoo, Poole et al. 1999, Phagoo, Reddi et al. 2001, Rashid, Inoue et al. 2004). Des travaux sur des souris dépourvues du gène du RB1 dans un modèle inflammatoire suggèrent l'implication du RB1 dans le déclenchement de la sensibilisation centrale et le développement de la douleur neuropathique (Pesquero, Araujo et al. 2000), tandis que l'administration d'agonistes sélectifs du RB1 dans la moelle épinière chez les souris dépourvues de RB1 produit une hyperalgésie thermique dose-dépendante (Ferreira, Campos et al. 2002).

1.11 Le TRPV1

Le récepteur de la capsaïcine TRPV1 fait partie de la grande superfamille des canaux TRP voltage-dépendants et ligand-dépendants. Les canaux TRPV1 sont exprimés majoritairement sur les terminaisons nerveuses des fibres sensorielles A δ et C dans la moelle épinière au niveau des laminae I et II. À ce niveau, le TRPV1 module la

transmission synaptique des signaux nociceptifs et participe à la perception douloureuse (Caterina and Julius 2001).

Le TRPV1 est composé de six domaines transmembranaires avec un pore entre le cinquième et le sixième domaine, et comporte des sites d'activation aux extrémités N- et C- terminales retrouvées dans le cytoplasme (Caterina and Julius 2001). Le TRPV1 forme des homotétramères qui se regroupent pour former un canal cationique non sélectif, perméable aux cations mono- et divalents, mais qui fait preuve d'une affinité accrue pour les ions Na^+ et Ca^{2+} . De plus, le TRPV1 manifeste une perméabilité élevée pour les grands cations polyvalents permettant le passage d'anesthésiques synthétiques (Caterina, Schumacher et al. 1997, Cao, Liao et al. 2013).

La nature polymodale du TRPV1 lui permet de réagir promptement aux composés algogènes exogènes et endogènes, de sorte que les températures nocives ($>42^\circ\text{C}$), le pH acide (< 6.0), les endovanilloïdes, les cytokines, les prostaglandines, les leukotriènes, l'alcool, les facteurs de croissance et les dérivés de nature végétale, y compris la capsaïcine (l'ingrédient piquant des piments forts) et la résinifératoxine (dérivée du cactus *Euphorbia resinifera*) produisent une sensation douloureuse en activant le TRPV1 (Mickle, Shepherd et al. 2015). À titre d'exemple, la BK, l'ATP, les prostaglandines ou le NGF peuvent sensibiliser le TRPV1 par la modulation allostérique du canal en facilitant la sensation douloureuse évoquée par un stimulus thermique (Sugiura, Tominaga et al. 2002, Moriyama, Higashi et al. 2005). La résinifératoxine montre un effet agoniste sur le TRPV1 qui est 3 à 4 fois plus puissant que celui de la capsaïcine (Szallasi, Szabó et al. 1999). Les toxines d'araignées telles que les vanillotoxines (VaTx) -1, 2, 3 et la « toxine à

double nœud » (DkTx) manifestent une forte activation du TRPV1 (Siemens, Zhou et al. 2006).

Lors d'un dommage tissulaire, les médiateurs pronociceptifs augmentent l'expression du TRPV1 dans les neurones sensoriels (à la fois au niveau de l'ARNm et de la protéine). L'expression du TRPV1 sur les afférences sensorielles endommagées diminue, tandis qu'une nouvelle expression du TRPV1 apparaît sur les fibres sensorielles intactes (Caterina and Julius 2001). L'activation du TRPV1 déclenche un potentiel d'action Ca^{2+} -dépendant et stimule la libération des médiateurs sensoriels (Glutamate, NO, CGRP, SP, etc.) pour engendrer la douleur (Julius 2013).

1.11.1 L'activation du TRPV1

Les modifications post-traductionnelles du TRPV1, incluant la phosphorylation des résidus sérine/thréonine, changent la sensibilité du récepteur à différents agents algogènes, ce qui potentialise l'activité du récepteur. Les protéines kinases PKC, PKA ou *Src* –kinase phosphorylent directement les résidus sérine et thréonine de l'extrémité N- et C-terminale du TRPV1 (Wang and Woolf 2005, Han, Li et al. 2012, Wang, Joseph et al. 2015). Ainsi, les PKC et PKA, en phosphorylant les sites Ser-116, Ser-502 ou Ser-800, peuvent réduire le seuil thermique du canal de 43° à 38°-33°C de sorte qu'il est activé à une température corporelle normale (mécanisme sous-jacent à la douleur thermique inflammatoire). Aussi, elles changent la sensibilité du canal aux protons, passant d'un pH d'activation de 5.6-6.2 à un pH de 6.4-7.0, ce qui sensibilise les nocicepteurs lors d'une lésion tissulaire (Zhang, Huang et al. 2005). En plus, l'activation de la p38 MAPK par le NGF transporté rétrogradement au corps cellulaires dans le GRD augmente l'expression

du canal sur les fibres sensorielles et maintient la sensibilisation neuronale à long-terme (Dong, Du et al. 2012). Une voie alternative d'activation du TRPV1 est liée à l'hydrolyse par la PLC du lien unissant la phosphatidylinositol-bisphosphate (PIP2) à la CaMKII qui est couplée d'une façon constitutive au domaine C-terminal du TRPV1 en gardant le statut inactif du récepteur (Numazaki, Tominaga et al. 2003). De cette manière, le détachement du PIP2 du TRPV1, soit par une hydrolyse directe sous l'action de la PLC, soit par une phosphorylation induite par des protéines kinases, active le TRPV1 (Chuang, Prescott et al. 2001). L'activation du TRPV1 entraîne une dépolarisation de la membrane plasmique neuronale suivie par l'ouverture des canaux Nav/Cav, qui conduit à un déclenchement du potentiel d'action et la propagation du stimulus nociceptif (Caterina, Schumacher et al. 1997). Les changements du potentiel membranaire et la dépendance intrinsèque du voltage sont également à la base du mécanisme d'activation du TRPV1 (Voets, Droogmans et al. 2004). Dans ce contexte, le TRPV1 possède la propriété de '*rectification sortante*' au cours de la phase de dépolarisation qui augmente l'influx d'ions Ca^{2+} dans la cellule en altérant la cinétique du potentiel d'action et la régulation calcium-dépendant du canal (Gunthorpe, Harries et al. 2000). Une fois activé, le TRPV1 suscite le déclenchement de la libération vésiculaire de glutamate et de peptides neuro-modulateurs (substance P et CGRP) à partir des terminaisons centrales nociceptives dans la corne dorsale de la moelle épinière, provoquant ainsi une réponse douloureuse. Fait intéressant, la libération périphérique des neuropeptides peut être déclenchée par activation réflexe axo-axonale au niveau des terminaisons nerveuses dendritiques entraînant une réponse neurogénique inflammatoire (Couture 2001). Cette libération des neuropeptides peut être bloquée par des anesthésiques locaux qui ciblent les canaux

sodiques voltage-dépendants (Caterina and Julius 2001). Toutefois, la libération des peptides sensoriels survenant après l'activation directe et non réflexe de la fibre sensorielle est insensible à ces agents et contribue à la perception douloureuse liée à certaines pathologies comme l'asthme, la cystite interstitielle ou la maladie inflammatoire de l'intestin (Campbell and Meyer 2006). À noter que les neurotrophines NGF, BDNF (facteur neurotrophique dérivé du cerveau), NT-3 (neurotrophine 3), NT-5 (neurotrophine 5), et GDNF stimulent également l'insertion du TRPV1 dans la membrane et permettent son activation (Spofford and Brennan 2012).

1.11.2 L'inactivation (désensibilisation) du TRPV1

Une fois activé, le TRPV1 subit une désensibilisation rapide en présence du ligand, qui agit de manière allostérique et qui entraîne une diminution de la décharge neuronale lors d'une activation prolongée du canal (Caterina, Schumacher et al. 1997). Cette désensibilisation résulte de l'influx de Ca^{2+} à travers le canal et l'activation des phosphatases (PPA1/2A, PP2B, protéines tyrosine phosphatases) capables d'induire la déphosphorylation du TRPV1 et sa fermeture (Mohapatra and Nau 2005, Ambrosino, Soldovieri et al. 2013). Il est aussi montré que l'activation de la voie Ca^{2+} /CaM (calcium-calmoduline) et l'interaction de PIP2 avec les extrémités N- et C- terminales du TRPV1 sont des mécanismes critiques pour la désensibilisation des canaux, car ils sont responsables d'inhiber le courant induit par la capsaïcine d'une façon dépendante du calcium (Rosenbaum, Gordon-Shaag et al. 2004). De plus, par un mécanisme dépendant de la calcineurine, certains cannabinoïdes montrent un effet inhibiteur sur le courant calcique et sur la libération de neuropeptides à la suite de l'activation du TRPV1

(Patwardhan, Jeske et al. 2006). Un mécanisme inhibiteur du TRPV1, impliquant la protéine $G_{i/o}$ et l'inhibition de l'AMPC et de la PKA est observé lors de l'activation des récepteurs opioïdes μ . Ce mécanisme inhibe les courants calciques induits par le TRPV1 et produit un effet analgésique (Endres-Becker, Heppenstall et al. 2007). Notez que l'action répétitive d'un ligand sur le TRPV1 peut engendrer une désensibilisation Ca^{2+} - dépendant du récepteur suivi par une tuméfaction mitochondriale, une dysfonction prolongée ou même une dégénérescence des structures associées au TRPV1 (Chiang, Ohno et al. 2015). À titre d'exemple, la perfusion intravésicale de vanilloïdes améliore par ce mécanisme les symptômes du tractus urinaire inférieur liés à un état hyperactif de la vessie associé aux lésions de la moelle épinière avec des complications minimales à long terme (Chancellor and de Groat 1999).

Par conséquent, la stimulation répétée du TRPV1 et la capacité de la capsaïcine à désensibiliser les neurones nociceptifs représentent une stratégie viable pour soulager la douleur pathologique. Effectivement, l'application topique de capsaïcine s'est révélée efficace dans certaines douleurs neuropathiques (Mason, Moore et al. 2004), y compris la névralgie liée à la neuropathie diabétique, la névralgie du zona (herpès zoster) (Westerman, Roberts et al. 1988), la névralgie liée au VIH (virus de l'immunodéficience humaine) (Caterina and Julius 2001) et la douleur neuropathique chirurgicale (Ellison, Loprinzi et al. 1997).

De très bons résultats ont été obtenus dans le traitement de la polyneuropathie sensorielle distale associée au VIH, lorsqu'un patch dermique à forte concentration de capsaïcine (NGX - 4010) est appliqué à la zone douloureuse (Simpson, Brown et al. 2008). Des troubles liés à une sous-expression du TRPV1 pourraient également déclencher les

douleurs chroniques; ce phénomène observé au cours de la douleur neuropathique est associé à un déficit d'expression du TRPV1 au niveau de la peau (Facer, Casula et al. 2007).

1.11.3 Le TRPV1 dans la douleur neuropathique

Le rôle du TRPV1 dans le développement de la douleur est strictement lié à la découverte de l'action de la capsaïcine sur la perception douloureuse. Ainsi, une étude, réalisée par Jancsó (1967), prouva pour la première fois que la capsaïcine active les neurones sensoriels et rend les animaux résistants aux stimuli douloureux (Jancso, Jancso-Gabor et al. 1967). Ensuite, d'autres études trouvèrent que l'activation du TRPV1 sur les fibres C polymodales peut conduire à l'excitation neurale accompagnée par la libération de médiateurs proinflammatoires, la sensibilisation des récepteurs et la toxicité neurale (Bertin, Aoki-Nonaka et al. 2014). Par conséquent, la sensibilité à la capsaïcine fut reconnue comme un marqueur important de la nociception.

L'importance du TRPV1 dans la douleur a été démontrée soit par une ablation génétique du TRPV1 soit par son blocage pharmacologique. La première preuve du rôle du TRPV1 dans la douleur provient des observations sur la diminution de l'hypersensibilité thermique chez les rongeurs ayant reçu une injection de capsazépine (antagoniste vanilloïde compétitif du TRPV1) (Caterina, Schumacher et al. 1997). Ensuite, certains modèles de douleur inflammatoire chez les rongeurs TRPV1^{-/-}, y compris l'inflammation induite par l'adjuvant complet de Freund (CFA), révélèrent une inhibition de l'hyperalgésie thermique induite par des médiateurs inflammatoires (Caterina, Leffler et al. 2000, Davis, Gray et al. 2000). Les médiateurs proinflammatoires augmentent

rapidement l'expression (ARNm) du TRPV1 dans les afférences sensorielles et, ainsi, la perception douloureuse (Mickle, Shepherd et al. 2015).

Le rôle du TRPV1 dans le développement et l'évolution de la douleur inflammatoire est donc le plus important parmi tous les canaux TRP (Jardin, Lopez et al. 2017). D'autre part, l'implication du TRPV1 dans la douleur neuropathique a été démontrée dans des modèles associés au diabète, à la lésion d'un nerf périphérique et la chimiothérapie (Bourinet, Altier et al. 2014). Ainsi, une étude récente révéla que la quercétine (flavonoïde avec un puissant effet antioxydant) atténue la douleur neuropathique induite par le paclitaxel (chimiothérapeutique) (Gao, Zan et al. 2016) en bloquant l'activation PKC ϵ –dépendante du TRPV1 (Malek, Pajak et al. 2015). De plus, l'administration intraplantaire ou intraganglionnaire des antagonistes du TRPV1 diminue l'excitation des neurones à large gamme dynamique dans la moelle épinière et atténue l'hyperalgésie et l'allodynie (Palazzo, Luongo et al. 2012).

À noter que l'allodynie mécanique est due à la sensibilisation centrale (subordonnée à la signalisation glutamatergique et à la signalisation dépendante du CGRP et de la substance P) causée par l'activation du TRPV1 (Baron 2006, Lappin, Randall et al. 2006, Voisin 2010). L'application de l'antagoniste sélectif du TRPV1, 5'-iodorésiniferatoxine (IRTX), bloque la libération de microvésicules contenant du glutamate et atténue l'hypermensibilité à des stimuli nociceptifs (Palazzo, Luongo et al. 2010). Sur la base de ces découvertes, le TRPV1 a été assigné comme un intégrateur des stimuli nociceptifs (Caterina, Schumacher et al. 1997, Caterina, Leffler et al. 2000), aussi parce qu'il est principalement exprimé sur les afférences sensorielles de type C (dans une moindre

mesure sur les fibres A δ), et qu'il est impliqué dans la détection, la transduction et la régulation de la transmission douloureuse.

De cette façon, le TRPV1 est la base moléculaire de la douleur inflammatoire, la douleur neuropathique, la douleur viscérale, la douleur cancéreuse, la douleur dentaire et la migraine (Mickle, Shepherd et al. 2015).

1.11.4 Interaction entre le TRPV1 et les récepteurs des kinines dans la douleur neuropathique

Étant donné que le TRPV1 et les récepteurs des kinines (du moins le RB2) sont exprimés sur les fibres sensorielles, qu'ils sont activés par des stimuli nociceptifs et que leurs antagonistes produisent un effet antinociceptif dans différents modèles de douleur (Levy and Zochodne 2000, Pesquero, Araujo et al. 2000), une possible interaction entre ces récepteurs a été suggérée dans l'évolution de la douleur aiguë et chronique. L'activation du TRPV1 par la BK a d'abord été rapportée lors d'une douleur inflammatoire. Ainsi, l'injection d'un agoniste du RB2 (Tyr⁸-BK) dans la patte de la souris produit une réponse nociceptive rapide (Ferreira, da Silva et al. 2004). Le TRPV1 est alors proposé comme une cible importante des voies de signalisation de la BK dans l'induction de la synthèse des cytokines et dans l'activation des neurones sensoriels. Le TRPV1 est reconnu comme un médiateur des mécanismes ioniques couplant les récepteurs des kinines à l'excitation et à la sensibilisation des nocicepteurs (Caterina and Julius 2001, Shin, Cho et al. 2002). À titre d'exemple, chez les rats, la capsazépine (l'antagoniste de TRPV1) est capable d'inhiber le potentiel d'action évoqué par la capsaïcine et par la BK à la fois sur les fibres C et sur les neurones des GRD (Shin, Cho et al. 2002, Ferreira, da Silva et al. 2004). De

plus, chez les souris TRPV1^{-/-}, la BK n'induit qu'une faible décharge des nocicepteurs (Kollarik and Udem 2004). Ces résultats fournissent des preuves indiquant que les agonistes du RB2 et du TRPV1 peuvent activer la même structure pour produire une réponse nociceptive (Ferreira, da Silva et al. 2004). La BK (via le RB2) est en mesure de sensibiliser le TRPV1 aux stimuli nociceptifs en activant les voies de signalisation PLC-PKC dépendantes qui mettent en exécution l'hydrolyse de PIP2 et la phosphorylation du TRPV1 (Rajpal, Gerovac et al. 2007). La BK peut exercer des effets nociceptifs indirects par la production de prostaglandines et des leucotriènes induits par la PLA2 (Shin, Cho et al. 2002, Calixto, Medeiros et al. 2004). Ainsi, la BK produit des effets nociceptifs en stimulant la production de seconds messagers qui sensibilisent le TRPV1 (Ferreira, da Silva et al. 2004). À noter que la BK induit la désensibilisation rapide des RB2 qui se produit conjointement avec l'induction durable du RB1 (Ferreira, Campos et al. 2002). Dans ce contexte, le RB1 favorise une signalisation intracellulaire plus prolongée par rapport au RB2 pouvant générer une douleur chronique par une interaction constante avec le TRPV1 (Ueda 2006, Rajpal, Gerovac et al. 2007).

Des études montrent que le TRPV1 est un facteur de déclenchement de la synthèse des cytokines pro-inflammatoires et des ERO qui à leur tour, peuvent induire le RB1 par la voie NF- κ B (Hamza, Wang et al. 2010, Talbot, Chahmi et al. 2010). Ainsi, une étude montre une augmentation de 40 fois les taux d'ARNm de l'IL-1 β chez des rats traités avec la capsaïcine; cette induction est prévenue par la capsazépine (l'antagoniste sélectif du TRPV1) (Talbot, Chahmi et al. 2010). Fait intéressant, les niveaux d'ARNm du TNF α ne sont pas affectés par le traitement avec la capsaïcine.

La délétion du RB1 ou son blocage pharmacologique montre une diminution de l'hypersensibilité thermique dans des modèles inflammatoires induits par le carragénine et la formaline (Rupniak, Boyce et al. 1997, Porreca, Vanderah et al. 2006) ou par l'adjuvant complet de Freud (Ferreira, Campos et al. 2001, Calixto, Medeiros et al. 2004). Ces études suggèrent que l'induction du RB1 serait tributaire de l'activation du TRPV1 selon un mécanisme dépendant du stress oxydant, des cytokines pro-inflammatoires et de la voie NF- κ B (Ni et al. 1998b, Campos et al. 1999, Medeiros et al. 2004)

1.12 Modèles animaux de douleur neuropathique

Pour mieux comprendre les mécanismes impliqués dans la DN et identifier les cibles stratégiques dans le développement de thérapies efficaces, des études précliniques avec des modèles animaux reflétant la situation clinique s'avèrent nécessaires (Garcia-Larrea and Magnin 2008). Jusqu'à la fin des années 1970, la recherche était presque exclusivement centrée sur les réactions comportementales et les réponses électrophysiologiques aiguës à des stimuli thermiques ou mécaniques utilisant les réactions réflexes évoqués pour simuler la douleur humaine (King, Qu et al. 2011). Les tests de la queue et de la plaque chauffante ont été les seuls tests utilisés pour le dépistage des analgésiques pharmaceutiques précliniques (Garcia-Larrea and Magnin 2008).

Cependant, la douleur spontanée et l'hypersensibilité à des stimuli nocifs et anodins sont la principale plainte chez les patients souffrants des douleurs chroniques. Par conséquent, les modèles plus anciens sont pertinents seulement pour tester la douleur nociceptive aiguë, ayant une valeur limitée pour évaluer l'hypersensibilité associée à la DN (Jaggi, Jain et al. 2011). Dans ce contexte, Wall et ses collègues développèrent un modèle de douleur chronique en

produisant une lésion d'un nerf périphérique ouvrant ainsi une nouvelle avenue de recherche sur la compréhension des mécanismes sous-jacents à la DN.

Plusieurs modèles animaux ont été conçus selon le type de lésion et le compartiment endommagé (Tableau 1.5) (Bouhassira, Attal et al. 2005, Garcia-Larrea and Magnin 2008). Plus de 40 modèles animaux de DN, développés à partir de lésions du système nerveux périphérique ou central, ont contribué à la compréhension des mécanismes de la douleur chronique. L'objectif principal des modèles est d'étudier la physiopathologie et les options de traitements conformes à chaque type de douleur sur la base du comportement des animaux (hypersensibilité aux stimuli thermiques ou mécaniques) et sur la mesure de l'expression et de la distribution cellulaire des cibles moléculaires identifiées.

Tableau 1.5. Principaux modèles expérimentaux de douleur neuropathique

Modèles périphériques
<i>Lésions traumatiques</i>
<ul style="list-style-type: none"> • constriction chronique du nerf sciatique (Bennet and Xie 1988) • ligature partielle du nerf sciatique (Seltzer and Shir 1990) • lésion du nerf spinal (Kim and Chung 1992) • axotomie partielle ou totale d'un nerf périphérique (Malmberg and Basbaum 1998)
<i>Lésions non-traumatiques</i>
<ul style="list-style-type: none"> • neuropathie diabétique par injection de streptozotocine (Courteix 1993) • neuropathie toxique par drogues antinéoplasiques (vincristine, paclitaxel) (Flatters and Bennet 2004)
Modèles centraux
<ul style="list-style-type: none"> • lésions excitotoxiques (glutamate, acide kaïnique, quisqualate) (Yeziarski et al. 1998) • lésion chirurgicale du faisceau spinothalamique (Vierck et al. 1999) • cordotomie antérolatérale chirurgicale (Lopez et al. 2004) • contusion spinale (Grill 2005)

(Adapté selon Bouhassira, Attal et al. 2005, Garcia-Larrea and Magnin 2008)

1.12.1 Modèle de Seltzer (ligature partielle du nerf sciatique)

Le modèle expérimental choisi pour notre étude est la ligature partielle du nerf sciatique développée par Seltzer et al. (1990). Ce modèle a été utilisé pour introduire la neuropathie périphérique équivalente à la causalgie chez les humains. Selon IASP (1993), ce type de douleur fait partie des “syndromes régionaux douloureux complexes” qui apparaissent après un traumatisme d’un nerf périphérique tel que celui du plexus médian (35%), du nerf sciatique (40%), du plexus brachial (12%) et d’autres nerfs (13%) (Sebastin 2011). Les douleurs associées à une lésion d’un nerf périphérique peuvent être caractérisées par une hyperalgésie ou une allodynie, ayant un caractère permanent et qui ne se limite pas nécessairement au territoire du nerf lésé (Bruehl 2010). Le modèle Seltzer est un modèle classique de neuropathie périphérique qui est accompagné par une sensibilité accrue aux stimuli mécaniques (allodynie mécanique) et thermiques (hyperalgésie thermique, allodynie au froid). Ces particularités permettent de tester les agonistes et les antagonistes sélectifs du RB1 et duTPRV1 sur la progression de la douleur neuropathique périphérique et de définir leur rôle dans la physiopathologie de ce type de douleur.

CHAPITRE II

ARTICLE SCIENTIFIQUE

Hypothèse de travail

Les douleurs neuropathiques (DN) portent un caractère débilisant et elles sont résistantes aux médicaments conventionnels. Leurs mécanismes sont complexes et impliquent des changements dans l'activité et l'expression des protéines membranaires. En outre, le RB1 des kinines et le TRPV1 seraient des cibles thérapeutiques potentielles. Nous proposons que ces deux récepteurs interagissent directement (sur la même cellule) ou indirectement (via la libération de médiateurs, notamment les cytokines) causant un changement mutuel de leur expression et de leur activité pronociceptive.

Objectifs de l'étude

L'étude cible l'interaction entre le RB1 et le TRPV1 dans un modèle expérimental de DN (modèle de Seltzer), en précisant leur fonction, leur expression et leur localisation cellulaire dans la moelle épinière et les GRD au niveau lombaire. Des études pharmacologiques effectuées avec des inhibiteurs du RB1 et du TRPV1 permettent d'évaluer l'impact sur les réponses comportementales nociceptives et sur le mode de régulation de leur expression.

Approche expérimentale

Des rats Sprague-Dawley ont subi une LPNS (Seltzer et al. 1990). Deux semaines post-LPNS, l'impact d'un traitement avec un antagoniste du RB1 (SSR240612; 10 mg/kg/jr i.p.) ou du TRPV1 (SB366791; 1 mg/kg/jr i.p.) a été mesuré chaque jour sur une période d'une semaine sur les comportements nociceptifs (l'hyperalgésie thermique, l'allodynie tactile et au froid). Puis, après la semaine de traitement, les taux d'ARNm du RB1, du TRPV1, du TNF α et de

l'IL-1 β ont été mesurés dans la portion lombaire de la moelle épinière et des GRD par qRT-PCR. L'allodynie tactile a été mesurée avec des filaments de Von Frey et l'allodynie au froid, par l'application d'une goutte d'acétone à la surface plantaire des pattes postérieures. L'hyperalgésie thermique a été mesurée par la méthode de Hargreaves. La distribution et la localisation cellulaire du RB1, du TRPV1 et de l'IL-1 β ont été visualisées par immunofluorescence sur les fibres sensorielles, la microglie et les astrocytes. L'expression protéique de ces cibles a été mesurée quantitativement avec une approche immunohistochimique.

Cette étude est présentée dans un article non encore soumis pour le British Journal of Pharmacology.

ARTICLE

Interaction between TRPV1 and Kinin B1 receptor in a rat neuropathic pain model

Veronica Cernit and Réjean Couture

Department of Pharmacology and Physiology, Faculty of Medicine, Université de Montréal,
Montréal, Québec, Canada H3C 3J7

Running title: TRPV1 and kinin B1 receptor-induced neuropathic pain

Corresponding Author

Dr Réjean Couture

Tel.: 514-343-7060

Email: rejean.couture@umontreal.ca

Abstract

Background and Purpose

Neuropathic pain (NP) remains a prevalent clinical problem. Kinins are mediators of pain and inflammation and the kinin B1 receptor (B1R) may play a role in NP following interaction with the cytokine pathway (IL-1 β , TNF α) and the transient receptor potential vanilloid type1 (TRPV1), an integrator of noxious stimuli.

Experimental Approach

Sprague-Dawley rats (225-250 g), subjected to unilateral partial sciatic nerve ligation (PSNL), were tested for the impact of one-week treatment with antagonists for B1R (SSR240612, 10 mg kg⁻¹ i.p.) or TRPV1 (SB366791, 1mg kg⁻¹ i.p.) on nociceptive behavior, mRNA expression of B1R, TRPV1, TNF α and IL-1 β and cellular distribution of B1R, TRPV1 and IL-1 β in the lumbar spinal cord and dorsal root ganglion.

Key Results

Both B1R and TRPV1 antagonists suppressed PSNL-induced thermal hyperalgesia, but only SB366791 blunted mechanical and cold allodynia. Whereas SSR240612 reversed astrogliosis and the enhanced B1R and TRPV1 mRNA levels induced by PSNL, SB366791 further increased B1R mRNA and astrogliosis. B1R was colocalised with IL-1 β on astrocytes, yet TRPV1 was expressed on sensory fibers. IL-1 β mRNA (but not TNF α) was further increased under B1R or TRPV1 antagonism, suggesting that IL-1 β is located upstream to B1R and TRPV1.

Conclusions and Implications

B1R and TRPV1 contribute to thermal hyperalgesia and play a distinctive role in allodynia associated with NP. Data suggest an indirect and reciprocal regulatory interaction between B1R and TRPV1. This study highlights the possibility that a combined treatment with B1R and TRPV1 antagonists can afford a better therapeutic strategy in NP.

Abbreviations

- BK, bradykinin; B1R, kinin type 1 receptor; B2R, kinin type 2 receptor; DRG, dorsal root ganglion; GFAP, glial fibrillary acidic protein; Iba1, ionized calcium binding adapter molecule 1; PSNL, partial sciatic nerve ligation; PWL, paw withdrawal latency; PWF, paw withdrawal frequency; PWT, paw withdrawal threshold; NP, neuropathic pain; TRPV1, transient receptor potential vanilloid type 1; iDH, ipsilateral dorsal horn; DRG, dorsal root ganglia; SP, spinal cord.

1.0 Introduction

Neuropathic pain (NP) associated with peripheral nerve injury is a widespread clinical problem without effective treatment. The meta-analysis of 21 reports on NP prevalence in general population has shown that NP associated with specific conditions displayed 3.9-42/100000 person-years [PY] for postherpetic neuralgia, 12.6-28.9/100000 PY for trigeminal neuralgia and 15.3-72.3/100000 PY for painful diabetic peripheral neuropathy (van Hecke, Austin et al. 2014). Understanding the underlying mechanisms and the development of new pharmacological targets are prerequisite to treat NP-evoked spontaneous pain, hyperalgesia and allodynia (Woolf 2004). Kinins are mediators of pain and inflammation (Couture, Harrison et al. 2001, Calixto, Medeiros et al. 2004) and their B1 and B2 receptors (B1R and B2R) may represent relevant therapeutic targets. Both receptors have been found to be expressed on primary sensory components, promoting mechanical and thermal hyperalgesia (Couture and Lindsey 2000, Petcu, Dias et al. 2008, Talbot, Chahmi et al. 2010). Nociceptive responses to mechanical and thermal noxious stimuli are curtailed in kinin receptor knockout mice (Pesquero, Araujo et al. 2000). Kinin receptor antagonists display antinociceptive effects in NP models induced by sciatic nerve injury ((Levy and Zochodne 2000, Yamaguchi-Sase, Hayashi et al. 2003, Petcu, Dias et al. 2008) brachial plexus avulsion (Quintao, Passos et al. 2008) and in type 1 and type 2 diabetes (Gabra, Merino et al. 2005, Talbot, Chahmi et al. 2010). It is believed that B2R activation entails the onset of acute phase of inflammatory pain, while B1R is involved in the late phase of inflammatory hyperalgesia and NP (De Brito Garipey, Talbot et al. 2013, Dutra, Bento et al. 2013). This is consistent with the constitutive (with rapid internalisation and desensitisation) and inducible (with weak internalisation and desensitization) features of B2R and B1R, respectively (Leeb-Lundberg, Marceau et al. 2005).

Transient receptor potential vanilloid type 1 (TRPV1), a noxious heat detector and integrator of thermal and chemical noxious stimuli, can serve as the bradykinin effector on nociceptive afferents (Ferreira, Lorenzetti et al. 1993). TRPV1 can be sensitized through the phosphorylation (Numazaki, Tominaga et al. 2002) of its C-terminal end by protein kinase A and/or C in the presence of a variety of inflammatory stimuli (Ma and Quirion 2007), including bradykinin (Chuang, Prescott et al. 2001). TRPV1 and B2R are functionally coupled to each other through intracellular Gq/11 α -PLC β -PKC ϵ signaling pathway. B2R triggers activation of PLC β with subsequent PKC ϵ -dependent hydrolysis of phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate (PIP₂) and activation of TRPV1 channel (Numazaki, Tominaga et al. 2002). Such interaction between TRPV1 and B1R has never been reported despite B1R was found on primary sensory neurons (Ma 2001) and thermal hyperalgesia was associated with enhanced B1R and TRPV1 mRNA levels following spinal cord injury (DomBourian, Turner et al. 2006) and diabetic neuropathy (Talbot, Chahmi et al. 2010). Thermal hyperalgesia did not manifest in TRPV1 knockout mice (Caterina, Leffler et al. 2000) and in B1R knockout mice in NP models associated with nerve injury (Ferreira, Beirith et al. 2005) and type 1 diabetes (Gabra, Merino et al. 2005). Moreover, nociceptive behavioural responses to capsaicin-induced TRPV1 activation are inhibited in B1R knockout mice (Pesquero, Araujo et al. 2000), and capsaicin enhanced the expression of B1R in spinal cord and caused hyperalgesia under B1R activation, (Talbot, Chahmi et al. 2010) suggesting an interaction between B1R and TRPV1. The stimulation of TRPV1 can enhance the production of pro-inflammatory cytokines such as TNF α and IL-1 β (Huang, Yu et al. 2015) that are known to enhance the expression of B1R through the activation of p-38 MAPK and NF- κ B (Phagoo, Reddi et al. 2001). IL-1 β also induces p-38 dependent sensitization of TRPV1-positive nociceptors and TNF α up-regulates

TRPV1 expression on sensory neurons (Khan, Diogenes et al. 2008) contributing to enhanced mechanical and thermal stimuli evoked hyperalgesia. IL-1 β promotes astrocyte proliferation and activation through overexpressed IL-1R1 (Guo, Wang et al. 2007). Activated astrocytes, in turn, release inflammatory mediators such as prostaglandins, chemokines, cytokines and nitrogen species that enhance hyperalgesia (Basu, Krady et al. 2004) contributing to NP. The upregulation of B1R in spinal dorsal horn microglia by pro-inflammatory cytokines has recently been shown as an early mechanism in diabetic NP (Talbot and Couture 2012) that is congruent with the role of microglia in NP (Liu and Yuan 2014).

Interaction between B1R and TRPV1 appears as a potential NP mechanism. This hypothesis was addressed using the classical model of NP induced by unilateral partial sciatic nerve ligation (PSNL). The impact of one-week blockade of B1R or TRPV1 was determined on: 1- behavioural nociceptive responses (thermal hyperalgesia and allodynia); 2- B1R and TRPV1 genes expression along with the expression profile of TNF- α and IL-1 β in the lumbar spinal cord and dorsal root ganglion (DRG); 3- the cellular distribution and possible co-localisation of B1R and TRPV1 on primary sensory fibres, astrocytes and microglia.

2.0 Materials and methods

2.1 Animals

Experiments were carried out in 44 male Sprague-Dawley rats (225-250 g) purchased from Charles River (St-Constant, QC, Canada). Animals were housed two per cage and kept in a controlled environment and pathogen-free conditions (room temperature 23 °C, humidity 40%, 12/12h light/dark cycle). Normal chow diet (Charles River Rodent) and tap water were accessible *ad libitum*. Prior to experimentation, rats were allowed to acclimate for 5-7 days.

Experiments were performed during the light phase of the cycle (9:00 AM–4:00 PM). The Animal Care Committee of the Université de Montréal approved all research procedures (Protocols 16-140, 17-140), which were in compliance with the guiding principles for animal experimentation as enunciated by the Canadian Council on Animal Care.

2.2 Partial sciatic nerve ligation (PSNL)

Partial ligation of the sciatic nerve was performed according to the original description of Seltzer *et al.*, 1990. Prior to surgery, rats were randomly divided into 8 groups (four groups of 7 rats for PSNL and four groups of 4 rats for control). PSNL was carried out under general anesthesia with 3% Isoflurane (Santa Cruz Biotechnology, Mississauga, ON, Canada), which was kept during surgery at 500-1000 ml/min and vaporizer at 5% so that gas exposure level within the work environment was at 2 ppm (according to OSHA standards). Under aseptic conditions, after incision of the skin at the upper-thigh level of the left paw, the sciatic nerve was exposed and a tight ligation of the dorsal third to half thickness of the nerve was made with 6-0 silk, distal to the insertion of the posterior biceps semitendinosum muscle. After the ligation, the wound was sewn to the skin with 4-0 silk. Operated rats were recovered from anaesthesia and placed in a warm, clean, dry and quiet environment. The wound healed within 1 to 2 days, and the rats behaved normally. Additional naïve, non-operated, non-treated rats were used as control. Following the surgery and over the next 2 days, the rats received the antibiotic Tribissen 24%, 0.05 ml/kg, s.c., (Schering Canada Inc., Pointe Claire, QC, Canada) and Carprofen 0.5mg kg⁻¹, s.c., (Rimadyl 50mg/ml, Zoetis Canada Inc., Kirkland, QC, Canada). Rats subjected to PSNL developed weakness of the hindpaw to the side of injury on

the first day after nerve ligation. All along the treatment, a protective but not self-mutilating behaviour as autotomy was observed. No animals were excluded from the study.

2.3 Behavioral assessment

Nocifensive behavior was assessed on each hind paw before and after surgery (on days 3, 7, 14 post-PSNL) and during one week of treatment (beginning from day 14 post-PSNL) with both B1R and TRPV1 antagonists and their vehicles. Naïve, control groups have also been tested.

2.3.1 Tactile allodynia test

Tactile allodynia test (Foot Withdrawal Response to mechanical stimuli) was performed according to the method of Chaplan *et al.*, 1994, by employing a calibrated series of 8 von Frey (VF) filaments from 0.7 to 26.0 g (Stoelting, Wood Dale, IL, USA). Prior to testing, rats were placed under a transparent plastic dome on a metal mesh support and were allowed for 20-30 min to accommodate. Starting from the weakest filament, one at a time, the VF filaments were applied perpendicular to the skin of hind-paw at mid-plantar region with adequate pressure until they bend. Each filament was applied 10 times (2-3 s per stimulation, with 1-2 min between stimulations). 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. As the nociceptive response to mechanical stimulation in control rats was set between 12-15 g, an upper cut-off for the paw withdrawal was estimated at 15g.

2.3.2 Cold allodynia test

Cold allodynia test (Foot Withdrawal Response to Acetone) was assessed as described by Choi *et al.*, 1994. Rats were placed under a transparent plastic dome on a metal mesh floor and after their accommodation, an acetone bubble formed at the tip of a plastic tube connected to a syringe was applied 5 times (at 5 min intervals) to the tested hind paw at the level of the heel. Rats experiencing allodynia due to evaporation-evoked cooling respond with an abrupt withdrawal of tested paw to avoid pain. The frequency of foot withdrawal was calculated as percent (number of trials accompanied by brisk foot withdrawal) \times 100/ (number of total trials).

2.3.3 Thermal hyperalgesia test

Thermal hyperalgesia test (Paw Withdrawal Test) was assessed as described previously by Hargreaves *et al.*, 1988. Paw withdrawal latency in seconds was measured by exposing the left hind paw to a thermal stimulus. Briefly, rats were placed in Plexiglas cages on top of a glass floor to adapt for a period of 30 min. The radiant thermal stimulus (UGO Basile Plantar Test 37370) was focused under the glass floor to project on the middle plantar surface of each hind paw of the rats. A cut-off time of the radiation beam was set up at 20 s to prevent tissue damage. The value of paw withdrawal was calculated as the average of three tests with the 3-min interval between each measurement.

2.4 Pharmacological treatment

The selective non-peptide B1R antagonist 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] (Gougat, Ferrari et al. 2004) was kindly provided by Sanofi-Aventis R&D (Montpellier, France) and the selective TRPV1 antagonist SB366791 (N-(3-Methoxyphenyl)-4-chlorocinnamide) was purchased from SynInnova Laboratories Inc. (Edmonton, AB, Canada). Both antagonists, being in the form of a powder, were dissolved in dimethyl sulfoxide (DMSO) solution obtained from Millipore Sigma (ON, Canada). Rats subjected to PSNL were divided into 4 groups of 7 rats as follows: SSR240612 (Gr 1), SB366791 (Gr 2) and their vehicles 20% DMSO (Gr 3) and 50% DMSO (Gr 4), respectively. Four groups of 4 non-operated and non-treated rats served as naïve controls for each series of experiments. The pharmacological treatment was initiated 14 days after PSNL. Antagonists of B1R (10mg kg⁻¹) and TRPV1 (1mg kg⁻¹) and their vehicles (20% or 50% DMSO) were given i.p. once a day for one week. These doses of SSR240612 and SB366791 blocked diabetic pain neuropathy (Dias, Talbot et al. 2010, Talbot, Chahmi et al. 2010) and inflammatory heat hyperalgesia in a murine model of bone cancer (Niiyama, Kawamata et al. 2009), respectively. Moreover, dose-response experiments were done in a pilot study, which established the dose of 1mg kg⁻¹ SB366791 as the most effective to block nociceptive behavior. Painful behavior in rats was recorded 3h after treatment with SSR240612 and immediately after treatment with SB366791.

2.5 qRT-PCR

Rats were sacrificed on day 21 after PSNL by decapitation under deep anesthesia with 3% isoflurane. Spinal cords were extracted and L3-L5 portions were harvested. The ipsi- and contralateral DRG of the same levels were excised after spinal laminectomy. Isolated tissues (spinal cord and DRG) were put immediately after sectioning into RNA*later* stabilisation

reagent (QIAGEN, Valencia, CA, USA) and stored at -80°C until processed. Levels of B₁R, TRPV1, TNF- α and IL1- β mRNAs were measured using quantitative real-time PCR according to the method described previously (Ferreira, Beirith et al. 2005, Talbot and Couture 2012, Haddad and Couture 2017). Total RNAs were extracted from isolated tissues according to E.Z.N.A. HP Total RNA Kit Quick Guide instructions (Omega Bio-Tek, Norcross, USA). First-strand cDNA synthesis was carried out from 200 ng total RNA with random hexamer primers and was used as template for each reaction with the All-in-One cDNA Synthesis SuperMix (Cedarlane, Burlington, ON, Canada) (Table 2.1). Then qRT-PCR was performed with 300nM of each primer in the fluorescent double-stranded DNA binding dye SYBR Green Master Mix (Cedarlane, Burlington, ON, Canada). Fluorescent signal and the progress of DNA amplification was detected using the Mx3000p device (Stratagene, La Jolla, CA, USA) as described previously (Aoki, Su et al. 2002). The primer pairs were designed by Vector NTI software (Table 1). For standardisation and quantification, rat 18S was amplified simultaneously. The qRT-PCT was run in triplicates. The relative fold-expression level of the target genes was calculated by the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method (Schmittgen and Livak 2008).

2.6 Immunohistochemical and immunofluorescence procedures

Immunohistochemical and immunofluorescence procedures for protein analysis were processed as described previously (Katikireddy and O'Sullivan 2011). Spinal cord sections and ipsi- and contralateral DRG of L3-L5 levels from naïve and nerve-injured rats were quickly removed from sacrificed rats. Collected tissues were either embedded in paraffin wax or rapidly frozen in cryoembedding compound of isopentane (cooled by liquid nitrogen at -55°C) and stored at -80°C until use. Prior to paraffin embedding, collected tissues were

immediately drop-fixed in ice-cold freshly made 4% paraformaldehyde (PFA) in a buffered solution and kept for 24 h at room temperature (RT). After fixation, tissues were transferred to 70% ethanol and stored at 4°C. For immunofluorescent staining, fresh frozen spinal cords were serially cut into 20-µm thick coronal sections with a cryostat and put onto ice-cooled glass slides. Paraffin embedded cords and DRG were serially cut into 8-µm thick coronal sections with a microtome and mounted onto glass slides. For further antibody staining, paraffin wax removal, rehydration and antigen retrieval from samples were performed. Wax was removed by three changes immersion of slides in fresh xylene solution, 5 min each, followed by three changes treatment with 100% - 95% alcohol and water for rehydration, 5 min each. Deparaffinated and rehydrated slides were then incubated for 40-60 min at 95-100 °C in citrate EDTA buffer (10 mM citric acid, 2 mM EDTA, 0.05% Tween 20, pH 6.2) for antigen retrieval and unmasking epitopes for antibody binding. Fresh frozen samples did not require the above-described procedures. Prior to immunostaining, the samples were dried overnight at RT and post-fixed in pre-cooled (-20 °C) 4%PFA solution for 10 min. To remove the fixative, slides were three times washed in 1mM PBS solution, 5 min each. In order to block non-specific labeling, samples were incubated with 5% serum in PBS-T (10% donkey serum and 0.25% triton X-100) in a humidified chamber at RT for 1 h. Primary antibodies for B1R, TRPV1, IBa1, GFAP, CGRP, IB4+ and IL-1β (diluted 1:200 in PBS with 0.5% donkey serum albumin) were applied to the sections on the slides and incubated in a humidified chamber overnight at 4°C. The primary antibodies used in this study are: polyclonal rabbit antiserum for B1R (Biotechnology Research Institute, Montreal, QC, Canada), mouse monoclonal anti-vanilloid receptor 1 (VR-1, sc-398417, Santa Cruz Biotechnology, Inc, Dallas, USA), chicken polyclonal anti-glia fibrillary acid protein (GFAP, ab4674, Abcam, Toronto,

ON), mouse polyclonal anti-ionized calcium binding adapter molecule (Iba-1, Wako, Richmond, VA, USA), rabbit monoclonal anti-calcitonin gene related peptide IgG (sp-17, Abcam, Toronto, ON), fluorescein labeled GSL I isolectin B4 (FL-1201, Vector laboratories, Burlingame, USA) and polyclonal Goat anti-IL1- β IgG (PA5-46956 Polyclonal Goat IgG, ThermoFisher scientific, Rockford, USA). On the next day, antibody solution was removed and samples were washed three times with wash buffer (1mM PBS) for 5 min each followed by incubation with secondary antibodies (diluted in 1mM PBS solution 1:200) at RT for 1 h. The secondary antibodies used in this study are: Alexa Fluor 488 (Donkey anti-rabbit IgG (A21206, Invitrogen), Alexa Fluor 555 (Donkey anti-mouse IgG (A31570, Invitrogen), Alexa Fluor 633 (Donkey anti-goat IgG (A-21082, Invitrogen) and Alexa Fluor 555 (Goat anti-chicken IgY (A-21437, Invitrogen). Thereafter, the secondary antibody solution was removed; slides were washed three times in wash solution, then dried and mounted using an antifade reagent. Images were obtained with Olympus IX2 inverted microscope (DSU; Olympus, Tokyo, Japan). The examination was limited to the dorsal horn under confocal microscope (Leica Confocal microscope, Richmond Hill, ON, Canada) using the krypton laser (568 nm). For enzymatic detection of antigens, immunohistochemistry HRP staining protocol was used (Winkler and McGeer 2008). Samples were processed as described before except an additional peroxidase-blocking step was added to prevent non-specific background resulting from conjugated HRP use. Thus, slides were preceded as follows: sections were incubated in peroxidase blocking solution (0.3% H₂O₂ in PBS) for 10 min at RT; then, biotin conjugated, goat anti-rabbit secondary antibody was applied to the slides and incubated for 2 hat RT followed by an incubation in Streptavidin-HRP for 1 h (for detection of biotinylated antibodies). For immunohistochemical staining, 3,3'-Diaminobenzidine (DAB) chromogen

was used (for up to 10 min). Rinsing of slides in 1mM PBS wash solution followed each step. Finally, slides were passed through xylene and ethanol 95% and 100% (2 times), and then mounted with DPX medium for further visualization.

2.7 Densitometric analysis

Densitometric analysis of B1R distribution was made in 5 rats arbitrarily selected in each group as described elsewhere (Peretti-Renucci, Feuerstein et al. 1991). Five tissue sections/rat of the lumbar spinal cord (25 sections/group) were analyzed by using computer-based MCID-M1 analysis software, version 4.20 Rev.1.0 (Imaging Research, St. Catherines, ON, Canada). Images of the targeted sections were captured with Dage-MTI CCD72 monochromatic camera (Nikon, Japan) by using 2.5 objective, and were displayed in 8-bit mono format for further analysis. Step-by-step sections were scanned and analyzed on the full-scale image display (256 x 256 pixels). The digitalized signal of the selected regions was analyzed in a range of 0-255 pixels and the optical density (O.D) values were automatically converted by the software and displayed into molar quantities by means in a range of 0.1-1.0.

2.8 Statistical analysis of data

Statistical analysis was carried out in accordance with the recommendations of experimental data analysis in pharmacology (Curtis, Bond et al. 2015) using Prism5.0 GraphPad Software (La Jolla, CA, USA) and Excell 2016 Software (Microsoft). Data were expressed as means \pm S.E.M. obtained from n rats. Statistical significance was determined with Student's t-test for unpaired samples or one-way analysis of variance (ANOVA) followed by the Bonferroni test for multiple comparisons. *P* values of ≤ 0.05 were considered to be statistically significant.

3.0 Results

3.1 Changes of nociceptive behaviour after PSNL

There was no difference in baseline values of paw withdrawal latency (PWL) to noxious (mechanical or thermal) stimulation between the hind paws in any groups of rats. On day 3 after PSNL, a significant decrease (from 14.3 ± 1.4 to 5.1 ± 0.8) in paw withdrawal latency (PWL) to mechanical stimuli was seen on the ipsilateral paw. Although less significant ($p=0.03$), the PWL on the contralateral paw was also reduced (from 14.3 ± 1.4 to 11.4 ± 1.8) (Fig. 2.1A). Paw withdrawal frequency (PWF) to acetone-evoked cold allodynia was significantly increased on the ipsilateral paw (from 0% to $54.3 \pm 11.2\%$) compared to contralateral paw where the PWF change was not significant (from 0% to $2.8 \pm 3.6\%$) (Fig.2.1B). Thermal hyperalgesia did not occur on days 3 and 7 after PSNL, yet on day 14 a significant decrease (from 11.8 ± 0.9 to 8.1 ± 0.5 s) in PWL to heat stimuli (thermal hyperalgesia) was observed on the ipsilateral paw compared to the contralateral paw where the PWL change was not significant (from 12.1 ± 1.1 to 11.1 ± 0.6 s).

3.1.1 Effect of the B1R antagonist on PSNL-induced nociceptive behavior

Daily treatment for 7 days with the B1R antagonist SSR240612 (10 mg kg^{-1} , i.p.) from day 14 did not reverse mechanical hypersensitivity in PSNL rats in both ipsilateral ($3.4 \pm 1.2\text{g}$) and contralateral ($10.71 \pm 1.8\text{g}$) paws on day 7 of treatment when compared to vehicle values (3.42 ± 1.1) g and (10.71 ± 1.4) g, respectively) (Fig. 2.1A). Treatment with SSR240612 failed to affect the time-course of PSNL-induced cold allodynia in both the ipsilateral ($80.0 \pm 12.1\%$) and contralateral (0%) paws on day 7 of treatment when compared to the vehicle (Fig.2.1B).

In contrast, daily administration of the B1R antagonist had an inhibitory effect on thermal hyperalgesia compared to the vehicle. A significant augmentation of PWL on the ipsilateral (from 8.1 ± 0.6 s prior to treatment to 13.4 ± 1.0 s on day 7 of treatment) and contralateral (from 11.1 ± 0.8 s to 14.2 ± 1.0 s.) paws when compared to the vehicle (Fig. 1C).

3.1.2 Effect of the TRPV1 antagonist on PSNL-induced nociceptive behaviour

The TRPV1 antagonist SB366791 (1 mg kg^{-1} , i.p.) inhibited nociceptive behavior manifested by tactile allodynia in PSNL rats in comparison to vehicle-treated group. Thus one-week administration of the antagonist inhibited PWL on both ipsilateral and contralateral paws from 2.6 ± 0.7 g to 14.3 ± 1.4 g and from 9.1 ± 0.8 g to 16.6 ± 3.1 g, respectively (Fig. 2.2A). We noticed that TRPV1 antagonist reversed and blocked mechanical hypersensitivity for up to 10 min with maximum effect at 1 min post-drug administration (16.4 ± 0.6 g and 17.9 ± 0.6 g on ipsi- and contralateral paws, respectively) exceeding the cut-off value of PWL estimated at 15g. This inhibitory and analgesic effect returned gradually to baseline values within 30-40 min after SB366791 administration (Fig. 2.2B).

Cold allodynia occurred only on the ipsilateral paw after PSNL. Daily treatment with SB366791 abolished PWF from $83.6 \pm 12.7\%$ to 0% on the ipsilateral paw. The antagonist had no significant effect on the contralateral paw (Fig.2.2C). The inhibitory effect of SB366791 on cold allodynia lasted about 40 min and returned gradually to around 60% of PWF during the next 2 h to reach baseline values on the next day after treatment (Fig 2.2D).

SB399791 reversed thermal hyperalgesia in the ipsilateral (from 7.6 ± 0.7 s to 10.4 ± 1.6 s) and contralateral (from 8.2 ± 1.3 s to 11.6 ± 1.8 s) paws from day 1 to day 7 of treatment (Fig. 2E).

Time-course inhibition was not shown herein because thermal hyperalgesia remained inhibited from 10 min to 24 h post-SB399791 at the time of the next day treatment.

3.1.3 Effect of B1R and TRPV1 antagonists on spinal mRNA levels

B1R and TRPV1 mRNA levels were measured in the lumbar spinal cord (SC) 21 days post-PSNL, 3h after the last drug administration. B1R mRNA but not TRPV1 mRNA was significantly increased in the contralateral SC compared with control. However, both B1R and TRPV1 mRNA levels were significantly increased on the ipsilateral SC when compared to the contralateral SC or control rats. One-week treatment with SSR240612 reversed completely the enhanced expression of B1R and TRPV1 on the ipsilateral and that of B1R on the contralateral SC compared to vehicle (Fig.2.3A). In contrast, SB366791 enhanced by 12-fold B1R mRNA level in both sides of the SC in PSNL rats when compared to vehicle. SB366791 treatment had no significant effect on TRPV1 mRNA level on both sides of the SC in comparison to vehicle (Fig. 2.3B).

PSNL increased significantly TNF- α and IL-1 β mRNA levels with respect to control, on both contralateral and ipsilateral SC (Table2.2). These changes were not significantly different between the contralateral and ipsilateral SC. SSR240612 enhanced significantly IL-1 β but not TNF- α gene expression on both sides of the SC with respect to vehicle. Conversely, the TRPV1 antagonist failed to affect TNF α mRNA levels on both sides but enhanced significantly IL-1 β on both sides of the SC compared to vehicle (Table2.2).

3.1.4 Effect of B1R and TRPV1 antagonists on mRNA levels in DRG

No significant change of B1R mRNA expression level was detected in the contralateral and ipsilateral DRG of PSNL rats in comparison to control. One-week treatment with SSR240612 failed to affect B1R mRNA levels in both DRG sides in comparison to vehicle (Fig.2.3C). Whereas TRPV1 mRNA level was not affected in contralateral DRG of PSNL rats, it was increased on the ipsilateral DRG in comparison to control; treatment with SSR240612 had a small but significant inhibitory effect on TRPV1 expression on the ipsilateral DRG (Fig.2.3C). The enhanced TRPV1 mRNA expression on the ipsilateral DRG was no longer significant in PSNL rats treated with SB366791 (Fig.2.3D).

PSNL enhanced by 3.9-fold the expression of TNF- α on the ipsilateral DRG while it was not significantly reduced on the contralateral DRG. One-week treatment with SSR240612 did not affect the expression of TNF- α compared with vehicle (Table 2.3). Conversely, the one-week treatment with the TRPV1 antagonist diminished significantly the TNF- α gene expression compared to vehicle on the ipsilateral DRG. The expression of IL-1 β was not significantly affected by PSNL or by both antagonists on the contralateral and ipsilateral DRG (Table 2.3).

3.4 B1R protein expression in the ipsilateral dorsal horn

PSNL caused widespread distribution of B1R immunostaining in the ipsilateral dorsal horn of the lumbar spinal cord. PSNL increased by two-fold B1R protein expression compared to control, which was inhibited by SSR240612 treatment compared to vehicle-treated group. In contrast, treatment with the TRPV1 antagonist, SB366791, enhanced by close to 6-fold B1R immunostaining in the ipsilateral dorsal horn compared to vehicle-treated group (Fig. 2.4). It is worth noting that the morphology of astrocytes was changed after PSNL and followed the

pattern of B1R expression and distribution. Indeed, astrocytes had larger and more ramified processes in PSNL spinal cord and this astroglyosis was absent after treatment with SSR240612 and further increased with SB366791 (Fig. 2.4).

3.5 Localization of B1R in the ipsilateral Dorsal Horn (iDH) and DRG (iDRG)

To further demonstrate the link between B1R and astrocytes, their possible co-expression with astrocytes was studied by immunofluorescence. As shown in Fig. 2.5 (a) and (c), B1R and astrocytes (identified with GFAP) were weakly expressed in control iDH. However, in the iDH of PSNL, B1R (Fig. 2.5 B) and astrocytes (Fig. 2.5 B') immunostaining was more striking and both markers merged highlighting their colocalization (Fig. 2.5 B''). A triple immunostaining has also detected a colocalization between IL-1 β , GFAP and B1R in iDH (Fig. 2.7 A, A', A''). Interestingly, IL-1 β was colocalized partially with B1R and more extensively with GFAP, being consistent with the idea that astrocytic IL-1 β might contribute to B1R expression in spinal dorsal horn astrocytes after peripheral nerve injury. The distribution of B1R on other spinal cord cell types was performed by immunostaining using Iba-1 (marker of microglia), CGRP (marker of peptide sensory fibres) and IB4+ (marker of non-peptide sensory fibres). Data showed enhanced immunostaining of those markers in iDH of PSNL rats in comparison to control iDH. Importantly no evidence of colocalization was found for B1R on microglia (Fig. 2.5 C'') and primary sensory fibres (Fig. 2.5 D'', E''). The absence of B1R on peptidergic (CGRP) and non peptidergic (IB4+) A δ and C fibres was further confirmed by the lack of co-expression of B1R and TRPV1 in iDH after PSNL (Fig. 2.5 A'') and by the absence of B1R in the DRG after PSNL although the high expression of TRPV1 (Fig. 2.6 A'', B'').

4.0 Discussion

Our study suggests an indirect regulatory interaction between B1R and TRPV1, which is likely mediated by the pro-inflammatory cytokine IL-1 β . After PSNL, we found that: 1) B1R was involved in thermal hyperalgesia, but not in mechanical and cold allodynia; 2) TRPV1 was involved in thermal and mechanical hypersensitivity; 3) B1R and TRPV1 expression (mRNA and protein) was enhanced in the SC; 4) B1R gene expression was further increased under TRPV1 antagonism; 5) B1R antagonist reversed the enhanced B1R and TRPV1 mRNA levels; 6) B1R was immunolocalised on astrocytes but not on primary sensory fibres or microglia; 7) TRPV1 was not coexpressed with B1R and was found only on sensory fibers; 8) enhanced B1R expression in astrocytes followed the pattern of IL-1 β mRNA, suggesting a role for this cytokine in the induction of B1R on astrocytes; 9) enhanced gene expression of IL-1 β (but not of TNF α) was further increased under B1R or TRPV1 antagonism, suggesting that IL-1 β is located upstream to B1R and TRPV1.

4.0.1 B1R in neuropathic pain

B1R antagonist inhibited heat hyperalgesia for up to 24 h, however it did not alter the mechanical and cold allodynia. This finding supports previous data showing that B1R^{-/-} mice (Calixto, Medeiros et al. 2004, Ferreira, Beirith et al. 2005) or pharmacological B1R blockade (Levy and Zochodne 2000, Yamaguchi-Sase, Hayashi et al. 2003, Petcu, Dias et al. 2008) reduced thermal hyperalgesia in NP models. Likewise B1R^{-/-} mice (Gabra, Couture et al. 2003) and B1R antagonism (Gabra, Merino et al. 2005, Talbot, Chahmi et al. 2010) alleviated heat hyperalgesia in streptozotocin-diabetic rodents. We found no correlation between the degree of B1R gene expression in PSNL rats and nociceptive behaviour elicited by mechanical or

cold stimuli. Indeed, in the absence of B1R (under B1R antagonism), allodynia remained untouched. The absence of B1R involvement in allodynia is consistent with our previous study using the same model of neuropathic pain (Petcu, Dias et al. 2008). Nonetheless, other studies showed the ability of B1R antagonism to abolish mechanical and cold hypersensitivity (Levy and Zochodne 2000, Yamaguchi-Sase, Hayashi et al. 2003, Ferreira, Beirith et al. 2005). The reason for this discrepancy is unknown and might be related to differences in NP models. The type of antagonist might not be so critical as a similar dose and regimen of SSR240612 inhibited allodynia in STZ-diabetic rats (Dias, Talbot et al. 2010, Talbot, Chahmi et al. 2010). Interestingly, SSR240612 also reversed PSNL-induced overexpression of B1R and TRPV1 mRNAs in the SC. These results confirmed our previous studies showing that PSNL upregulated B1R binding sites in the ipsilateral and contralateral SC at 2 and 14 days (Petcu, Dias et al. 2008). However, we did not find any expression of B1R in lumbar DRG, contrary to other studies showing an increased level of B1R mRNA within the lumbar DRG (Levy and Zochodne 2000) and in naïve DRG (Levy and Zochodne 2000, Ma 2001). One study also reported B1R expression in large diameter myelinated DRG neurons in PSNL mice. The authors argued that B1R expression is mediated by the phosphorylation of ERK, suggesting that BK-mediated expression of B1R occurs solely in nerve-injured mice.

In our study, B1R and IL-1 β followed the same pattern of expression in the SC. This is keeping with the role of IL-1 β in the induction of B1R through the NF- κ B pathway (Passos, Fernandes et al. 2004). IL-1 β is known to be responsible for thermal and mechanical hypersensitivity (Cunha, Cunha et al. 2000, Kim, Chu et al. 2014) and may account for allodynia under B1R blockade. Importantly, B1R and IL-1 β are highly co-expressed on astrocytes, which is congruent with the production of IL-1 β by astrocytes (Basu, Krady et al.

2004) and the presence of IL-1 β binding sites on activated astrocytes (Liberto, Albrecht et al. 2004). Therefore, one can suggest that B1R upregulation after PSNL is mediated by astrocyte-derived IL-1 β . Such interaction could explain the upregulation of B1R under TRPV1 antagonism and highlights a regulatory function for TRPV1 in B1R expression.

As B1R and TRPV1 do not co-express in the SC and DRG, their regulation might be indirectly mediated by the release of IL-1 β from astrocytes, which is consistent with the enhanced astrogliosis induced by TRPV1 blockade. Importantly, we did not detect B1R protein expression in microglia (Iba-1) or in peptidergic (CGRP) and non-peptidergic (IB4+) sensory fibres. This is congruent with the absence of B1R mRNA in the DRG, and does not support the presence of B1R in primary sensory fibres. Previous reports have shown immunolabelled B1R on sensory fibres in naïve animals (Wotherspoon and Winter 2000), in sectioned rat sciatic-nerve (Ma 2001) and in CFA treated rats (Fox, Wotherspoon et al. 2003). Data based on immunohistochemistry can lead to discrepancies if antibodies are not proven to be highly specific. Our results were obtained with B1R antibodies fully characterized in knockout mice and with siRNA strategy (Pouliot, Héту et al. 2011, Lacoste, Tong et al. 2013, Hachana, Bhat et al. 2018) and are further supported at mRNA levels. Because allodynia is believed to be mediated by A β fibres (Urano, Ara et al. 2012), the pattern of B1R expression on A β fibres in PSNL-induced neuropathy remains to be addressed.

Although we failed to detect B1R on microglia after PSNL, other experimental paradigms support its expression on microglia, notably in STZ-induced diabetic neuropathy (Talbot and Couture 2012), under systemic inflammation (e.g. induced by LPS, cytokines) (Passos, Fernandes et al. 2004) and in microglia cells cultures (Ifuku, Farber et al. 2007). The absence

of B1R on microglia after 3 weeks of PSNL could reflect the early phase of NP and its occurrence in a later phase cannot be excluded.

4.0.2 TRPV1 in neuropathic pain

Although several studies have proven that TRPV1 activation is associated to mechanical allodynia (Baron 2006, Lappin, Randal et al. 2006, Voisin 2010), other studies failed to demonstrate a role for TRPV1 in allodynia (Suter, Berta et al. 2009). However, we found that the TRPV1 antagonist blocked transiently both tactile and cold allodynia for the first 10 min after drug administration; allodynia returning gradually to pretreatment values during the next 30-40 min. Although TRPV1 is commonly recognized as a main noxious heat sensor, being involved in thermal hyperalgesia (Urano, Ara et al. 2012, Liu, Du et al. 2015) and in inflammatory pain (Zhang, Huang et al. 2005), we suggest that it could also be involved in mechanical and cold hypersensitivity during NP. TRPV1 is normally expressed on subsets of C- and A δ -fibres (Caterina 2007), being subjected to a downregulation in injured C-afferents and to an upregulation in uninjured A δ fibres (Urano, Ara et al. 2012). TRPV1-containing A δ -fibres sprout into the dorsal lamina II, leading to development of mechanical and cold allodynia; similar to human causalgia after peripheral nerve injury (Meyerson, Ren et al. 1995). Our study confirmed earlier reports on TRPV1 and CGRP co-expression on sensory fibres (Meng, Ovsepian et al. 2009), and did not confirm the presence of TRPV1 on microglia or astrocytes as it was shown in naïve rats (Doly, Fischer et al. 2004) or in TRPV1^{-/-} mice (Mannari, Morita et al. 2013).

We found an overexpression of B1R mRNA elicited by the TRPV1 antagonist. This finding was unexpected, as in a previous study we found that TRPV1 stimulation with systemic

capsaicin resulted in B1R upregulation in the SC and DRG (Talbot, Chahmi et al. 2010). We further investigated the relationship between B1R and TRPV1 by immunofluorescence. As B1R and TRPV1 were not colocalised on astrocytes, microglia and sensory fibres, a direct physical interaction between them is unlikely, and excludes an activation of TRPV1 by B1R as does B2R through PLC-PKC ϵ -dependent phosphorylation (Numazaki, Tominaga et al. 2002).

We observed a similar pattern of TRPV1 and TNF α mRNAs upregulation in lumbar SC and DRG. The SB366791, but not B1R antagonist, curtailed TNF α expression in both ipsilateral and contralateral DRG, indirectly confirming the mutual relationship between TRPV1 and TNF α on sensory neurons (Khan, Diogenes et al. 2008). These findings support a role for TNF α in the trafficking of TRPV1 to the nociceptor membrane (Meng, Wang et al. 2016) that can explain mechanical and cold hypersensitivity mediated by TRPV1. Because the B1R antagonist suppressed the enhanced expression of TRPV1 (but not TNF α) and increased the expression of IL-1 β , it is suggested that B1R upregulates TRPV1 by a mechanism independent on cytokines (IL-1 β and TNF α). Again this suggests a reciprocal regulatory control between B1R and TRPV1.

4.2 Conclusion

While B1R and TRPV1 contributed to thermal hyperalgesia, they play a distinctive role in allodynia associated with NP. A direct interaction between B1R and TRPV1 is not supported in this model of NP. However, the pharmacological approach using B1R and TRPV1 antagonists, suggests a reciprocal regulatory mechanism between B1R and TRPV1 expression as B1R antagonism suppressed TRPV1 overexpression and TRPV1 blockade caused

astrogliosis responsible for the overexpression of IL-1 β and B1R expression in astrocytes. Thus, IL-1 β acts as an astrocyte messenger, which activates TRPV1-containing sensory fibres and enhances astrocyte B1R expression. This study highlights the possibility that TRPV1 antagonism may exert a counter-productive effect in the treatment of NP by enhancing simultaneously the expression and function of IL-1 β and B1R. This opens the possibility that a combined treatment with B1R and TRPV1 antagonists can offer a better therapeutic strategy in NP.

Author contributions

V.C. and R.C. conceived and designed the experiments. V.C. performed the experiments, analysed the data and drafted the paper. R.C. supervised the study, edited and wrote the final version of the manuscript. All authors approved the final manuscript.

Conflict of Interest

The authors declare no conflicts of interest.

Declaration of transparency and scientific rigour

This **Declaration** acknowledges that this paper adheres to the principles for transparent reporting and scientific rigour of preclinical research recommended by funding agencies, publishers and other organizations engaged with supporting research.

Acknowledgements

This work was supported by a Grant-in-Aid from the Canadian Institutes of Health Research (MOP-119329) to R.C. Authors are most grateful to Jacques Sénécal for his expert technical assistance and Youssef Haddad for his help in the setup of experimental procedures. V.C. received Studentship awards during the course of her M.Sc. from the Graduate Program in Physiology and the Faculty of Medicine, Université de Montréal.

References

- Aoki, Shunsuke, Qingning Su, Hang Li, Kaori Nishikawa, Kohichi Ayukawa, Yoko Hara, Kazuhiko Namikawa, Sumiko Kiryu-Seo, Hiroshi Kiyama, and Keiji Wada. 2002. 'Identification of an Axotomy-Induced Glycosylated Protein, AIGP1, Possibly Involved in Cell Death Triggered by Endoplasmic Reticulum–Golgi Stress', *The Journal of Neuroscience*, 22: 10751.
- Basu, A., J. K. Krady, and S. W. Levison. 2004. 'Interleukin-1: a master regulator of neuroinflammation', *J Neurosci Res*, 78: 151-6.
- Calixto, J. B., R. Medeiros, E. S. Fernandes, J. Ferreira, D. A. Cabrini, and M. M. Campos. 2004. 'Kinin B1 receptors: key G-protein-coupled receptors and their role in inflammatory and painful processes', *Br J Pharmacol*, 143: 803-18.
- Caterina, M. J. 2007. 'Transient receptor potential ion channels as participants in thermosensation and thermoregulation', *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 292: R64-76.
- Caterina, M. J., A. Leffler, A. B. Malmberg, W. J. Martin, J. Trafton, K. R. Petersen-Zeitz, M. Koltzenburg, A. I. Basbaum, and D. Julius. 2000. 'Impaired nociception and pain sensation in mice lacking the capsaicin receptor', *Science*, 288: 306-13.
- Chuang, H. H., E. D. Prescott, H. Kong, S. Shields, S. E. Jordt, A. I. Basbaum, M. V. Chao, and D. Julius. 2001. 'Bradykinin and nerve growth factor release the capsaicin receptor from PtdIns(4,5)P2-mediated inhibition', *Nature*, 411: 957-62.

- Couture, R., M. Harrisson, R. M. Vianna, and F. Cloutier. 2001. 'Kinin receptors in pain and inflammation', *Eur J Pharmacol*, 429: 161-76.
- Couture, R., and C. J. Lindsey. 2000. 'Chapter VII Brain kallikrein–kinin system: from receptors to neuronal pathways and physiological functions.' in R. Quirion, A. Björklund and T. Hökfelt (eds.), *Handbook of Chemical Neuroanatomy* (Elsevier).
- Cunha, J. M., F. Q. Cunha, S. Poole, and S. H. Ferreira. 2000. 'Cytokine-mediated inflammatory hyperalgesia limited by interleukin-1 receptor antagonist', *Br J Pharmacol*, 130: 1418-24.
- Curtis, M. J., R. A. Bond, D. Spina, A. Ahluwalia, S. P. Alexander, M. A. Giembycz, A. Gilchrist, D. Hoyer, P. A. Insel, A. A. Izzo, A. J. Lawrence, D. J. MacEwan, L. D. Moon, S. Wonnacott, A. H. Weston, and J. C. McGrath. 2015. 'Experimental design and analysis and their reporting: new guidance for publication in BJP', *Br J Pharmacol*, 172: 3461-71.
- De Brito Garipey, H., S. Talbot, J. Senecal, and R. Couture. 2013. 'Brain kinin B(1) receptor contributes to the onset of stereotypic nocifensive behavior in rat', *Behav Brain Res*, 241: 17-26.
- Dias, J. P., S. Talbot, J. Senecal, P. Carayon, and R. Couture. 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.
- Doly, Stéphane, Jacqueline Fischer, Chiara Salio, and Marie Conrath. 2004. 'The vanilloid receptor-1 is expressed in rat spinal dorsal horn astrocytes', *Neuroscience Letters*, 357: 123-26.
- DomBourian, M. G., N. A. Turner, T. A. Gerovac, R. Vemuganti, G. S. Miranpuri, K. Tureyen, I. Satriotomo, V. Miletic, and D. K. Resnick. 2006. 'B1 and TRPV-1 receptor genes and their relationship to hyperalgesia following spinal cord injury', *Spine (Phila Pa 1976)*, 31: 2778-82.
- Dutra, R. C., A. F. Bento, D. F. Leite, M. N. Manjavachi, R. Marcon, M. A. Bicca, J. B. Pesquero, and J. B. Calixto. 2013. 'The role of kinin B1 and B2 receptors in the persistent pain induced by experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) in mice: evidence for the involvement of astrocytes', *Neurobiol Dis*, 54: 82-93.

- Ferreira, J., A. Beirith, M. A. Mori, R. C. Araujo, M. Bader, J. B. Pesquero, and J. B. Calixto. 2005. 'Reduced nerve injury-induced neuropathic pain in kinin B1 receptor knock-out mice', *J Neurosci*, 25: 2405-12.
- Ferreira, S. H., B. B. Lorenzetti, and S. Poole. 1993. 'Bradykinin initiates cytokine-mediated inflammatory hyperalgesia', *British Journal of Pharmacology*, 110: 1227-31.
- Fox, A., G. Wotherspoon, K. McNair, L. Hudson, S. Patel, C. Gentry, and J. Winter. 2003. 'Regulation and function of spinal and peripheral neuronal B1 bradykinin receptors in inflammatory mechanical hyperalgesia', *Pain*, 104: 683-91.
- Gabra, B. H., R. Couture, and P. Sirois. 2003. '[Functional duality of kinin receptors in pathophysiology]', *Med Sci (Paris)*, 19: 1101-10.
- Gabra, B. H., V. F. Merino, M. Bader, J. B. Pesquero, and P. Sirois. 2005. 'Absence of diabetic hyperalgesia in bradykinin B1 receptor-knockout mice', *Regul Pept*, 127: 245-8.
- Gougat, J., B. Ferrari, L. Sarran, C. Planchenault, M. Poncelet, J. Maruani, R. Alonso, A. Cudennec, T. Croci, F. Guagnini, K. Urban-Szabo, J. P. Martinolle, P. Soubrie, O. Finance, and G. Le Fur. 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: 661-9.
- Guo, Wei, Hu Wang, Mineo Watanabe, Kohei Shimizu, Shiping Zou, Stacey C. LaGraize, Feng Wei, Ronald Dubner, and Ke Ren. 2007. 'Glial—Cytokine—Neuronal Interactions Underlying the Mechanisms of Persistent Pain', *J Neurosci*, 27: 6006-18.
- Hachana, Soumaya, Menakshi Bhat, Jacques Sénécal, Frédéric Huppé-Gourgues, Réjean Couture, and Elvire Vaucher. 2018. 'Expression, distribution and function of kinin B1 receptor in the rat diabetic retina', *British Journal of Pharmacology*, 175: 968-83.
- Haddad, Y., and R. Couture. 2017. 'Kininase 1 As a Preclinical Therapeutic Target for Kinin B1 Receptor in Insulin Resistance', *Front Pharmacol*, 8: 509.
- Huang, W. X., F. Yu, R. M. Sanchez, Y. Q. Liu, J. W. Min, J. J. Hu, N. B. Bsoul, S. Han, J. Yin, W. H. Liu, X. H. He, and B. W. Peng. 2015. 'TRPV1 promotes repetitive febrile

- seizures by pro-inflammatory cytokines in immature brain', *Brain Behav Immun*, 48: 68-77.
- Ifuku, M., K. Farber, Y. Okuno, Y. Yamakawa, T. Miyamoto, C. Nolte, V. F. Merrino, S. Kita, T. Iwamoto, I. Komuro, B. Wang, G. Cheung, E. Ishikawa, H. Ooboshi, M. Bader, K. Wada, H. Kettenmann, and M. Noda. 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: 13065-73.
- Katikireddy, Kishore Reddy, and Finbarr O'Sullivan. 2011. 'Immunohistochemical and Immunofluorescence Procedures for Protein Analysis.' in Lorraine O'Driscoll (ed.), *Gene Expression Profiling: Methods and Protocols* (Humana Press: Totowa, NJ).
- Khan, A. A., A. Diogenes, N. A. Jeske, M. A. Henry, A. Akopian, and K. M. Hargreaves. 2008. 'Tumor necrosis factor α enhances the sensitivity of rat trigeminal neurons to capsaicin', *Neuroscience*, 155: 503-09.
- Kim, Y. S., Y. Chu, L. Han, M. Li, Z. Li, P. C. LaVinka, S. Sun, Z. Tang, K. Park, M. J. Caterina, K. Ren, R. Dubner, F. Wei, and X. Dong. 2014. 'Central terminal sensitization of TRPV1 by descending serotonergic facilitation modulates chronic pain', *Neuron*, 81: 873-87.
- Lacoste, B., X. K. Tong, K. Lahjouji, R. Couture, and E. Hamel. 2013. 'Cognitive and cerebrovascular improvements following kinin B1 receptor blockade in Alzheimer's disease mice', *J Neuroinflammation*, 10: 57.
- Leeb-Lundberg, L. M., F. Marceau, W. Muller-Esterl, D. J. Pettibone, and B. L. Zuraw. 2005. 'International union of pharmacology. XLV. Classification of the kinin receptor family: from molecular mechanisms to pathophysiological consequences', *Pharmacol Rev*, 57: 27-77.
- Levy, Dan, and Douglas W. Zochodne. 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: 265-71.
- Liberto, C. M., P. J. Albrecht, L. M. Herx, V. W. Yong, and S. W. Levison. 2004. 'Pro-regenerative properties of cytokine-activated astrocytes', *J Neurochem*, 89: 1092-100.
- Liu, F., and H. Yuan. 2014. 'Role of glia in neuropathic pain', *Front Biosci (Landmark Ed)*, 19: 798-807.

- Liu, J., J. Du, Y. Yang, and Y. Wang. 2015. 'Phosphorylation of TRPV1 by cyclin-dependent kinase 5 promotes TRPV1 surface localization, leading to inflammatory thermal hyperalgesia', *Exp Neurol*, 273: 253-62.
- Ma, Q. P. 2001. 'The expression of bradykinin B(1) receptors on primary sensory neurones that give rise to small caliber sciatic nerve fibres in rats', *Neuroscience*, 107: 665-73.
- Ma, W., and R. Quirion. 2007. 'Inflammatory mediators modulating the transient receptor potential vanilloid 1 receptor: therapeutic targets to treat inflammatory and neuropathic pain', *Expert Opin Ther Targets*, 11: 307-20.
- Mannari, Tetsuya, Shoko Morita, Eriko Furube, Makoto Tominaga, and Seiji Miyata. 2013. 'Astrocytic TRPV1 ion channels detect blood-borne signals in the sensory circumventricular organs of adult mouse brains', *Glia*, 61: 957-71.
- Meng, J., S. V. Ovsepiyan, J. Wang, M. Pickering, A. Sasse, K. R. Aoki, G. W. Lawrence, and J. O. Dolly. 2009. 'Activation of TRPV1 mediates calcitonin gene-related peptide release, which excites trigeminal sensory neurons and is attenuated by a retargeted botulinum toxin with anti-nociceptive potential', *J Neurosci*, 29: 4981-92.
- Meng, Jianghui, Jiafu Wang, Martin Steinhoff, and James Oliver Dolly. 2016. 'TNF α induces co-trafficking of TRPV1/TRPA1 in VAMP1-containing vesicles to the plasmalemma via Munc18-1/syntaxin1/SNAP-25 mediated fusion', *Scientific Reports*, 6: 21226.
- Meyerson, B. A., B. Ren, P. Herregodts, and B. Linderoth. 1995. 'Spinal cord stimulation in animal models of mononeuropathy: effects on the withdrawal response and the flexor reflex', *Pain*, 61: 229-43.
- Niiyama, Y., T. Kawamata, J. Yamamoto, S. Furuse, and A. Namiki. 2009. 'SB366791, a TRPV1 antagonist, potentiates analgesic effects of systemic morphine in a murine model of bone cancer pain†', *BJA: British Journal of Anaesthesia*, 102: 251-58.
- Numazaki, M., T. Tominaga, H. Toyooka, and M. Tominaga. 2002. 'Direct phosphorylation of capsaicin receptor VR1 by protein kinase C ϵ and identification of two target serine residues', *J Biol Chem*, 277: 13375-8.
- Passos, G. F., E. S. Fernandes, M. M. Campos, J. G. Araujo, J. L. Pesquero, G. E. Souza, M. C. Avellar, M. M. Teixeira, and J. B. Calixto. 2004. 'Kinin B1 receptor up-regulation after lipopolysaccharide administration: role of proinflammatory cytokines and neutrophil influx', *J Immunol*, 172: 1839-47.

- Peretti-Renucci, R., C. Feuerstein, M. Manier, P. Lorimier, M. Savasta, J. Thibault, N. Mons, and M. Geffard. 1991. 'Quantitative image analysis with densitometry for immunohistochemistry and autoradiography of receptor binding sites--methodological considerations', *J Neurosci Res*, 28: 583-600.
- Pesquero, J. B., R. C. Araujo, P. A. Heppenstall, C. L. Stucky, J. A. Silva, Jr., T. Walther, S. M. Oliveira, J. L. Pesquero, A. C. Paiva, J. B. Calixto, G. R. Lewin, and M. Bader. 2000. 'Hypoalgesia and altered inflammatory responses in mice lacking kinin B1 receptors', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 97: 8140-5.
- Petcu, M., J. P. Dias, B. Ongali, G. Thibault, W. Neugebauer, and R. Couture. 2008. 'Role of kinin B1 and B2 receptors in a rat model of neuropathic pain', *Int Immunopharmacol*, 8: 188-96.
- Phagoo, Stephen B., Krisanavane Reddi, Kathryn D. Anderson, L. M. Fredrik Leeb-Lundberg, and David Warburton. 2001. 'Bradykinin B1 Receptor Up-Regulation by Interleukin-1 β and B1 Agonist Occurs through Independent and Synergistic Intracellular Signaling Mechanisms in Human Lung Fibroblasts', *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 298: 77.
- Pouliot, Mylène, Simon Héту, Karim Lahjouji, Réjean Couture, and Elvire Vaucher. 2011. 'Modulation of retinal blood flow by kinin B1 receptor in Streptozotocin-diabetic rats', *Experimental Eye Research*, 92: 482-89.
- Quintao, N. L., G. F. Passos, R. Medeiros, A. F. Paszcuk, F. L. Motta, J. B. Pesquero, M. M. Campos, and J. B. Calixto. 2008. 'Neuropathic pain-like behavior after brachial plexus avulsion in mice: the relevance of kinin B1 and B2 receptors', *J Neurosci*, 28: 2856-63.
- Schmittgen, T. D., and K. J. Livak. 2008. 'Analyzing real-time PCR data by the comparative C(T) method', *Nat Protoc*, 3: 1101-8.
- Suter, M. R., T. Berta, Y. J. Gao, I. Decosterd, and R. R. Ji. 2009. 'Large A-fiber activity is required for microglial proliferation and p38 MAPK activation in the spinal cord: different effects of resiniferatoxin and bupivacaine on spinal microglial changes after spared nerve injury', *Mol Pain*, 5: 53.
- Talbot, S., E. Chahmi, J. P. Dias, and R. Couture. 2010. 'Key role for spinal dorsal horn microglial kinin B1 receptor in early diabetic pain neuropathy', *J Neuroinflammation*, 7: 36.

- Talbot, S., and R. Couture. 2012. 'Emerging role of microglial kinin B1 receptor in diabetic pain neuropathy', *Exp Neurol*, 234: 373-81.
- Urano, H., T. Ara, Y. Fujinami, and B. Y. Hiraoka. 2012. 'Aberrant TRPV1 expression in heat hyperalgesia associated with trigeminal neuropathic pain', *Int J Med Sci*, 9: 690-7.
- Winkler, D. F., and P. L. McGeer. 2008. 'Protein labeling and biotinylation of peptides during spot synthesis using biotin p-nitrophenyl ester (biotin-ONp)', *Proteomics*, 8: 961-7.
- Woolf, C. J. 2004. 'Dissecting out mechanisms responsible for peripheral neuropathic pain: implications for diagnosis and therapy', *Life Sci*, 74: 2605-10.
- Wotherspoon, G., and J. Winter. 2000. 'Bradykinin B1 receptor is constitutively expressed in the rat sensory nervous system', *Neurosci Lett*, 294: 175-8.
- Yamaguchi-Sase, S., I. Hayashi, H. Okamoto, Y. Nara, S. Matsuzaki, S. Hoka, and M. Majima. 2003. 'Amelioration of hyperalgesia by kinin receptor antagonists or kininogen deficiency in chronic constriction nerve injury in rats', *Inflamm Res*, 52: 164-9.
- Zhang, Xuming, Jiehong Huang, and Peter A. McNaughton. 2005. 'NGF rapidly increases membrane expression of TRPV1 heat-gated ion channels', *The EMBO Journal*, 24: 4211-23.

List of tables

Table 2.1. List of primer pairs used in qRT-PCR analysis

	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	
B1R Forward	5' GCA GCG CTT AAC CAT AGC GGA AAT 3'	367 – 391	NM_030851
B1R Reverse	5' CCA GTT GAA ACG GTT CCC GAT GTT 3'	478 - 454	
IL-1 β Forward	5' TGT CAC TCA TTG TGG CTG TGG AGA 3'	247–270	NM_031512
IL-1 β Reverse	5' TGG GAA CAT CAC ACA CTA GCA GGT 3'	411–388	
TRPV1 Forward	5' GCA CAA TGG GCA GAA TGA CAC CAT 3'	575 - 598	NM_031982
TRPV1 Reverse	5' GGC ATT GAC AAA CTG CTT CAG GCT 3'	656 - 633	
TNF- α Forward	5' ATG ATC CGA GAT GTG GAA CTG GCA 3'	160 - 183	NM_012675
TNF- α Reverse	5'AAT GAG AAG AGG CTG AGG CAC AGA 3'	257 - 234	

Table 2.2. Expression of TNF α and IL-1 β genes in the Spinal Cord after treatment with B1R antagonist (SSR240612) and TRPV1 antagonist (SB366791)

Dorsal horn (side)	Group of treatment	TNFα (fold expression)	IL-1β (fold expression)
SSR240612			
<i>Contralateral</i>	Control	1	1
	Vehicle	3.16	2.5
	SSR240612	5.5	4.7*
<i>Ipsilateral</i>	Vehicle	3.83	2.25
	SSR240612	5.06	5*
SB366791			
<i>Contralateral</i>	Control	1	1
	Vehicle	3.07	1.98
	SB366791	3.34	4.96*
<i>Ipsilateral</i>	Vehicle	3.95	1.81
	SB366791	4.4	3.95*

Values are mean \pm SEM of seven rats per group. * $p < 0.01$ vs. *vehicle* was calculated with one-way ANOVA test and rectified by using the Bonferroni correction.

Table 2.3. Expression of TNF α and IL-1 β genes in the DRG after treatment with B1R antagonist (SSR240612) and TRPV1 antagonist (SB366791)

DRG (side)	Group of treatment	TNFα (fold expression)	IL-1β (fold expression)
SSR240612			
<i>Contralateral</i>	Control	1	1
	Vehicle	0.56	0.46
	SSR240612	0.88	0.93
<i>Ipsilateral</i>	Vehicle	3.87*	0.17
	SSR240612	3.6*	0.36
SB366791			
<i>Contralateral</i>	Control	1	1
	Vehicle	0.37	0.2
	SB366791	0.03	0.4
<i>Ipsilateral</i>	Vehicle	3.26*	0.34
	SB366791	2.21*	0.28

Values are mean \pm SEM of seven rats per group. * $p < 0.01$ vs. control was calculated with one-way ANOVA test and rectified by using the Bonferroni correction.

Figures legend

Figure 2.1. Nociceptive behaviour after treatment with B1R antagonist

Effect of one-week daily administration of SSR240612 (10mg kg⁻¹ i.p.) and vehicle on mechanical allodynia (A), cold allodynia (B) and heat-hyperalgesia (C) Data represents the mean ± SEM of seven rats. Comparison to control (**p*<0.05) and to vehicle treated group ([#]*p*<0.05). At some points, standard deviations are not seen because they overlap with the points.

Figure 2.2. Nociceptive behaviour after treatment with TRPV1 antagonist

SB366791 given daily in a dose of 1mg kg⁻¹ has significantly, though transiently, reversed mechanical- (A), cold- (C) and heat- (E) evoked hypersensitivity in the ipsilateral paw. The time-course representations of tactile (B) and cold (D) allodynia denote the blockage of pain sensation for the first 10 min after drug administration with gradual return of the sensitiveness to baseline values the next 20 min. The antagonist produced a long-lasting inhibition (up to 24 hours post-injection) of the heat-evoked hypersensitivity (time-course representation is not shown). No differences in paw-withdrawal frequencies were attested in contralateral paws in none of the groups. **p*<0.05 denotes significance vs. control; *****p*<0.05 denotes significance vs. vehicle-treated group; n=7.

Figure 2.3. Expression of B1R and TRPV1 in the SC after treatment with SSR240612

PSNL caused a significant expression of both B1R (blank) and TRPV1 (hatched) genes in the ipsilateral dorsal horn of the SC (A, B). One-week treatment with B1R antagonist 10mg kg⁻¹ (A) has reversed the genomic expression of both genes to the baseline values. On the side contralateral to the injury, the PSNL has significantly augmented only the B1R gene expression, which was reverted to baseline values by SSR240612 treatment. In the DRG (C)

there was not detected any meaningful expression of B1R gene after PSNL. However, TRPV1 gene was significantly expressed solely in the ipsilateral DRG after PSNL; SSR240612 treatment didn't change the degree of TRPV1 gene expression TRPV1 antagonist (B) has overexpressed the B1R gene in both ipsilateral and contralateral sides, whereas the expression of TRPV1 gene wasn't affected. P-value shows a significant difference in TRPV1 expression both after PSNL and after SB366791 treatment although there was no discrepancy of TRPV1 gene expression between ipsilateral vehicle- and SB366791-treated groups. PSNL produced an important expression of TRPV1 gene uniquely in the ipsilateral DRG (D), while treatment with SB366791 reversed TRPV1 gene expression to the baseline values. Results are displayed as RQ (relative quantification) fold-change \pm SEM of seven independent values. The levels of marginal significance are illustrated as follows: * $p < 0.05$ vs. control; # $p < 0.05$ ipsilateral treated vs. ipsilateral vehicle; § $p < 0.05$ ipsilateral vehicle vs. contralateral vehicle; ^ $p < 0.05$ contralateral treated vs. contralateral vehicle; n=7.

Figure 2.4. Distribution and quantitative assessment of B1R protein expression in the ipsilateral dorsal horn of the spinal cord

Images show representative digital microphotographs of the lumbar SC sections above the ipsilateral dorsal horn (IDH). B1-kinin receptor was revealed by color based (DAB chromogen) immuno-enzymatic (biotin-streptavidin HRP) technique. Although B1R was widely spread on the whole surface of SC sections, it has been detected prevalently in the ipsilateral dorsal horn compared to the contralateral dorsal horn. PSNL caused a two-fold expression of B1R in the lumbar spinal cord, with respect to the group of control One-week treatment with TRPV1 antagonist SB366791 produced highly significant expression of B1R in the lumbar spinal cord compared with control and with vehicle treated group. By contrast,

B1R antagonist SSR240612 strongly inhibited B1R expression in the lumbar SC of PSNL rats compared to control and to vehicle-treated group. Significance is illustrated as * $p < 0.05$ vs. control and [#] $p < 0.05$ vs. vehicle-treated group.

Figure 2.5. Localization of B1R in the ipsilateral Dorsal Horn (iDH) of lumbar SC of PSNL rats

Images are representative microphotographs of B1R (green, A, B, C,D,E, F) distribution into the iDH of the lumbar SC relative to TRPV1 (red, A'), GFAP (blue, B'), Iba-1 (red, C'), CGRP (red, D'), IB4+ (red, E') and IL-1 β (blue, F') Images *a, b, c, d, e, f* depict the control immunostaining and display a very weak signal for above mentioned peptides. B1R colocalizes with astrocytes (GFAP, B', B''), but not with TRPV1 (TRPV1, red, A', A''), microglia (Iba1, red, C', C''), peptidergic sensory fibres (CGRP, red, D', D'') and non-peptidergic fibres (IB4+, red, E', E''). Pannel F, F', F'' reveals the B1R (green) and IL-1 β (blue) distribution into the iDH of the lumbar SC. Pannel F'' portray a moderate colocalisation of B1R and IL-1 β in iDH (white-bluish spots). Bar scale: 75 μ m

Figure 2.6. Localization of B1R in the ipsilateral lumbar DRG (iDRG) of PSNL rats

Images are representative microphotographs of B1R (green) and TRPV1 (red) distribution into the iDRG. Panels *a,b,c* represents the control immunolabelling. B1R (green, A, B) is not depicted in the iDH of PSNL rats, whereas TRPV1 (red, A', B') appears in moderate quantity.

Bar scale: 75 μ m

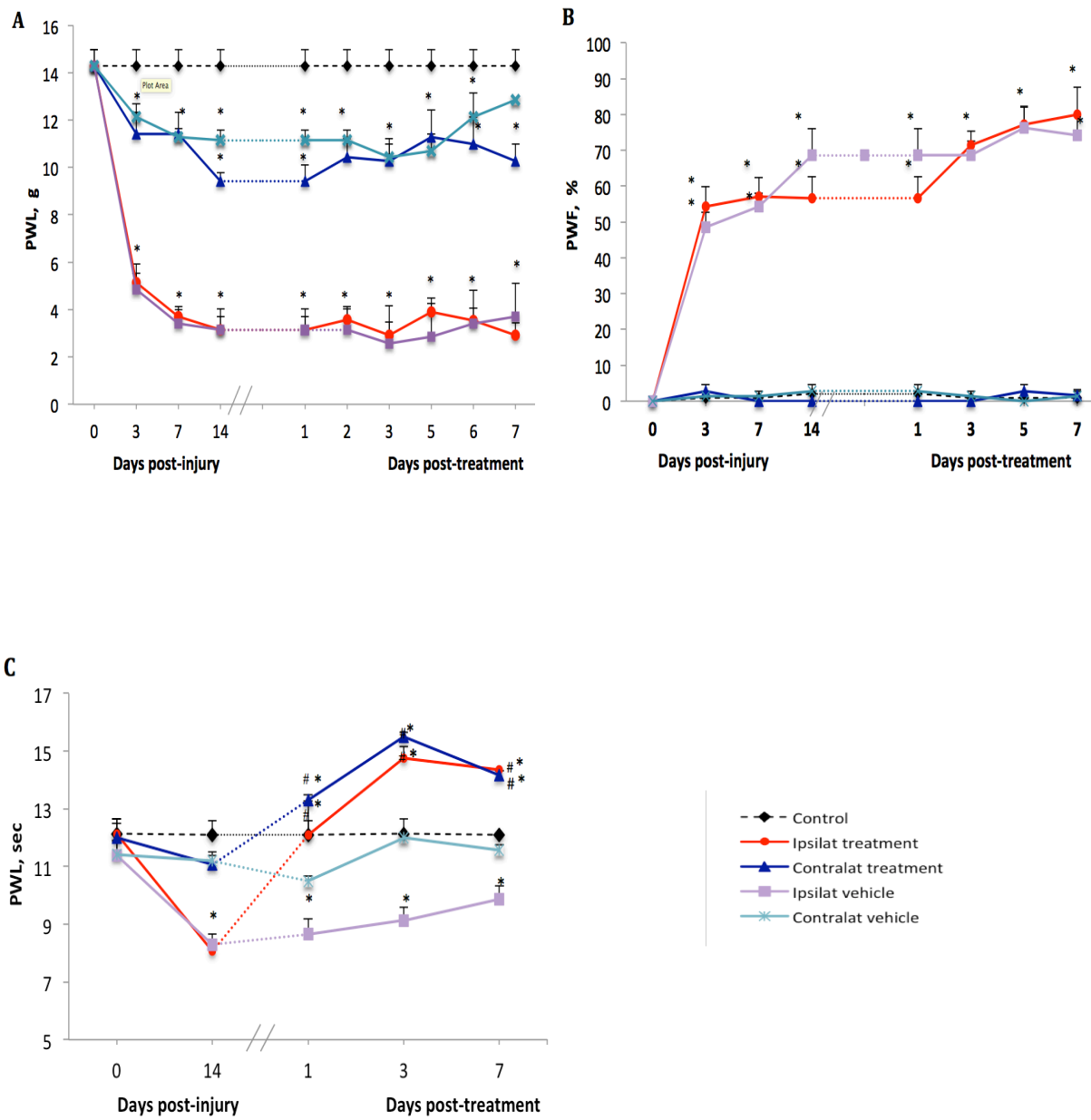


Fig 2.1.

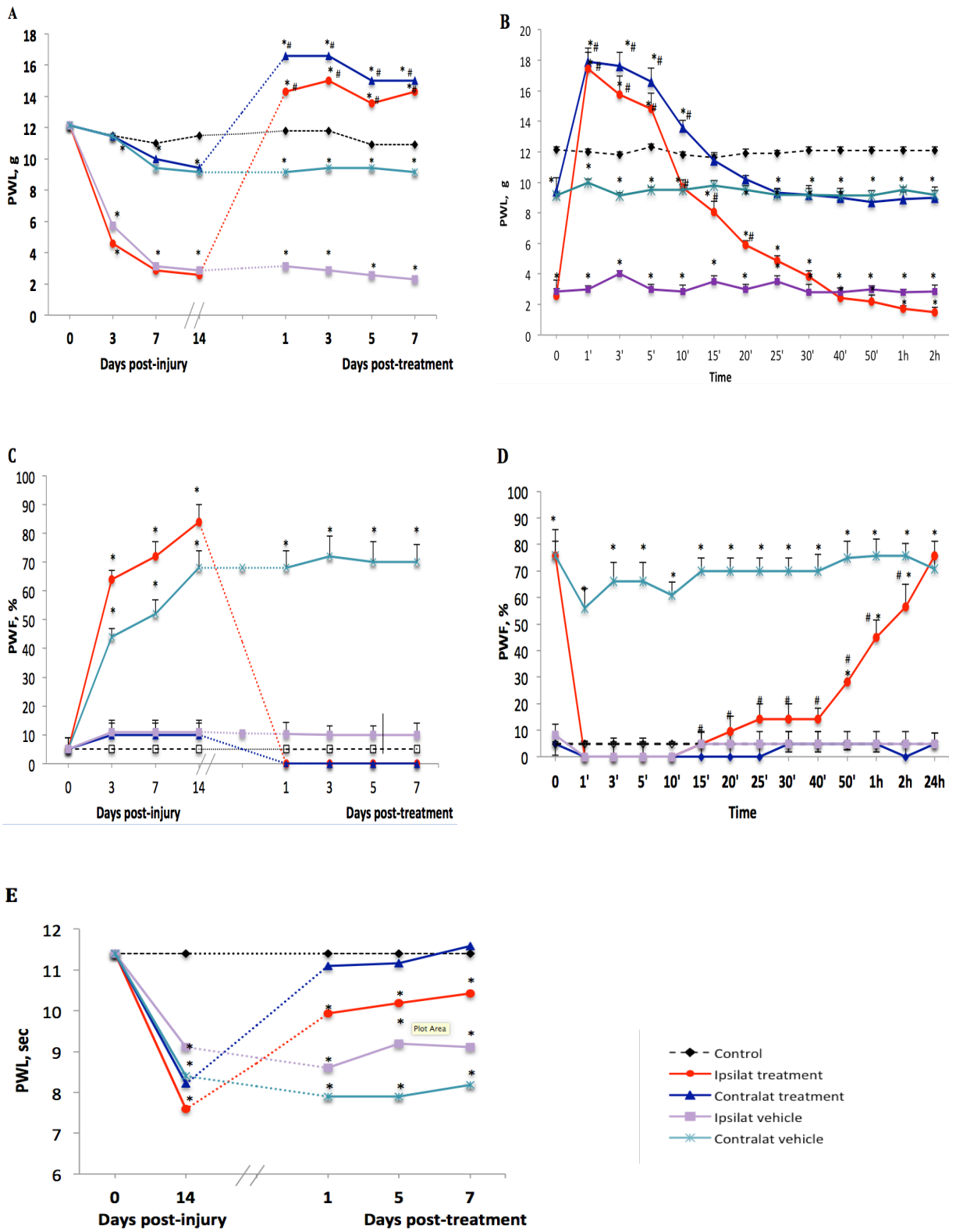


Fig 2.2.

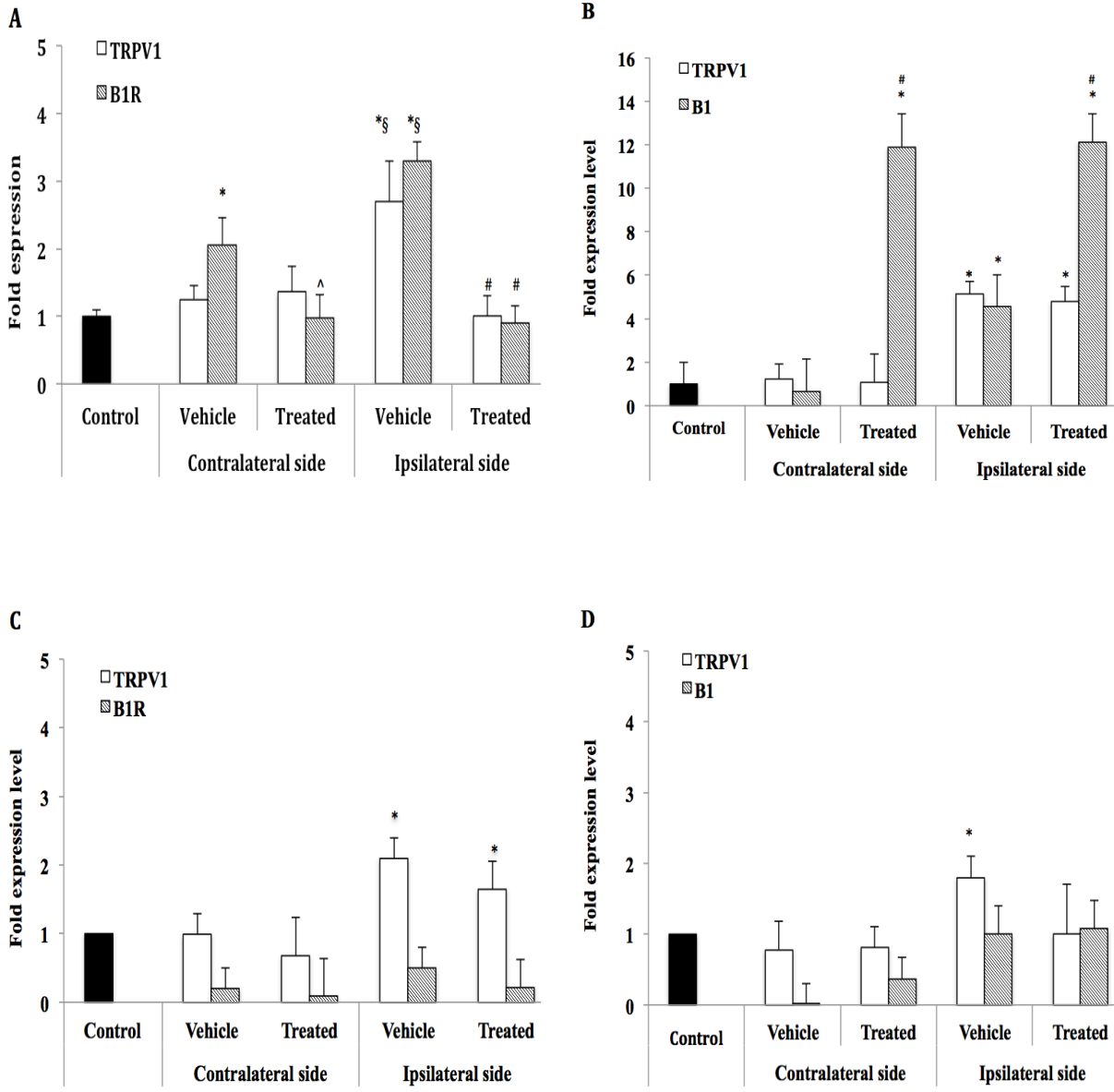


Fig 2.3.

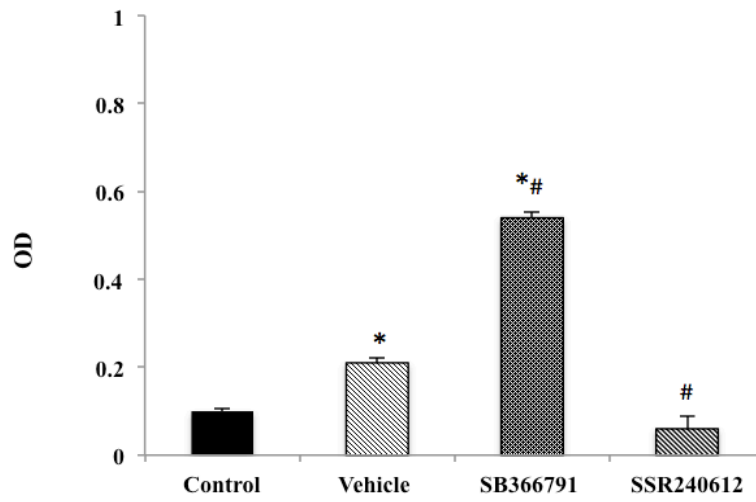
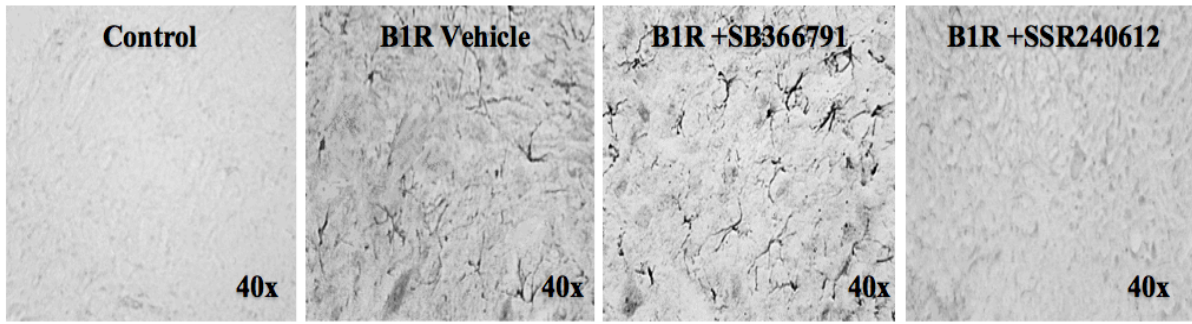
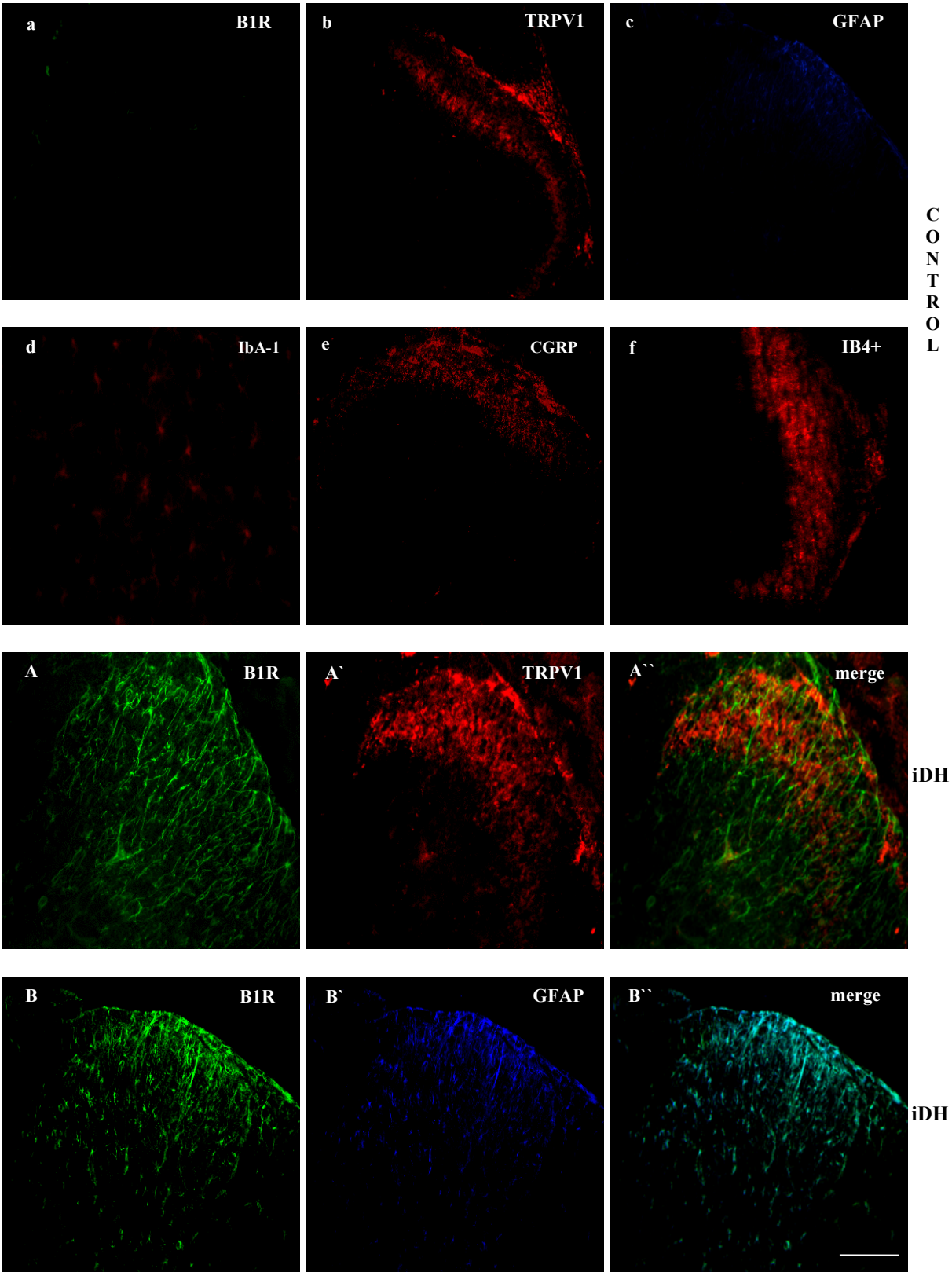


Fig 2.4.



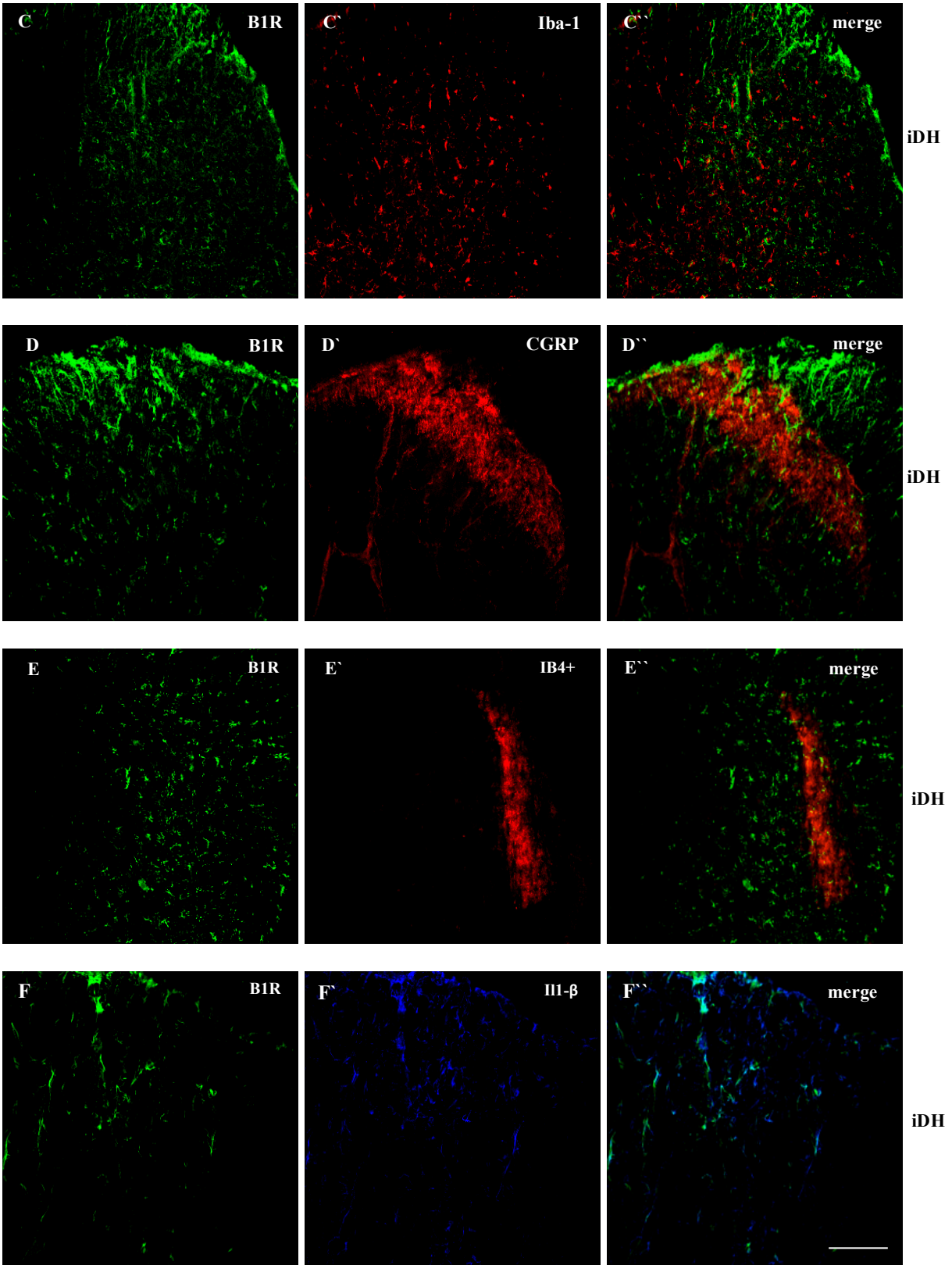


Fig 2.5.

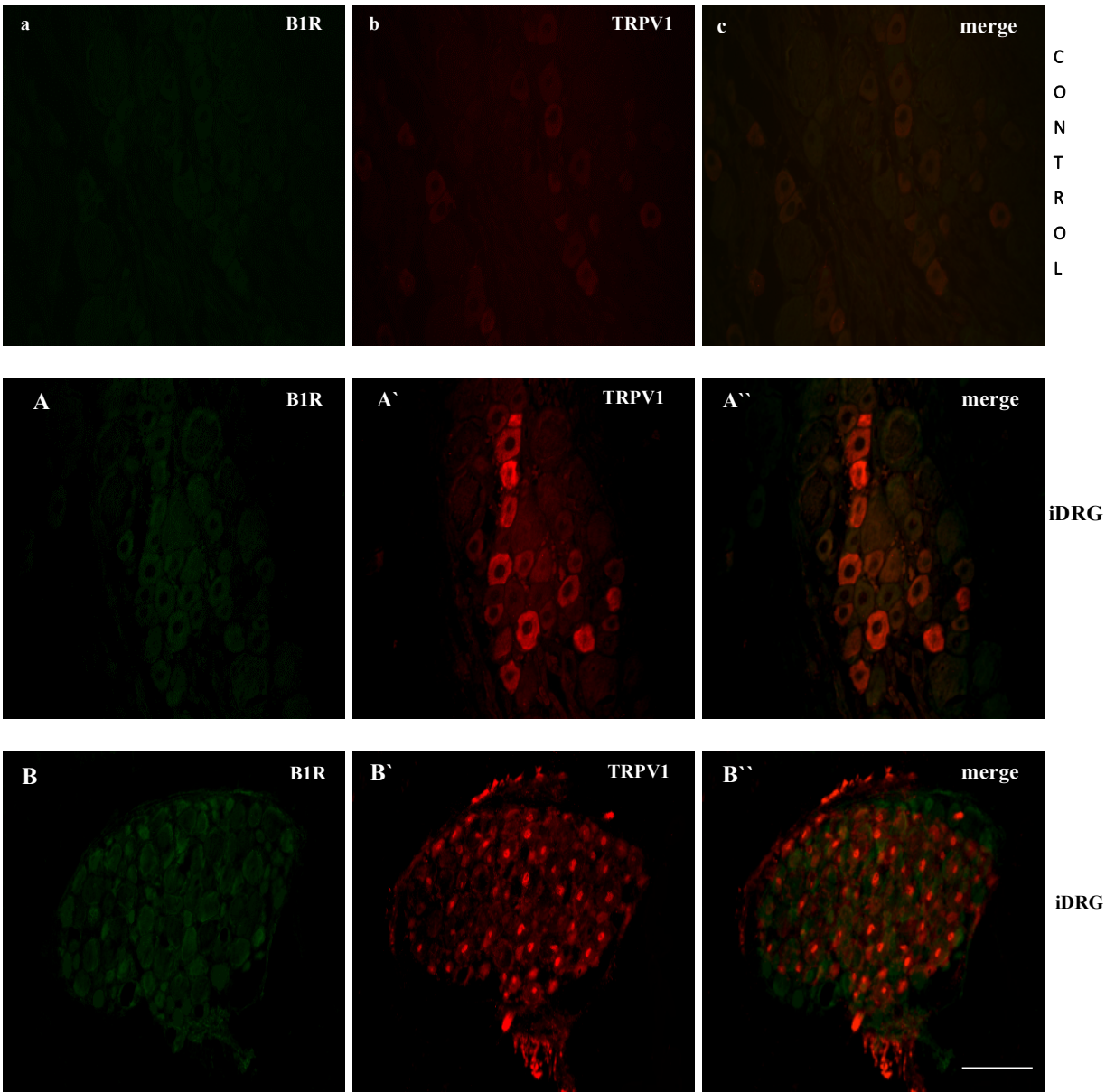


Fig 2.6.

CHAPITRE III
D'AUTRES ÉTUDES

3.0 Hypothèse de travail

Le TRPV1 est impliqué dans le développement et le maintien de la DN, étant connu pour son rôle de transducteur et d'intégrateur au niveau des nocicepteurs. L'antagonisme du TRPV1 inhibe l'hyperalgésie thermique et de façon transitoire l'allodynie mécanique et au froid chez les rats ayant subi une LPNS. Le fonctionnement du TRPV1 implique l'activation des composantes neuronales et gliales de la moelle épinière et des GRD.

3.1 Objectif

Analyser la distribution du TRPV1 dans la moelle épinière lombaire chez les rats LPNS.

3.2 Approches expérimentales

Les rats ont été soumis à la LPNS d'une patte arrière. Le 21-ème jour post-LPNS, les sections de moelles épinières lombaires ont été préparées tel que décrit dans l'article afin de détecter le TRPV1 en immunofluorescence.

3.3 Résultats

3.3.1 La distribution du TRPV1 dans la moelle épinière ipsilatérale chez les rats LPNS

Les images ci-dessous illustrent la distribution du TRPV1 dans la corne dorsale ipsilatérale de la moelle épinière chez les rats soumis à la LPNS (groupe véhicule). Le TRPV1 n'est pas colocalisé avec les astrocytes (GFAP) ou la microglie (Iba1), mais il est coexprimé majoritairement sur les fibres IB4+ et partiellement sur les fibres peptidergiques CGRP.

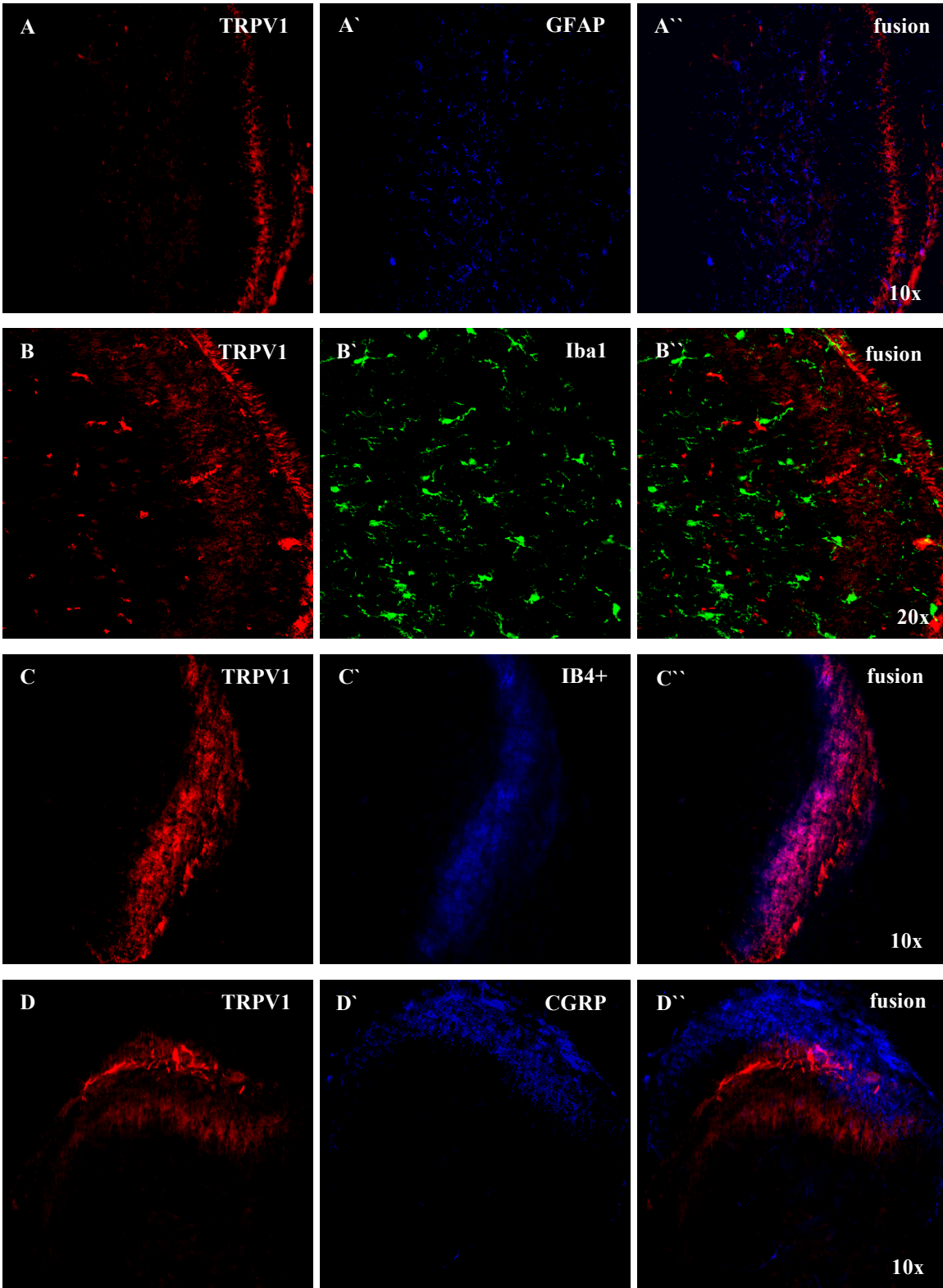


Figure 3.1. Distribution du TRPV1 dans la corne ipsilatérale de la moelle épinière

Les colonnes A,B,C,D révèlent le marquage du TRPV1 (rouge). Les colonnes A', B', C', D' illustrent les images représentatives du GFAP (A', bleu), Iba1 (B', vert), IB4+ (C', bleu) et CGRP (D', bleu). Les colonnes A'',B'', C'', D'' montrent la fusion des deux premières colonnes en vue de dévoiler le type cellulaire sur lequel est localisé le TRPV1 dans la corne dorsale (s'il y en a). Les sections de 20µm ont été visualisées en microscopie confocale à un agrandissement de 10x (A'', C'', D'') et de 20x (B'').

3.3.2 La distribution du TRPV1 par rapport à l'IL-1 β dans la moelle épinière ipsilatérale chez les rats LPNS

Une analyse approfondie des images nous permet de conclure que, même si la distribution du TRPV1 et de l'IL-1 β est apparemment adjacente, ils ne sont pas colocalisés sur le même type cellulaire.

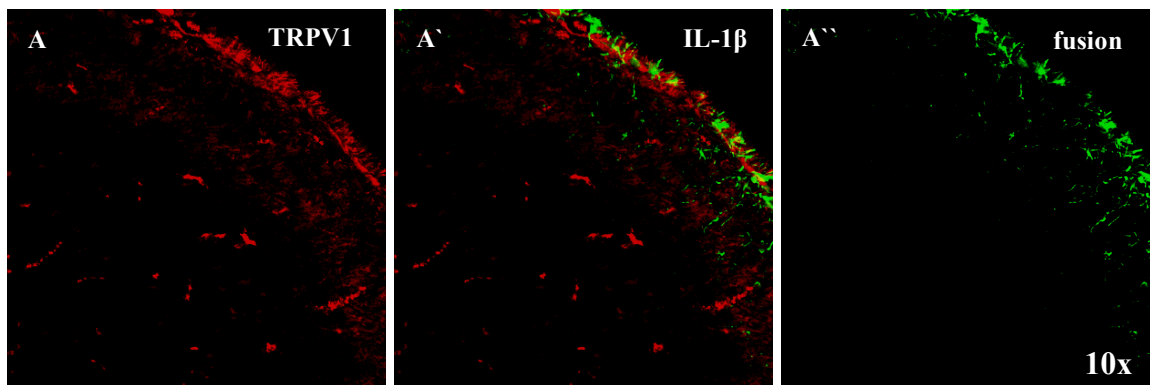


Figure 3.2. Distribution du TRPV1 et de l'IL-1 β dans la moelle épinière

Les images illustrent la distribution du TRPV1 (A, rouge) et de l'IL-1 β (A', vert) dans la corne dorsale ipsilatérale de la moelle épinière. L'image A'' ne montre pas de colocalisation du TRPV1 avec l'IL-1 β . Les sections de 20 μ m ont été visualisées en microscopie confocale à un agrandissement de 10x (A'').

3.3.3 Colocalisation du TRPV1 sur les neurones de la corne ventrale

Les images révèlent une expression du TRPV1 sur les neurones intraspinaux (marqués avec DAPI) de la corne ventrale de la moelle épinière des rats LPNS (groupe-véhicule). Apparemment, le marquage avec le DAPI montre des neurones moteurs de la corne ventrale de la moelle épinière. Cependant, cette allégation demande à être vérifiée dans de prochaines études.

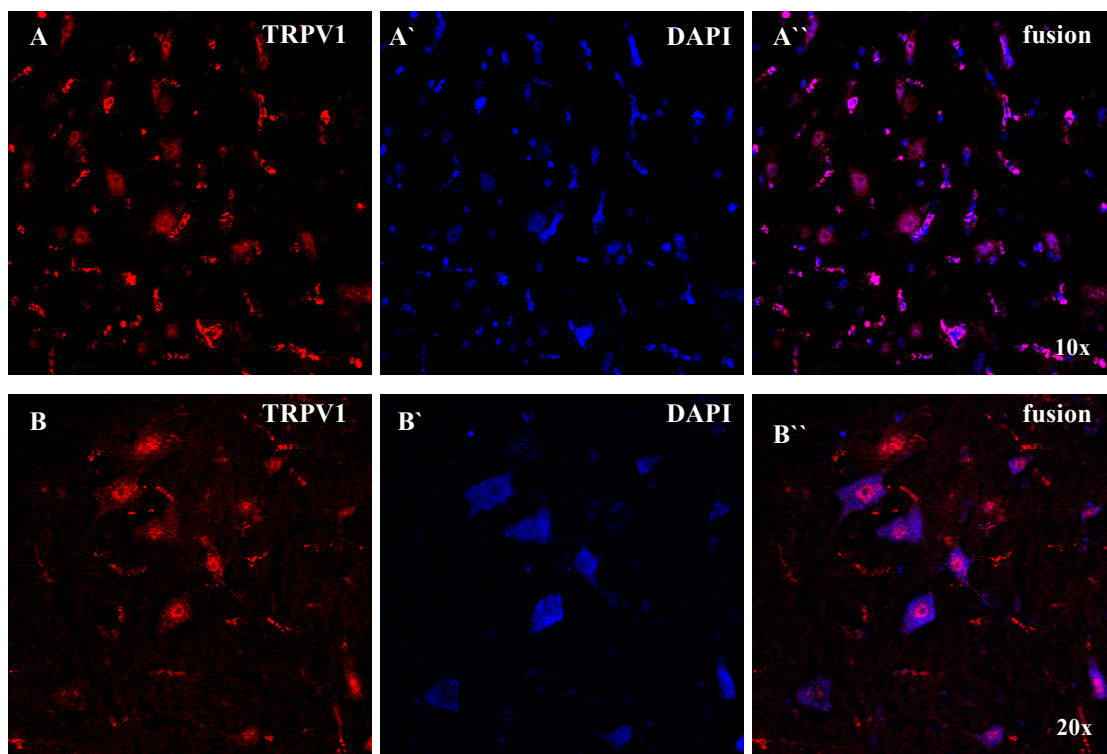


Figure 3.3. Colocalisation du TRPV1 dans la corne ventrale de la moelle épinière

Les images illustrent la distribution du TRPV1 (A, B rouge) et des noyaux marqués avec DAPI (A', B', bleu) dans la corne ventrale de la moelle épinière. Les images A'' et B'' révèlent la coexpression du TRPV1 avec le DAPI. Les sections de 20 μ m ont été visualisées en microscopie confocale à un agrandissement de 10x (A'') et 20x (B'').

3.3.4 La distribution du RB1 versus TRPV1 dans la corne dorsale de la moelle épinière

Les images ci-dessous révèlent la distribution du RB1 (vert) par rapport au TRPV1 (rouge) dans la corne dorsale de la moelle épinière chez les rats LPNS. L'agrandissement en 60x [A''', B''', C'''] montre la distribution du RB1 autour du TRPV1, ce qui confirme l'idée d'une interaction entre le RB1 et le TRPV1 dans la DN.

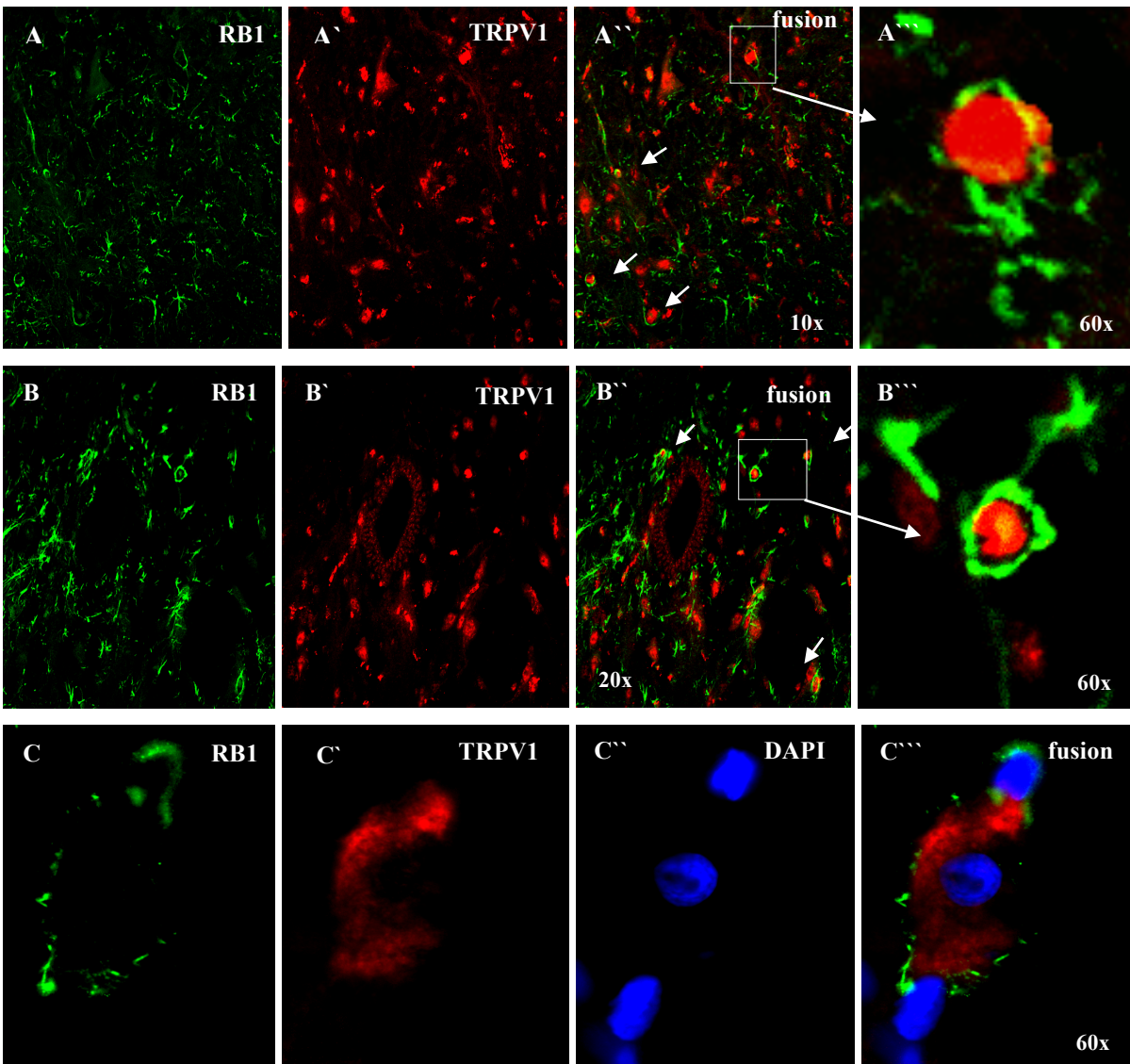


Figure 3.4. Distribution du RB1 versus le TRPV1 dans la moelle épinière

Les colonnes A, B, C, illustrent le marquage du RB1 (vert), les colonnes A', B', C' montrent la distribution du TRPV1 (rouge). Les colonnes A'', B'', C'' et A''', B''', C''' représentent la fusion des deux premières colonnes en vue de montrer la localisation du RB1 vis-à-vis du TRPV1. Les sections de 20 µm ont été visualisées en microscopie confocale à des agrandissements de 10x (A''), 20x (B''), 40x (A''', B''') et 60x (C''').

CHAPITRE IV

DISCUSSION

4.1 Discussion générale

Selon une étude, plus de 20 millions de personnes aux États-Unis et plus de 10% des personnes âgées de 40 ans et plus souffrent de DN (Gregg, Sorlie et al. 2004); le nombre de personnes atteintes étant en constante augmentation avec l'âge. La DN est une douleur chronique qui constitue un enjeu de santé publique majeur. Ainsi, la DN a des effets dévastateurs sur la santé des patients en affectant leur qualité de vie, qui est aggravée par un manque de traitements efficaces. Bien qu'au cours des dernières décennies, plusieurs stratégies de traitement de la DN aient été adoptées, son évolution est notoirement difficile à contrôler et demande la recherche de nouveaux concepts alternatifs de médication. Pour cette raison, le développement d'un traitement approprié, fondé sur des données probantes, est nécessaire. Dans ce contexte, le RB1 des kinines et le TRPV1 pourraient servir de cibles moléculaires dans la gestion pharmacologique de la DN. L'objectif majeur de cette étude vise à comprendre la relation entre le RB1 et le TRPV1 lors de la neuropathie causée par une LPNS; cet objectif émerge de nos études antérieures montrant que l'administration systémique de la capsaïcine (agoniste du TRPV1) est capable d'induire l'expression du RB1 dans la moelle épinière (Talbot, Dias et al. 2012). Ainsi, cette étude est basée sur l'hypothèse que le TRPV1 peut potentialiser la DN par la modulation de l'expression du RB1 sur les cellules gliales de la moelle épinière (microglie ou astrocytes). À cette fin, nous avons opté pour une approche pharmacologique en employant des antagonistes du RB1 (SSR240612) et du TRPV1 (SB366791). Cette étude démontre, pour la première fois, qu'il existe un mécanisme de contrôle mutuel entre le RB1 et le TRPV1 opérant indirectement via des cytokines proinflammatoires. De plus, nos résultats suggèrent que le RB1 et le TRPV1 agissent de manière complémentaire; le RB1 compensant le déficit de fonctionnement du

TRPV1. Les résultats montrent aussi qu'une interaction directe entre ces deux récepteurs est peu probable puisqu'ils ne se retrouvent pas sur les mêmes types cellulaires. Nos résultats suggèrent également que l'interaction entre le RB1 et le TRPV1 a lieu au niveau spinal, car le RB1 n'est pas exprimé dans les GRD et sur les fibres sensorielles.

Les faits saillants de cette étude sont les suivants :

- l'antagonisme du TRPV1 induit une surexpression du RB1 et une astrogliose prononcée dans la moelle épinière lombaire, mais pas dans les GRD, tandis que l'antagonisme du RB1 renverse l'expression du TRPV1 au niveau spinal, mais pas dans les GRD;
- le patron d'expression du RB1 suit celui de l'IL-1 β , alors que l'expression du TNF α suit le patron d'expression du TRPV1;
- l'expression protéique du RB1 est retrouvée uniquement dans les astrocytes, alors que le TRPV1 est exprimé sur les fibres peptidergiques (CGRP) et non peptidergiques (IB4⁺) et sur les éléments neuronaux de la corne ventrale et des GRD.

4.2 La pertinence du modèle animal de LPNS parmi d'autres modèles de DN

De nos jours, pour étudier la DN trois modèles animaux sont couramment utilisés: la constriction chronique du nerf sciatique par une ligature lâche (CCN), la ligature partielle du nerf sciatique (LPNS) et la ligature serrée des nerfs spinaux (LNS). Bien que ces modèles produisent des comportements nociceptifs similaires, il existe une différence significative dans l'ampleur de chaque composante douloureuse entre les modèles. Ainsi, l'ampleur de l'allodynie mécanique produite par la LNS est plus importante que celle produite par la LPNS, tandis que la CCN engendre une réponse allodymique faible (Kim and Chung 1997). De plus, la LNS conduit à un déficit moteur sévère qui interfère avec les tests comportementaux (Jaggi, Jain et al. 2011). La douleur induite par la LNS est plus forte par rapport aux autres modèles et cause plus de souffrance aux animaux. Par exemple, la LNS nécessite des procédures chirurgicales plus étendues comparativement aux CCN et LPNS. D'autre part, la CCN est caractérisée par une diminution de la vitesse de conduction nerveuse et par des dommages importants aux axones myélinisés versus les axones non myélinisés; ce qui n'est pas observé pour la LPNS. En outre, la CCN produit seulement la sensibilisation des fibres C (Carlton, Dougherty et al. 1991), tandis que la LPNS conduit à la sensibilisation des fibres A β et C, les deux étant impliquées dans le développement de l'hypersensibilité mécanique et thermique (Gabay and al. 2004). Par conséquent, le modèle de LPNS est considéré comme le plus pertinent pour la compréhension de la DN (Seltzer et al. 1990). Pour ces raisons et puisque le modèle de la LPNS a été le plus souvent utilisé pour étudier la DN, nous l'avons adopté pour notre étude. Dans ce modèle, la patte postérieure gauche du rat est rasée et la dissection de la peau est faite pour exposer le nerf sciatique au niveau de la cuisse supérieure. Environ le tiers à la moitié du nerf sciatique est ligaturé avec une suture de soie 6-0 en aval du point où le nerf

biceps-semi tendineux postérieur bifurque (Kim and Chung 1997). Les comportements nociceptifs tels que l'allodynie mécanique et l'allodynie au froid ont été observés à partir du 3^e jour post-chirurgie, alors que l'hyperalgésie thermique apparaît vers le 14^e jour. Toutefois, les premières manifestations d'hyperalgésie thermique, d'une intensité légère, sont observées chez certains animaux à partir des 9^e et 10^e jours après la chirurgie. Lors de la première semaine post-chirurgie, la douleur causée par la LPNS est indépendante du système nerveux sympathique et se transforme graduellement en douleur dépendante de ce système vers la deuxième semaine après la chirurgie (Kim and Chung 1997). L'ampleur et la durée des réponses à la douleur varient considérablement en fonction des souches d'animaux et du matériel de suture (Yoon, Lee et al. 1999), ainsi que des conditions d'hébergement (nourriture, litière, voisinage) (Mogil 2009).

4.3 La pertinence de l'approche pharmacologique

Les évaluations précliniques des thérapies pharmacologiques pour la DN ont rarement été traduites en médicaments bénéfiques pour les humains. Ainsi, parmi tous les antagonistes des récepteurs des kinines, seulement l'antagoniste du RB2, Icatibant, a été approuvé pour l'utilisation clinique dans l'angioédème héréditaire et les rhinites allergiques. Parmi les antagonistes du TRPV1, l'AMG 517 (suspension de 2% Pluronic 108) et le JNJ-39439335 (Mavatrip) arrivèrent à la deuxième étape de la première phase des essais cliniques chez l'homme pour traiter l'arthrose. Toutefois, les antagonistes TRPV1 manifestent une hyperthermie dépendante de leurs concentrations plasmatiques (Manitpisitkul, Brandt et al. 2016). Par ailleurs, le manque d'agents approuvés pour la DN a alimenté la critique sur la validité des modèles animaux (Brell 2014). Toutefois, l'utilisation des agonistes et des

antagonistes chez les modèles animaux permet de mieux comprendre les mécanismes d'interaction entre les molécules cibles à fort potentiel thérapeutique.

Contrairement aux antagonistes peptidiques ([Leu⁸]desArg⁹BK, Lys[Leu⁸]desArg⁹BK) et peptidiques avec acides aminés non naturels (R-715, R-892, R-954) du RB1, le SSR240612 est un antagoniste non-peptidique qui traverse la barrière hématoencéphalique (Gougat, Ferrari et al. 2004), pouvant exercer ses effets sur les neurones et les cellules gliales dans le SNC. Le SSR240612 a montré une inhibition de l'allodynie mécanique et au froid (Dias, Talbot et al. 2010, Talbot, Chahmi et al. 2010) dans des modèles diabétiques de DN. Le SSR240612 est actif par la voie orale dans des modèles d'inflammation neurogénique et de douleur inflammatoire (Huang, Zhang et al. 2006). Ce composé est capable d'inhiber l'hyperalgésie thermique induite par l'irradiation UV (à des doses de 1-3 mg/kg), d'abolir la réponse nociceptive en phase tardive dans le modèle à la formaline (doses de 10-30 mg/kg) et de bloquer l'hyperalgésie thermique induite par une lésion du nerf sciatique chez le rat (Gougat, Ferrari et al. 2004) . En outre, le SSR240612 réduit l'œdème de l'oreille induit par la capsaïcine chez la souris (doses de 0,3, 3 et 30 mg / kg p.o.) et prévient l'hyperalgésie thermique d'origine neuropathique dans le modèle de CCN chez le rat (Huang, Zhang et al. 2006). De plus, des études de notre laboratoire ont montré que l'antagoniste du RB1: LF22-0542 a inhibé l'hyperalgésie thermique au jour 21, sans affecter l'allodynie tactile et au froid (Petcu, Dias et al. 2008). Malgré son efficacité impressionnante dans les modèles animaux, le développement du SSR240612 et d'autres antagonistes du RB1 a été interrompu pour des raisons non divulguées après un essai clinique en phase II (Qadri and Bader 2018).

Le SB366791 est un antagoniste sélectif du TRPV1 qui a prouvé son efficacité in vivo chez le rat et l'humain (Rami, Thompson et al. 2004) par rapport aux autres antagonistes tels que le

rouge de ruthénium, la capsazépine, l'iodo-résinifératoxine (iodo-RTX) ou les cinnamides (Varga, Nemeth et al. 2005). Le rouge de ruthénium, par exemple, est un antagoniste de tous les canaux TRPV (Gunthorpe, Rami et al. 2004), alors que la capsazépine est un antagoniste qui montre une faible activité spécifique selon l'espèce (Walker, Perkins et al. 1995), en bloquant aussi les récepteurs nicotiques de l'acétylcholine (Liu, Blin et al. 1996) et les canaux Ca^{2+} -voltage dépendants (England, Hebllich et al. 2001). Par contre, l'iodo-RTX est un antagoniste puissant du TRPV1, qui n'est pas compétitif et qui possède des actions faiblement sélectives qui sont mal définies (Seabrook, Sutton et al. 2002). Bien que les autres antagonistes soient efficaces *in vitro*, leur efficacité n'a pas été démontrée *in vivo* (Gunthorpe, Rami et al. 2004, Varga, Nemeth et al. 2005). Ainsi, SB366791 est reconnu comme un puissant antagoniste possédant une haute sélectivité, capable d'abolir les effets produits par la capsaïcine, les pH acides et les hautes températures (Gunthorpe, Rami et al. 2004, Varga, Nemeth et al. 2005).

4.4 Le rôle du RB1 dans la DN produite par une LPNS

L'activation des récepteurs des kinines par ses agonistes endogènes ou exogènes produit la douleur inflammatoire ou neuropathique, manifestée par l'hyperalgésie ou l'allodynie chez les humains et les animaux de laboratoire (Perkins and Kelly 1993, Couture and Lindsey 2000, Levy and Zochodne 2000, Pesquero, Araujo et al. 2000, Ferreira, Campos et al. 2001, Yamaguchi-Sase, Hayashi et al. 2003, Gabra, Merino et al. 2005, Cunha, Verri et al. 2007, Dias, Ismael et al. 2007, Rajpal, Gerovac et al. 2007, Hamza, Wang et al. 2010, Dutra, Bento et al. 2013). Bien que certaines de ces études aient suggéré l'implication du RB1 dans l'hyperalgésie et l'allodynie dans des modèles de douleur inflammatoire (Levy and Zochodne

2000, Yamaguchi-Sase, Hayashi et al. 2003, Rashid, Inoue et al. 2004, Dias, Ismael et al. 2007, Talbot, Theberge-Turmel et al. 2009), d'autres études ne supportent pas la participation du RB1 au développement de l'allodynie chez les rongeurs soumis à une LPNS (Gougat, Ferrari et al. 2004, Petcu, Dias et al. 2008). Par exemple, l'ablation du gène du RB1 provoque une réduction significative de l'hyperalgésie produite par une lésion nerveuse, alors que l'allodynie mécanique réapparaît chez ces souris vers les jours 35-42 post-LPNS.

De plus, les antagonistes du RB1 tels que la des-Arg⁹-[Leu⁸]-BK ou le LF22-0542 furent incapables de réduire l'allodynie associée à la LPNS chez les rongeurs (Ferreira, Beirith et al. 2005, Petcu, Dias et al. 2008). En accord avec ces dernières études, nous avons trouvé que le SSR240612 est capable d'inhiber l'hyperalgésie thermique, mais pas l'allodynie mécanique et thermique chez les rats soumis à une LPNS. Ainsi le rôle du RB1 sur l'allodynie semble tributaire du modèle animal utilisé (neuropathie associée à une maladie métabolique comme le diabète vs. neuropathie associée à une lésion nerveuse). De plus, les études montrant une inhibition de l'allodynie mécanique et thermique chez les rats LPNS utilisèrent un antagoniste peptidique (des-Arg⁹-Leu⁸-BK)(Levy and Zochodne 2000, Rashid, Inoue et al. 2004), ce qui exclut un problème de distribution avec le SSR240612 qui normalement diffuse dans tous les compartiments et n'est pas soumis à l'action des peptidases contrairement aux antagonistes peptidiques qui ont une courte demi-vie.

Certaines études rapportèrent que lors d'une lésion ou d'une constriction d'un nerf, les changements des niveaux d'ARNm du RB1 dans la moelle épinière ne se manifestent que du côté ipsilatéral à la lésion du nerf (Levy and Zochodne 2000). Toutefois, chez les rats LPNS, nous avons trouvé une augmentation importante des ARNm du RB1 des deux côtés de la moelle épinière associée à des changements comportementaux liés à la douleur. Ces

divergences peuvent dépendre du temps de mesure après la lésion du nerf. Contrairement à d'autres études avec le modèle CCN (Petersen., 1998 a, b), nous n'avons pas trouvé d'augmentation d'ARNm du RB1 dans les GRD. Ceci peut expliquer le rôle central et non pas périphérique du RB1 dans la DN avec le modèle de LPNS.

Notre étude montre la présence du RB1 exclusivement sur les astrocytes dans la moelle épinière. En conformité avec l'absence d'ARNm du RB1 dans les GRD, le RB1 n'a pas été identifié par immunohistochimie sur les neurones peptidergiques ou non peptidergiques, contrairement à d'autres études utilisant des modèles de douleur inflammatoire ou *in vitro* (Wotherspoon and Winter 2000, Ma 2001, Rashid, Inoue et al. 2004, Talbot, Chahmi et al. 2010).

La nouveauté de notre étude est que l'antagoniste du TRPV1 produit une surexpression du RB1 dans la moelle épinière, mais pas dans les GRD lombaires, suggérant une régulation entre le TRPV1 et le RB1. Bien que certaines études aient suggéré une possible interaction entre le TRPV1 et le RB1 (Ueda 2006, Rajpal, Gerovac et al. 2007), celle-ci n'a pas encore été prouvée. Cette suggestion était basée sur des études montrant la capacité de la BK d'engendrer une modification allostérique du TRPV1 (Caterina and Julius 2001, Szallasi and McAlexander 2015) et de le sensibiliser à des stimuli nocifs à travers le RB2 (Julius and Basbaum 2001). Une étude récente a montré, chez les rats qui n'ont pas développé un diabète, qu'en présence d'un RB2 fonctionnel, le RB1 demeure découplé et lorsque la signalisation du RB2 est altérée, le couplage du RB1 est activé (Desposito, Zadigue et al. 2017). Ceci pourrait inférer une interaction similaire entre le RB1 et le TRPV1, surtout du fait que le TRPV1 peut relayer les mécanismes ioniques qui couplent les récepteurs des kinines à l'excitation et à la sensibilisation des nocicepteurs (Shin, Cho et al. 2002). Une autre étude a montré que

l'antagonisme du RB2 cause la mort des animaux diabétiques soumis à une occlusion transitoire d'une artère cérébrale, et elle a suggéré que la surexpression du RB1 pourrait jouer un rôle neuroprotecteur (Desposito, Zadigue et al. 2017). Mis dans le contexte de notre étude, ces données n'excluent pas que la surexpression du RB1 lors du blocage du TRPV1 pourrait avoir un caractère compensatoire et protecteur. Le rôle du RB2 dans ce phénomène demeure à être étudié.

4.4.1 Le RB1 dans d'autres observations

Nous avons observé que l'antagonisme du RB1 cause une perte significative du poids corporel chez les rats LPNS et un ramollissement osseux, alors que la surexpression du RB1 lors de l'antagonisme du TRPV1 n'a eu aucun effet sur le poids corporel des animaux LPNS. Ceci est en accord avec une étude qui montre que l'absence des RB1 et RB2 augmente la perte minérale osseuse chez les souris diabétiques Akita de type 1 (Kakoki, Sullivan et al. 2010). Ces données allègent un rôle biologique du RB1 au niveau de l'os, en accord avec l'expression (ARNm et protéine) du RB1 dans des lignées cellulaires ostéoblastiques humaines (Brechtel, Persson et al. 2008). Des études de notre laboratoire ont montré que le RB1 est exprimé dans le tissu adipeux de la souris obèse et diabétique nourrie avec une diète riche en gras (El Akoum, Haddad et al. 2017). Or, le traitement d'une semaine avec le SSR240612 a réduit le gain de poids corporel et l'adiposité dans ce modèle de diabète de type 2 (El Akoum, Haddad et al. 2017) ainsi que chez le rat obèse diabétique Zucker (Midaoui, Talbot et al. 2015). Ces études soulignent un rôle du RB1 dans l'adipogenèse et expliquent nos observations avec le SSR240612 sur la perte de poids corporel de nos rats.

4.5 Les cytokines proinflammatoires dans la régulation du RB1 et du TRPV1

4.5.1 L'IL-1 β

Dans cette étude, les taux d'ARNm de l'IL-1 β dans la moelle épinière augmentent après le traitement avec l'antagoniste du RB1 ce qui est en corrélation avec le degré de la DN manifestée par l'allodynie. Ces résultats suggèrent le rôle de l'IL-1 β dans la DN (Scholz and Woolf 2007) et l'impact mineur du RB1 dans l'allodynie mécanique, et montre le rôle primordial de l'IL-1 β dans le maintien de l'allodynie et dans la communication entre les neurones et les cellules gliales. Ceci est appuyé par les résultats de l'application intrathécale d'anticorps neutralisant IL-1 β qui montrent une inhibition de l'allodynie mécanique chez les rats CCN (Kawasaki, Xu et al. 2008) d'une manière dose-dépendante (Sweitzer, Colburn et al. 1999).

Notre étude montre aussi que les changements d'expression génomique de l'IL-1 β et du RB1 sont similaires dans la moelle épinière et subissent les mêmes augmentations après le traitement avec l'antagoniste du TRPV1. Ces résultats mettent en évidence une régulation conjointe du RB1 et de l'IL-1 β (Phagoo, Poole et al. 1999). L'expression de l'IL-1 β et du RB1 pourrait être contrôlée tant au niveau transcriptionnel, par l'activation du NF- κ B (Ni, Chao et al. 1998, Schanstra, Bataillé et al. 1998) et de la kinase extracellulaire - ERK ou de la voie p38 MAPK (Campos, Souza et al. 1999), qu'au niveau post-transcriptionnel (Levy and Zochodne 2000, Calixto, Medeiros et al. 2004). L'IL-1 β pourrait agir directement sur les neurones nociceptifs (Ren and Dubner 2008) à travers un mécanisme IL-1R/TyrK/PKC-dépendant et activerait directement les fibres sensorielles de types C et A δ (Obreja, Rathee et al. 2002). Aussi, l'IL-1 β est capable de sensibiliser et d'augmenter la densité des canaux transducteurs de la douleur (tels que le TRPV1) sur les fibres nociceptives (Binshtok, Wang et

al. 2008) par la libération des médiateurs pro-nociceptifs tels que NGF, PGs, IL-6, SP et MMP9 (Inoue, Ikoma et al. 1999, Samad, Moore et al. 2001, Kawasaki, Xu et al. 2008). Par exemple, le NGF (Ji and Woolf 2001, Zhang, Huang et al. 2005) et la PGE₂ (Moriyama, Higashi et al. 2005) peuvent augmenter la sensibilisation du TRPV1 en augmentant sensiblement l'excitabilité et l'activité spontanée neuronale (Binshtok, Wang et al. 2008, Schäfers and Sorkin 2008). Contrairement à d'autres études (Kawasaki, Xu et al. 2008, Ren and Torres 2009), notre étude n'a pas détecté une expression significative d'IL-1 β dans les GRD, suggérant ainsi l'origine gliale de l'IL-1 β dans la DN liés à une LPNS. En effet, l'IL-1 β est colocalisé modérément avec le GFAP et le RB1 dans la corne dorsale de la moelle épinière confirmant la présence de cette cytokine sur les astrocytes (Samad, Moore et al. 2001, Guo, Wang et al. 2007, Zhang, Hu et al. 2010). Par conséquent, l'IL-1 β libérée par les astrocytes serait responsable de l'induction du RB1 par une action autocrine ou paracrine sur les astrocytes.

4.5.2 Le TNF α

Lors d'une lésion nerveuse, le TNF α est libéré par les cellules de Schwann du nerf lésé, étant la seule cytokine véhiculée par le transport axonal vers la glie par les afférences lésées (Miller, Jung et al. 2009). Ainsi, le TNF α perfusé dans les GRD *in vitro* peut induire des décharges excitatrices dans les fibres A δ et C, mettant en évidence la sensibilité accrue du nerf lésé à des niveaux élevés de TNF α (Schäfers, Lee et al. 2003). En plus, le TNF α produit une expression rapide du TNFR1 sur les fibres sensorielles (Lindenlaub and Sommer 2003, Myers, Campana et al. 2006) qui est en lien avec le degré de nociception. Par exemple, l'injection intra-plantaire

du TNF α peut induire une hyperalgésie mécanique et thermique persistante (Cunha, Verri et al. 2007), en réduisant le seuil d'activation des fibres C (Junger and Sorkin 2000).

Notre étude a mesuré une expression accrue de l'ARNm du TNF α dans la moelle épinière et les GRD de la région lombaire suite à une LPNS. Les niveaux d'expression du TNF α n'ont pas été affectés par l'administration des antagonistes du RB1 ou de TRPV1, suggérant que son expression primaire est indépendante du RB1 et du TRPV1 dans la DN induite par une LPNS. Par contre, le TNF α est reconnu pour son rôle dans l'induction du RB1 (Hamza, Wang et al. 2010) et du TRPV1 (Miller, Jung et al. 2009). Une telle activation se produit lorsque le TNF α agit de concert avec l'IL-1 β (Woolf and Ma 2007). Notre étude confirme ainsi les études antérieures qui proposent un rôle important des cytokines dans le développement de l'hyperalgésie mécanique et thermique dans la DN (Cunha, Cunha et al. 2000, Guo, Wang et al. 2007, Kawasaki, Xu et al. 2008) et dans la régulation du RB1 et du TRPV1.

4.6. Le TRPV1 dans la douleur causée par la LPNS

L'activation du TRPV1 par des stimuli nociceptifs reflète son rôle primordial dans l'hyperalgésie (Caterina, Leffler et al. 2000, Palazzo, Luongo et al. 2010, Uchytlova, Spicarova et al. 2014); ce canal étant reconnu comme un capteur de chaleur (Caterina, Schumacher et al. 1997, Tominaga and Tominaga 2005) impliqué dans la détection, la transmission et la régulation de la perception douloureuse (Palazzo, Luongo et al. 2012). La régulation du TRPV1 dans la DN se produit au niveau périphérique, spinal et supraspinal (Caterina, Leffler et al. 2000, Doly, Fischer et al. 2004). La composante spinale est principalement impliquée dans l'hypoalgésie et l'analgésie causée par les antagonistes du TRPV1 (Cui, Honore et al. 2006). Certaines recherches démontrent l'implication des TRPV1

spinaux dans l'allodynie mécanique et au froid, et confirment les études qui ont suggéré la participation du TRPV1 dans la formation de l'hypersensibilité mécanique et thermique chez les souris et les rats CCN (Kanai, Nakazato et al. 2005, Watabiki, Kiso et al. 2011). Cependant, d'autres études suggèrent la participation limitée des TRPV1 centraux dans l'allodynie (Uchytlova, Spicarova et al. 2014). Par exemple, l'administration perineurale de la résinifératoxine chez le rat est inefficace dans l'allodynie mécanique (Neubert, Mannes et al. 2008). Nos résultats supportent quant à eux l'implication des TRPV1 périphériques et centraux dans l'hyperalgésie thermique et l'allodynie puisque l'expression du TRPV1 est augmentée dans les GRD et la corne dorsale, et parce que l'antagoniste du TRPV1 inhibe l'hyperalgésie thermique pour une durée d'environ 24 h et l'allodynie pour une durée de 30-40 min. Intéressante, le SB366791 a bloqué l'allodynie mécanique et au froid pendant les premières 10 min après l'injection; les rats demeuraient réfractaires à des stimulations tactiles maximales (correspondant à des filaments de von Frey de 26 g). À noter que, dans notre étude les comportements nociceptifs ont été inhibés par l'antagoniste du TRPV1 malgré des niveaux accrus d'ARNm du RB1 dans la moelle épinière; ce qui conforte l'hypothèse sur l'absence de la participation du RB1 dans le développement de l'allodynie. De plus, les comportements nociceptifs correspondaient à des niveaux accrus d'ARNm du TRPV1 dans la moelle épinière et les GRD des deux côtés ; ceci en accord avec les données précédentes (Hudson, Bevan et al. 2001, Fukuoka, Tokunaga et al. 2002, Palazzo, Luongo et al. 2010). Notez que les patrons d'expression génomique du TRPV1 et du TNF α furent similaires.

Le TNF α est capable d'augmenter la proportion de neurones immunoréactifs au TRPV1 impliqués dans la génération de l'hyperalgésie inflammatoire (Chen, Willcockson et al. 2009) en plus d'activer le trafic et l'insertion membranaire du TRPV1 (Meng, Wang et al. 2016). À

son tour, la stimulation thermique du TRPV1 peut augmenter l'expression du TNF α par un mécanisme dépendant du Ca²⁺ et de la PKC soulignant une liaison régulatrice réciproque entre le TNF α et le TRPV1 dans la DN (Miller, Jung et al. 2009). Néanmoins, l'hyperalgésie thermique induite par le TNF α implique à la fois le TRPV1 et l'IL-1 β , pour assurer son maintien (Fernandes, Passos et al. 2005, Miller, Jung et al. 2009).

Dans les modèles de douleur inflammatoire, l'augmentation de la protéine et de l'ARNm du TRPV1 dans la moelle épinière est associée à une diminution de l'astroglie (Eskander, Ruparel et al. 2015). Ainsi, une étude chez les souris dépourvues de TRPV1 soumises à une LPNS montre que l'injection intraplantaire de la capsaïcine causa une plus grande immunoloration pour les GFAP dans la moelle épinière par rapport aux souris naïves (Chen, Willcockson et al. 2009). De cette manière, lors d'une lésion nerveuse, l'antagonisme du TRPV1 pourrait induire une astroglie accrue associée à une surexpression de l'IL-1 β sur les astrocytes suivis par la surexpression du RB1 dans la moelle épinière, tel qu'observé dans notre étude. Cette astroglie et l'expression accrue de l'IL-1 β et du RB1 se fait indépendamment de l'absence de coexpression du TRPV1 et de l'IL-1 β dans la moelle épinière (Figure 3.2, A'') et malgré l'absence du TRPV1 sur la microglie (Figure 3.1, B'') et les astrocytes (Figure 3.1, A''), contrairement aux modèles inflammatoires (Doly, Fischer et al. 2004, Talbot, Chahmi et al. 2010, Marrone, Morabito et al. 2017). Le TRPV1 a été détecté sur les fibres peptidergiques (Figure 3.1 D'') et non peptidergiques (Figure 3.1, C''), la composante non peptidergique étant prédominante en conformité avec des études antérieures (Caterina, Schumacher et al. 1997, Guo, Vulchanova et al. 1999).

À titre d'observation intéressante, nous avons aussi détecté le TRPV1 dans des neurones de la corne ventrale et de la colonne intermédiolatérale de la moelle épinière lombaire dans le

groupe de rats LPNS non traités (Figure 3.3). Le phénotype cellulaire de ce marquage n'a pas été identifié car il va au-delà des objectifs de notre étude. Cependant, la distribution topographique et la morphologie de ces neurones suggèrent la présence du TRPV1 sur les motoneurones et les fibres préganglionnaires sympathiques. Cette possibilité fort intrigante demeure à être validée avec des marqueurs appropriés (eg. : l'acétylcholinestérase). Une localisation sur les neurones de 2^e ordre qui projettent aux sites supraspinaux est une autre possibilité. D'ailleurs, nous avons observé que le SB366791 produit une action sédatrice d'environ 10-15 min après l'injection; les rats demeuraient somnolents et réfractaires à des stimuli externes, suggérant un site d'action central.

4.7. L'interaction du RB1 et du TRPV1

Tel qu'illustré à la Figure 3.4, les astrocytes exprimant le RB1 entourent les fibres sensorielles qui projettent dans la moelle épinière et qui expriment le TRPV1. Une telle proximité physique des structures portant le RB1 et le TRPV1 met davantage l'accent sur la possibilité d'une régulation mutuelle entre ces deux récepteurs. Tel que mentionné plus haut, l'interaction entre le RB1 et le TRPV1 n'est pas directe (car pas de colocalisation cellulaire), mais s'accomplit indirectement par l'entremise des cytokines proinflammatoires, possiblement l'IL-1 β . Une telle régulation implique l'interaction tripartite neurone-microglie-astrocyte, la microglie ayant un rôle décisif dans la phase d'initiation de la DN (Wang, Couture et al. 2014, Tsuda and Inoue 2016) et les astrocytes dans le maintien de la DN. Ainsi, le mécanisme possible d'interaction entre le RB1 et le TRPV1 dans la DN suite à une LPNS est illustré à la Figure 4.1 et peut être décrit comme suit : la lésion nerveuse produite par la LPNS interrompt l'activité neuronale dans les fibres sensorielles lésées et initie la dégénérescence Wallérienne

qui change le patron d'expression des canaux transducteurs de la douleur, tel que le TRPV1. Aussi, la lésion nerveuse produit la libération des médiateurs proinflammatoires tels que la BK et le TNF α qui activent également le TRPV1 et sensibilisent les fibres sensorielles. La sensibilisation périphérique active la libération des neuromédiateurs sensoriels (glutamate, SP, CGRP, etc.) qui, accompagnés par des médiateurs inflammatoires, initient la sensibilisation centrale et l'activation de la microglie. La microglie, à son tour, libère des cytokines proinflammatoires (TNF α et IL- 1 β) pour induire la sensibilisation des nocicepteurs et activer les astrocytes. Ensuite, les astrocytes eux-mêmes amorcent la production de grandes quantités d'IL- 1 β , qui par un mécanisme autocrine ou paracrine, induit le RB1 à leur surface. Les astrocytes entourent les nocicepteurs de manière à ce que le RB1 et les TRPV1 se retrouvent dans une proximité étroite et peuvent interagir indirectement par l'intermédiaire de l'IL- 1 β .

Triade Neurone-Microglie-Astrocyte
SNC (matière grise)

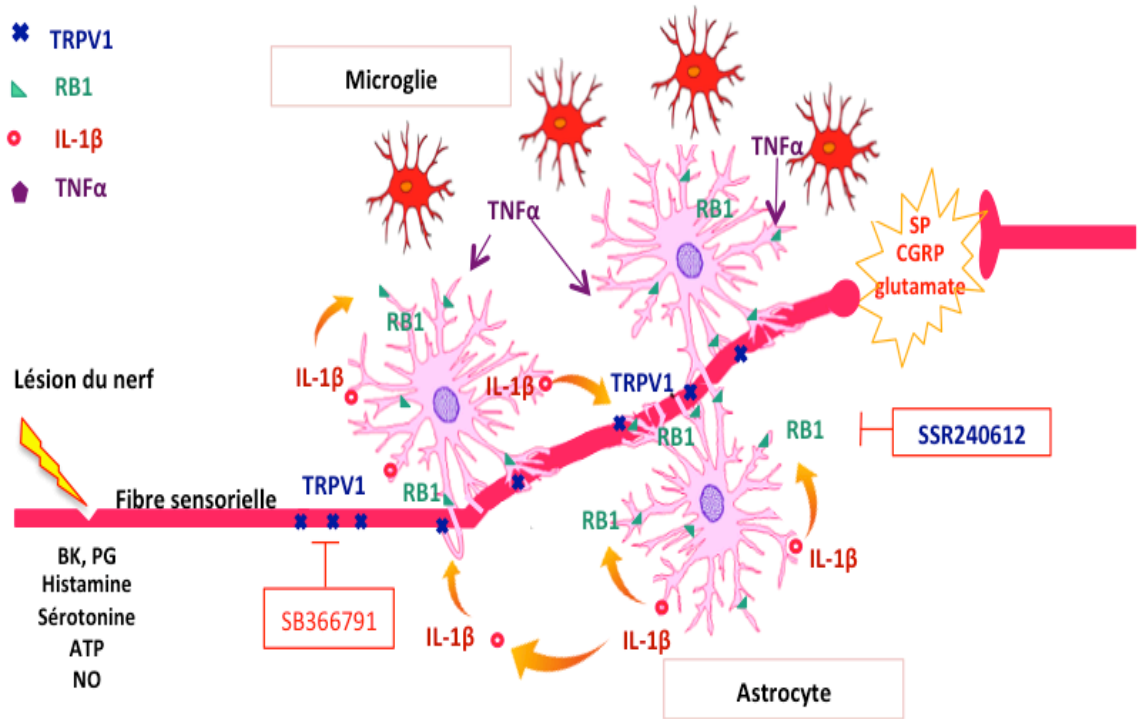


Figure 4.1. L'interaction RB1-TRPV1 dans la douleur neuropathique

4.8. Perspectives

Cette étude a montré que les cytokines TNF α et IL-1 β jouent un rôle dans l'interaction entre le RB1 et le TRPV1 dans l'évolution de la douleur neuropathique et que l'IL-1 β serait responsable de la surexpression du RB1 sur les astrocytes. Dans les conditions d'un antagonisme du TRPV1, l'induction du RB1 pourrait porter un caractère compensatoire. Ainsi, la surexpression du RB1, qui est accompagnée par une sensation douloureuse durable, pourrait servir d'indice sur la persistance de la lésion nerveuse et pourrait faire partie d'un mécanisme général d'initiation des processus réparateurs de défauts tissulaires.

Toutefois, les mécanismes exacts impliqués dans la surexpression du RB1 demeurent encore inconnus. D'autres cytokines proinflammatoires ainsi que le stress oxydant pourraient être impliqués lors d'un antagonisme du TRPV1. Pour ces raisons sont envisagées des études sur l'expression des cytokines pro-inflammatoires (IL-6) et/ou cytokines anti-inflammatoires (IL-10) et des produits d'ERO. Ce serait aussi intéressant d'analyser le degré d'induction du RB1 dans les conditions d'un antagonisme d'IL-1 β , d'IL-6 et/ou d'autres cytokines et d'un antagonisme d'ERO.

Le rôle des astrocytes dans le maintien de l'hypersensibilité douloureuse est déjà bien défini (Kawasaki, Zhuang et al. 2006, Zhang, Cheng 2009, Ren, 2010). Toutefois, ce serait pertinent de savoir le degré d'expression du RB1 dans les conditions d'une inhibition de l'activation astrocytaire associée à un antagonisme du TRPV1, ainsi que la possibilité d'induction du RB1 sur d'autres types cellulaires dans la moelle épinière ou les GRD lors d'une inhibition des astrocytes. Également, une inhibition de la microglie pourrait exclure l'implication de l'IL-1 β microgliale dans l'induction du RB1 sur les astrocytes, suggérant une interaction mutuelle entre le RB1 et l'IL-1 β d'origine astrocytaire et soutenant l'idée d'une auto-induction du RB1 sur les astrocytes. Le fait que l'antagoniste du TRPV1 produit une inhibition de l'hyperalgésie thermique et de l'allodynie avec des décours temporels différents fait suggérer la présence du TRPV1 sur différentes populations de fibres sensorielles. Puisque nos travaux ont ciblé les fibres de type C polymodales qui sont d'avantage impliquées dans l'hyperalgésie thermique, il serait pertinent d'étudier l'expression du TRPV1 sur les fibres A δ et A β dans ce modèle de douleur neuropathique.

En outre, nos résultats sur l'expression du TRPV1 sur les neurones intraspinaux de la corne ventrale de la moelle épinière suite à une LPNS pourraient ouvrir une nouvelle approche dans la compréhension de la pathogénèse de la douleur neuropathique et nécessite une étude approfondie.

Conclusion

La DN est un phénomène complexe qui comporte de multiples interactions rendant difficile le développement d'une cible thérapeutique spécifique et efficace. Notre étude met en lumière l'interaction réciproque du RB1 et du TRPV1 dans la DN. Ainsi, l'antagonisme du TRPV1 entraîne une astrogliose avec une surexpression du RB1 dans la moelle épinière, suggérant un synergisme fonctionnel entre ces deux récepteurs et un mécanisme compensateur. Ceci peut expliquer l'effet mitigé des antagonistes du TRPV1 en clinique. Le RB1 serait capable d'engendrer une DN réfractaire aux traitements avec les antagonistes du TRPV1. En revanche, l'antagonisme du RB1 n'induit pas les mêmes effets sur l'expression du TRPV1. Ainsi, le SSR240612 cause un renversement de l'expression du TRPV1 vers les valeurs basales et bloque l'astrogliose et l'hyperalgésie thermique. Étant donné que l'inhibition du RB1 ne bloque pas l'allodynie, nous recommandons de bloquer les 2 récepteurs (TRPV1 et RB1) dans une approche thérapeutique plus complète. Cette hypothèse demande toutefois à être validée dans de prochaines études précliniques.

Bibliographie

Amaya, F., H. Wang, M. Costigan, A. J. Allchorne, J. P. Hatcher, J. Egerton, T. Stean, V. Morisset, D. Grose, M. J. Gunthorpe, I. P. Chessell, S. Tate, P. J. Green and C. J. Woolf (2006). "The voltage-gated sodium channel Na(v)1.9 is an effector of peripheral inflammatory pain hypersensitivity." J Neurosci **26**(50): 12852-12860.

Ambron, R. T. and E. T. Walters (1996). "Priming events and retrograde injury signals." Molec Neurobiol **13**(1): 61-79.

Ambrosino, P., M. V. Soldovieri, C. Russo and M. Taglialatela (2013). "Activation and desensitization of TRPV1 channels in sensory neurons by the PPAR α agonist palmitoylethanolamide." Br J Pharmacol **168**(6): 1430-1444.

Angers, S., A. Salahpour and M. Bouvier (2002). "Dimerization: An Emerging Concept for G Protein-Coupled Receptor Ontogeny and Function." Annu Rev Pharmacol Toxicol **42**(1): 409-435.

Aoki, S., Q. Su, H. Li, K. Nishikawa, K. Ayukawa, Y. Hara, K. Namikawa, S. Kiryu-Seo, H. Kiyama and K. Wada (2002). "Identification of an Axotomy-Induced Glycosylated Protein, AIGP1, Possibly Involved in Cell Death Triggered by Endoplasmic Reticulum-Golgi Stress." J Neurosci **22**(24): 10751.

Austin, C. E., J. C. Foreman and G. K. Scadding (1994). "Reduction by Hoe 140, the B2 kinin receptor antagonist, of antigen-induced nasal blockage." Br J Pharmacol **111**(4): 969-971.

Austinat, M., S. Braeuninger, J. B. Pesquero, M. Brede, M. Bader, G. Stoll, T. Renne and C. Kleinschnitz (2009). "Blockade of bradykinin receptor B1 but not bradykinin receptor B2 provides protection from cerebral infarction and brain edema." Stroke **40**(1): 285-293.

Backonja, M. M., N. Attal, R. Baron, D. Bouhassira, M. Drangholt, P. J. Dyck, R. R. Edwards, R. Freeman, R. Gracely, M. H. Haanpaa, P. Hansson, S. M. Hatem, E. K. Krumova, T. S. Jensen, C. Maier, G. Mick, A. S. Rice, R. Rolke, R. D. Treede, J. Serra, T. Toelle, V. Tugnoli, D. Walk, M. S. Walalce, M. Ware, D. Yarnitsky and D. Ziegler (2013). "Value of quantitative sensory testing in neurological and pain disorders: NeuPSIG consensus." Pain **154**(9): 1807-1819.

Baron, R. (2006). "Mechanisms of disease: neuropathic pain--a clinical perspective." Nat Clin Pract Neurol **2**(2): 95-106.

Basbaum, A. I., D. M. Bautista, G. Scherrer and D. Julius (2009). "Cellular and molecular mechanisms of pain." Cell **139**(2): 267-284.

Basbaum, A. I. and C. J. Woolf (1999). "Pain." Curr Biol **9**(12): R429-431.

Basu, A., J. K. Krady and S. W. Levison (2004). "Interleukin-1: a master regulator of neuroinflammation." J Neurosci Res **78**(2): 151-156.

Beissner, F., A. Brandau, C. Henke, L. Felden, U. Baumgärtner, R.-D. Treede, B. G. Oertel and J. Lötsch (2010). "Quick Discrimination of A(delta) and C Fiber Mediated Pain Based on Three Verbal Descriptors." PLoS ONE **5**(9): e12944.

Bennett, G. J. and Y. K. Xie (1988). "A peripheral mononeuropathy in rat that produces disorders of pain sensation like those seen in man." Pain **33**(1): 87-107.

Berger, J. V., L. Knaepen, S. P. Janssen, R. J. Jaken, M. A. Marcus, E. A. Joosten and R. Deumens (2011). "Cellular and molecular insights into neuropathy-induced pain hypersensitivity for mechanism-based treatment approaches." Brain Res Rev **67**(1-2): 282-310.

Berta, T., T. Liu, Y. C. Liu, Z. Z. Xu and R. R. Ji (2012). "Acute morphine activates satellite glial cells and up-regulates IL-1beta in dorsal root ganglia in mice via matrix metalloprotease-9." Mol Pain **8**: 18.

Bertin, S., Y. Aoki-Nonaka, P. R. de Jong, L. L. Nohara, H. Xu, S. R. Stanwood, S. Srikanth, J. Lee, K. To, L. Abramson, T. Yu, T. Han, R. Touma, X. Li, J. M. Gonzalez-Navajas, S. Herdman, M. Corr, G. Fu, H. Dong, Y. Gwack, A. Franco, W. A. Jefferies and E. Raz (2014). "The ion channel TRPV1 regulates the activation and proinflammatory properties of CD4(+) T cells." Nat Immunol **15**(11): 1055-1063.

Binshtok, A. M., H. Wang, K. Zimmermann, F. Amaya, D. Vardeh, L. Shi, G. J. Brenner, R. R. Ji, B. P. Bean, C. J. Woolf and T. A. Samad (2008). "Nociceptors are interleukin-1beta sensors." J Neurosci **28**(52): 14062-14073.

Bouhassira, D. (2008). "Définition et classification des douleurs neuropathiques." La Presse Médicale **37**(2, Part 2): 311-314.

Bouhassira, D., N. Attal, H. Alchaar, F. Boureau, B. Brochet, J. Bruxelle, G. Cunin, J. Fermanian, P. Ginies, A. Grun-Overdyking, H. Jafari-Schluep, M. Lanteri-Minet, B. Laurent, G. Mick, A. Serrie, D. Valade and E. Vicaut (2005). "Comparison of pain syndromes associated with nervous or somatic lesions and development of a new neuropathic pain diagnostic questionnaire (DN4)." Pain **114**(1-2): 29-36.

Bourinet, E., C. Altier, M. E. Hildebrand, T. Trang, M. W. Salter and G. W. Zamponi (2014). "Calcium-permeable ion channels in pain signaling." Physiol Rev **94**(1): 81-140.

Bradman, M. J., D. K. Arora, R. Morris and T. Thippeswamy (2010). "How do the satellite glia cells of the dorsal root ganglia respond to stressed neurons?--nitric oxide saga from embryonic development to axonal injury in adulthood." Neuron Glia Biol **6**(1): 11-17.

Brechter, A. B., E. Persson, I. Lundgren and U. H. Lerner (2008). "Kinin B1 and B2 receptor expression in osteoblasts and fibroblasts is enhanced by interleukin-1 and tumour necrosis factor- α . Effects dependent on activation of NF- κ B and MAP kinases." Bone **43**(1): 72-83.

Brell, J. M. (2014). "Animal models of peripheral neuropathy: modeling what we feel, understanding what they feel." ILAR J **54**, (3): 253–258

Bruehl, S. (2010). "An update on the pathophysiology of complex regional pain syndrome." Anesthesiology **113**(3): 713-725.

Calixto, J. B., R. Medeiros, E. S. Fernandes, J. Ferreira, D. A. Cabrini and M. M. Campos (2004). "Kinin B1 receptors: key G-protein-coupled receptors and their role in inflammatory and painful processes." Br J Pharmacol **143**(7): 803-818.

Campbell, D. J. (2013). Chapter 188 - Bradykinin Peptides A2 - Kastin, Abba J. Handbook of Biologically Active Peptides (Second Edition). Boston, Academic Press: 1386-1393.

Campbell, J. N. and R. A. Meyer (2006). "Mechanisms of neuropathic pain." Neuron **52**(1): 77-92.

Campos, M. M., L. V. Mata and J. B. Calixto (1995). "Expression of B1 kinin receptors mediating paw edema and formalin-induced nociception. Modulation by glucocorticoids." Can J Physiol Pharmacol **73**(7): 812-819.

Campos, M. M., G. E. Souza and J. B. Calixto (1999). "In vivo B1 kinin-receptor upregulation. Evidence for involvement of protein kinases and nuclear factor kappaB pathways." Br J Pharmacol **127**(8): 1851-1859.

Cao, E., M. Liao, Y. Cheng and D. Julius (2013). "TRPV1 structures in distinct conformations reveal activation mechanisms." Nature **504**(7478): 113-118.

Carlton, S. M., P. M. Dougherty, C. M. Pover and R. E. Coggeshall (1991). "Neuroma formation and numbers of axons in a rat model of experimental peripheral neuropathy." Neurosci Lett **131**(1): 88-92.

Carniglia, L., D. Ramírez, D. Durand, J. Saba, J. Turati, C. Caruso, T. N. Scimonelli and M. Lasaga (2017). "Neuropeptides and Microglial Activation in Inflammation, Pain, and Neurodegenerative Diseases." Mediators Inflamm **2017**: 5048616.

Caterina, M. J. (2007). "Transient receptor potential ion channels as participants in thermosensation and thermoregulation." Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol **292**(1): R64-76.

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

Caterina, M. J., A. Leffler, A. B. Malmberg, W. J. Martin, J. Trafton, K. R. Petersen-Zeitz, M. Koltzenburg, A. I. Basbaum and D. Julius (2000). "Impaired nociception and pain sensation in mice lacking the capsaicin receptor." Science **288**(5464): 306-313.

Caterina, M. J., M. A. Schumacher, M. Tominaga, T. A. Rosen, J. D. Levine and D. Julius (1997). "The capsaicin receptor: a heat-activated ion channel in the pain pathway." Nature **389**(6653): 816-824.

Charignon, D., S. Peter, L. Martin and C. Drouet (2012). Icatibant, the bradykinin B2 receptor antagonist with target to the interconnected kinin systems. Expert Opin Pharmacother. 2012 Oct;13(15):2233-47

Chen, J. J., J. H. Lue, L. H. Lin, C. T. Huang, R. P. Chiang, C. L. Chen and Y. J. Tsai (2010). "Effects of pre-emptive drug treatment on astrocyte activation in the cuneate nucleus following rat median nerve injury." Pain **148**(1): 158-166.

Chen, Y., H. H. Willcockson and J. G. Valtchanoff (2009). "Influence of the vanilloid receptor TRPV1 on the activation of spinal cord glia in mouse models of pain." Exp Neurol **220**(2): 383-390.

Chiang, H., N. Ohno, Y.-L. Hsieh, D. J. Mahad, S. Kikuchi, H. Komuro, S.-T. Hsieh and B. D. Trapp (2015). "Mitochondrial fission augments capsaicin-induced axonal degeneration." Acta Neuropathologica **129**: 81-96.

Chuang, H. H., E. D. Prescott, H. Kong, S. Shields, S. E. Jordt, A. I. Basbaum, M. V. Chao and D. Julius (2001). "Bradykinin and nerve growth factor release the capsaicin receptor from PtdIns(4,5)P2-mediated inhibition." Nature **411**(6840): 957-962.

Clark, A. K., D. Gruber-Schoffnegger, R. Drdla-Schutting, K. J. Gerhold, M. Malcangio and J. Sandkühler (2015). "Selective Activation of Microglia Facilitates Synaptic Strength." J of Neurosci **35**(11): 4552-4570.

Colburn, R. W., A. J. Rickman and J. A. DeLeo (1999). "The effect of site and type of nerve injury on spinal glial activation and neuropathic pain behavior." Exp Neurol **157**(2): 289-304.

Colloca, L., T. Ludman, D. Bouhassira, R. Baron, A. H. Dickenson, D. Yarnitsky, R. Freeman, A. Truini, N. Attal, N. B. Finnerup, C. Eccleston, E. Kalso, D. L. Bennett, R. H. Dworkin and S. N. Raja (2017). "Neuropathic pain." Nature reviews. Disease primers **3**: 17002-17002.

Colombo, E. and C. Farina (2016). "Astrocytes: Key Regulators of Neuroinflammation." Trends Immunol **37**(9): 608-620.

Costa, R., E. M. Motta, R. C. Dutra, M. N. Manjavachi, A. F. Bento, F. R. Malinsky, J. B. Pesquero and J. B. Calixto (2011). "Anti-nociceptive effect of kinin B(1) and B(2) receptor antagonists on peripheral neuropathy induced by paclitaxel in mice." Br J Pharmacol **164**(2b): 681-693.

Coull, J. A., D. Boudreau, K. Bachand, S. A. Prescott, F. Nault, A. Sik, P. De Koninck and Y. De Koninck (2003). "Trans-synaptic shift in anion gradient in spinal lamina I neurons as a mechanism of neuropathic pain." Nature **424**(6951): 938-942.

Coull, J. A. M., S. Beggs, D. Boudreau, D. Boivin, M. Tsuda, K. Inoue, C. Gravel, M. W. Salter and Y. De Koninck (2005). "BDNF from microglia causes the shift in neuronal anion gradient underlying neuropathic pain." Nature **438**: 1017.

Coutaux, A., F. Adam, J. C. Willer and D. Le Bars (2005). "Hyperalgesia and allodynia: peripheral mechanisms." Joint Bone Spine **72**(5): 359-371.

Couture, R., N. Blaes and J. P. Girolami (2014). "Kinin receptors in vascular biology and pathology." Curr Vasc Pharmacol **12**(2): 223-248.

Couture, R. and J.-P. Girolami (2004). "Putative roles of kinin receptors in the therapeutic effects of angiotensin 1-converting enzyme inhibitors in diabetes mellitus." Eur J Pharmacol **500**(1-3): 467-485.

Couture, R., M. Harrisson, R. M. Vianna and F. Cloutier (2001). "Kinin receptors in pain and inflammation." Eur J Pharmacol **429**(1-3): 161-176.

Couture, R. and C. J. Lindsey (2000). Chapter VII Brain kallikrein–kinin system: from receptors to neuronal pathways and physiological functions. Handbook of Chemical Neuroanatomy. R. Quirion, A. Björklund and T. Hökfelt, Elsevier. **16**: 241-300.

Cui, J. G., S. Holmin, T. Mathiesen, B. A. Meyerson and B. Linderoth (2000). "Possible role of inflammatory mediators in tactile hypersensitivity in rat models of mononeuropathy." Pain **88**(3): 239-248.

Cui, M., P. Honore, C. Zhong, D. Gauvin, J. Mikusa, G. Hernandez, P. Chandran, A. Gomtsyan, B. Brown, E. K. Bayburt, K. Marsh, B. Bianchi, H. McDonald, W. Niforatos, T. R. Neelands, R. B. Moreland, M. W. Decker, C. H. Lee, J. P. Sullivan and C. R. Faltynek (2006). "TRPV1 receptors in the CNS play a key role in broad-spectrum analgesia of TRPV1 antagonists." J Neurosci **26**(37): 9385-9393.

Cunha, J. M., F. Q. Cunha, S. Poole and S. H. Ferreira (2000). "Cytokine-mediated inflammatory hyperalgesia limited by interleukin-1 receptor antagonist." Br J Pharmacol **130**(6): 1418-1424.

Cunha, T. M., W. A. Verri, Jr., S. Y. Fukada, A. T. Guerrero, T. Santodomingo-Garzon, S. Poole, C. A. Parada, S. H. Ferreira and F. Q. Cunha (2007). "TNF-alpha and IL-1beta mediate inflammatory hypernociception in mice triggered by B1 but not B2 kinin receptor." Eur J Pharmacol **573**(1-3): 221-229.

Curtis, M. J., R. A. Bond, D. Spina, A. Ahluwalia, S. P. Alexander, M. A. Giembycz, A. Gilchrist, D. Hoyer, P. A. Insel, A. A. Izzo, A. J. Lawrence, D. J. MacEwan, L. D. Moon, S. Wonnacott, A. H. Weston and J. C. McGrath (2015). "Experimental design and analysis and their reporting: new guidance for publication in BJP." Br J Pharmacol **172**(14): 3461-3471.

Davis, J. B., J. Gray, M. J. Gunthorpe, J. P. Hatcher, P. T. Davey, P. Overend, M. H. Harries, J. Latcham, C. Clapham, K. Atkinson, S. A. Hughes, K. Rance, E. Grau, A. J. Harper, P. L. Pugh, D. C. Rogers, S. Bingham, A. Randall and S. A. Sheardown (2000). "Vanilloid receptor-1 is essential for inflammatory thermal hyperalgesia." Nature **405**(6783): 183-187.

De Brito Gariépy, H., S. Talbot, J. Senecal and R. Couture (2013). "Brain kinin B(1) receptor contributes to the onset of stereotypic nocifensive behavior in rat." Behav Brain Res **241**: 17-26.

Desposito, D., G. Zadigue, C. Taveau, C. Adam, F. Alhenc-Gelas, N. Bouby and R. Roussel (2017). "Neuroprotective effect of kinin B1 receptor activation in acute cerebral ischemia in diabetic mice." Sci Rep **7**(1): 9410.

Dias, J. P., M. A. Ismael, M. Pilon, J. de Champlain, B. Ferrari, P. Carayon and R. Couture (2007). "The kinin B1 receptor antagonist SSR240612 reverses tactile and cold allodynia in an experimental rat model of insulin resistance." Br J Pharmacol **152**(2): 280-287.

Dias, J. P., S. Talbot, J. Senecal, P. Carayon and R. Couture (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**(9): e12622.

Doly, S., J. Fischer, C. Salio and M. Conrath (2004). "The vanilloid receptor-1 is expressed in rat spinal dorsal horn astrocytes." Neuroscience letters **357**(2): 123-126.

DomBourian, M. G., N. A. Turner, T. A. Gerovac, R. Vemuganti, G. S. Miranpuri, K. Tureyen, I. Satriotomo, V. Miletic and D. K. Resnick (2006). "B1 and TRPV-1 receptor genes and their relationship to hyperalgesia following spinal cord injury." Spine (Phila Pa 1976) **31**(24): 2778-2782.

Dong, F., Y. R. Du, W. Xie, J. A. Strong, X. J. He and J. M. Zhang (2012). "Increased function of the TRPV1 channel in small sensory neurons after local inflammation or in vitro exposure to the pro-inflammatory cytokine GRO/KC." Neurosci Bull **28**(2): 155-164.

Dubin, A. E. and A. Patapoutian (2010). "Nociceptors: the sensors of the pain pathway." J Clin Invest **120**(11): 3760-3772.

Dutra, R. C., A. F. Bento, D. F. Leite, M. N. Manjavachi, R. Marcon, M. A. Bicca, J. B. Pesquero and J. B. Calixto (2013). "The role of kinin B1 and B2 receptors in the persistent pain induced by experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) in mice: evidence for the involvement of astrocytes." Neurobiol Dis **54**: 82-93.

Dworkin, R. H., A. B. O'Connor, J. Audette, R. Baron, G. K. Gourlay, M. L. Haanpää, J. L. Kent, E. J. Krane, A. A. LeBel, R. M. Levy, S. C. Mackey, J. Mayer, C. Miaskowski, S. N. Raja, A. S. C. Rice, K. E. Schmader, B. Stacey, S. Stanos, R.-D. Treede, D. C. Turk, G. A. Walco and C. D. Wells (2010). "Recommendations for the Pharmacological Management of Neuropathic Pain: An Overview and Literature Update." Mayo Clinic Proceedings **85**(3 Suppl): S3-S14.

El Akoum, S., Y. Haddad and R. Couture (2017). "Impact of pioglitazone and bradykinin type 1 receptor antagonist on type 2 diabetes in high-fat diet-fed C57BL/6J mice." Obesity Science & Practice **3**(3): 352-362.

England, S., F. Hebllich, I. F. James, J. Robbins and R. J. Docherty (2001). "Bradykinin evokes a Ca²⁺-activated chloride current in non-neuronal cells isolated from neonatal rat dorsal root ganglia." J Physiol **530**(Pt 3): 395-403.

Enquist, J., C. Skroder, J. L. Whistler and L. M. Leeb-Lundberg (2007). "Kinins promote B2 receptor endocytosis and delay constitutive B1 receptor endocytosis." Mol Pharmacol **71**(2): 494-507.

Ernsberger, U. (2008). "The role of GDNF family ligand signalling in the differentiation of sympathetic and dorsal root ganglion neurons." Cell and Tissue Research **333**(3): 353-371.

Eskander, M. A., S. Ruparel, D. P. Green, P. B. Chen, E. D. Por, N. A. Jeske, X. Gao, E. R. Flores and K. M. Hargreaves (2015). "Persistent Nociception Triggered by Nerve Growth

Factor (NGF) Is Mediated by TRPV1 and Oxidative Mechanisms." J Neurosci **35**(22): 8593-8603.

Facci, L., M. Barbierato, C. Marinelli, C. Argentini, S. D. Skaper and P. Giusti (2014). "Toll-Like Receptors 2, -3 and -4 Prime Microglia but not Astrocytes Across Central Nervous System Regions for ATP-Dependent Interleukin-1 β Release." Scientific Reports **4**: 6824.

Facer, P., M. A. Casula, G. D. Smith, C. D. Benham, I. P. Chessell, C. Bountra, M. Sinisi, R. Birch and P. Anand (2007). "Differential expression of the capsaicin receptor TRPV1 and related novel receptors TRPV3, TRPV4 and TRPM8 in normal human tissues and changes in traumatic and diabetic neuropathy." BMC Neurol **7**: 11.

Fellin, T., O. Pascual and P. G. Haydon (2006). "Astrocytes Coordinate Synaptic Networks: Balanced Excitation and Inhibition." Physiology **21**(3): 208-215.

Fernandes, E. S., G. F. Passos, M. M. Campos, G. E. de Souza, J. F. Fittipaldi, J. L. Pesquero, M. M. Teixeira and J. B. Calixto (2005). "Cytokines and neutrophils as important mediators of platelet-activating factor-induced kinin B1 receptor expression." Br J Pharmacol **146**(2): 209-216.

Ferreira, J., A. Beirith, M. A. Mori, R. C. Araujo, M. Bader, J. B. Pesquero and J. B. Calixto (2005). "Reduced nerve injury-induced neuropathic pain in kinin B1 receptor knock-out mice." J Neurosci **25**(9): 2405-2412.

Ferreira, J., M. M. Campos, R. Araujo, M. Bader, J. B. Pesquero and J. B. Calixto (2002). "The use of kinin B1 and B2 receptor knockout mice and selective antagonists to characterize the nociceptive responses caused by kinins at the spinal level." Neuropharmacology **43**(7): 1188-1197.

Ferreira, J., M. M. Campos, J. B. Pesquero, R. C. Araujo, M. Bader and J. B. Calixto (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**(8): 1006-1012.

Ferreira, J., G. L. da Silva and J. B. Calixto (2004). "Contribution of vanilloid receptors to the overt nociception induced by B(2) kinin receptor activation in mice." Br J Pharmacol **141**(5): 787-794.

Ferreira, S. H., B. B. Lorenzetti and S. Poole (1993). "Bradykinin initiates cytokine-mediated inflammatory hyperalgesia." Br J Pharmacol **110**(3): 1227-1231.

Fields, H. L., M. Rowbotham and R. Baron (1998). "Postherpetic neuralgia: irritable nociceptors and deafferentation." Neurobiol Dis **5**(4): 209-227.

Finnerup, N. B., S. Haroutounian, P. Kamerman, R. Baron, D. L. H. Bennett, D. Bouhassira, G. Cruccu, R. Freeman, P. Hansson, T. Nurmikko, S. N. Raja, A. S. C. Rice, J. Serra, B. H. Smith, R.-D. Treede and T. S. Jensen (2016). "Neuropathic pain: an updated grading system for research and clinical practice." Pain **157**(8): 1599-1606.

Fox, A., G. Wotherspoon, K. McNair, L. Hudson, S. Patel, C. Gentry and J. Winter (2003). "Regulation and function of spinal and peripheral neuronal B1 bradykinin receptors in inflammatory mechanical hyperalgesia." Pain **104**(3): 683-691.

Fregnan, F., L. Muratori, A. R. Simões, M. G. Giacobini-Robecchi and S. Raimondo (2012). "Role of inflammatory cytokines in peripheral nerve injury." Neural Regen Res **7**(29): 2259-2266.

Freyenhagen, R., R. Baron, T. Tolle, E. Stemmler, U. Gockel, M. Stevens and C. Maier (2006). "Screening of neuropathic pain components in patients with chronic back pain associated with nerve root compression: a prospective observational pilot study (MIPORT)." Curr Med Res Opin **22**(3): 529-537.

Fukuoka, T., A. Tokunaga, T. Tachibana, Y. Dai, H. Yamanaka and K. Noguchi (2002). "VR1, but not P2X(3), increases in the spared L4 DRG in rats with L5 spinal nerve ligation." Pain **99**(1-2): 111-120.

Gabay, E. and M. Tal (2004). "Pain behavior and nerve electrophysiology in the CCI model of neuropathic pain." Pain **110**(1-2): 354-360.

Gabra, B. H., R. Couture and P. Sirois (2003). "[Functional duality of kinin receptors in pathophysiology]." Med Sci (Paris) **19**(11): 1101-1110.

Gabra, B. H., V. F. Merino, M. Bader, J. B. Pesquero and P. Sirois (2005). "Absence of diabetic hyperalgesia in bradykinin B1 receptor-knockout mice." Regul Pept **127**(1-3): 245-248.

Gakuba, C. and T. Gaberel (2017). Chapter 15. Cerebrovascular Activity of Peptides Generated by Central Nervous System. Primer on Cerebrovascular Diseases. J Neurosci **2**(2017): 82-86

Gao, W., Y. Zan, Z. J. Wang, X. Y. Hu and F. Huang (2016). "Quercetin ameliorates paclitaxel-induced neuropathic pain by stabilizing mast cells, and subsequently blocking PKCepsilon-dependent activation of TRPV1." Acta Pharmacol Sin **37**(9): 1166-1177.

Gao, Y. J. and R. R. Ji (2010). "Targeting astrocyte signaling for chronic pain." Neurotherapeutics **7**(4): 482-493.

Garcia-Larrea, L. and M. Magnin (2008). Physiopathologie de la douleur neuropathique : revue des modèles expérimentaux et des mécanismes proposés. La Presse Médicale **37**:2, 315-340.

Gilron, I., R. Baron and T. Jensen (2015). "Neuropathic pain: principles of diagnosis and treatment." Mayo Clin Proc **90**(4): 532-545.

Gobeil, F., A. Fortier, T. Zhu, M. Bossolasco, M. Leduc, M. Grandbois, N. Heveker, G. Bkaily, S. Chemtob and D. Barbaz (2006). "G-protein-coupled receptors signalling at the cell nucleus: an emerging paradigm." Can J Physiol Pharmacol **84**(3-4): 287-297.

Gougat, J., B. Ferrari, L. Sarran, C. Planchenault, M. Poncelet, J. Maruani, R. Alonso, A. Cudennec, T. Croci, F. Guagnini, K. Urban-Szabo, J. P. Martinolle, P. Soubrie, O. Finance and G. Le Fur (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**(2): 661-669.

Graeber, M. B. and M. J. Christie (2012). "Multiple mechanisms of microglia: a gatekeeper's contribution to pain states." Exp Neurol **234**(2): 255-261.

Gregg, E. W., P. Sorlie, R. Paulose-Ram, Q. Gu, M. S. Eberhardt, M. Wolz, V. Burt, L. Curtin, M. Engelgau and L. Geiss (2004). "Prevalence of lower-extremity disease in the US adult population ≥ 40 years of age with and without diabetes: 1999-2000 national health and nutrition examination survey." Diabetes Care **27**(7): 1591-1597.

Gunthorpe, M. J., M. H. Harries, R. K. Prinjha, J. B. Davis and A. Randall (2000). "Voltage- and time-dependent properties of the recombinant rat vanilloid receptor (rVR1)." J Physiol **525 Pt 3**: 747-759.

Gunthorpe, M. J., H. K. Rami, J. C. Jerman, D. Smart, C. H. Gill, E. M. Soffin, S. Luis Hannan, S. C. Lappin, J. Egerton, G. D. Smith, A. Worby, L. Howett, D. Owen, S. Nasir, C. H. Davies, M. Thompson, P. A. Wyman, A. D. Randall and J. B. Davis (2004). "Identification and characterisation of SB-366791, a potent and selective vanilloid receptor (VR1/TRPV1) antagonist." Neuropharmacology **46**(1): 133-149.

Guo, A., L. Vulchanova, J. Wang, X. Li and R. Elde (1999). "Immunocytochemical localization of the vanilloid receptor 1 (VR1): relationship to neuropeptides, the P2X3 purinoceptor and IB4 binding sites." Eur J Neurosci **11**(3): 946-958.

Guo, W., H. Wang, M. Watanabe, K. Shimizu, S. Zou, S. C. LaGraize, F. Wei, R. Dubner and K. Ren (2007). "Glial—Cytokine—Neuronal Interactions Underlying the Mechanisms of Persistent Pain." J neurosci **27**(22): 6006-6018.

Hachana, S., M. Bhat, J. Sénécal, F. Huppé-Gourgues, R. Couture and E. Vaucher (2018). "Expression, distribution and function of kinin B1 receptor in the rat diabetic retina." Br J Pharmacol **175**(6): 968-983.

Haddad, Y. and R. Couture (2016). "Interplay between the kinin B1 receptor and inducible nitric oxide synthase in insulin resistance." Br J Pharmacol **173**(12): 1988-2000.

Haddad, Y. and R. Couture (2017). "Kininase 1 As a Preclinical Therapeutic Target for Kinin B1 Receptor in Insulin Resistance." Front Pharmacol **8**: 509.

Hamza, M., X. M. Wang, A. Adam, J. S. Brahim, J. S. Rowan, G. N. Carmona and R. A. Dionne (2010). "Kinin B1 receptors contributes to acute pain following minor surgery in humans." Mol Pain **6**: 12.

Han, Y., Y. Li, X. Xiao, J. Liu, X. L. Meng, F. Y. Liu, G. G. Xing and Y. Wan (2012). "Formaldehyde up-regulates TRPV1 through MAPK and PI3K signaling pathways in a rat model of bone cancer pain." Neurosci Bull **28**(2): 165-172.

Hanisch, U.-K. and H. Kettenmann (2007). "Microglia: active sensor and versatile effector cells in the normal and pathologic brain." Nature Neuroscience **10**: 1387.

Hartung, J. E., O. Eskew, T. Wong, I. E. Tchivileva, F. A. Oladosu, S. C. O'Buckley and A. G. Nackley (2015). "Nuclear factor-kappa B regulates pain and COMT expression in a rodent model of inflammation." Brain, behavior, and immunity **50**: 196-202.

Heitsch, H. (2003). "The therapeutic potential of bradykinin B2 receptor agonists in the treatment of cardiovascular disease." Expert Opin Investig Drugs **12**(5): 759-770.

Herrero, J. F., J. M. Laird and J. A. Lopez-Garcia (2000). "Wind-up of spinal cord neurones and pain sensation: much ado about something?" Prog Neurobiol **61**(2): 169-203.

Holló, K., L. Ducza, Z. Hegyi, K. Dócs, K. Hegedűs, E. Bakk, I. Papp, G. Kis, Z. Mészár, Z. Bardóczi and M. Antal (2017). "Interleukin-1 receptor type 1 is overexpressed in neurons but not in glial cells within the rat superficial spinal dorsal horn in complete Freund adjuvant-induced inflammatory pain." J Neuroinflamm **14**(1): 125.

Hopp, S. and C. Albert-Weissenberger (2015). "The kallikrein-kinin system: a promising therapeutic target for traumatic brain injury." Neural Regen Res **10**(6): 885-886.

Huang, J., X. Zhang and P. A. McNaughton (2006). "Inflammatory pain: the cellular basis of heat hyperalgesia." Curr Neuropharmacol **4**(3): 197-206.

Huang, W. X., F. Yu, R. M. Sanchez, Y. Q. Liu, J. W. Min, J. J. Hu, N. B. Bsoul, S. Han, J. Yin, W. H. Liu, X. H. He and B. W. Peng (2015). "TRPV1 promotes repetitive febrile seizures by pro-inflammatory cytokines in immature brain." Brain Behav Immun **48**: 68-77.

Huang, Y., D. E. Smith, O. Ibanez-Sandoval, J. E. Sims and W. J. Friedman (2011). "Neuron-specific effects of interleukin-1beta are mediated by a novel isoform of the IL-1 receptor accessory protein." J Neurosci **31**(49): 18048-18059.

Hudson, L. J., S. Bevan, G. Wotherspoon, C. Gentry, A. Fox and J. Winter (2001). "VR1 protein expression increases in undamaged DRG neurons after partial nerve injury." Eur J Neurosci **13**(11): 2105-2114.

Ifuku, M., K. Farber, Y. Okuno, Y. Yamakawa, T. Miyamoto, C. Nolte, V. F. Merrino, S. Kita, T. Iwamoto, I. Komuro, B. Wang, G. Cheung, E. Ishikawa, H. Ooboshi, M. Bader, K. Wada, H. Kettenmann and M. Noda (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**(48): 13065-13073.

Inoue, A., K. Ikoma, N. Morioka, K. Kumagai, T. Hashimoto, I. Hide and Y. Nakata (1999). "Interleukin-1beta induces substance P release from primary afferent neurons through the cyclooxygenase-2 system." J Neurochem **73**(5): 2206-2213.

Jaggi, A. S., V. Jain and N. Singh (2011). "Animal models of neuropathic pain." Fundam Clin Pharmacol **25**(1): 1-28.

Jancso, N., A. Jancso-Gabor and J. Szolcsanyi (1967). "Direct evidence for neurogenic inflammation and its prevention by denervation and by pretreatment with capsaicin." Br J Pharmacol Chemother **31**(1): 138-151.

Jardin, I., J. J. Lopez, R. Diez, J. Sanchez-Collado, C. Cantonero, L. Albarran, G. E. Woodard, P. C. Redondo, G. M. Salido, T. Smani and J. A. Rosado (2017). "TRPs in Pain Sensation." Front Physiol **8**: 392.

Jensen, T. S. and N. B. Finnerup (2014). "Allodynia and hyperalgesia in neuropathic pain: clinical manifestations and mechanisms." Lancet Neurol **13**(9): 924-935.

Jeong, H.-K., K. Ji, K. Min and E.-H. Joe (2013). "Brain Inflammation and Microglia: Facts and Misconceptions." Exp Neurobiology **22**(2): 59-67.

Ji, R. R. and M. R. Suter (2007). "p38 MAPK, microglial signaling, and neuropathic pain." Mol Pain **3**: 33.

Ji, R. R. and C. J. Woolf (2001). "Neuronal plasticity and signal transduction in nociceptive neurons: implications for the initiation and maintenance of pathological pain." Neurobiol Dis **8**(1): 1-10.

Julius, D. (2013). "TRP channels and pain." Annu Rev Cell Dev Biol **29**: 355-384.

Julius, D. and A. I. Basbaum (2001). "Molecular mechanisms of nociception." Nature **413**(6852): 203-210.

Junger, H. and L. S. Sorkin (2000). "Nociceptive and inflammatory effects of subcutaneous TNFalpha." Pain **85**(1-2): 145-151.

Kakoki, M., K. A. Sullivan, C. Backus, J. M. Hayes, S. S. Oh, K. Hua, A. M. H. Gasim, H. Tomita, R. Grant, S. B. Nossov, H.-S. Kim, J. C. Jennette, E. L. Feldman and O. Smithies (2010). "Lack of both bradykinin B1 and B2 receptors enhances nephropathy, neuropathy, and bone mineral loss in Akita diabetic mice." Proc Natl Sci USA **107**(22): 10190-10195.

Kanai, Y., E. Nakazato, A. Fujiuchi, T. Hara and A. Imai (2005). "Involvement of an increased spinal TRPV1 sensitization through its up-regulation in mechanical allodynia of CCI rats." Neuropharmacology **49**(7): 977-984.

Katikireddy, K. R. and F. O'Sullivan (2011). Immunohistochemical and Immunofluorescence Procedures for Protein Analysis. Gene Expression Profiling: Methods and Protocols. L. O'Driscoll. Totowa, NJ, Humana Press: 155-167.

Kawasaki, Y., Z. Z. Xu, X. Wang, J. Y. Park, Z. Y. Zhuang, P. H. Tan, Y. J. Gao, K. Roy, G. Corfas, E. H. Lo and R. R. Ji (2008). "Distinct roles of matrix metalloproteases in the early- and late-phase development of neuropathic pain." Nat Med **14**(3): 331-336.

Khakh, B. S. (2001). "Molecular physiology of P2X receptors and ATP signalling at synapses." Nat Rev Neurosci **2**(3): 165-174.

Khan, A. A., A. Diogenes, N. A. Jeske, M. A. Henry, A. Akopian and K. M. Hargreaves (2008). "Tumor necrosis factor α enhances the sensitivity of rat trigeminal neurons to capsaicin." Neuroscience **155**(2): 503-509.

Kim, C. F. and G. Moalem-Taylor (2011). "Detailed characterization of neuro-immune responses following neuropathic injury in mice." Brain Res **1405**: 95-108.

Kim, K. J. and J. M. Chung (1997). "Comparison of three rodent neuropathic pain models." Exp Brain Res **113**(2): 200-206.

Kim, Y. S., Y. Chu, L. Han, M. Li, Z. Li, P. C. LaVinka, S. Sun, Z. Tang, K. Park, M. J. Caterina, K. Ren, R. Dubner, F. Wei and X. Dong (2014). "Central terminal sensitization of TRPV1 by descending serotonergic facilitation modulates chronic pain." Neuron **81**(4): 873-887.

King, T., C. Qu, A. Okun, R. Mercado, J. Ren, T. Brion, J. Lai and F. Porreca (2011). "Contribution of afferent pathways to nerve injury-induced spontaneous pain and evoked hypersensitivity." Pain **152**(9): 1997-2005.

Kobayashi, K., T. Fukuoka, H. Yamanaka, Y. Dai, K. Obata, A. Tokunaga and K. Noguchi (2006). "Neurons and glial cells differentially express P2Y receptor mRNAs in the rat dorsal root ganglion and spinal cord." J Comp Neurol **498**(4): 443-454.

Kollarik, M. and B. J. Udem (2004). "Activation of bronchopulmonary vagal afferent nerves with bradykinin, acid and vanilloid receptor agonists in wild-type and TRPV1^{-/-} mice." J Physiol **555**(Pt 1): 115-123.

Kuhr, F., J. Lowry, Y. Zhang, V. Brovkovich and R. A. Skidgel (2010). "Differential regulation of inducible and endothelial nitric oxide synthase by kinin B1 and B2 receptors." Neuropeptides **44**(2): 145-154.

Kuric, E. and K. Ruscher (2014). "Dynamics of major histocompatibility complex class II-positive cells in the postischemic brain - influence of levodopa treatment." J Neuroinflammation **11**(1): 145.

Lacoste, B., X. K. Tong, K. Lahjouji, R. Couture and E. Hamel (2013). "Cognitive and cerebrovascular improvements following kinin B1 receptor blockade in Alzheimer's disease mice." J Neuroinflammation **10**: 57.

Lappin, S. C., A. D. Randall, M. J. Gunthorpe and V. Morisset (2006). "TRPV1 antagonist, SB-366791, inhibits glutamatergic synaptic transmission in rat spinal dorsal horn following peripheral inflammation." Eur J Pharmacol **540**(1-3): 73-81.

Leeb-Lundberg, L. M., F. Marceau, W. Muller-Esterl, D. J. Pettibone and B. L. Zuraw (2005). "International union of pharmacology. XLV. Classification of the kinin receptor family: from molecular mechanisms to pathophysiological consequences." Pharmacol Rev **57**(1): 27-77.

Leeb-Lundberg, L. M. F., D. S. Kang, M. E. Lamb and D. B. Fathy (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**(12): 8785-8792.

Levant, A., E. Levy, M. Argaman and S. Fleisher-Berkovich (2006). "Kinins and neuroinflammation: dual effect on prostaglandin synthesis." Eur J Pharmacol **546**(1-3): 197-200.

Levy, D. and D. W. Zochodne (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**(3): 265-271.

Liberto, C. M., P. J. Albrecht, L. M. Herx, V. W. Yong and S. W. Levison (2004). "Pro-regenerative properties of cytokine-activated astrocytes." J Neurochem **89**(5): 1092-1100.

Lindenlaub, T. and C. Sommer (2003). "Cytokines in sural nerve biopsies from inflammatory and non-inflammatory neuropathies." Acta Neuropathol **105**(6): 593-602.

Liu, F. and H. Yuan (2014). "Role of glia in neuropathic pain." Front Biosci (Landmark Ed) **19**: 798-807.

Liu, J., N. Blin, B. R. Conklin and J. Wess (1996). "Molecular Mechanisms Involved in Muscarinic Acetylcholine Receptor-mediated G Protein Activation Studied by Insertion Mutagenesis." J Biol Chem **271**(11): 6172-6178.

Liu, J., J. Du, Y. Yang and Y. Wang (2015). "Phosphorylation of TRPV1 by cyclin-dependent kinase 5 promotes TRPV1 surface localization, leading to inflammatory thermal hyperalgesia." Exp Neurol **273**: 253-262.

Lo, F. S., S. Zhao and R. S. Erzurumlu (2011). "Astrocytes promote peripheral nerve injury-induced reactive synaptogenesis in the neonatal CNS." J Neurophysiol **106**(6): 2876-2887.

Loeser, J. D. and R. D. Treede (2008). "The Kyoto protocol of IASP Basic Pain Terminology." Pain **137**(3): 473-477.

Ma, Q. P. (2001). "The expression of bradykinin B(1) receptors on primary sensory neurones that give rise to small caliber sciatic nerve fibres in rats." Neuroscience **107**(4): 665-673.

Ma, W. and R. Quirion (2007). "Inflammatory mediators modulating the transient receptor potential vanilloid 1 receptor: therapeutic targets to treat inflammatory and neuropathic pain." Expert Opin Ther Targets **11**(3): 307-320.

Malek, N., A. Pajak, N. Kolosowska, M. Kucharczyk and K. Starowicz (2015). "The importance of TRPV1-sensitisation factors for the development of neuropathic pain." Mol Cell Neurosci **65**: 1-10.

Manitpisitkul, P., M. Brandt, C. M. Flores, V. Kenigs, J. A. Moyer, G. Romano, K. Shalayda and A. J. Mayorga (2016). "TRPV1 antagonist JNJ-39439335 (mavatriptan) demonstrates proof of pharmacology in healthy men: a first-in-human, double-blind, placebo-controlled, randomized, sequential group study." Pain Reports **1**(4): e576.

Mannari, T., S. Morita, E. Furube, M. Tominaga and S. Miyata (2013). "Astrocytic TRPV1 ion channels detect blood-borne signals in the sensory circumventricular organs of adult mouse brains." Glia **61**(6): 957-971.

Marceau, F., J. F. Hess and D. R. Bachvarov (1998). "The B1 receptors for kinins." Pharmacol Rev **50**(3): 357-386.

Marceau, F., J. F. Larrivee, J. Bouthillier, M. Bachvarova, S. Houle and D. R. Bachvarov (1999). "Effect of endogenous kinins, prostanoids, and NO on kinin B1 and B2 receptor expression in the rabbit." Am J Physiol **277**(6 Pt 2): R1568-1578.

Marceau, F. and D. Regoli (2004). "Bradykinin receptor ligands: therapeutic perspectives." Nat Rev Drug Discov **3**(10): 845-852.

Marchand, S. (2008). "The physiology of pain mechanisms: from the periphery to the brain." Rheum Dis Clin North Am **34**(2): 285-309.

Maria, A. G., P. Dillenburg-Pilla, R. I. Reis, E. M. Floriano, C. Tefé-Silva, S. G. Ramos, J. B. Pesquero, C. Nahmias and C. M. Costa-Neto (2016). "Host kinin B1 receptor plays a protective role against melanoma progression." Scientific Reports **6**: 22078.

Marrone, M. C., A. Morabito, M. Giustizieri, V. Chiurchiu, A. Leuti, M. Mattioli, S. Marinelli, L. Riganti, M. Lombardi, E. Murana, A. Totaro, D. Piomelli, D. Ragozzino, S. Oddi, M. Maccarrone, C. Verderio and S. Marinelli (2017). "TRPV1 channels are critical brain inflammation detectors and neuropathic pain biomarkers in mice." Nat Commun **8**: 15292.

McMahon, S. B. and M. Malcangio (2009). "Current challenges in glia-pain biology." Neuron **64**(1): 46-54.

Meng, J., S. V. Ovsepian, J. Wang, M. Pickering, A. Sasse, K. R. Aoki, G. W. Lawrence and J. O. Dolly (2009). "Activation of TRPV1 mediates calcitonin gene-related peptide release, which excites trigeminal sensory neurons and is attenuated by a retargeted botulinum toxin with anti-nociceptive potential." J Neurosci **29**(15): 4981-4992.

Meng, J., J. Wang, M. Steinhoff and J. O. Dolly (2016). "TNF α induces co-trafficking of TRPV1/TRPA1 in VAMP1-containing vesicles to the plasmalemma via Munc18-1/syntaxin1/SNAP-25 mediated fusion." Scientific Reports **6**: 21226.

Meyerson, B. A., B. Ren, P. Herregodts and B. Linderoth (1995). "Spinal cord stimulation in animal models of mononeuropathy: effects on the withdrawal response and the flexor reflex." Pain **61**(2): 229-243.

Mickle, A. D., A. J. Shepherd and D. P. Mohapatra (2015). Nociceptive TRP Channels: Sensory Detectors and Transducers in Multiple Pain Pathologies. Pharmaceuticals (Basel). 2016 Dec; **9**(4): 72.

Mickle, A. D., A. J. Shepherd and D. P. Mohapatra (2015). "Sensory TRP channels: the key transducers of nociception and pain." Prog Mol Biol Transl Sci **131**: 73-118.

Midaoui, A. E., S. Talbot, K. Lahjouji, J. P. Dias, I. G. Fantus and R. Couture (2015). "Effects of Alpha-Lipoic Acid on Oxidative Stress and Kinin Receptor Expression in Obese Zucker Diabetic Fatty Rats." J Diabetes Metab **6**(6): 1-7.

Mika, J., M. Osikowicz, E. Rojewska, M. Korostynski, A. Wawrzczak-Bargiela, R. Przewlocki and B. Przewlocka (2009). "Differential activation of spinal microglial and astroglial cells in a mouse model of peripheral neuropathic pain." Eur J Pharmacol **623**(1-3): 65-72.

Mika, J., M. Zychowska, K. Popiolek-Barczyk, E. Rojewska and B. Przewlocka (2013). "Importance of glial activation in neuropathic pain." Eur J Pharmacol **716**(1-3): 106-119.

Miller, R. J., H. Jung, S. K. Bhangoo and F. A. White (2009). "Cytokine and chemokine regulation of sensory neuron function." Handb Exp Pharmacol(194): 417-449.

Moalem, G. and D. J. Tracey (2006). "Immune and inflammatory mechanisms in neuropathic pain." Brain Research Reviews **51**(2): 240-264.

Moalem, G., K. Xu and L. Yu (2004). "T lymphocytes play a role in neuropathic pain following peripheral nerve injury in rats." Neuroscience **129**(3): 767-777.

Mogil, J. S. (2009). "Animal models of pain: progress and challenges." Nat Rev Neurosci **10**(4): 283-294.

Moniwa, N., J. Agata, M. Hagiwara, N. Ura and K. Shimamoto (2006). "The role of bradykinin B1 receptor on cardiac remodeling in stroke-prone spontaneously hypertensive rats (SHR-SP)." Biol Chem **387**(2): 203-209.

Moriyama, T., T. Higashi, K. Togashi, T. Iida, E. Segi, Y. Sugimoto, T. Tominaga, S. Narumiya and M. Tominaga (2005). "Sensitization of TRPV1 by EP1 and IP reveals peripheral nociceptive mechanism of prostaglandins." Mol Pain **1**: 3.

Murphy, E. J. (2015). "Blood-brain barrier and brain fatty acid uptake: Role of arachidonic acid and PGE2." J Neurochem **135**(5): 845-848.

Myers, R. R., W. M. Campana and V. I. Shubayev (2006). "The role of neuroinflammation in neuropathic pain: mechanisms and therapeutic targets." Drug Discov Today **11**(1-2): 8-20.

Neubert, J. K., A. J. Mannes, L. J. Karai, A. C. Jenkins, L. Zawatski, M. Abu-Asab and M. J. Iadarola (2008). "Perineural resiniferatoxin selectively inhibits inflammatory hyperalgesia." Molecular Pain **4**: 3-3.

Ni, A., L. Chao and J. Chao (1998). "Transcription factor nuclear factor kappaB regulates the inducible expression of the human B1 receptor gene in inflammation." J Biol Chem **273**(5): 2784-2791.

Nickel, F. T., F. Seifert, S. Lanz and C. Maihofner (2012). "Mechanisms of neuropathic pain." Eur Neuropsychopharmacol **22**(2): 81-91.

Niiyama, Y., T. Kawamata, J. Yamamoto, S. Furuse and A. Namiki (2009). "SB366791, a TRPV1 antagonist, potentiates analgesic effects of systemic morphine in a murine model of bone cancer pain†." BJA **102**(2): 251-258.

Noda, M., K. Sasaki, M. Ifuku and K. Wada (2007). "Multifunctional effects of bradykinin on glial cells in relation to potential anti-inflammatory effects." Neurochem Int **51**(2-4): 185-191.

Numazaki, M., T. Tominaga, K. Takeuchi, N. Murayama, H. Toyooka and M. Tominaga (2003). "Structural determinant of TRPV1 desensitization interacts with calmodulin." Proc Natl Acad Sci USA **100**(13): 8002-8006.

Numazaki, M., T. Tominaga, H. Toyooka and M. Tominaga (2002). "Direct phosphorylation of capsaicin receptor VR1 by protein kinase Cepsilon and identification of two target serine residues." J Biol Chem **277**(16): 13375-13378.

Obreja, O., P. K. Rathee, K. S. Lips, C. Distler and M. Kress (2002). "IL-1 beta potentiates heat-activated currents in rat sensory neurons: involvement of IL-1RI, tyrosine kinase, and protein kinase C." Faseb j **16**(12): 1497-1503.

Ochoa, J. L. and D. Yarnitsky (1993). "Mechanical hyperalgesias in neuropathic pain patients: Dynamic and static subtypes." Annals of Neurology **33**(5): 465-472.

Palazzo, E., L. Luongo, V. de Novellis, L. Berrino, F. Rossi and S. Maione (2010). "Moving towards supraspinal TRPV1 receptors for chronic pain relief." Mol Pain **6**: 66.

Palazzo, E., L. Luongo, V. de Novellis, F. Rossi, I. Marabese and S. Maione (2012). "Transient receptor potential vanilloid type 1 and pain development." Curr Opin Pharmacol **12**(1): 9-17.

Passos, G. F., E. S. Fernandes, M. M. Campos, J. G. Araujo, J. L. Pesquero, G. E. Souza, M. C. Avellar, M. M. Teixeira and J. B. Calixto (2004). "Kinin B1 receptor up-regulation after lipopolysaccharide administration: role of proinflammatory cytokines and neutrophil influx." J Immunol **172**(3): 1839-1847.

Pekny, M. and M. Pekna (2014). "Astrocyte reactivity and reactive astrogliosis: costs and benefits." Physiol Rev **94**(4): 1077-1098.

Peretti-Renucci, R., C. Feuerstein, M. Manier, P. Lorimier, M. Savasta, J. Thibault, N. Mons and M. Geffard (1991). "Quantitative image analysis with densitometry for immunohistochemistry and autoradiography of receptor binding sites--methodological considerations." J Neurosci Res **28**(4): 583-600.

Perkins, M. N. and D. Kelly (1993). "Induction of bradykinin B1 receptors in vivo in a model of ultra-violet irradiation-induced thermal hyperalgesia in the rat." Br J Pharmacol **110**(4): 1441-1444.

Pesquero, J. B., R. C. Araujo, P. A. Heppenstall, C. L. Stucky, J. A. Silva, Jr., T. Walther, S. M. Oliveira, J. L. Pesquero, A. C. Paiva, J. B. Calixto, G. R. Lewin and M. Bader (2000). "Hypoalgesia and altered inflammatory responses in mice lacking kinin B1 receptors." Proc Natl Acad Sci U S A **97**(14): 8140-8145.

Petcu, M., J. P. Dias, B. Ongali, G. Thibault, W. Neugebauer and R. Couture (2008). "Role of kinin B1 and B2 receptors in a rat model of neuropathic pain." Int Immunopharmacol **8**(2): 188-196.

Phagoo, S. B., S. Poole and L. M. F. Leeb-Lundberg (1999). "Autoregulation of Bradykinin Receptors: Agonists in the Presence of Interleukin-1 β Shift the Repertoire of Receptor Subtypes from B2 to B1 in Human Lung Fibroblasts." Molecular Pharmacology **56**(2): 325.

Phagoo, S. B., K. Reddi, K. D. Anderson, L. M. F. Leeb-Lundberg and D. Warburton (2001). "Bradykinin B1 Receptor Up-Regulation by Interleukin-1 β and B1 Agonist Occurs through Independent and Synergistic Intracellular Signaling Mechanisms in Human Lung Fibroblasts." JPET**298**(1): 77.

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

Potier, L. (2014). Role of the kallikrein-kinins system in diabetes and its complications. J Endocrinol. 2014 Apr 22;221(2):297-308.

Pouliot, M., S. Héту, K. Lahjouji, R. Couture and E. Vaucher (2011). "Modulation of retinal blood flow by kinin B1 receptor in Streptozotocin-diabetic rats." Exp Eye Res **92**(6): 482-489.

Qadri, F. and M. Bader (2018). "Kinin B1 receptors as a therapeutic target for inflammation." Expert Opin Ther Targets **22**(1): 31-44.

Quintao, N. L., G. F. Passos, R. Medeiros, A. F. Paszcuk, F. L. Motta, J. B. Pesquero, M. M. Campos and J. B. Calixto (2008). "Neuropathic pain-like behavior after brachial plexus avulsion in mice: the relevance of kinin B1 and B2 receptors." J Neurosci **28**(11): 2856-2863.

Raidoo, D. M. and K. D. Bhoola (1997). "Kinin receptors on human neurones." J Neuroimmunol **77**(1): 39-44.

Rajpal, S., T. A. Gerovac, N. A. Turner, J. I. Tilghman, B. K. Allcock, S. L. McChesney, G. S. Miranpuri, S. W. Park and D. K. Resnick (2007). "Antihyperalgesic effects of vanilloid-1 and bradykinin-1 receptor antagonists following spinal cord injury in rats." J Neurosurg Spine **6**(5): 420-424.

Rami, H. K., M. Thompson, P. Wyman, J. C. Jerman, J. Egerton, S. Brough, A. J. Stevens, A. D. Randall, D. Smart, M. J. Gunthorpe and J. B. Davis (2004). "Discovery of small molecule antagonists of TRPV1." Bioorg Med Chem Lett **14**(14): 3631-3634.

Rapoport, S. I. (2008). "Arachidonic Acid and the Brain." J Nutrition **138**(12): 2515-2520.

Rashid, M. H., M. Inoue, S. Kondo, T. Kawashima, S. Bakoshi and H. Ueda (2003). "Novel expression of vanilloid receptor 1 on capsaicin-insensitive fibers accounts for the analgesic effect of capsaicin cream in neuropathic pain." J Pharmacol Exp Ther **304**(3): 940-948.

Rashid, M. H., M. Inoue, M. Matsumoto and H. Ueda (2004). "Switching of bradykinin-mediated nociception following partial sciatic nerve injury in mice." J Pharmacol Exp Ther **308**(3): 1158-1164.

Regoli, D. and F. Gobeil (2016). "Kinins and peptide receptors." Biol Chem **397**(4): 297-304.

Regoli, D. and F. Gobeil (2017). "Kallikrein-kinin system as the dominant mechanism to counteract hyperactive renin-angiotensin system." Can J Physiol Pharmacol **95**(10): 1117-1124.

Ren, K. and R. Dubner (2008). "Neuron-glia crosstalk gets serious: role in pain hypersensitivity." Curr Opin Anaesthesiol **21**(5): 570-579.

Ren, K. and R. Torres (2009). "Role of interleukin-1 β during pain and inflammation." Brain Res Rev **60**(1): 57-64.

Rohl, C., R. Lucius and J. Sievers (2007). "The effect of activated microglia on astrogliosis parameters in astrocyte cultures." Brain Res **1129**(1): 43-52.

Rosenbaum, T., A. Gordon-Shaag, M. Munari and S. E. Gordon (2004). "Ca(2+)/Calmodulin Modulates TRPV1 Activation by Capsaicin." The J Gen Physiol **123**(1): 53-62.

Rupniak, N. M., S. Boyce, J. K. Webb, A. R. Williams, E. J. Carlson, R. G. Hill, J. A. Borkowski and J. F. Hess (1997). "Effects of the bradykinin B1 receptor antagonist des-Arg9[Leu8]bradykinin and genetic disruption of the B2 receptor on nociception in rats and mice." Pain **71**(1): 89-97.

Samad, T. A., K. A. Moore, A. Sapirstein, S. Billet, A. Allchorne, S. Poole, J. V. Bonventre and C. J. Woolf (2001). "Interleukin-1 β -mediated induction of Cox-2 in the CNS contributes to inflammatory pain hypersensitivity." Nature **410**(6827): 471-475.

Schäfers, M., D. H. Lee, D. Brors, T. L. Yaksh and L. S. Sorkin (2003). "Increased sensitivity of injured and adjacent uninjured rat primary sensory neurons to exogenous tumor necrosis factor-alpha after spinal nerve ligation." J Neurosci **23**(7): 3028-3038.

Schäfers, M. and L. Sorkin (2008). "Effect of cytokines on neuronal excitability." Neuroscience Letters **437**(3): 188-193.

Schaible, H. G., M. Schmelz and I. Tegeder (2006). "Pathophysiology and treatment of pain in joint disease." Adv Drug Deliv Rev **58**(2): 323-342.

Schanstra, J. P., E. Bataillé, M. E. Marin Castaño, Y. Barascud, C. Hirtz, J. B. Pesquero, C. Pecher, F. Gauthier, J. P. Girolami and J. L. Bascands (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**(10): 2080-2091.

Scharfstein, J., P. I. P. Ramos and M. Barral-Netto (2017). "G Protein-Coupled Kinin Receptors and Immunity Against Pathogens." Adv Immunol **136**: 29-84.

Schmittgen, T. D. and K. J. Livak (2008). "Analyzing real-time PCR data by the comparative C(T) method." Nat Protoc **3**(6): 1101-1108.

Scholz, J. and C. J. Woolf (2007). "The neuropathic pain triad: neurons, immune cells and glia." Nat Neurosci **10**(11): 1361-1368.

Schomberg, D., G. Miranpuri, T. Duellman, A. Crowell, R. Vemuganti and D. Resnick (2015). "Spinal cord injury induced neuropathic pain: Molecular targets and therapeutic approaches." Metab Brain Dis **30**(3): 645-658.

Schomberg, D. and J. K. Olson (2012). "Immune responses of microglia in the spinal cord: contribution to pain states." Exp Neurol **234**(2): 262-270.

Scott, J. D. and T. Pawson (2009). "Cell signaling in space and time: where proteins come together and when they're apart." Science **326**(5957): 1220-1224.

Seabrook, G. R., K. G. Sutton, W. Jarolimek, G. J. Hollingworth, S. Teague, J. Webb, N. Clark, S. Boyce, J. Kerby, Z. Ali, M. Chou, R. Middleton, G. Kaczorowski and A. B. Jones (2002). "Functional properties of the high-affinity TRPV1 (VR1) vanilloid receptor antagonist (4-hydroxy-5-iodo-3-methoxyphenylacetate ester) iodo-resiniferatoxin." J Pharmacol Exp Ther **303**(3): 1052-1060.

Sebastin, S. (2011). Complex regional pain syndrome. Indian J Plast Surg. 2011 May;44(2):298-307.

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

Senger, J. L. B., V. M. K. Verge, H. S. J. Macandili, J. L. Olson, K. M. Chan and C. A. Webber (2018). "Electrical stimulation as a conditioning strategy for promoting and accelerating peripheral nerve regeneration." Experimental Neurology **302**: 75-84.

Sharma, J. N. (2014). "Basic and clinical aspects of bradykinin receptor antagonists." Prog Drug Res **69**: 1-14.

Shemer, A., D. Erny, S. Jung and M. Prinz (2015). "Microglia Plasticity During Health and Disease: An Immunological Perspective." Trends Immunol **36**(10): 614-624.

Shin, J., H. Cho, S. W. Hwang, J. Jung, C. Y. Shin, S. Y. Lee, S. H. Kim, M. G. Lee, Y. H. Choi, J. Kim, N. A. Haber, D. B. Reichling, S. Khasar, J. D. Levine and U. Oh (2002). "Bradykinin-12-lipoxygenase-VR1 signaling pathway for inflammatory hyperalgesia." Proc Natl Acad Sci U S A **99**(15): 10150-10155.

Shubayev, V. I. and R. R. Myers (2001). "Axonal transport of TNF-alpha in painful neuropathy: distribution of ligand tracer and TNF receptors." J Neuroimmunol **114**(1-2): 48-56.

Siemens, J., S. Zhou, R. Piskorowski, T. Nikai, E. A. Lumpkin, A. I. Basbaum, D. King and D. Julius (2006). "Spider toxins activate the capsaicin receptor to produce inflammatory pain." Nature **444**(7116): 208-212.

Sikandar, S. and A. H. Dickenson (2012). "Visceral Pain – the Ins and Outs, the Ups and Downs." Curr Opin Support Palliat Care **6**(1): 17-26.

Simpson, D. M., S. Brown and J. Tobias (2008). "Controlled trial of high-concentration capsaicin patch for treatment of painful HIV neuropathy." Neurology **70**(24): 2305-2313.

Sofroniew, M. V. (2015). "Astrogliosis." Cold Spring Harb Perspect Biol **7**(2): a020420.

Spofford, C. M. and T. J. Brennan (2012). "Gene expression in skin, muscle, and dorsal root ganglion after plantar incision in the rat." Anesthesiology **117**(1): 161-172.

Stander, S., M. Steinhoff, M. Schmelz, E. Weisshaar, D. Metzger and T. Luger (2003). "Neurophysiology of pruritus: cutaneous elicitation of itch." Arch Dermatol **139**(11): 1463-1470.

Sugiura, T., M. Tominaga, H. Katsuya and K. Mizumura (2002). "Bradykinin lowers the threshold temperature for heat activation of vanilloid receptor 1." J Neurophysiol **88**(1): 544-548.

Suter, M. R., T. Berta, Y. J. Gao, I. Decosterd and R. R. Ji (2009). "Large A-fiber activity is required for microglial proliferation and p38 MAPK activation in the spinal cord: different effects of resiniferatoxin and bupivacaine on spinal microglial changes after spared nerve injury." Mol Pain **5**: 53.

Suzumura, A. (2013). "Neuron-microglia interaction in neuroinflammation." Curr Protein Pept Sci **14**(1): 16-20.

Svensson, C. I., M. Marsala, A. Westerlund, N. A. Calcutt, W. M. Campana, J. D. Freshwater, R. Catalano, Y. Feng, A. A. Protter, B. Scott and T. L. Yaksh (2003). "Activation of p38 mitogen-activated protein kinase in spinal microglia is a critical link in inflammation-induced spinal pain processing." J Neurochem **86**(6): 1534-1544.

Sweitzer, S. M., R. W. Colburn, M. Rutkowski and J. A. DeLeo (1999). "Acute peripheral inflammation induces moderate glial activation and spinal IL-1beta expression that correlates with pain behavior in the rat." Brain Res **829**(1-2): 209-221.

Szallasi, A. and M. A. McAlexander (2015). TRP channels as therapeutic targets : from basic science to clinical use. Expert Opin Ther Pat. 2012 Jun;22(6):663-95

Szallasi, A., T. Szabó, T. Bíró, S. Modarres, P. M. Blumberg, J. E. Krause, D. N. Cortright and G. Appendino (1999). "Resiniferatoxin-type phorboid vanilloids display capsaicin-like selectivity at native vanilloid receptors on rat DRG neurons and at the cloned vanilloid receptor VR1." Br J Pharmacol **128**(2): 428-434.

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

Talbot, S. and R. Couture (2012). "Emerging role of microglial kinin B1 receptor in diabetic pain neuropathy." Exp Neurol **234**(2): 373-381.

Talbot, S., H. De Brito Garipey, J. Saint-Denis and R. Couture (2012). "Activation of kinin B1 receptor evokes hyperthermia through a vagal sensory mechanism in the rat." J Neuroinflammation **9**: 214.

Talbot, S., J. P. Dias, K. Lahjouji, M. R. Bogo, M. M. Campos, P. Gaudreau and R. Couture (2012). "Activation of TRPV1 by capsaicin induces functional kinin B(1) receptor in rat spinal cord microglia." J Neuroinflammation **9**: 16.

Talbot, S., P. Theberge-Turmel, D. Liazoghli, J. Senecal, P. Gaudreau and R. Couture (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.

Tan, Z.-Y., A. D. Piekarz, B. T. Priest, K. L. Knopp, J. L. Krajewski, J. S. McDermott, E. S. Nisenbaum and T. R. Cummins (2014). "Tetrodotoxin-Resistant Sodium Channels in Sensory Neurons Generate Slow Resurgent Currents That Are Enhanced by Inflammatory Mediators." The J Neurosci **34**(21): 7190-7197.

Terzuoli, E., L. Morbidelli, G. Nannelli, A. Giachetti, S. Donnini and M. Ziche (2018). "Involvement of Bradykinin B2 Receptor in Pathological Vascularization in Oxygen-Induced Retinopathy in Mice and Rabbit Cornea." Int J Mol Sci **19**(2).

Thornton, P., B. W. McColl, L. Cooper, N. J. Rothwell and S. M. Allan (2010). "Interleukin-1 drives cerebrovascular inflammation via MAP kinase-independent pathways." Curr Neurovasc Res **7**(4): 330-340.

Tidjane, N., L. Gaboury and R. Couture (2016). "Cellular localisation of the kinin B1R in the pancreas of streptozotocin-treated rat and the anti-diabetic effect of the antagonist SSR240612." Biol Chem **397**(4): 323-336.

Tidjane, N., A. Hachem, Y. Zaid, Y. Merhi, L. Gaboury, J. P. Girolami and R. Couture (2015). "A primary role for kinin B1 receptor in inflammation, organ damage, and lethal thrombosis in a rat model of septic shock in diabetes." Eur J Inflamm **13**(1): 40-52.

Tominaga, M. and T. Tominaga (2005). "Structure and function of TRPV1." Pflugers Arch **451**(1): 143-150.

Tsuda, M. (2015). "[Mechanisms underlying the pathogenesis of neuropathic pain revealing by the role of glial cells]." Nihon Shinkei Seishin Yakurigaku Zasshi **35**(1): 1-4.

Tsuda, M. and K. Inoue (2016). "Neuron–microglia interaction by purinergic signaling in neuropathic pain following neurodegeneration." Neuropharmacology **104**: 76-81.

Tsuda, M., K. Inoue and M. W. Salter (2005). "Neuropathic pain and spinal microglia: a big problem from molecules in "small" glia." Trends neurosci **28**(2): 101-107.

Tsuda, M., K. Koga, T. Chen and M. Zhuo (2017). "Neuronal and microglial mechanisms for neuropathic pain in the spinal dorsal horn and anterior cingulate cortex." J Neurochem **141**(4): 486-498.

Tsuda, M., Y. Kohro, T. Yano, T. Tsujikawa, J. Kitano, H. Tozaki-Saitoh, S. Koyanagi, S. Ohdo, R. R. Ji, M. W. Salter and K. Inoue (2011). "JAK-STAT3 pathway regulates spinal astrocyte proliferation and neuropathic pain maintenance in rats." Brain **134**(Pt 4): 1127-1139.

Tsuda, M., Y. Shigemoto-Mogami, S. Koizumi, A. Mizokoshi, S. Kohsaka, M. W. Salter and K. Inoue (2003). "P2X4 receptors induced in spinal microglia gate tactile allodynia after nerve injury." Nature **424**(6950): 778-783.

Tsuda, M., H. Tozaki-Saitoh and K. Inoue (2012). "Purinergic system, microglia and neuropathic pain." Curr Opin Pharmacol **12**(1): 74-79.

Tsuda, M., H. Ueno, A. Kataoka, H. Tozaki-Saitoh and K. Inoue (2008). "Activation of dorsal horn microglia contributes to diabetes-induced tactile allodynia via extracellular signal-regulated protein kinase signaling." Glia **56**(4): 378-386.

Uchytlova, E., D. Spicarova and J. Palecek (2014). "TRPV1 antagonist attenuates postoperative hypersensitivity by central and peripheral mechanisms." Mol Pain **10**: 67.

Ueda, H. (2006). "Molecular mechanisms of neuropathic pain-phenotypic switch and initiation mechanisms." Pharmacol Ther **109**(1-2): 57-77.

Urano, H., T. Ara, Y. Fujinami and B. Y. Hiraoka (2012). "Aberrant TRPV1 expression in heat hyperalgesia associated with trigeminal neuropathic pain." Int J Med Sci **9**(8): 690-697.

VanDenKerkhof, E., Mann, G., Smith, N., Johnson, A., Gilron, I (2016). "An Epidemiological Study of Neuropathic Pain Symptoms in Canadian Adults". Pain Res Manag (2016), 2016: 9815750

van Hecke, O., S. K. Austin, R. A. Khan, B. H. Smith and N. Torrance (2014). "Neuropathic pain in the general population: a systematic review of epidemiological studies." Pain **155**(4): 654-662.

Vardeh, D., R. J. Mannion and C. J. Woolf (2016). "Toward a Mechanism-Based Approach to Pain Diagnosis." J Pain **17**(9 Suppl): T50-69.

Vardeh, D., D. Wang, M. Costigan, M. Lazarus, C. B. Saper, C. J. Woolf, G. A. Fitzgerald and T. A. Samad (2009). "COX2 in CNS neural cells mediates mechanical inflammatory pain hypersensitivity in mice." J Clin Invest **119**(2): 287-294.

Varga, A., J. Nemeth, A. Szabo, J. J. McDougall, C. Zhang, K. Elekes, E. Pinter, J. Szolcsanyi and Z. Helyes (2005). "Effects of the novel TRPV1 receptor antagonist SB366791 in vitro and in vivo in the rat." Neurosci Lett **385**(2): 137-142.

Vellani, V., O. Zachrisson and P. A. McNaughton (2004). "Functional bradykinin B1 receptors are expressed in nociceptive neurones and are upregulated by the neurotrophin GDNF." J Physiol **560**(Pt 2): 391-401.

Voets, T., G. Droogmans, U. Wissenbach, A. Janssens, V. Flockerzi and B. Nilius (2004). "The principle of temperature-dependent gating in cold- and heat-sensitive TRP channels." Nature **430**(7001): 748-754.

Voisin, D. (2010). Rôle des astrocytes dans la douleur neuropathique périphérique et la douleur cancéreuse. Douleurs : Evaluation - Diagnostic - Traitement **11**(5):237-244

von Hehn, C. A., R. Baron and C. J. Woolf (2012). "Deconstructing the neuropathic pain phenotype to reveal neural mechanisms." Neuron **73**(4): 638-652.

Walker, K., M. Perkins and A. Dray (1995). "Kinins and kinin receptors in the nervous system." Neurochem Int **26**(1): 1-16; discussion 17-26.

Walters, E. T. (2014). "Neuroinflammatory contributions to pain after SCI: roles for central glial mechanisms and nociceptor-mediated host defense." Exp Neurol **258**: 48-61.

Wang, D., R. Couture and Y. Hong (2014). "Activated microglia in the spinal cord underlies diabetic neuropathic pain." Eur J Pharmacol **728**: 59-66.

Wang, H. and C. J. Woolf (2005). "Pain TRPs." Neuron **46**(1): 9-12.

Wang, S., J. Joseph, J. Y. Ro and M. K. Chung (2015). "Modality-specific mechanisms of protein kinase C-induced hypersensitivity of TRPV1: S800 is a polymodal sensitization site." Pain **156**(5): 931-941.

Wang, Z. Y., T. McDowell, P. Wang, R. Alvarez, T. Gomez and D. E. Bjorling (2014). "Activation of CB1 inhibits NGF-induced sensitization of TRPV1 in adult mouse afferent neurons." Neuroscience **277**: 679-689.

Watabiki, T., T. Kiso, M. Tsukamoto, T. Aoki and N. Matsuoka (2011). "Intrathecal administration of AS1928370, a transient receptor potential vanilloid 1 antagonist, attenuates mechanical allodynia in a mouse model of neuropathic pain." Biol Pharm Bull **34**(7): 1105-1108.

Wen, Y.-R., P.-H. Tan, J.-K. Cheng, Y.-C. Liu and R.-R. Ji (2011). "Role of microglia in neuropathic pain, postoperative pain, and morphine tolerance." Journal of the Formosan Medical Association = Taiwan yi zhi **110**(8): 487-494.

Whalley, E. T., C. D. Figueroa, L. Gera and K. D. Bhoola (2012). "Discovery and therapeutic potential of kinin receptor antagonists." Expert Opin Drug Discov **7**(12): 1129-1148.

Williams, A. and K. D. Craig (2016). Updating the definition of pain. Pain. 2016 Nov; **157**(11):2420-2423

Winkler, D. F. and P. L. McGeer (2008). "Protein labeling and biotinylation of peptides during spot synthesis using biotin p-nitrophenyl ester (biotin-ONp)." Proteomics **8**(5): 961-967.

Wong, M. (2016). Chapter 30. Kallikrein-Kinin System. Comp End Bas Clin Res (**2016**): 266–267

Woolf, C. J. (2004). "Dissecting out mechanisms responsible for peripheral neuropathic pain: implications for diagnosis and therapy." Life Sci **74**(21): 2605-2610.

Woolf, C. J. (2010). "What is this thing called pain?" J Clin Invest **120**(11): 3742-3744.

Woolf, C. J. and Q. Ma (2007). "Nociceptors--noxious stimulus detectors." Neuron **55**(3): 353-364.

Woolf, C. J. and R. J. Mannion (1999). "Neuropathic pain: aetiology, symptoms, mechanisms, and management." Lancet **353**(9168): 1959-1964.

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

Wooten, M., H.-J. Weng, T. V. Hartke, J. Borzan, A. H. Klein, B. Turnquist, X. Dong, R. A. Meyer and M. Ringkamp (2014). "Three functionally distinct classes of C-fiber nociceptors in primate." Nature communications **5**: 4122-4122.

Wotherspoon, G. and J. Winter (2000). "Bradykinin B1 receptor is constitutively expressed in the rat sensory nervous system." Neurosci Lett **294**(3): 175-178.

Xu, J., O. A. Carretero, L. Zhu, E. G. Shesely, N.-E. Rhaleb, X. Dai, L. Wang, J. J. Yang and X.-P. Yang (2013). "Protective role of AT(2) and B(1) receptors in kinin B(2)-receptor-knockout mice with myocardial infarction." Clinical science **124**(2): 87-96.

Xu, Q. and T. L. Yaksh (2011). "A brief comparison of the pathophysiology of inflammatory versus neuropathic pain." Current Opinion in Anaesthesiology **24**(4): 400-407.

Yamaguchi-Sase, S., I. Hayashi, H. Okamoto, Y. Nara, S. Matsuzaki, S. Hoka and M. Majima (2003). "Amelioration of hyperalgesia by kinin receptor antagonists or kininogen deficiency in chronic constriction nerve injury in rats." Inflamm Res **52**(4): 164-169.

Yamamoto, Y., R. Terayama, N. Kishimoto, K. Maruhama, M. Mizutani, S. Iida and T. Sugimoto (2015). "Activated microglia contribute to convergent nociceptive inputs to spinal dorsal horn neurons and the development of neuropathic pain." Neurochem Res **40**(5): 1000-1012.

Yoon, Y. W., D. H. Lee, B. H. Lee, K. Chung and J. M. Chung (1999). "Different strains and substrains of rats show different levels of neuropathic pain behaviors." Exp Brain Res **129**(2): 167-171.

Zelenka, M., M. Schafers and C. Sommer (2005). "Intraneural injection of interleukin-1beta and tumor necrosis factor-alpha into rat sciatic nerve at physiological doses induces signs of neuropathic pain." Pain **116**(3): 257-263.

Zhang, D., X. Hu, L. Qian, J. P. O'Callaghan and J.-S. Hong (2010). "Astrogliosis in CNS Pathologies: Is There A Role for Microglia?" Molecular Neurobiology **41**(2): 232-241.

Zhang, J., D. J. Cavanaugh, M. I. Nemenov and A. I. Basbaum (2013). "The modality-specific contribution of peptidergic and non-peptidergic nociceptors is manifest at the level of dorsal horn nociresponsive neurons." J Physiol **591**(Pt 4): 1097-1110.

Zhang, X., J. Huang and P. A. McNaughton (2005). "NGF rapidly increases membrane expression of TRPV1 heat-gated ion channels." The EMBO Journal **24**(24): 4211-4223.

Zhang, X., F. Tan, V. Brovkovich, Y. Zhang and R. A. Skidgel (2011). "Cross-talk between carboxypeptidase M and the kinin B1 receptor mediates a new mode of G protein-coupled receptor signaling." J Biol Chem **286**(21): 18547-18561.

Zhuang, Z. Y., Y. R. Wen, D. R. Zhang, T. Borsello, C. Bonny, G. R. Strichartz, I. Decosterd and R. R. Ji (2006). "A peptide c-Jun N-terminal kinase (JNK) inhibitor blocks mechanical allodynia after spinal nerve ligation: respective roles of JNK activation in primary sensory neurons and spinal astrocytes for neuropathic pain development and maintenance." J Neurosci **26**(13): 3551-3560.

Zimmermann, M. (2001). "Pathobiology of neuropathic pain." Eur J Pharmacol **429**(1-3): 23-37.

