

Université de Montréal

ADMINISTRATION D'EUGÉNOL INTRATHÉCAL
POUR LE TRAITEMENT DE LA DOULEUR
NEUROPATHIQUE

par

Ludivine Lionnet

Département de biomédecine vétérinaire
Faculté de médecine vétérinaire

Mémoire présenté à la Faculté de médecine vétérinaire
en vue de l'obtention du grade de
maître ès Sciences (M.Sc.)
en sciences vétérinaires
option biomédecine

Août 2009

© Ludivine Lionnet, 2009

Université de Montréal
Faculté de médecine vétérinaire

Ce mémoire intitulé

ADMINISTRATION D'EUGÉNOL INTRATHÉCAL
POUR LE TRAITEMENT DE LA DOULEUR
NEUROPATHIQUE

présenté par

Ludivine Lionnet

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes

Sophie Cuvelliez
présidente-rapporteuse

Pascal Vachon
directeur de recherche

Malcolm Gains
membre du jury

RÉSUMÉ

Le projet porte sur l'étude de l'effet de l'eugénol, composant principal du clou de girofle, sur la douleur neuropathique. L'objectif principal du projet était de déterminer la contribution du système nerveux central dans l'effet analgésique de l'eugénol. Lors d'une étude préliminaire, la pénétrabilité de l'eugénol a été évaluée dans le système nerveux central du rat. Des échantillons de sang, de cerveau et de moelle épinière ont été prélevés et les concentrations d'eugénol dans ces différents tissus ont été analysées à l'aide d'un spectromètre de masse. Les résultats ont montré que l'eugénol pénètre bien le système nerveux central avec une distribution plus importante dans la moelle épinière. Après l'induction de la douleur neuropathique à des rats Sprague-Dawley par le modèle de ligatures du nerf sciatique, des injections intrathécales d'eugénol furent réalisées afin d'évaluer l'effet central de l'eugénol. La plus forte dose d'eugénol a atténué l'allodynie secondaire après 15min, 2h et 4h et a aussi amélioré l'hyperalgésie thermique après 2h et 4h.

Ces résultats confirment l'hypothèse que l'eugénol atténue les deux aspects de la douleur neuropathique que sont l'allodynie et l'hyperalgésie. Les injections au niveau lombaire permettent de penser que l'eugénol, un agoniste/antagoniste des récepteurs vanilloïdes pourrait diminuer la douleur neuropathique en agissant notamment au niveau des récepteurs vanilloïdes situés dans la corne dorsale de la moelle épinière.

Mots-clés : Eugénol, douleur neuropathique, injection intrathécale, hyperalgésie, allodynie, rats Sprague-Dawley.

ABSTRACT

The project is based on the study of the effects of eugenol, the main component of clove oil, on neuropathic pain. The main objective was to determine the central effect of eugenol. In a preliminary study we evaluated the penetrability of eugenol in the central nervous system of rats. Blood, brain and spinal cord samples were collected and concentrations were determined by mass spectrometry. Brain-to-plasma and spinal cord-to-plasma ratios suggest that eugenol penetrates the central nervous system of rats relatively well, with a preferential distribution in the spinal cord. Following the induction of neuropathic pain in male Sprague-Dawley rats using the sciatic nerve ligation model, intrathecal injections of eugenol were done to evaluate the central effect of eugenol. Treatment with the high dose of eugenol significantly decreased secondary mechanical allodynia measured by the Von Frey test after 15min, 2h and 4h and improved thermal hyperalgesia measured by the Hargreaves device after 2h and 4h.

Results support the hypothesis that eugenol may alleviate neuropathic pain, both allodynia and hyperalgesia. Eugenol, a vanilloid agonist/antagonist may therefore reduce neuropathic pain by acting on vanilloid receptors at the level of the dorsal horn of the spinal cord.

Key words: eugenol, intrathecal injection, neuropathic pain, distribution in CNS, Sprague-Dawley rats.

TABLE DES MATIÈRES

Liste des tableaux.....	ix
Liste des figures.....	x
Liste des sigles et des abréviations.....	xv
Dédicace.....	xx
Remerciements.....	xxi
Introduction.....	1

RECENSION DE LA LITTÉRATURE

INTRODUCTION.....	2
1. QU'EST-CE QUE LA DOULEUR ?.....	4
1.1. Fonctionnement de la nociception.....	5
1.1.1. Les différentes étapes.....	5
1.1.2. Les voies de la douleur.....	7
1.1.3. Les fibres transmettant la douleur.....	8
1.1.4. Les substances algogènes.....	10
1.1.5. Les récepteurs impliqués dans la douleur.....	13
1.2. Contrôle endogène de la douleur.....	16
1.3. Cas particulier de la douleur chronique.....	18
1.3.1. Potentialisation à long terme.....	18
1.3.2. Facilitation et inhibition descendantes.....	21

2. LA DOULEUR NEUROPATHIQUE	24
2.1. Définition	24
2.1.1. Les connexions éphatiques.....	25
2.1.2. L'hyperalgésie.....	26
2.2. Le rôle de la glie	27
2.3. Traitements actuels	30
2.4. Evaluation de la douleur neuropathique	32
2.4.1. Les modèles animaux.....	32
2.4.2. Tests utilisés pour évaluation de la douleur neuropathique..	34
3. L'EUGÉNOL	36
3.1. Historique	36
3.2. Autres propriétés de l'eugénol	38
3.3. Mode d'action de l'eugénol	39
3.3.1. Généralités.....	39
3.3.2. Action de l'eugénol sur les récepteurs au GABA.....	40
3.3.3. Action de l'eugénol sur les récepteurs NMDA.....	41
3.3.4. Action de l'eugénol sur les canaux à sodium.....	42
3.3.5. Action de l'eugénol sur le récepteur TRPV1	43
4. LES RÉCEPTEURS VANILLOIDES ET LE TRPV1	43
4.1. Les récepteurs vanilloïdes	43
4.1.1. Caractérisation et localisation des récepteurs vanilloïdes.....	43

4.1.2. Fonctionnement des récepteurs vanilloïdes.....	45
4.2. Les récepteurs Transient Receptor Potential Vanilloïd.....	46
4.2.1. Le TRPV1.....	46
4.3. Les molécules agonistes et antagonistes	48
4.3.1. Présentation.....	48
4.3.2. La capsaïcine en clinique et ses inconvénients.....	50

ARTICLE

ABSTRACT.....	53
1. Introduction.....	54
2. Material and Methods.....	56
2.1. Animals.....	56
2.2. Analytical assay.....	57
2.3. Pharmacokinetic study.....	57
2.4. Pharmacodynamic study.....	58
2.5. Data analysis and statistics.....	63
3. Results.....	63
3.1. Pharmacokinetic results	63
3.2. Pharmacodynamic results.....	65
4. Discussion.....	74
REFERENCES.....	80
ANNEXES.....	91

DISCUSSION ET CONCLUSION

DISCUSSION	95
CONCLUSION GÉNÉRALE	104
BIBLIOGRAPHIE	105
ANNEXE : Autorisation des co-auteurs	138

LISTE DES TABLEAUX

ARTICLE :

Table I: Pharmacokinetic parameters of eugenol in plasma, brain and spinal cord following oral administration of eugenol (40 mg/kg) in male Sprague-Dawley rats. Values calculated from mean plasmatic concentration results.65

ANNEXE :

Table I : Von Frey test values: comparison between neuropathy and low and high doses of eugenol (right paw).....91

Table II : Hargreaves test values: comparison between neuropathy and low and high doses of eugenol (right paw).....92

Table III : Von Frey test values: comparison between neuropathy, days post injection and baseline.....93

Table IV : Hargreaves test values: comparison between neuropathy, days post injection and baseline.....93

Table V : Rotarod values: baseline and values at time of eugenol's maximal effect.94

LISTE DES FIGURES

RECENSION DE LA LITTÉRATURE

Figure 1 : Voies de conduction de la douleur. D'après Bear et coll, 1997. Source : Beaulieu P. 2005. *Pharmacologie de la douleur*. Montréal, QC, CAN: Les Presses de l'Université de Montréal.6

Figure 2 : Quelques éléments participant au déclenchement du signal nociceptif. Source : Norbert Weiss et Michel De Waard M/S : médecine sciences, vol. 22, n° 4, 2006, p. 396-40410

Figure 3 : Des médiateurs chimiques peuvent sensibiliser et parfois activer les nocicepteurs. Source : Lembeck et Gamse 1982 et Fields 1987 dans Kandel ER, Schwartz JH, Jessel TM. 2000. *Principles of Neural Science*. Elsevier/North-Holland, New York,12

Figure 4 : Comparaison d'une terminaison nerveuse normale et lors de sensibilisation centrale. a) En temps normal et b) En état de sensibilisation centrale. Source : Milligan ED, Watkins LR. 2009. Pathological and protective roles of glia in chronic pain. *Nat Rev Neurosci* **10**:23-36,14

Figure 5 : La théorie du portillon. Source : Melzack R, Wall PD. 1965. Pain mechanisms : a new theory. *Science* **150**:971-979.....17

Figure 6: Un modèle pour l'induction de la phase précoce de la potentialisation à long terme. En haut : pendant la transmission synaptique normale à basse fréquence. En bas : quand la membrane post-synaptique est dépolarisée par l'action des récepteurs non-NMDA lors d'une succession d'influx à hautes fréquences qui engendre la PLT. Source : Kandel ER, Schwartz JH, Jessel TM. 2000. *Principles of Neural Science*. Elsevier/North-Holland, New York,.....20

Figure 7 : Projections de la lamina I aux parties émotionnelles du cerveau et de la lamina V au thalamus et au cortex, qui génèrent les composantes affectives et sensorielles de la douleur. Source : Villanueva L, Dickenson AH, Ollat H. 2004. *The pain system in normal and pathological states : a primer for clinicians*. IASP Press.Seattle.23

Figure 8 : L'hyperalgésie secondaire. Source : Beaulieu P. 2005. *Pharmacologie de la douleur*. Montréal, QC, CAN: Les Presses de l'Université de Montréal,.....27

Figure 9 : Le rôle pro-inflammatoire de la glie. Source : Milligan ED, Watkins LR. 2009. Pathological and protective roles of glia in chronic pain. *Nat Rev Neurosci* **10**:23-36,.....29

- Figure 10 : Chirurgie du modèle de Bennett de constriction chronique du nerf sciatique. Source : Photo prise au laboratoire du Dr Pascal Vachon, Université de Montréal.....33
- Figure 11: Appareillage du test de Hargreaves. Source : <http://www.iitcinc.com/Product%20pages/Analgesia/Plantar.html>.....34
- Figure 12 : Appareillage du test de Von Frey. Source : photo de gauche : <http://www.bioseb.com/bioseb>, photo de droite : prise au laboratoire du Dr Pascal Vachon, Université de Montréal.....35
- Figure 13: Illustrations du Giroflier et des clous de girofle. Source : www.itv-midipyrenees.com/publications/fiches-...36
- Figure 14: Molécule d'eugénol.
Source : www.pherobase.com/database/synthesis/synthesi........37
- Figure 15 : Marquage des récepteurs TRPV1 à la résinifératoxine radioactive chez A : le porc, B : l'homme. L'image C est le contrôle où la liaison a été déplacée par l'ajout de résinifératoxine non-radioactive. Source : Szallasi A, Blumberg PM, Nilsson S, Hökfelt T, Lundberg JM. 1994. Visualization by [³H]resiniferatoxin autoradiography of capsaicin-sensitive neurons in the rat, pig and man. *Eur J Pharmacol* **264**: 217-221.....47

Figure 16 : Structures chimiques de certaines molécules activant ou inhibant les récepteurs vanilloïdes. Source : Caterina MJ, Julius D. 2001. The vanilloid receptor: a molecular gateway to the pain pathway. *Annu Rev Neurosci* **24**: 487-517.....49

ARTICLE :

Figure 1: Experimental design.....59

Figure 2 : Mean (\pm SE) concentration profiles on semi-log scale of eugenol in brain, lumbar spinal cord and plasma following a single oral administration (40 mg/kg) in male Sprague-Dawley rats (n = 3 animals/time point).....64

Figure 3 : Von Frey and Hargreaves results (mean \pm SE) for baseline (pre-test) and neuropathy following CCI surgery of the right sciatic nerve in male Sprague Dawley rats (n = 6).....66

Figure 4 : Intrathecal eugenol results for Von Frey and Hargreaves tests (Mean \pm SE) for right paw of male neuropathic Sprague-Dawley rats (n = 6)..... 68

Figure 5 : : Rotarod treadmill scores (Mean \pm SE) of intact male Sprague-Dawley rats (n = 6) after injection of cyclodextrin, and eugenol (10 μ g and 50 μ g).....70

Figure 6 : Von Frey and Hargreaves results (Mean \pm SE) for neuropathy and days following the last eugenol injection (50 μ g) after CCI surgery of the right sciatic nerve in male Sprague Dawley rats (n = 6).....72

Figure 7 : Dorsal horn lumbar spinal cord section X100 (top) stained with hematoxylin-eosin-phloxin-saffran staining showing normal neuronal tissue following intrathecal administration of 50 μ g of eugenol. Lumbar spinal cord dorsal horn with GFAP immunostaining X100 (bottom) showing minimal astrocytic reactivity (dark stains) following intrathecal administration of 50 μ g of eugenol.....73

LISTE DES SIGLES ET DES ABRÉVIATIONS

ad libitum: à volonté

A β : A-beta

A δ : A-delta

ADP : Adénosine-Di-Phosphate

AMP : Adénosine-Mono-Phosphate

AMPA : alpha-amino-3-hydroxy-5-méthyl-4-isoxazole propionate

AM404 : nom d'un vanilloïde de synthèse de la compagnie AMGEN

ASIC: Acid Sensing Ionic Channels

ATP: Adénosine-Tri-Phosphate

B1/B2 : récepteurs des bradykinines de type 1 et 2

B6C3F1 : souche de souris

BDNF: Brain Derived Growth Factor

Ca²⁺: Calcium

CCI: Chronic Constriction Injury (modèle de Bennett)

CFA: Complete Freud's Adjuvant

CGRP: Calcitonin Gene-Related Peptid

CNS: central nervous system

DRG: dorsal root ganglia

ERK: Extracellular signal-Regulated Kinase

F344: souche de rats Fisher

GABA: acide-gamma-amino-butyrique

GCD : ganglion de la corne dorsale

GFAP : Glial Fibrillary Acidic Protein

GLAST : Glutamate/Aspartate Transporter

GLT1 : Glutamate Transporter Type 1

H1 : Récepteur à l'histamine type 1

HPS : Hematoxylin-eosin-Phloxin-Saffran

HSPs: Heat Shock Proteins

IL1: interleukine 1

IL-1 β : interleukine 1 beta

IL-1R: récepteur à l'interleukine 1

IL-6 : interleukine 6

INH : système spinal d'inhibition

Ins(1,4,5)P3 : Inositol 1,4,5-tri-Phosphate

IT: intrathécal

JNK: c-Jun N-terminal Kinase

K⁺: potassium

L5, L6: nerfs lombaires 5 et 6

L6 and L7 vertebrae : vertèbre lombaires 6 et 7

Mg²⁺ : magnésium

MMP2 : Matrix Metalloproteinase 2

MMP9 : Matrix Metalloproteinase 9

MO: Missouri

MRV : médulla rostroventrale

MS-222 : tricaïne méthanesulfonate

Na⁺: sodium

NFκB: Nuclear Factor kappa B

NGF: Nerve Growth Factor

NK1: Neurokinine de type 1

NMDA: N-Methyl-D-Aspartic acid

NO : Nitric Oxyde

NTP : Institut National pour les sciences de la santé environnementale

NY: New York

p : niveau statistiquement significatif

P2X3, P2X4 : purinorécepteurs 3 et 4

P38 MAPK : P38 Mitogen-Activated Protein Kinase

Per os : par voie orale

PGE2 : Prostaglandine E2

P-gps : P-Glycoproteins

PLT : potentialisation à long terme

QC: Québec

rtx : résinifératoxine

RTX-[H3] : résinifératoxine tritiée

SAS : nom du programme de statistiques

SG : substance gélatineuse

SGPA : substance grise péri-aqueducal

SNI : Spared Nerve Injury

T : cellule de transmission

TENS : stimulation électrique transcutanée

TLR : Toll-Like Receptors

TNF : Tumor Necrosis Factor

TNF α : Tumor Necrosis Factor alpha

TRPV1: Transient Potential Receptor Vanilloid type 1

USA: Unites States of America

VGCCs: Voltage Gated Calcium Currents

VR: Vanilloid receptor

5-HT3: récepteur sérotoninergique de type 3

*: p values statistically significant

Unités :

AUC_{0-t}: Area Under Curve from time zero to the last measurable concentration

AUC_{0-inf}: Area Under Curve extrapolated to infinity

C_{max}: maximum plasma concentration

g : unité de gravité

g : gramme

G : Gauge

h: heure

μ g : microgramme

mL : millilitre

μ L : microlitre

μ m : micromètre

m/s : mètre par seconde

mg/kg : milligramme par kilogramme

min : minute

mV : millivolt

n : nombre de sujets dans un groupe

ng : nanogramme

pH : mesure de l'acidité d'une solution

s: seconde

SE : standard error

SEM : standard error of the mean

T_{\max} : time to maximum plasma concentration

W : Watt

X100 : grossissement microscopique fois 100

°C : degrés Celcius

*A ma grand-mère, Solange, qui souffre chaque jour de
douleur neuropathique,*

*A tous ceux dont la douleur fait partie
du quotidien, dans l'espoir qu'un jour ils en soient libérés...*

REMERCIEMENTS

Toute ma gratitude va à mon directeur de recherche, le Dr Pascal Vachon, pour sa patience, sa joie de vivre, sa passion qu'il sait transmettre mieux que quiconque, son optimisme, son efficacité, ses nombreuses qualités humaines et son rire caractéristique ! J'ai eu une chance inespérée de vous avoir comme directeur, merci beaucoup de m'avoir si bien guidée pendant ce projet, pour votre temps jamais compté, pour les discussions sur à peu près tous les sujets. Grâce à vous j'ai pu être initiée au monde de la recherche, réaliser un projet très intéressant et rester au Québec. Je vous en suis très reconnaissante.

Un grand merci au Dr Francis Beaudry pour son aide précieuse notamment au niveau informatique et pour la relecture, merci à Catherine Ferland, et au Dr Pablo Lema pour leur aide pendant ce projet de recherche. Merci au Dr Sarah Guénette pour la documentation.

Merci à ma grand-mère Solange, pour m'avoir fait confiance et avoir testé le clou de girofle, j'espère que l'apaisement procuré persistera si tu n'oublies pas de prendre tes tisanes !

Merci à mes parents, pour la relecture et pour avoir été là dans les moments plus difficiles.

Merci à mon amour, Nicolas, pour avoir accepté de venir au Canada même si ça n'a pas été facile tous les jours, et pour le temps passé à la mise en page de cet ouvrage... je t'aime très fort.

Merci à Micheline St Germain, sans qui toute cette aventure n'aurait jamais été possible !

INTRODUCTION

La douleur neuropathique est une affection de plus en plus fréquente qui touche les hommes et les animaux. Ses origines sont multiples mais le diabète en est la cause principale, sachant que 50% des diabétiques développeront une douleur neuropathique. Différents traitements sont actuellement utilisés mais n'arrivent pas à soulager tous les patients, ou ne sont pas toujours bien tolérés à cause de leurs effets secondaires. L'intérêt est donc suscité de trouver d'autres alternatives à ces traitements en étudiant notamment des molécules plus naturelles qui auraient possiblement moins d'effets adverses, dépendamment de la substance étudiée. Des molécules faisant partie de la famille des vanilloïdes ont démontré des effets analgésiques autant contre la douleur inflammatoire que la douleur neuropathique. Des études *in vitro* ont démontré que l'eugénol, composant principal du clou de girofle, cause une activation/désactivation du récepteur vanilloïde TRPV1. Les effets analgésiques de l'eugénol seraient donc principalement expliqués par le blocage réversible des récepteurs vanilloïdes en inhibant la transmission douloureuse. Présents à plusieurs niveaux dans le système nerveux des mammifères, les récepteurs vanilloïdes se retrouvent tant dans les cellules du système nerveux central que dans les cellules du système nerveux périphérique. Ce projet de maîtrise est la continuité d'expériences précédemment réalisées sur l'eugénol afin d'élucider un peu plus sa biodistribution et son lieu d'action, notamment en étudiant l'effet central de l'eugénol sur la douleur neuropathique en l'injectant directement dans le système nerveux.

RECENSION DE LA LITTÉRATURE

INTRODUCTION

La douleur est un domaine de recherche en ébullition. En 1957 le professeur Alajouanine écrivait dans la préface de son livre son souhait qu'une « plus parfaite connaissance de la douleur et des douleurs serve à soulager ou à guérir davantage de patients, le vrai but de la médecine ». (Alajouanine, 1957)

Les différentes douleurs qui nous affectent ainsi que nos animaux ne sont ni simples à comprendre, ni à soigner et beaucoup d'efforts sont entrepris pour diminuer les douleurs qu'elles soient chirurgicales ou associées à d'autres pathologies. La recherche a fait de considérables avancées ces dernières années sur la compréhension des voies douloureuses, des emplacements anatomiques des différents récepteurs impliqués dans la douleur, notamment chez le rat, et des mécanismes de transfert des informations nociceptives à travers le système nerveux central (Willis et Coggeshall, 2004). L'analgésie est un but omniprésent dans les thérapeutiques médicales aujourd'hui et prend une place de plus en plus importante également en médecine vétérinaire.

Afin de mieux comprendre les différents mécanismes qui sous-tendent la douleur, différents modèles sur les animaux de laboratoire ont été mis au point. Les aboutissements de ces travaux de recherche sont utiles afin de comprendre les différents aspects de la nociception autant en médecine humaine que vétérinaire, bien que les voies de la douleur soient parfois différentes entre les espèces.

A cet effet, l'utilisation du rat nous permet de mieux comprendre les voies nerveuses de ce mammifère qui se rapprochent des voies nerveuses humaines. Les rongeurs sont une espèce idéale pour effectuer des études de par leur forte prolificité, leur court cycle de reproduction et leur longévité réduite (Kohn et Clifford, 2002). Les différentes manipulations effectuées sur ces animaux sont d'une grande aide et sont nécessaires afin que les connaissances progressent et que les médecins et vétérinaires soient à même de soulager un plus grand nombre d'individus.

1. QU'EST-CE QUE LA DOULEUR ?

La douleur est définie selon l'IASP (International Association for the Study of Pain) comme une « sensation ou une perception émotionnelle désagréable, consécutive à une altération tissulaire réelle ou potentielle ou décrite en des termes évoquant une telle altération ». Elle est toujours subjective et peut varier d'un individu à l'autre. Chaque personne en apprend la signification par l'expérience dès les premiers moments de la vie. La douleur peut s'exprimer à plusieurs intensités allant d'une faible douleur à une douleur chronique ou encore une douleur insupportable menaçant la survie. La douleur peut accélérer le développement de tumeurs par une inhibition des fonctions immunitaires (Ben-Eliyahu *et al*, 1991 ; Keller *et al*, 1981 ; Laudenslager *et al*, 1983). Le contrôle de la douleur est donc vital chez les patients souffrant de cancer (Zeppetella, 2009). Il existe des différences dans la perception de la douleur, liées à l'éducation, au sexe de l'individu mais aussi à l'âge. Les enfants et les personnes âgées reçoivent moins d'analgésiques que les jeunes adultes (Egbert, 1990 ; Mc Grath, 1990). Ce n'est que récemment que l'on a admis que les bébés humains souffrent réellement (Gauvin-Piquard et Pichard-Leandri, 1988). La douleur est donc un phénomène désagréable variant selon différentes caractéristiques physiologiques et psychologiques des individus.

1.1. Fonctionnement de la nociception

1.1.1. Les différentes étapes

Le stimulus nociceptif initial ne constitue pas l'unique facteur contribuant à la douleur ressentie. Entre ces deux événements se succèdent quatre étapes marquées par une série de réactions chimiques et électriques (Fields, 1987) : La transduction sensorielle correspond à la transformation du stimulus mécanique, thermique ou chimique en énergie chimio-électrique dans les terminaisons nerveuses sensorielles spécialisées. Ensuite la transmission de l'influx suit trois séquences : de la périphérie à la moelle épinière, de la moelle au tronc cérébral et au thalamus et du thalamus au cortex. La modulation se fait par les neurones inhibiteurs avant que l'influx n'atteigne le cortex puis enfin la perception de la douleur est ressentie. Pour l'interpréter tout individu se réfère à sa situation émotionnelle et à la sommation des ses expériences passées.

Les premiers intervenants dans la transmission de la douleur sont, chez les mammifères, les nocicepteurs, qui sont des terminaisons libres (mécaniques, chimiques, thermiques) disséminées un peu partout dans l'organisme (Besson *et al*, 1982). Un nocicepteur a deux caractéristiques : il répond de façon proportionnelle à l'intensité du stimulus et a un seuil de réponse plus élevé que les simples thermorécepteurs et mécanorécepteurs répondant à des stimuli légers (Besson *et al*, 1982). Un neurone primaire véhicule alors l'information recueillie par ces récepteurs jusqu'aux cornes dorsales de la moelle épinière, en passant par le ganglion de la corne dorsale (GCD). Le GCD contient des neurones sensitifs

pseudo-unipolaires, c'est-à-dire qu'ils ne donnent naissance qu'à un seul axone qui bifurque pour aller d'un côté vers la périphérie et de l'autre vers la corne dorsale de la moelle (Milligan et Watkins, 2009). Dans la moelle, un neurone secondaire croise le plan sagittal et se prolonge en formant des voies spinothalamiques jusqu'au thalamus, en passant par la substance grise périaqueducale et les noyaux du raphé. Au niveau thalamique, un troisième neurone envoie les informations nociceptives vers différentes régions du cortex et du système limbique.

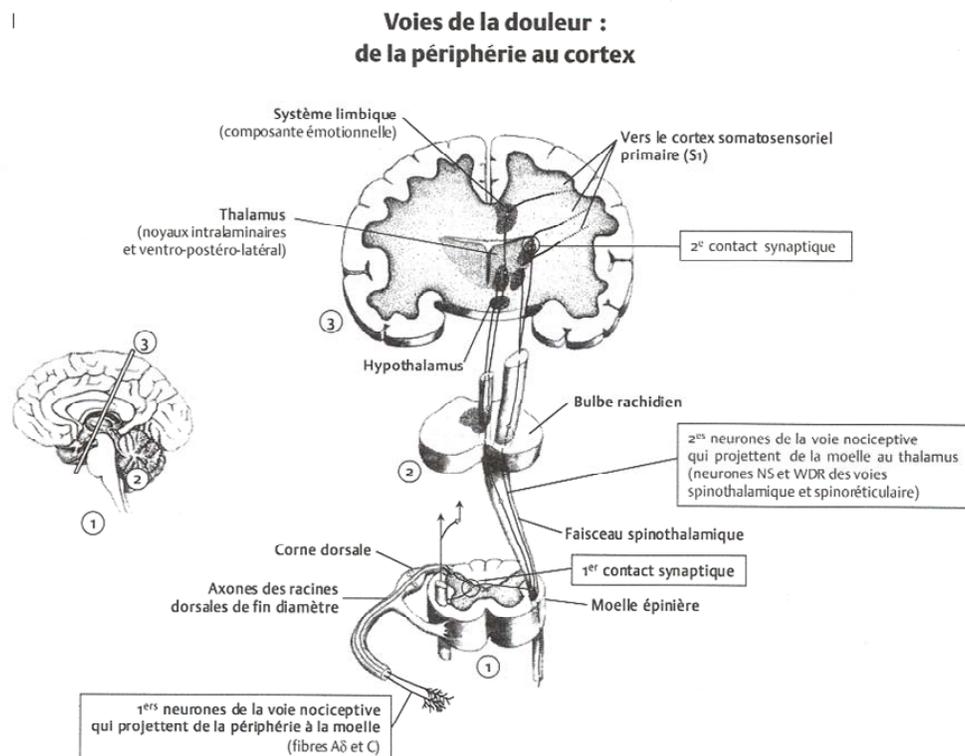


Figure 1 : Voies de conduction de la douleur. Le neurone primaire provient de la périphérie (fibres A δ ou C). Il fait un contact synaptique avec un neurone secondaire qui est soit un neurone nociceptif spécifique ou un neurone nociceptif

non spécifique. Les fibres de ces seconds neurones croisent immédiatement dans la moelle pour se projeter vers les noyaux latéraux du thalamus par la voie spinothalamique ou vers différentes structures du tronc cérébral et les noyaux médians du thalamus par la voie spinoréticulaire. Un deuxième contact synaptique se fait aux noyaux latéraux ou médians du thalamus. Les neurones des noyaux latéraux projettent vers les centres corticaux sensori-discriminatifs du cortex somatosensoriel, tandis que les neurones des noyaux médians projettent vers les centres corticaux motivo-affectifs du système limbique et du cortex cérébral.

NS : neurones nociceptifs spécifiques

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

(Source : Beaulieu, 2005).

1.1.2. Voies de la douleur

Les voies ascendantes de la douleur se divisent en fonction de leur lame d'origine dans la moelle épinière (Bernard et Gauriau, 2004). Il y a deux voies principales que peuvent prendre les informations nociceptives : la voie spinothalamique latérale et la voie spinoréticulothalamique (Marchand, 2005).

La première, la plus importante, projette vers les noyaux thalamiques latéraux et prend origine au niveau des lames 1, 4 et 6 de la corne dorsale de la moelle. Ses axones se terminent dans la partie latérale du complexe ventro-basal et dans le groupe nucléaire postérieur du thalamus. Cette voie est d'afférence rapide avec des champs récepteurs précis et permet de localiser précisément d'où vient la douleur car les fibres sont ensuite projetées vers le cortex somatosensoriel (Marchand,

2005). Une importante constance interindividuelle caractérise cette composante sensori-discriminative (Fields, 1987).

La deuxième voie est composée de fibres qui viennent des lames profondes 7 et 8. Ses axones cheminent d'abord dans la formation réticulée au niveau du tronc cérébral avant de projeter vers les noyaux thalamiques médians. Les signaux sont ensuite transmis à de nombreuses sphères du cortex ipsilatéral, notamment le lobe frontal et le système limbique. Cette voie, qui a des champs récepteurs plus larges et des fibres plus lentes, joue un rôle dans la mémoire et la perception désagréable liée à la douleur. Les modulations interindividuelles sont importantes face à cette composante (Marchand, 2005).

Ces deux voies nous permettent de nous soustraire à une douleur immédiate par un réflexe de retrait et donc protéger notre organisme de lésions, ainsi que d'éviter cette douleur à l'avenir.

1.1.3. Fibres transmettant la douleur

Les fibres nerveuses qui véhiculent l'information sont de différents diamètres et ont différentes vitesses de conduction. On les nomme les fibres A β , A δ et C (Marchand, 2005). Les fibres C sont non myélinisées, de diamètre variant entre 0,2 et 1,5 μ m et ont une vitesse de transmission lente de 0,5 à 2 m/s. Elles sont responsables de la seconde douleur, plus tardive et diffuse, de type brûlure. Elles ont un rôle important pour ce qui est de l'intensité de la douleur ressentie.

Les fibres A δ sont partiellement myélinisées, de diamètre variant entre 1 et 5 μ m et ont une vitesse de 5 à 30 m/s. Elles sont responsables de la première douleur,

rapide et bien localisée. Leur champ récepteur est relativement étroit et elles ne sont pas spontanément actives. Les nocicepteurs prolongés par ces fibres se divisent en mécano-nocicepteurs (20%) sensibles aux piqûres et aux pincements et en récepteurs polymodaux qui répondent aussi bien à des stimulations mécaniques, thermiques et même chimiques (Besson et Chaouch, 1987). Certaines fibres A δ agissent comme récepteurs thermiques pour des valeurs de chaud et de froid sans composantes nociceptives (Price, 1988).

Enfin, les fibres A β sont les plus grosses, d'un diamètre de 6 à 12 μ m. Elles sont myélinisées, et conduisent les influx le plus rapidement à une vitesse comprise entre 35 et 75 m/s. Elles répondent également à des stimuli non douloureux comme les vibrations ou le toucher léger.

La stimulation de ces fibres, seules, n'occasionne pas de douleur mais leur blocage en présence de stimulation des autres fibres, provoque une douleur plus intense. Elles auraient donc un certain rôle d'inhibition (Price, 1988). De plus, l'atteinte de ces fibres lors d'une pathologie ou d'une lésion, peut conduire à des influx anormaux lorsque ces fibres se mettent à transformer les influx non douloureux en douleur, phénomène appelé allodynie. (Milligan et Watkins, 2009).

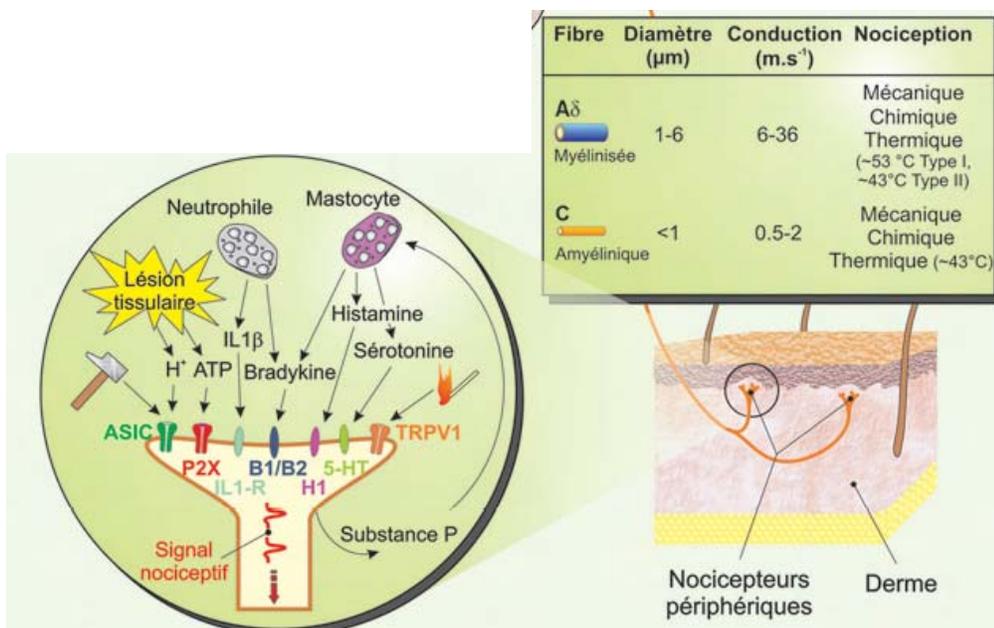


Figure 2 : Sont représentés quelques éléments participant au déclenchement du signal nociceptif. Ce signal peut être déclenché soit par l'activation de protéines canal en réponse à un stimulus d'origine thermique ou mécanique, soit par un ensemble de molécules libérées par le tissu lésé ou sécrétées par les cellules participant au processus inflammatoire s'il a lieu. Le signal nociceptif est ensuite conduit jusque dans la corne dorsale de la moelle épinière par des neurofibres de premier ordre Aδ et C. ASIC : acid sensing ionic channels ; P2X : récepteur ionotropique P2X ; IL-1R : récepteur de l'interleukine-1 ; B1/B2: récepteurs des bradykinines de type 1 et 2 ; H1 : récepteur de l'histamine de type 1 ; 5-HT : récepteur de la sérotonine ; TRPV1 : transient release potential vanilloid 1 ; IL-1β : interleukine-1β. (Source : Weiss et De Waard, 2006).

1.1.4. Substances algogènes

Une stimulation douloureuse aura pour effet de provoquer la libération de différents neurotransmetteurs à travers le réseau de conduction de la douleur. De

nombreuses substances ayant un rôle de signal d'inflammation chronique seront à leur tour relâchées par différentes cellules au pourtour de la terminaison nerveuse. On retrouve entre autres des substances comme les prostaglandines, l'histamine, la substance P, l'ATP, l'ADP, l'AMP, la bradykinine, le glutamate, les interleukines, les protons et le facteur nécrosant de tumeur alpha (Milligan et Watkins, 2009) dont certaines seront impliquées dans des cascades d'évènements comme l'inflammation, la transmission neuronale de la douleur et la sensibilisation périphérique (Guilbaud et Besson, 1997). La libération de protons, bradykinine, sérotonine et prostaglandines sont les plus aptes à activer les nocicepteurs alors que les terminaisons non-nociceptives ne sont pas affectées (Reeh et Kress, 1995 ; Handwerker, 1996 ; Raja *et al*, 1999). Les leucocytes jouent aussi un rôle dans l'activation des nocicepteurs (Fields, 1987). Le NGF (Nerve Growth Factor) et le BDNF (Brain-Derived Growth Factor) joueraient un rôle prépondérant dans le processus de la sensibilisation à court et à long terme. La concentration de NGF augmente rapidement lors de lésion inflammatoire (Donnerer *et al*, 1993 ; Mc Mahon et Bennett, 1997).

Sous l'activation des fibres C, les nocicepteurs eux-mêmes libèrent certains neuromédiateurs comme la substance P. Ce neuropeptide de 11 acides aminés se retrouve dans les fibres nerveuses de beaucoup de tissus sensibles à la douleur, notamment dans la paroi des vaisseaux sanguins (Furness *et al*, 1982) et dans les fibres afférentes primaires amyéliniques (Otsuka *et al*, 1982). C'est un vasodilatateur puissant qui occasionne de l'œdème car il provoque la libération d'histamine par les mastocytes. L'histamine excite les nocicepteurs et peut elle-

même provoquer une vasodilatation et de l'oedème. (Fields, 1987). La vasodilatation et l'hyperalgésie secondaires à une lésion cutanée ont été expliquées par l'excitation des nocicepteurs et ses conséquences, c'est-à-dire la libération de substance P et secondairement, d'histamine (Lembeck, 1983). Les données anatomiques plaident en faveur de cette hypothèse puisque l'on observe fréquemment des axones vraisemblablement afférents contenant de la substance P à proximité de mastocytes riches en histamine (Kruger *et al*, 1985).

La substance P a donc un rôle clé dans la transmission de la douleur. Son administration intrathécale et intraveineuse provoque chez les animaux des comportements de grattage et de mordillement qui disparaissent en présence d'un antagoniste des récepteurs Neurokinine de type 1 (NK1), récepteurs de liaison de la substance P- ou d'une injection de morphine (Hylden et Wilcox, 1981 ; Gamse et Saria, 1986 ; Sakurada *et al*, 1996). Les opioïdes inhibent la libération de substance P bloquant ainsi une certaine partie de la transmission douloureuse.

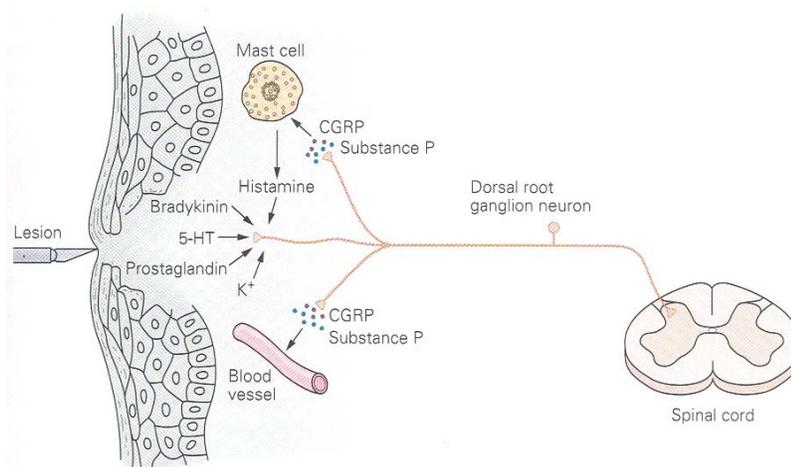


Figure 3 : Des médiateurs chimiques peuvent sensibiliser et parfois activer les nocicepteurs. Une lésion provoque la libération de bradykinine et de

prostaglandines qui agissent sur les nocicepteurs. L'activation de ces nocicepteurs provoque la libération de Substance P et de CGRP (Calcitonin Gene Related Peptide). La Substance P agit sur les mastocytes des terminaisons sensorielles. Leur dégranulation libère de l'histamine qui excite directement les nocicepteurs. La Substance P provoque l'extravasation du plasma et le CGRP provoque la dilatation des vaisseaux périphériques. L'œdème résultant de ces mécanismes entraîne la libération subséquente de bradykinine. (Source : Lembeck et Gamse, 1982 ; Fields, 1987).

1.1.5. Récepteurs impliqués dans la douleur

Au niveau moléculaire, plusieurs récepteurs sont impliqués dans la douleur, comme les récepteurs NK1 auxquels se lie la substance P relâchée par les neurones pré-synaptiques afférents et les récepteurs AMPA (alpha-amino-3-hydroxy-5-méthyl-isoxazole) et NMDA (N-Méthyl-D-Aspartate) auxquels se lie le glutamate. Dans des circonstances normales, il y a toujours un peu de glutamate libéré, conséquence de légers stimuli nociceptifs, qui module l'activation à court terme des récepteurs AMPA et kainate. Ils procurent de l'information aux centres supérieurs quant à la durée et l'intensité du stimulus. D'autres neuromodulateurs comme le CGPR (Calcitonin Gene-Related Peptide), la galanine, le polypeptide vasoactif intestinal et la somatostatine ont aussi des rôles cruciaux dans la synapse de la corne dorsale (Milligan et Watkins, 2009). Une co-libération de glutamate, substance P et CGRP entraîne l'activation des récepteurs NMDA provoquant des courants Ca^{2+} voltage dépendants (VGCCs). L'activation de certaines kinases, des récepteurs P2X3 par l'ATP, des récepteurs NK1 par la substance P, des récepteurs

métabotropiques par le glutamate, et la libération du BDNF, contribuent à augmenter la transmission douloureuse. Le récepteur TRPV1 impliqué aussi dans la transmission du signal douloureux, se trouve surexprimé lors de l'inflammation et ce phénomène contribue lui aussi à la sensibilisation aux signaux nociceptifs (Milligan et Watkins, 2009).

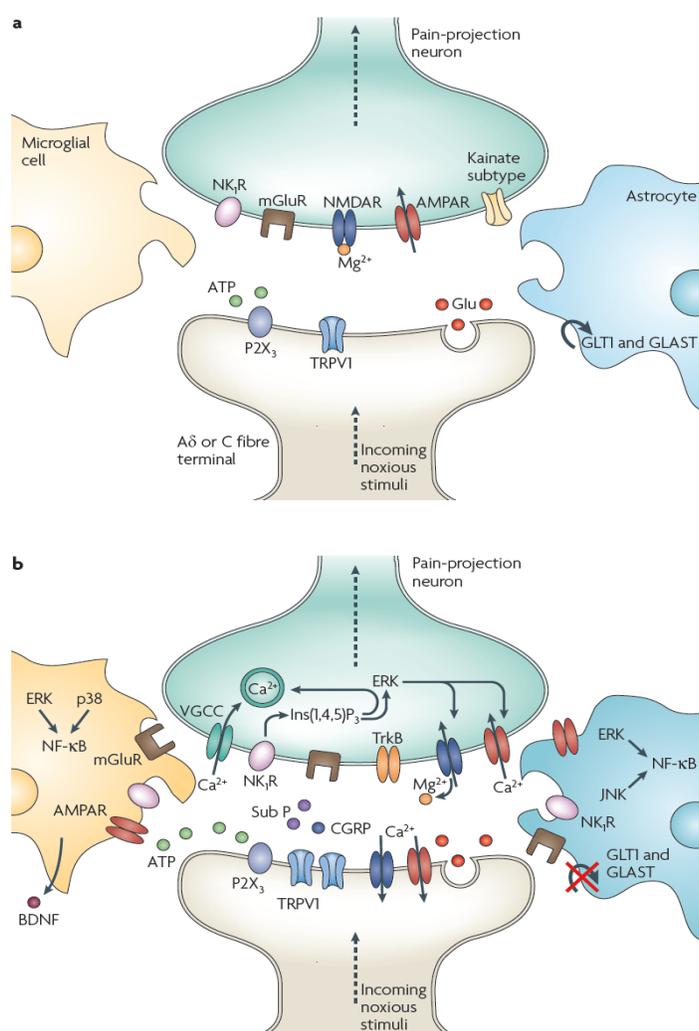


Figure 4: a) En temps normal, l'activation à basse fréquence des fibres Aδ et C par de faibles stimuli douloureux provoque la libération de glutamate des

terminaisons nerveuses afférentes pré-synaptiques de la corne dorsale de la moelle épinière. Il s'ensuit l'activation à court terme des récepteurs AMPA et kainate. Le récepteur NMDA, quant à lui, reste silencieux à cause de l'ion Mg^{2+} présent en son centre. Les astrocytes et la microglie restent inchangés par ces évènements synaptiques.

b) Après une certaine répétition des communications synaptiques, les neurones de la corne dorsale répondent davantage aux stimuli. La libération synchronisée de Substance P (Sub P) et de CGRP provoque l'activation du récepteur NMDA créant ainsi des courants calciques voltage-dépendants (VGCCs). De plus, la voie de signalisation de l'inositol-1,4,5-triphosphate (Ins(1,4,5)P3) et les MAPKs comme la kinase régulée par un signal extracellulaire (ERK) et la kinase c-Jun-N-terminale (JNK) sont activées. Dans les neurones, l'ERK peut continuer de sensibiliser les récepteurs AMPA et NMDA. L'activation des purinorécepteurs (P2X3) par l'ATP, des récepteurs à la substance P (NK1), des récepteurs métabotropiques au glutamate (mGluR) et la libération de BDNF contribuent à accentuer la transmission nociceptive. Les astrocytes et la microglie expriment différents récepteurs et sont activés par le glutamate, l'ATP et la substance P. Au niveau de la synapse, lorsqu'il y a trop longtemps présence de glutamate, les transporteurs au glutamate GLT1 et la navette Glutamate-Aspartate (GLAST), qui jouent un rôle crucial dans la clairance du glutamate de la fente synaptique, se dérèglent. Une excitation prolongée peut entraîner une activation des JNK et ERK au sein de la microglie et des astrocytes. Chacune de ces kinases peut activer la transcription du facteur nucléaire κB (NF κB) ce qui induit la synthèse de facteurs de l'inflammation. (Source : Milligan et Watkins, 2009).

En conditions normales, l'ion Mg^{2+} reste à l'intérieur de récepteur NMDA. Lors de communications synaptiques répétées, en cas de douleur, un phénomène apparaît, connu sous le nom de « sensibilisation centrale ». Quand les conditions sont telles que la stimulation nociceptive perdure, une quantité suffisante de substance P et de glutamate est déversée pour maintenir les neurones de la corne dorsale en dépolarisation. L'ion Mg^{2+} dans le récepteur NMDA est alors expulsé permettant alors un flux intrant de calcium dans le neurone, ce qui produit la synthèse d'oxyde nitrique et de prostaglandines. Ces molécules augmentent l'excitabilité des neurones de la corne dorsale et produisent une relâche exagérée de neurotransmetteurs de la part des neurones présynaptiques. Les messages douloureux transmis aux centres supérieurs sont alors amplifiés (Milligan et Watkins, 2009).

1.2. Contrôle endogène de la douleur

Il existe des mécanismes de contrôle endogène de la douleur afin d'éviter que celle-ci ne devienne chronique. Trois mécanismes ont été mis au jour : les mécanismes spinaux, les contrôles inhibiteurs descendants, et les contrôles par les centres supérieurs.

- Les mécanismes spinaux produisent des effets localisés expliqués par la théorie du portillon de Melzack et Wall. Ces chercheurs se sont penchés sur le fait que d'autres stimuli comme les stimuli cutanés ou l'état émotionnel pouvaient altérer ou inhiber le niveau de douleur ressenti.

Théorie du portillon

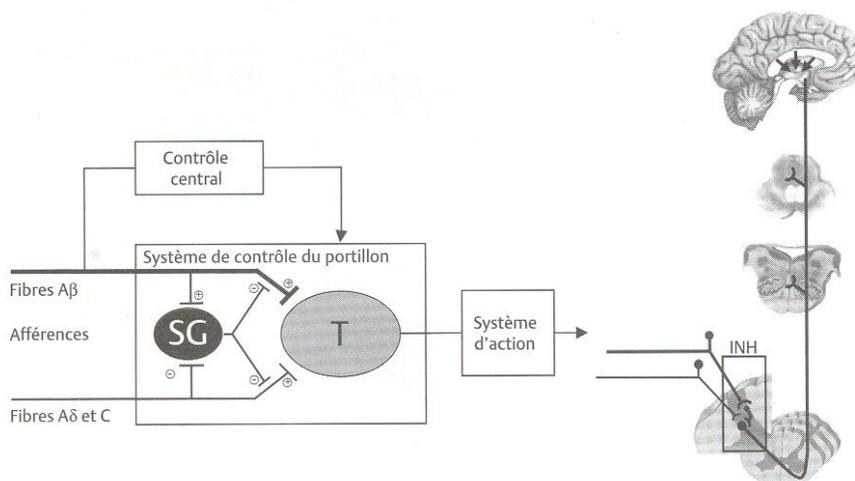


Figure 5: La théorie du portillon propose que la stimulation des fibres de gros calibre ($A\beta$) produit une analgésie localisée au segment de la stimulation par le recrutement d'interneurones inhibiteurs des cornes postérieures de la moelle, réduisant l'activité des cellules de transmission (T) vers les centres supérieurs. Donc une stimulation de basse intensité comme celle appliquée lors de l'utilisation du TENS (Stimulation Electrique Transcutanée) ou du massage léger produira une analgésie locale par le recrutement de ce système spinal d'inhibition (INH). Par contre, lors de perte de l'inhibition centrale l'excitation des fibres du toucher se traduit par une sensation douloureuse. SG : Substance gélatineuse. (Source : Melzack et Wall, 1965).

La stimulation sélective des fibres $A\beta$ recrute des interneurones inhibiteurs dans la substance gélatineuse des cornes postérieures de la moelle. Les cellules de la substance gélatineuse, à leur tour, régulent la dépolarisation de cellules plus

profondes de la corne dorsale qui donnent naissance à la voie spinoréticulothalamique (Melzack et Wall, 1965).

- Les contrôles inhibiteurs descendants, quant à eux, produisent des effets diffus en recrutant les interneurons enképhalineramiques. Le concept CIDN (contrôle inhibiteur diffus nociceptif) proposé par Le Bars en 1979 explique qu'une stimulation nociceptive, en plus d'envoyer des signaux vers le thalamus et les centres supérieurs, envoie des afférences vers la substance grise péri-aqueducule (SGPA) et les noyaux du raphé qui eux vont envoyer des afférences inhibitrices vers les différents niveaux spinaux via la sécrétion de sérotonine et de noradrénaline (Le Bars *et al*, 1979 a et b).

- Enfin, il existe un contrôle de la douleur par les centres supérieurs corticaux comme le démontre l'hypnose ou l'effet placebo (Marchand, 2005).

1.3. Cas particulier de la douleur chronique

1.3.1 Potentialisation à long terme

Des changements à long terme peuvent être induits dans les neurones spinaux. Bliss et Lomo (1973) ont montré que des successions de stimuli électriques brefs mais de haute fréquence augmentaient la transmission au niveau des synapses dans l'hippocampe et que cet effet s'étalait sur plusieurs heures. Ce phénomène a été appelé la potentialisation à long terme (PLT). Cette PLT pourrait être une cause sous-jacente de l'hyperalgésie, qui est une réaction exagérée face à une douleur peu intense, (Sandkühler, 2000) et il a été démontré que la sensibilisation centrale pourrait être une forme de PLT (Willis 1997, 2002). Des stimulations répétées à

haute fréquence du nerf sciatique induisent une PLT de la transmission synaptique au niveau des fibres A δ (Randic *et al*, 1993) et C (Liu et Sandkühler, 1995 ; 1997) *in vitro* et *in vivo*. L'activation simultanée de plusieurs récepteurs comme des récepteurs NMDA, AMPA et des récepteurs métabotropiques au glutamate est nécessaire pour l'induction de PLT au niveau spinal. Cette induction dépendra de l'intensité, du type de stimulus et de l'activité des contrôles descendants (Randic *et al*, 1993 ; Liu and Sandkühler, 1995 ; 1997). De plus, l'activation de phosphokinases et la phosphorylation subséquente des récepteurs entraîneront une modification fonctionnelle de ces derniers, les rendant plus excitables. La synthèse de récepteurs dans le noyau va également augmenter via des seconds messagers, ce qui va amplifier encore davantage la PLT. La PLT peut apparaître aussi bien au niveau de la voie sensorielle que de la voie affective de la douleur.

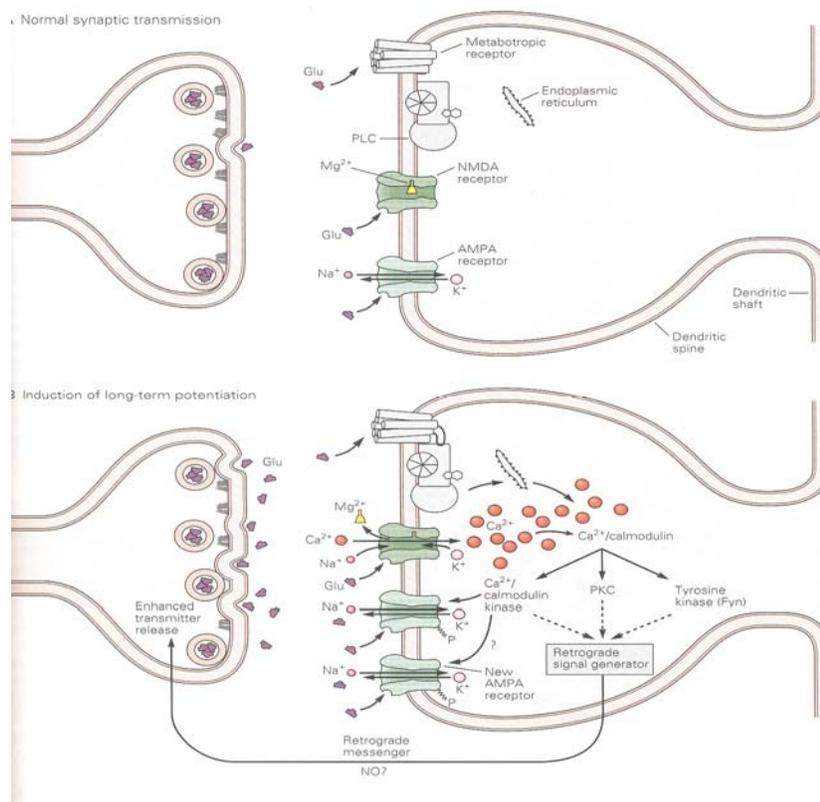


Figure 6 : Un modèle pour l'induction de la phase précoce de la potentialisation à long terme. En haut : pendant la transmission synaptique normale à basse fréquence, du glutamate est libéré des terminaisons pré-synaptiques et agit sur les récepteurs NMDA et non-NMDA qui sont de type AMPA. Du sodium et du potassium passent à travers les récepteurs AMPA mais pas à travers les récepteurs NMDA à cause de l'ion Mg^{2+} qui bloque le canal au potentiel de repos de la membrane.

En bas : quand la membrane post-synaptique est dépolarisée par l'action des récepteurs non-NMDA lors d'un train à haute fréquence qui engendre la PLT, l'ion Mg^{2+} est expulsé du canal NMDA, permettant ainsi au Ca^{2+} de passer librement. L'augmentation de calcium dans la terminaison dendritique active des

kinases calcium-dépendantes (la kinase Ca^{2+} /calmoduline et la protéine kinase C) ainsi que la tyrosine kinase Fyn. Ensemble, ces kinases induisent la PLT. La kinase calmoduline/ Ca^{2+} phosphoryle les canaux non-NMDA et augmente leur sensibilité au glutamate et de ce fait d'autres récepteurs normalement silencieux, s'activent. Ces changements engendrent une contribution post-synaptique pour la maintenance de la PLT. De plus, lorsque la PLT est induite, on pense que la cellule post-synaptique libère d'une façon encore inconnue, une série de messagers rétrogrades, dont le NO, qui agissent sur des protéines kinases des terminaisons pré-synaptiques pour initier une augmentation de la libération de neurotransmetteur qui contribue à la PLT. (Source : Kandel et al, 2000).

1.3.2 Facilitation et inhibition descendantes

Des changements périphériques et centraux apparaissent lors de douleur chronique. En réponse à une lésion, la douleur peut être amplifiée par des phénomènes comme la potentialisation à long terme ou la sensibilisation centrale. Plus récemment, une autre voie de facilitation d'origine supra-spinale a été identifiée. Cette voie excitatrice descendante, qui part du mésencéphale et du tronc cérébral peut potentialiser davantage les mécanismes spinaux de la douleur indépendamment d'évènements directs spinaux ou périphériques (Urban et Gebhart, 1999 ; Ossipov *et al*, 2000 ; Suzuki *et al*, 2002).

La transmission spinale peut être modulée par certains sites supraspinaux comme la substance grise péri-aqueducale et la médulla rostroventrale (MRV), exerçant à la fois des influences facilitatrices et inhibitrices sur la moelle (Urban et Gebhart, 1999 ; Millan, 2002). Des études comportementales avaient montré surtout une

influence inhibitrice de ces deux régions, mais plus récemment, la fonction opposée, c'est-à-dire une excitation venant de la MRV, a été démontrée. Il y a de plus en plus d'évidences anatomiques et pharmacologiques qui attestent l'existence de voies descendantes facilitatrices et leur rôle prépondérant dans le développement et la maintenance de sensibilisation centrale suite à une lésion (Urban et Gebhart, 1999 ; Porreca *et al*, 2002). Après induction de la neuropathie, la dépression neuronale de la MRV ou l'ablation sélective de neurones de la MRV exprimant les récepteurs opioïdes μ a atténué l'hyperalgésie tactile et thermique (Porreca *et al*, 2001 ; Burgess *et al*, 2002). De fait, une activation inappropriée des influences descendantes facilitatrices serait une des causes sous-jacentes de la neuropathie au niveau spinal. Des études récentes ont montré que la sérotonine serait un substrat clé de ces voies descendantes, produisant son effet excitateur en activant les récepteurs à sérotonine de la moelle épinière. Ainsi les récepteurs sérotoninergiques 5-HT₃, surtout localisés dans la corne dorsale superficielle, pourraient jouer ce rôle (Zeitz *et al*, 2002). De plus, plusieurs résultats tendent à montrer que les neurones ayant des récepteurs NK1 de la lamina 1 de la moelle seraient à l'origine de la boucle impliquant la MRV qui contrôle l'excitabilité spinale et la sensibilité à la douleur en activant la voie descendante sérotoninergique (Mantyh *et al*, 1997 ; Suzuki *et al*, 2002).

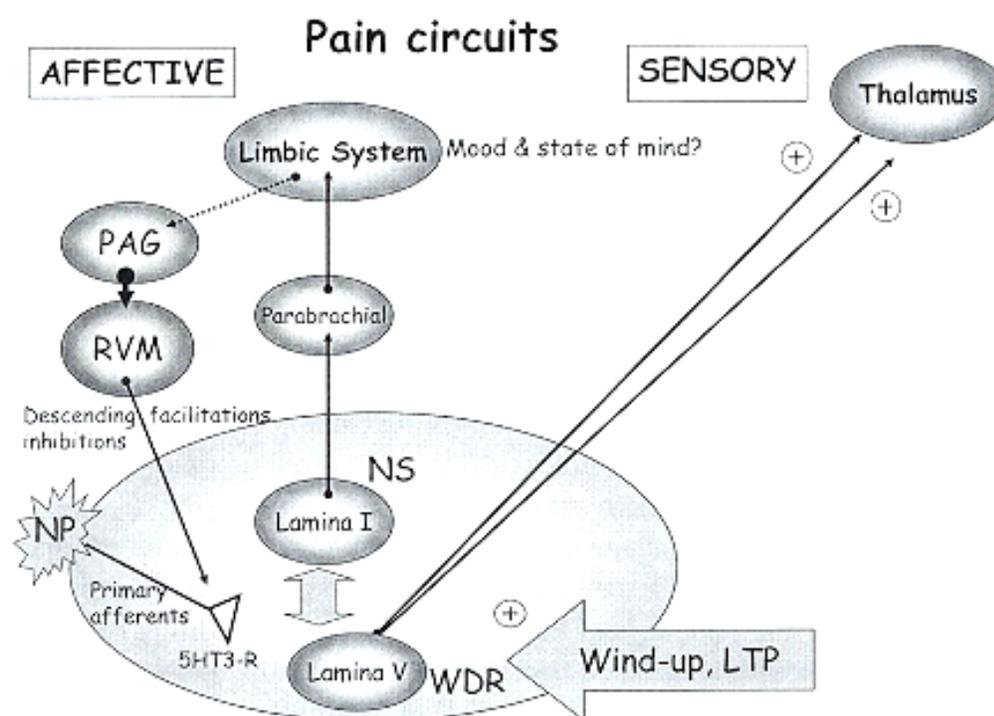


Figure 7 : Schéma montrant les projections de la lamina I vers les parties « émotionnelles » du cerveau (système limbique), et des voies de la lamina V au thalamus et au cortex, qui génèrent les composantes sensorielles discriminatives de la douleur. Lors de neuropathie, une augmentation de la facilitation descendante par les neurones de la lamina I et passant par la SGPA (PAG sur le schéma) et la MRV (RVM sur le schéma) active les récepteurs spinaux 5-HT₃, ce qui augmente d'autant plus l'activité ascendante de la corne dorsale. Ces voies seraient une des possibilités par lesquelles l'humeur pourrait augmenter la perception de la douleur et possiblement modifier les effets de certains médicaments sur l'activité spinale. (Source : Villanueva et al, 2004).

Lors de conditions pathologiques comme la neuropathie, les voies descendantes facilitatrices sont donc potentialisées et les influences excitatrices prédominent. Il

en résulte en une augmentation de la sensibilisation centrale et la contribution au développement de l'allodynie et de l'hyperalgésie.

2. LA DOULEUR NEUROPATHIQUE

2.1. Définition

La douleur neuropathique peut apparaître chez les humains et les animaux et se caractérise par des phases de douleur étendue, de déficit sensoriel, de sensation de brûlure, d'allodynie et d'hyperalgésie (Milligan et Watkins, 2009). Elle est la conséquence d'un dysfonctionnement du système nerveux central ou périphérique. La douleur neuropathique peut provenir d'une origine métabolique, infectieuse, médicamenteuse, toxique, néoplasique ou traumatique (Boulanger, 2005). Le diabète est sûrement la cause la plus importante avec 50% des patients diabétiques développant des neuropathies variables (Harvey, 2008). La prévalence des personnes souffrant de douleur neuropathique augmente avec l'âge (Boulanger, 2005). La douleur neuropathique s'exprime par des symptômes variés pouvant aller du picotement à la sensation de brûlure lancinante, d'élanement, d'engourdissement ou la sensation de décharge électrique. Mais les deux grandes caractéristiques en matière de symptômes sont le développement d'allodynie et également d'hyperalgésie qui seront développées plus loin.

L'hyperalgésie consiste en une augmentation de la perception douloureuse suite à un stimulus douloureux et l'allodynie, en une perception douloureuse d'une stimulation non douloureuse (Nichols *et al*, 1999). Ces deux facettes peuvent s'exprimer indépendamment ou coexister (Nichols *et al*, 1999). La douleur

neuropathique peut rester localisée ou s'étendre à différentes parties du corps. Les liens entre les étiologies, les symptômes et les mécanismes de cette douleur ne sont pas encore tous élucidés. Nous connaissons l'implication de plusieurs d'entre eux comme le système GABAergique, les récepteurs NMDA, une modification de l'expression et de la distribution des canaux Na^+ , une réaction inflammatoire provoquant une activité inadaptée des afférences nerveuses, ou encore une participation occasionnelle du système nerveux autonome sympathique (Boulanger, 2005). Des connections anormales, dites éphatiques, ont aussi un rôle dans le développement de la neuropathie.

2.1.1. Les connections éphatiques

Des connections éphatiques seraient impliquées dans le phénomène de douleur neuropathique, comme dans le cas de la névralgie du trijumeau par exemple. Selon Kerr (1979), les zones démyélinisées du nerf trijumeau seraient des sites de connections éphatiques et la douleur serait due à un court-circuit des potentiels d'action entre les afférences non nociceptives et nociceptives au niveau de la lésion. Selon cette théorie, la douleur spontanée proviendrait des stimulations mécaniques, induites par exemple par les pulsations des vaisseaux, des nerfs ou des ganglions. Il a été montré chez l'animal que les anticonvulsivants réduisent la décharge de potentiels d'action ectopiques dans les nerfs lésés (Yaari et Devor, 1985). Il s'agit d'une explication séduisante de l'action antalgique de ces médicaments, et cela expliquerait pourquoi ils ne sont efficaces que dans des douleurs lancinantes associées à des lésions nerveuses.

L'atténuation de la douleur neuropathique n'en reste pas moins difficile aujourd'hui et c'est pourquoi de plus amples recherches sont en cours dans le but de trouver de nouvelles voies thérapeutiques.

2.1.2 L'hyperalgésie

L'hyperalgésie, c'est-à-dire la réaction exagérée face à une stimulation douloureuse, se fait en deux phases : hyperalgésie primaire et secondaire. Différents facteurs inflammatoires sont d'abord libérés lors d'un stimulus douloureux : K^+ , prostaglandines, histamine, substance P, sérotonine, bradykinine, et recrutent les nocicepteurs avoisinants : c'est la phase primaire où le seuil de perception de la douleur de la région atteinte est abaissée. La deuxième phase est centrale. Les fibres C sont alors stimulées à répétition, ce qui produit une augmentation du nombre de potentiels d'action dans la moelle ; ce phénomène est appelé « windup » (Mendell, 1966). La moelle est ainsi sensibilisée et ceci sur une durée qui peut être relativement longue. Des substances excitatrices sont alors libérées comme le glutamate, l'aspartate, qui recruteront alors les récepteurs AMPA et NMDA. Une stimulation prolongée des récepteurs NMDA peut faire perdurer la douleur qui devient alors chronique.

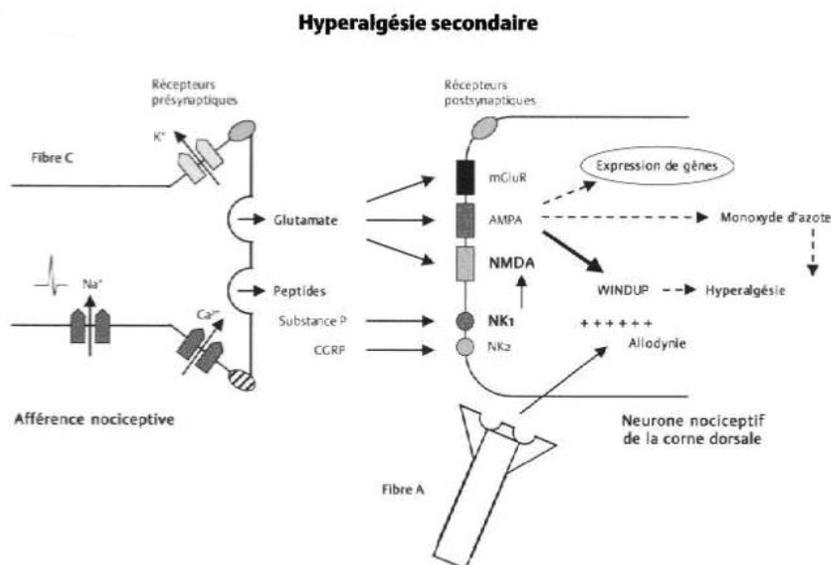


Figure 8 : *L'hyperalgésie secondaire s'explique par une sensibilisation des neurones nociceptifs des cornes dorsales de la moelle. Cette activation soutenue des récepteurs NK1 et NMDA produira des changements cellulaires dont l'activation de gènes à expression rapide. Ces changements abaisseront la sensibilité du neurone secondaire qui répondra à des stimulations nociceptives par une dépolarisation à plus haute fréquence (hyperalgésie). (Source : Beaulieu, 2005).*

Il a été démontré qu'il existe une relation entre l'intensité de la douleur et la concentration locale en K^+ , ce qui semble logique car toute lésion résulte en une augmentation de K^+ extracellulaire (Kandel, 2000).

2.2. Le rôle de la glie

La compréhension de l'apparition et du maintien de la douleur neuropathique n'est pas complète si l'on regarde uniquement l'activité neuronale. L'action de la glie est un mécanisme sous-jacent à cette douleur (Milligan et Watkins, 2009). Les

astrocytes et la microglie peuvent moduler les fonctions synaptiques et l'excitabilité des neurones par différents mécanismes (Halassa *et al*, 2007 et Pocock *et al*, 2007). Ces types cellulaires sont des médiateurs clés de la réponse immunitaire du système nerveux central (Nguyen *et al*, 2002). Les astrocytes expriment des récepteurs ionotropiques non NMDA et des récepteurs NMDA ainsi que des récepteurs métabotropiques au glutamate et des récepteurs pour la substance P (Porter et McCarthy, 1997). Lors de douleur, des molécules pro-inflammatoires sont libérées et le transport du glutamate est altéré (Fellin *et al*, 2006 et Parpura *et al*, 1994) : sa recapture diminue et il y a augmentation des influx excitateurs (Sung *et al*, 2003). La microglie s'active via ses récepteurs Toll-like TLR 2,3 et 4 qui sont sensibles à des signaux moléculaires exogènes mais aussi aux différentes substances inflammatoires endogènes libérées lors de douleur neuropathique comme les interleukines, le TNF α ou l'oxyde nitrique (NO) (Kim *et al*, 2007 ; Obata *et al*, 2008). Un antagonisme des récepteurs TLR-4 dans la moelle épinière provoque une réversion de la douleur neuropathique suscitée par une lésion du nerf sciatique (Hutchinson *et al*, 2007 ; 2008). Lorsque les neurones relâchent de l'ATP, du glutamate et de la substance P, ces derniers stimulent les astrocytes et la microglie qui à leur tour relâchent de l'ATP et du glutamate, ce qui active les neurones et les cellules gliales avoisinants (Milligan et Watkins, 2009). La glie sécrète alors des cytokines pro-inflammatoires contribuant à l'établissement de la douleur neuropathique. Le TNF α et l'IL-1 β par exemple augmentent l'excitabilité neuronale et la fréquence des synapses en augmentant la conductivité des récepteurs AMPA et NMDA (Beattie *et al*, 2002 ; Stellwagen et Malenka, 2006). L'ouverture des canaux NMDA provoque une plus grande entrée

de calcium, ainsi qu'une plus grande production de NO et de PGE2 qui sont impliqués dans l'amplification de l'excitabilité des neurones conduisant la douleur (Besson, 1999).

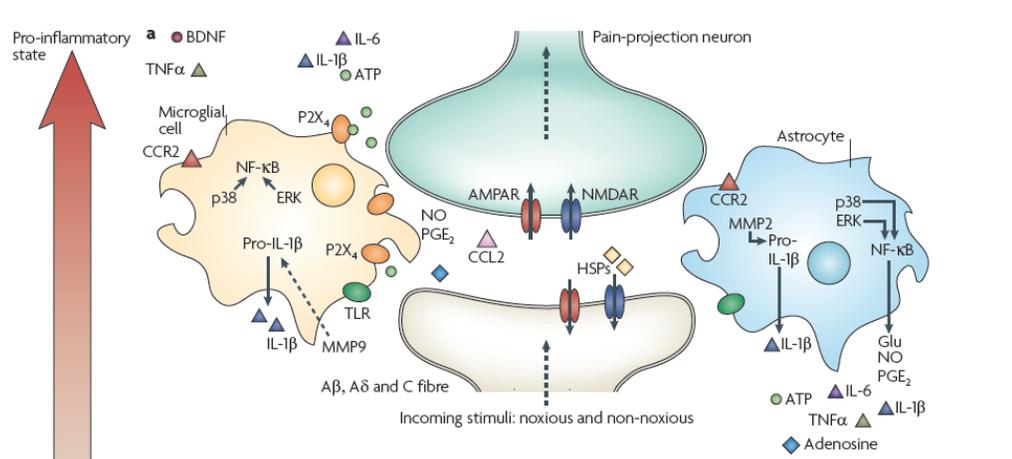


Figure 9 : *Le rôle pro-inflammatoire de la glie. Si un stimulus douloureux persiste, comme lors d'une inflammation chronique ou d'une lésion nerveuse, une sensibilisation centrale persistante amène des changements transcriptionnels dans les neurones de la corne dorsale, ce qui altère leur fonction pour une période prolongée. Les astrocytes répondent à cette activité synaptique en mobilisant le calcium intracellulaire, ce qui provoque la libération de glutamate, d'ATP qui se lie à P2X4, de facteur nécrosant de tumeur α (TNF α), d'interleukine 1 β (IL-1 β), d'IL-6, d'oxyde nitrique (NO) et de prostaglandine E2 (PGE2). La microglie activée est aussi une source de tous ces facteurs pro-inflammatoires. La métalloprotéinase de matrice 9 (MMP9) induit le clivage de la pro-IL-1 β et maintient l'activation de la microglie, tandis que la MMP2 maintient l'activation*

des astrocytes. L'activation de la p38 MAPK est induite au sein de la microglie et des astrocytes suite au signal de l'IL-1 β . Les astrocytes et la microglie s'activent après fixation de chémokines spécifiques. Après une lésion nerveuse, des protéines « heat shock » (HSPs) sont libérées et peuvent se lier aux récepteurs Toll-like (TLRs) exprimés sur les astrocytes et la microglie contribuant d'autant plus à l'activation de ces types cellulaires. (Source : Milligan et Watkins, 2009).

2.3. Traitements actuels

Différents traitements disponibles visent plusieurs cibles. Les antidépresseurs bloquent la récupération de noradrénaline et/ou de sérotonine au niveau synaptique ce qui prolonge leur action sur leurs récepteurs post synaptiques et la modulation de neurones cibles dans les aires de projection limbique notamment ; la capsaïcine appliquée localement diminue la libération de substance P, les anticonvulsivants sont utiles dans les douleurs liées à un membre fantôme suite à une amputation. Ces derniers agissent comme régulateurs négatifs de l'excitabilité neuronale en empêchant une activité excessive, soit en augmentant l'inhibition ou en diminuant l'excitation dans le système nerveux central. La gabapentine et la prégabaline, en sont des exemples, et elles diminuent la libération de glutamate, noradrénaline, et substance P. Les opioïdes agissent à trois niveaux différents des voies de la douleur : au niveau central, au niveau de la moelle, et en périphérie. Au niveau cellulaire, ils inhibent l'ouverture de canaux calciques voltage-dépendants réduisant ainsi la libération de neurotransmetteurs au niveau présynaptique. Les opioïdes permettent aussi l'ouverture des canaux potassiques entraînant une hyperpolarisation cellulaire au niveau postsynaptique (Beaulieu, 2005). Au niveau

central les récepteurs opioïdes se retrouvent principalement au niveau de régions impliquées dans la transmission et la modulation du message nociceptif, en particulier les voies descendantes inhibitrices mais aussi sur les voies ascendantes de la douleur. Au niveau spinal, les récepteurs opioïdes μ , δ ou κ sont retrouvés en grande concentration au niveau de la corne dorsale de la moelle épinière et une de leurs actions est de moduler la libération de la substance P (Beaulieu, 2005). Longtemps considérés inefficaces dans ce genre de douleur, les opioïdes semblent tout de même avoir un effet notamment sur la douleur liée à la perte d'un membre. L'oxycodone et le tramadol notamment sont utilisés pour traiter la douleur neuropathique. L'oxycodone est un agoniste semi-synthétique μ et κ possédant des propriétés similaires à celles de la morphine mais est deux fois plus puissante. Le tramadol est un opioïde synthétique d'action centrale qui aurait moins d'effets secondaires par rapport à la morphine. La combinaison d'oxycodone et de gabapentine, semblerait avoir un effet de synergie, les mécanismes d'action de ces molécules étant complémentaires (Harvey, 2008). Des études récentes utilisant des bloqueurs du système immunitaire, comme l'étanercept, un inhibiteur du $\text{TNF}\alpha$, ont démontré une efficacité contre la douleur neuropathique. Cette nouvelle voie de traitement devrait être évaluée de façon plus importante dans le futur et semble prometteuse (Zanella *et al*, 2008). Malgré les différentes avenues de traitements proposées, le contrôle de la douleur neuropathique reste difficile et les effets secondaires sont bien souvent incommodes pour les patients. La nécessité d'élaborer de nouvelles approches thérapeutiques reste donc une priorité.

2.4. Évaluation de la douleur neuropathique

2.4.1. Les modèles animaux

Un état pathologique ne peut être compris que si l'on arrive à le reproduire afin d'en élucider tous les mécanismes. Pour cette raison les chercheurs ont tenté et réussi à reproduire la douleur neuropathique à travers différents modèles animaux afin de pouvoir comprendre et décomposer les mécanismes sous-jacents à cette douleur. Les modèles de neuropathie périphérique post-traumatique chez le rat ont été particulièrement utiles pour élaborer de nouvelles voies thérapeutiques.

Ces modèles doivent être reproductibles quant aux déficits sensoriels créés, c'est-à-dire l'allodynie et l'hyperalgésie, pendant une période suffisante nécessaire aux différents tests sensoriels. Parmi les modèles les plus utilisés on retrouve :

- la constriction chronique du nerf sciatique (chronic constriction injury ou CCI) (Bennett et Xie, 1988),
 - la ligature partielle du nerf sciatique (Seltzer *et al*, 1990) et
 - la ligature du nerf spinal (Kim et Chung, 1992).
- le modèle CCI consiste en quatre ligatures lâches, au fil chromé catgut, autour du nerf sciatique proximale à sa trifurcation. Cette constriction du nerf résulte en un œdème intraneural, une ischémie focale et une dégénérescence axonale.

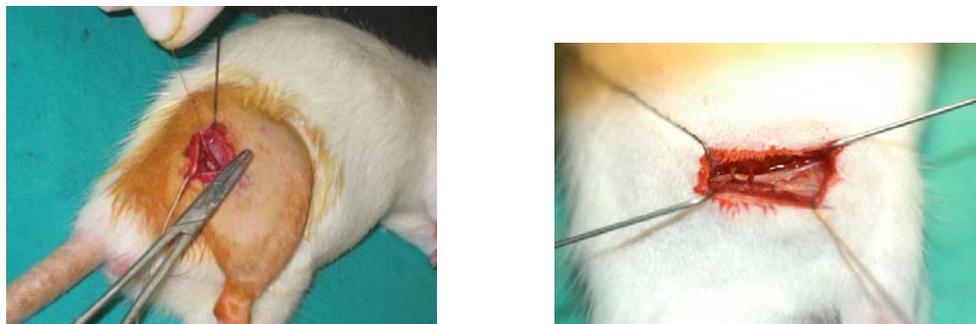


Figure 10: *Chirurgie du modèle de Bennett de constriction chronique du nerf sciatique. Pose de quatre ligatures sur le nerf au Catgut 4.0. (Source : laboratoire du Dr Pascal Vachon, UdeM).*

Pitcher *et al* (1999) ont modifié un peu cette technique en appliquant sur le nerf un tube de polyéthylène 90 au lieu de ligatures.

- dans le modèle de ligature partielle, le nerf sciatique est ligaturé fermement à son tiers ou à moitié.

- dans le modèle de ligature du nerf spinal, les nerfs spinaux L5 et L6 sont ligaturés fermement, proches de leurs ganglions respectifs. Ces trois modèles produisent le développement d'allodynie et d'hyperalgésie thermique pour des durées variables, allant de 2 mois à 7 mois. Cependant ces modèles préservent un certain nombre de fibres périphériques intactes pour garder une transmission sensorielle aux centres supérieurs et ainsi pouvoir tester la sensibilité des animaux (Hao *et al*, 2000). Un modèle plus récent a été élaboré par Lee *et al* (2000) qui consiste en la coupure partielle de différentes combinaisons des trois branches du nerf sciatique. La transection des branches surale et tibiale sont celles qui provoquent le plus d'hyperalgésie et d'allodynie. Il existe aussi d'autres modèles : la section de moelle épinière (Sung *et al*, 1998), la transection complète du nerf

sciatique (Wall *et al*, 1979) (ce modèle n'est plus guère utilisé car il provoque de l'automutilation), la ligature du nerf péronier commun (Vadakkan *et al*, 2005), modèle qui n'induit pas de déficit moteur contrairement à certains autres ; la ligature partielle du nerf saphène (Walczak *et al*, 2005), et le modèle SNI (Spared Nerve Injury) (Decosterd et Woolf, 2000). Ce dernier épargne la branche surale du nerf sciatique, ce qui permet l'investigation de changements non seulement dans les neurones sensoriels primaires lésés mais aussi dans les neurones sensoriels intacts en périphérie pour étudier leurs contributions respectives à la neuropathie (Decosterd et Woolf, 2000).

2.4.2 Tests utilisés pour l'évaluation de la douleur neuropathique.

Afin d'évaluer le degré de neuropathie atteint par les animaux utilisés dans les modèles pré-cités, différents tests pour la mesure de l'allodynie et de l'hyperalgésie ont été mis au point. L'hyperalgésie peut se décomposer en hyperalgésie thermique et mécanique. Les tests caractérisant l'hyperalgésie thermique les plus courants sont le test de retrait de la queue (D'Amour et Smith, 1941), le test de la plaque chauffante (Mogil *et al*, 1999), et le test de retrait de la patte de Hargreaves (Hargreaves *et al*, 1988).



Figure 11: *Appareillage du test de Hargreaves. (Source : <http://www.iitcinc.com>).*

Dans le test de Hargreaves, les rats sont placés dans des boîtes en plexiglas et une source lumineuse chauffante est appliquée sous la patte arrière des animaux. Un appareil électronique est connecté à la source lumineuse et mesure le temps de retrait de la patte de l'animal.

L'hyperalgésie mécanique peut être estimée grâce au test de l'épingle.

Les tests mesurant l'allodynie mécanique sont le test des filaments de Von Frey (figure 10) et le test de pression sur la patte de Randall-Selitto (Randall et Selitto, 1957).

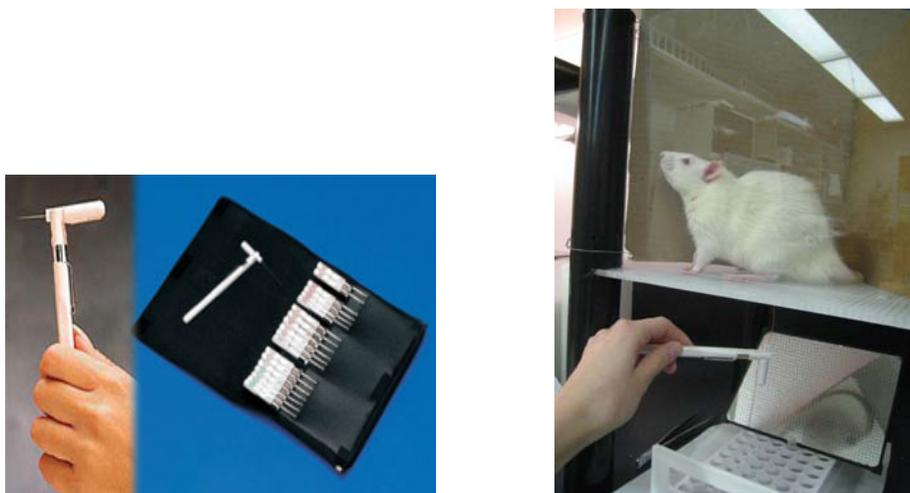


Figure 12 : Appareillage du test de Von Frey. (Source : <http://www.bioseb.com> et laboratoire du Dr Pascal Vachon, UdeM).

Dans le test de Von Frey, les fils sont tour à tour appliqués sous la patte postérieure du rat et le diamètre du fil auquel le rat réagit est ensuite noté.

L'injection de capsaïcine (Dougherty *et al*, 1998) et l'injection intraplantaire de formol (Dubuisson et Dennis, 1977) peuvent mesurer, quant à eux, la sensibilité

chimique des animaux. Il existe donc différents tests permettant d'évaluer la douleur neuropathique et l'efficacité des traitements chez les animaux.

3. L'EUGÉNOL

3.1 Historique

L'eugénol est un des composants principaux du clou de girofle. Le clou de girofle est le bouton floral d'un arbre originaire d'Indonésie, le giroflier (*Eugenia aromatica*). Les boutons floraux sont récoltés avant floraison puis séchés au soleil pour donner cette épice que nous connaissons bien.



Figure 13: *Illustrations du Giroflier et des clous de girofle. (Source : www.itv-midipyrenees.com).*

Depuis des décennies, le clou de girofle est utilisé pour ses vertus culinaires et médicinales. Il est beaucoup utilisé en médecine dentaire pour sa propriété d'anesthésique local (Kozam, 1977; Ohkubo et Shibata, 1997). Autrefois nos

grands-mères soignaient leurs maux de dents en mâchant un ou deux clous de girofle. Aujourd'hui les techniques se sont améliorées : par le mélange d'oxyde de zinc et d'eugénol on obtient un ciment utilisé en tant que matériau de restauration temporaire permettant à la fois un excellent scellement et une anesthésie de la pulpe dentaire. Qui plus est, ce ciment est en général très bien toléré par les patients. L'eugénol est aussi utilisé pour soulager la douleur associée à la pose de prothèses dentaires (Garibaldi *et al*, 1995).

L'huile essentielle de clou de girofle est faite en moyenne de 23 composés :

Des sesquiterpènes (7-10%), des esters (4-10%) des phénols dont l'eugénol (75-85%) et des oxydes. La molécule d'eugénol possède une fonction alkyl et une fonction alcène en plus du groupe phénol. C'est une molécule très lipophile qui appartient à la famille des vanilloïdes comme la capsaïcine.

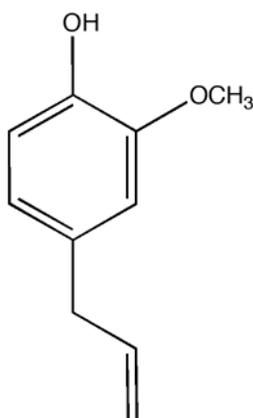


Figure 14 : Molécule d'eugénol. (Source : www.pherobase.com).

3.2 Autres propriétés de l'eugénol

Outre sa propriété d'anesthésique local, l'eugénol était déjà utilisé au siècle dernier comme anti-infectieux contre la tuberculose et la gangrène bronchique (Lebeau et Courtois, 1929). Depuis d'autres propriétés lui ont été découvertes, comme par exemple un effet anti-inflammatoire en inhibant la biosynthèse du thromboxane (Reddy et Lokesh, 1994), un effet antibactérien (Laekeman *et al*, 1990), des propriétés neuroprotectrices (Wie *et al*, 1997), anesthésiques (Guenette *et al*, 2006), anti-cancer (Newmark, 1996), antihistaminiques (Nishijima *et al* 1998), anti-anaphylactiques (Jadhav *et al*, 2004), anti-oxydantes (Chen *et al* 2009), et antifongiques contre *Candida albicans* (He *et al*, 2007; Chami *et al*, 2004).

D'autre part l'eugénol est utilisé pour l'anesthésie des poissons et constitue une alternative à l'utilisation du MS-222 (Hikasa *et al*, 1986; Munday et Wilson, 1997; Endo *et al*, 1972; Sladky *et al*, 2001 ; Guénette *et al*, 2007b). Les poissons atteignent un niveau d'anesthésie chirurgicale plus rapidement avec l'eugénol qu'avec le MS-222 mais présentent un réveil davantage prolongé (Sladky *et al*, 2001). Il a également été testé pour produire une anesthésie chez les amphibiens et les rongeurs (Guénette *et al*, 2006, 2007a ; Lafortune *et al*, 2001). L'immersion des grenouilles 15 minutes dans une solution d'eugénol induit une anesthésie d'environ une heure.

Chez les rats et les souris, par contre, le méthyleugénol, un dérivé de l'eugénol, présente quelques caractéristiques plus intéressantes que l'eugénol comme un temps d'induction réduit, un niveau d'anesthésie chirurgical et une cyanose limitée des tissus (Sell et Carlini, 1996). Cependant il existe un risque clair de

carcinogénicité avec cette molécule. L'Institut National pour les Sciences de la Santé Environnementale (NTP) a évalué le méthyleugénol dans une étude sur les rongeurs en l'administrant par gavage (NTP 2000). L'évidence de carcinogénicité était claire chez les rats F344 et les souris B6C3F1 suite à une apparition anormale de carcinomes hépatocellulaires, d'hépatocholangiocarcinomes et de tumeurs neuroendocrines de l'estomac glandulaire. La précaution est donc de mise lors de l'utilisation de méthyleugénol chez les animaux. Chez les humains la consommation de méthyleugénol (présent dans plusieurs aliments de notre quotidien) n'a pas été reliée avec des effets néfastes sur l'organisme mais cela pourrait être dû au peu d'études réalisées à ce sujet et à l'absence de données épidémiologiques.

L'eugénol, quant à lui, ne semble pas présenter un intérêt particulier comme anesthésique chez les mammifères par rapport aux autres molécules déjà mises sur le marché.

3.3. Mode d'action de l'eugénol

3.3.1 Généralités

Le mécanisme d'action de l'eugénol n'est pas encore tout à fait élucidé. Il agirait sur plusieurs récepteurs, dont les récepteurs GABA, les récepteurs NMDA, les canaux à Na⁺ et les récepteurs TRPV1. Selon une étude, l'eugénol aurait aussi une action sur les canaux à chlore des neurones des ganglions de la corne dorsale du rat (Ohkubo et Kitamura, 1997). L'eugénol est métabolisé par les reins et/ou le foie (Davies et Morris, 1993) et les métabolites retrouvés dans l'urine par la

méthode LC-ESI/MS/MS sont des sulfates et des glucuronides (Guénette *et al*, 2006). L'eugénol présente une demi-vie de 7,05 min dans le plasma et 12,6 min dans le sang après une injection unique par voie intraveineuse à la dose de 20mg/kg et une demi vie de 14h dans le plasma et 18h dans le sang suite à une administration orale à la dose de 40 mg/kg (Guénette *et al*, 2006, 2007). Cela suggère une biodistribution extravasculaire en partie à cause de la forte lipophilicité de cette molécule.

3.3.2. Action de l'eugénol sur les récepteurs au GABA

L'eugénol pourrait moduler les voies de la douleur en se liant aux récepteurs GABA et en augmentant l'affinité du GABA pour son récepteur (Aoshima et Hamamoto, 1999). Les récepteurs GABA sont divisés en deux sous-classes, les récepteurs GABA-A et les récepteurs GABA-B. Les récepteurs GABA-A sont les plus répandus dans le système nerveux des mammifères (Cooper *et al*, 1996). Les récepteurs GABA-A sont des récepteurs ionotropiques qui conduisent le chlore après liaison du neurotransmetteur GABA. Ce sont des récepteurs inhibiteurs qui antagonisent la tendance des récepteurs excitateurs à dépolariser la membrane jusqu'au seuil de déclenchement d'un potentiel d'action. L'activation du récepteur GABA-A amène le potentiel de membrane proche de l'équilibre du chlore, soit entre -60 et -80 mV (Nicholls, 1994). Les benzodiazépines, les barbituriques, et d'autres anesthésiques se lient à plusieurs sites allostériques du récepteur et amplifient l'action du GABA (Parker *et al*, 1986), provoquant différents effets allant de l'effet anticonvulsivant, à la sédation, de l'effet anxiolytique jusqu'à

l'anesthésie, dépendamment du temps d'ouverture du canal chlore (Nicholls, 1994).

D'après Aoshima et Hamamoto (1999), l'eugénol potentialiserait la réponse du récepteur GABA-A induisant ainsi un effet sédatif, mécanisme qui pourrait aussi expliquer son effet anesthésique.

3.3.3 Action de l'eugénol sur les récepteurs NMDA

Les fibres afférentes primaires impliquées dans la transmission douloureuse utilisent des acides aminés excitateurs, du glutamate et de l'aspartate comme neurotransmetteurs. Les récepteurs des acides aminés excitateurs ont été divisés en trois types selon leur affinité pour différents agonistes. Ce sont les récepteurs NMDA, les récepteurs AMPA et les récepteurs kaïnate. Des agonistes de ces récepteurs génèrent de l'hyperalgésie (Aanonsen et Wilcox, 1987) tandis que l'application d'antagonistes de ces récepteurs provoque de l'analgésie (Cahusac *et al*, 1984 ; Näsström *et al*, 1992). Les récepteurs NMDA, AMPA et kaïnate sont impliqués dans le fonctionnement de neurones superficiels et profonds au niveau de la corne dorsale de la moelle épinière (Dickenson et Sullivan, 1987 ; Aanonsen *et al*, 1990 ; Gerber et Randic, 1989). Selon Sakaruda *et al*, (1998) les récepteurs NMDA auraient un plus grand rôle que les récepteurs AMPA ou kaïnate dans la transmission spinale de la douleur induite par la capsaïcine. De plus, il a été établi que la corrélation entre l'élévation de calcium et la mort neuronale induite par le glutamate était liée aux récepteurs NMDA (Goldberg et Choi, 1993 ; Hartley *et al*, 1993). Wie *et al* (1997) ont démontré un effet neuroprotecteur de l'eugénol vis-à-vis de la neurotoxicité induite par le glutamate. L'eugénol modulerait l'action du

récepteur NMDA en bloquant partiellement l'entrée massive de calcium à l'intérieur du neurone provoquée par le glutamate (Wie *et al*, 1997).

3.3.4. Action de l'eugénol sur les canaux à sodium

L'expression et les propriétés fonctionnelles de canaux à Na⁺ voltage-dépendants sont altérées, dans les neurones sensoriels primaires, lors d'inflammation ou de lésion nerveuse. Ces canaux sont essentiels dans l'initiation et la propagation de potentiels d'action dans les ganglions de la corne dorsale. Certaines isoformes des canaux à sodium comme le Nav 1.7, Nav1.8 et Nav1.9 sont exprimées de façon prédominante dans les neurones nociceptifs des ganglions de la corne dorsale et présentent des dysfonctionnements lors de lésion nerveuse (Akopian *et al*, 1996 ; Cummins *et al*, 2007). Le canal Nav1.9 module l'hypersensibilité inflammatoire produite entre autres par la capsaïcine (Amaya *et al*, 2006). L'inhibition de courants Na⁺ dans les neurones sensoriels pourrait donc être un mécanisme important provoquant l'analgésie.

L'eugénol inhibant déjà les courants calciques activés par haut voltage dans les neurones primaires afférents de la dent (Lee *et al*, 2005), montre aussi une action sur les courants sodiques. En effet il a été reporté que l'eugénol inhiberait les courants sodiques des neurones primaires afférents de la dent chez le rat (Park *et al*, 2006). De plus l'eugénol inhiberait également ces courants au niveau des neurones des ganglions de la corne dorsale par interaction avec les canaux à sodium inactivés, en ralentissant beaucoup leur passage à une forme activée, diminuant ainsi l'excitabilité neuronale (Cho *et al*, 2008). L'inhibition des

courants de sodium par l'eugénol est l'une des explications de ses propriétés analgésiques.

3.3.5. Action de l'eugénol sur le TRPV1

Le fait que l'eugénol soit un congénère structurel de la capsaïcine, avec un groupe vanillyl, suggère une action de l'eugénol similaire à celle de la capsaïcine sur les récepteurs TRPV1 des neurones sensoriels (Caterina *et al*, 1997 ; Helliwell *et al*, 1998 ; Tominaga *et al*, 1998). Cela a été démontré *in vitro* par Yang *et al* (2003). L'action analgésique de l'eugénol résulterait alors du blocage réversible de ces récepteurs. Cette action est inhibée par la capsazépine, un antagoniste compétitif du TRPV1 (Ohkubo et Shibata, 1997).

Le fonctionnement de ce récepteur et le comportement de l'eugénol vis-à-vis de ce récepteur sont discutés plus en détails dans la partie suivante.

4. LES RÉCEPTEURS VANILLOÏDES ET LE TRPV1

4.1 Les récepteurs vanilloïdes

4.1.1. Caractérisation et localisation des récepteurs vanilloïdes

Les récepteurs vanilloïdes sont des canaux ioniques exprimés entre autres par les neurones nociceptifs qui jouent un rôle important dans l'intégration de la douleur chimique et thermique. Ils ont été découverts en 1846 lors de recherches sur la sensation de brûlure en bouche du piment (Thresh, 1846). Le composant âcre du

piment fut nommé capsaïcine. Cette molécule, dérivée de l'acide homovanillique se lie aux récepteurs vanilloïdes (Nelson, 1919) et augmente la fréquence de dépolarisation des neurones nociceptifs. Les neurones primaires sensoriels sensibles aux vanilloïdes sont en général de faible diamètre et donnent naissance aux fibres C (Holzer, 1991) mais certains neurones donnant les fibres A δ y sont aussi sensibles et dans certains tissus, comme la pulpe dentaire, les fibres A δ prédominent parmi les neurones sensibles aux vanilloïdes (Ikeda *et al*, 1997).

Les récepteurs vanilloïdes se trouvent à la fois dans le système nerveux périphérique et le système nerveux central. Ils sont exprimés dans les neurones des ganglions de la corne dorsale (Guo *et al*, 1999), les ganglions du nerf trijumeau (Ács et Blumberg, 1994), les ganglions du nerf vague (Ács et Blumberg, 1994 ; Szallasi 1995), l'hypothalamus (Jancso-Gabor *et al*, 1970 ; Szolcsanyi *et al*, 1971), la formation réticulée (Ács *et al* 1996), les noyaux gris de la base, le striatum, le mésencéphale, les bulbes olfactifs, le pont, le cervelet, le cortex, le thalamus, et l'hippocampe (Sasamura *et al*, 1998).

Au niveau spinal, les récepteurs vanilloïdes sont présents à la fois au niveau pré-synaptique et post-synaptique de la corne dorsale de la moelle épinière (Guo *et al*, 1999 ; Valtschanoff *et al* 2001).

Certaines autres cellules peuvent aussi exprimer ces récepteurs comme par exemple les lymphocytes (Lai *et al*, 1998), les mastocytes et les cellules gliales (Biro *et al* (a et b), 1998).

4.1.2 Fonctionnement des récepteurs vanilloïdes

Au repos le pore du canal du récepteur vanilloïde est fermé. Lors de la liaison d'un vanilloïde il se produit un influx de cations à travers la membrane, surtout de calcium (Marsh *et al*, 1987 ; Wood *et al*, 1988). Cela génère en premier des potentiels d'action (Bevan et Docherty, 1993) perçus comme douloureux au départ puis s'ensuit, par des mécanismes encore peu connus, un état réfractaire appelé communément désensibilisation. Durant cette phase, les neurones stimulés ne répondent plus à différents stimuli endogènes ou exogènes (Jancso et Jancso, 1949). La désensibilisation est relié à un changement de conformation de la protéine récepteur par le vanilloïde qui ferme le canal. Cette période réfractaire a un potentiel thérapeutique. Les neurones sensibles aux vanilloïdes utilisent du glutamate, de l'ATP et d'autres neuropeptides comme neurotransmetteurs (Holzer, 1991 ; Malmberg et Yaksh, 1994 ; Lundberg, 1996). Ce serait une combinaison de neurotransmetteurs qui jouerait un rôle dans la transmission de la douleur car aucun des antagonistes testés n'a pu provoquer une analgésie complète (Dray et Urban, 1996).

Les vanilloïdes, selon qu'ils provoquent une sensation âcre ou non, n'ouvrent pas le canal de la même façon (Liu *et al*, 1997). Les composés âcres comme la capsaïcine, ouvrent le canal de façon brusque et cela provoque une entrée massive de calcium alors que les composés non âcres ouvrent doucement le canal et l'influx de calcium n'est alors pas suffisant pour générer un potentiel d'action.

La désensibilisation des récepteurs vanilloïdes par la capsaïcine dépend de plusieurs facteurs dont sa concentration, la durée de l'application et la présence ou l'absence de calcium extracellulaire (Holzer, 1991 ; Szolcsanyi, 1993).

Les vanilloïdes provoquent la relâche de neuropeptides pro-inflammatoires des terminaisons nerveuses sensibles comme la substance P et le CGRP, qui initient la cascade de l'inflammation neurogénique et sensibilisent les neurones algogènes (Gepetti et Holzer, 1996). Par la suite, lors de la désactivation du récepteur, il y a arrêt de la libération de neuropeptides (Gamse *et al*, 1982 ; Miller *et al*, 1982 ; Taylor *et al*, 1984). Sachant que la substance P joue un rôle primordial dans la transmission de la douleur au niveau central, la modulation des récepteurs vanilloïdes centraux affectera la transmission de la douleur à ce niveau.

4.2. Les récepteurs Transient Receptor Potential Vanilloïd

On compte présentement six sous-classes de TRPV : TRPV1, TRPV2, TRPV3, TRPV4 ainsi que TRPV5 et TRPV6 qui sont un peu différents des quatre premiers. Ils ont été classés selon leur action neurophysiologique (Caterina et Julius, 2001 ; Davis *et al*, 2000 ; Szallasi et Blumberg, 1999 ; Vriens *et al*, 2009). Les paragraphes suivants n'aborderont que le TRPV1.

4.2.1 Le TRPV1

Le TRPV1 (Transient Receptor Potential Vanilloïd 1) est un distant parent de la famille des TRP (Transient Release Potential) qui sont des canaux calciques (Montell et Rubin, 1989). Ce récepteur est formé de six domaines transmembranaires (Caterina *et al*, 1997) et un domaine incomplet qui serait associé au pore du canal. La distribution la plus abondante du VR1 se situe dans la zone de Lissauer (lamina I) et dans la partie interne de la lamina II, la substancia gelatinosa (Guo *et al*, 1999). Cette distribution a pu être mise en évidence par le

marquage spécifique du VR1 par la résinifératoxine tritiée (RTX-[3H]) et la prise d'image par autoradiographie (Szallasi *et al*, 1994).

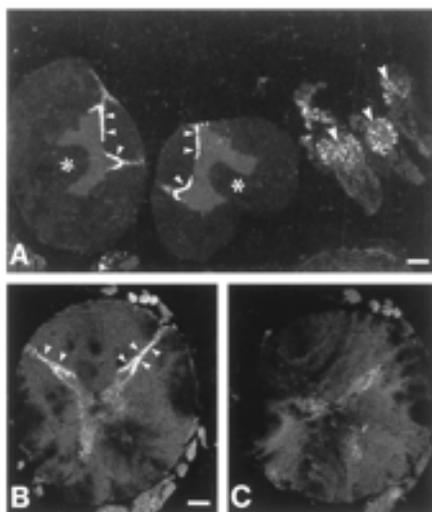


Figure 15 : Marquage des récepteurs *TRPV1* par la résinifératoxine radioactive chez *A* : le porc, *B* : l'homme. L'image *C* est le contrôle avec l'ajout de résinifératoxine non-radioactive. Les récepteurs sont présents dans les couches superficielles de la corne dorsale de la moelle épinière chez les deux espèces. (Source : Szallasi *et al*, 1994).

Caterina *et al* (1997) ont cloné le *TRPV1* démontrant une préférence pour les cations divalents, en particulier le calcium et le magnésium. Sa perméabilité au calcium est proche de celle du récepteur *NMDA* (Mayer et Westbrook, 1987).

Le *VR1* est un intégrateur de stimuli douloureux, chimiques et physiques. La chaleur permet l'ouverture du canal alors que la capsaïcine ou un faible pH permettraient de diminuer le seuil de réponse à la chaleur, provoquant alors l'ouverture du canal même à température ambiante (Tominaga *et al*, 1998). Donc

le VR1 peut être activé par une température supérieure à 43°C, un faible pH, mais aussi des molécules endogènes comme l'anandamide (Caterina *et al*, 1997 ; Tominaga *et al*, 1998 ; Szallasi et Blumberg, 1999).

Certains médiateurs de l'inflammation comme les prostaglandines ou la bradykinine pourraient moduler l'action du VR1 (Premkumar et Ahern, 2000 ; Chuang *et al*, 2001). La bradykinine est capable de recruter des neurones de tailles intermédiaires pour qu'ils répondent aux vanilloïdes (Stucky *et al*, 1998) donc le nombre de nocicepteurs et leur sensibilité augmente lors de l'inflammation, ce qui joue un rôle important dans le développement de l'hyperalgésie.

4.3. Les molécules agonistes et antagonistes

4.3.1. Présentation

La capsaïcine et la résinifératoxine (rtx) démontrent des effets agonistes spécifiques et non réversibles de ces récepteurs (Szallasi et Blumberg, 1993 ; 1999). Il existe des substances naturelles antagonistes comme le guaïacol (Ohkubo et Shibata, 1997), la pipérine, la zingérone (Liu et Simon, 1996), le scutigéral (Szallasi *et al*, 1999), l'olvanil (Lawand *et al*, 1997), la trialkylglycine (Garcia-Martinez *et al*, 2002) et l'eugénol, qui est un agoniste/antagoniste et qui agit sur le TRPV1 (Yang *et al*, 2003).

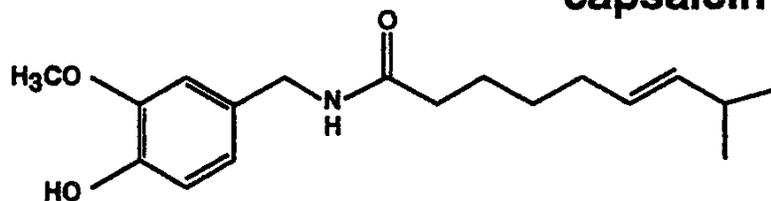
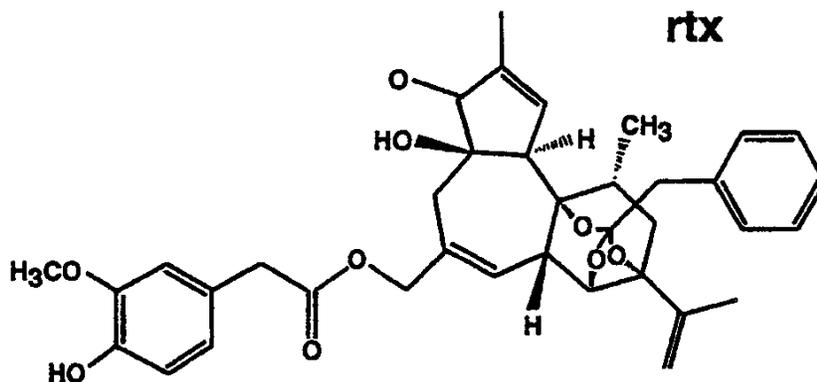
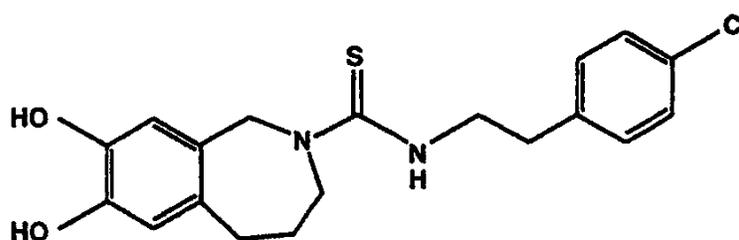
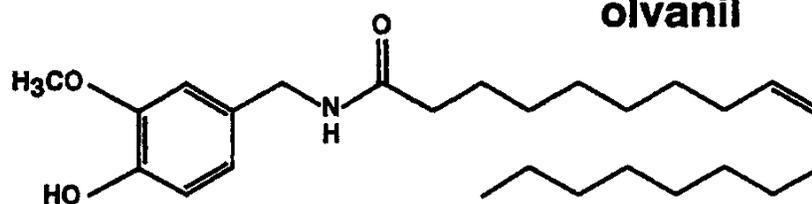
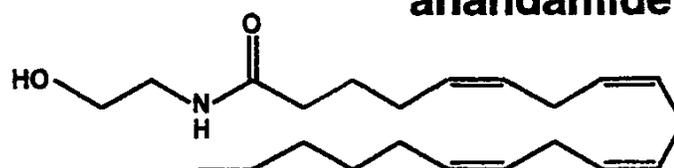
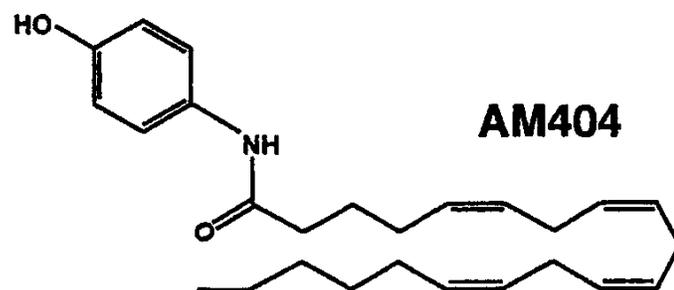
capsaicin**rtx****capsazepine****olvanil****anandamide****AM404**

Figure 16 : Structures chimiques de certaines molécules activant ou inhibant les récepteurs vanilloïdes. rtx : résinifératoxine AM404 : nom d'un composé commercial. (Source : Caterina et Julius, 2001).

Les antagonistes du TRPV1 ont démontré des effets analgésiques autant contre la douleur découlant de l'inflammation que contre la douleur neuropathique (Caterina *et al*, 1997 ; Ohkubo et Shibata, 1997 ; Tominaga *et al*, 1998). Les vanilloïdes démontrent des différences frappantes dans leurs actions biologiques. Par exemple la capsaïcine est âcre et désensibilise le récepteur alors que la pipérine est aussi âcre (Szolcsanyi, 1982) mais ne le désensibilise pas (Liu et Simon, 1996). L'olvanil n'est pas âcre (Brand *et al*, 1987 ; Dray *et al*, 1990) mais désensibilise le récepteur (Dray *et al*, 1990 ; Liu *et al*, 1997). Ces différences reflètent des variations cinétiques dans les propriétés d'ouverture du canal. Il y aurait un ou plusieurs vanilloïdes endogènes produits en faible quantité ou de faible activité (Maderspach et Fajsz, 1982) mais ce domaine reste peu connu.

4.3.2. La capsaïcine en clinique et ses inconvénients

La capsaïcine est un ingrédient que l'on retrouve dans certaines crèmes destinées à soulager les douleurs musculaires, et elle est aussi utile pour traiter le problème d'hyperréflexie du detrusor (De Groat, 1997 ; Cruz, 1998) et l'hypersensitivité de la vessie (Stephenson et Mundy, 1994 ; Heritz et Blavais, 1996). La capsaïcine topique a aussi été essayée comme traitement adjuvant analgésique dans différentes conditions de douleur neuropathique comme la neuralgie post-herpétique (Bernstein *et al*, 1987 ; Bucci *et al*, 1988) mais l'irritation et la

sensation de brûlure qu'elle provoque sont souvent mal tolérées. De plus, *in vitro*, la capsaïcine provoque la mort cellulaire par apoptose en laissant entrer trop de calcium dans les neurones, expliquant sa toxicité à forte dose (Wood, 1993).

L'idéal serait donc de synthétiser un vanilloïde non irritant capable d'une désensibilisation durable. Le ligand devrait ne pas provoquer de potentiel d'action tout en désensibilisant le récepteur et donc activer lentement le récepteur vanilloïde tout en inactivant rapidement les canaux voltage-dépendants au Ca^{2+} et au Na^+ .

L'eugénol a la capacité de bloquer le récepteur TRPV1 de façon réversible et possède également une action sur les canaux Na^+ . Comme il y a des récepteurs vanilloïdes au niveau de la corne dorsale de la moelle épinière, et que ces récepteurs peuvent moduler l'allodynie et l'hyperalgésie, l'hypothèse posée est que l'eugénol agissant comme agoniste/antagoniste du récepteur aura une activité analgésique lors de douleur neuropathique évaluée par la sensibilité thermique et mécanique, ceci lors d'une douleur neuropathique induite, en utilisant le modèle chirurgical de constriction du nerf sciatique de Bennett chez le rat.

Intrathecal eugenol administration alleviates neuropathic pain in male Sprague-Dawley rats

Ludivine Lionnet, Francis Beaudry, Pascal Vachon

*Université de Montréal, Faculté de Médecine Vétérinaire, Département de
Biomédecine Vétérinaire et de Pathologie & Microbiologie, Saint-Hyacinthe, QC,
Canada*

Corresponding author: Dr Pascal Vachon

Université de Montréal

Faculté de Médecine Vétérinaire

Département de Biomédecine Vétérinaire

C.P. 5000

Saint-Hyacinthe, Qc

J2S 7C6

Phone number: 450-773-8521 ext. 8294

Fax: 450-778-8109

Abstract

The main objective of this study was to determine the central effect of eugenol on neuropathic pain when injected intrathecally at the level of the lumbar spinal cord. In a preliminary study we evaluated the penetrability of eugenol in the CNS of rats. Blood, brain and spinal cord samples were collected at selected time points following eugenol administration and concentrations were determined by tandem liquid chromatography-mass spectrometry. Brain-to-plasma and spinal cord-to-plasma ratios (3.3 and 6.7 respectively) suggest that eugenol penetrates the CNS of rats relatively well, with a preferential distribution in the spinal cord. Following the induction of neuropathic pain in rats using the sciatic nerve ligation model, intrathecal injections of eugenol were done to evaluate the central effect of eugenol. Treatment with 50 μ g of eugenol significantly decreased secondary mechanical allodynia after 15 min, 2 h and 4 h ($p < 0.05$; < 0.005 ; < 0.05 respectively) and improved thermal hyperalgesia after 2 h and 4 h ($p < 0.001$ and $p < 0.05$). Results support the hypothesis that eugenol may alleviate neuropathic pain, both allodynia and hyperalgesia, by acting centrally most probably at the level of the dorsal horn of the spinal cord where vanilloid receptors can be found.

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

1. Introduction

The treatment of chronic pain has become a major concern in medicine. Neuropathic pain is caused by a lesion in the peripheral or central nervous system and is characterised by the development of allodynia and hyperalgesia which are respectively the perception of pain after an innocuous stimulus and an overreaction after a painful stimulus (Nichols *et al*, 1999). These two sensations can be felt together or independently. Neuropathic pain can result from metabolic pathologies such as diabetes mellitus, traumas, neoplasms and also amputations. Traditional analgesic agents are ineffective on this type of pain so new treatment approaches need to be developed.

Vanilloid receptors have a central role in the development and maintenance of neuropathic pain. They are present in both the peripheral and central nervous systems (Holzer, 1991). These receptors were first discovered by Thresh in 1846 during his study on hot peppers. He named the active ingredient capsaicin and predicted that capsaicin and vanillin-like structures being closely related would have similar functions, fact which was later proven by Nelson in 1919. Capsaicin provokes a burning sensation but also has an analgesic effect (Whittet, 1968; Lembeck, 1987; Dasgupta and Fowler, 1997). Jancso (1968) demonstrated that capsaicin not only modulates sensory neuronal activity but also renders animals resistant to painful stimuli. Holzer (1991) described the vanilloid receptor as a capsaicin operated channel in primary sensory neurons. Six subclasses of vanilloid transient receptor potential channels (TRPV1-V6) have been discovered

and they have been classified based on their specific activities (Caterina et Julius, 2001; Davis *et al*, 2000; Szallasi and Blumberg, 1999, Vriens *et al*, 2009).

Vanilloid receptor VR1 is a distant relative of the transient release potential (TRP) family of store-operated calcium channels (Montell and Rubin, 1989; Hardie and Minke, 1993; Wes *et al*, 1995; Clapham, 1996; Colbert *et al*, 1997; Roayaie *et al*, 1998) which integrates painful chemical and physical stimuli. Heat opens the channel pore of the VR1, whereas low pH would lower the receptor's heat threshold. (Tominaga *et al*, 1998). Mechanical transduction has also been demonstrated for this receptor (Cui *et al*, 2006; Culshaw *et al*, 2006; Honore *et al*, 2005; Pomonis *et al*, 2003). TRPV1 antagonists have demonstrated an analgesic effect on both inflammatory and neuropathic pain (Caterina *et al*, 1997; Ohkubo and Shibata, 1997; Tominaga *et al*, 1998). Some natural substances have demonstrated antagonistic activity for vanilloid receptors such as eugenol (Szallasi and Blumberg, 1993), guaiacol (Ohkubo et Shibata, 1997), zingerone (Liu and Simon, 1996), scutigeral (Szallasi *et al*, 1999), olvanil (Lawand *et al*, 1997) and trialkylglycine (Garcia-Martinez *et al*, 2002). Vanilloid receptors modulate pain at central and peripheral levels (McGarauthy *et al*, 2008).

Eugenol, one of the main components of clove oil (*Eugenia aromatica*), has shown *in vitro* action on the TRPV1 (Yang *et al*, 2003) inducing an analgesic effect by blocking this receptor. Eugenol has different pharmacological properties such as dental analgesia (Kozam, 1977; Ohkubo and Shibata, 1997), anti-inflammatory effect by inhibiting thromboxane biosynthesis (Reddy and Lokesh, 1994), antibacterial effect (Laekeman *et al*, 1990), neuroprotective effect (Wie *et al*, 1997), anesthetic effect (Guenette *et al*, 2006), as well as anticancer

(Newmark,1996), antihistaminic (Nishijima *et al*, 1998), anti-anaphylactic (Jadhav *et al*, 2004), anti-oxidant (Chen *et al* 2009), and antifungal effect on *Candida albicans* (He *et al*, 2007; Chami *et al*, 2004).

A recent study showed an analgesic effect of eugenol following oral administration in rats with neuropathic pain (Guenette *et al*, 2007), however since both central and peripheral up regulation of this receptor may occur in pain sensitization, the effect of eugenol could be at both levels of the nervous system.

The main objectives of this study were to determine the penetrability of eugenol in the brain and spinal cord of rats and then determine its effect on neuropathic pain following an intrathecal administration in rats using the chronic constriction sciatic nerve model. Von Frey filaments were used to test allodynia and Hargreaves apparatus to test thermal hyperalgesia. Since capsaicin is known to be neurotoxic when injected intrathecally (Basbaum, personal communication), histological evaluations of the lumbar spinal cord were also assessed to evaluate if neuron toxicity occurred after injection of eugenol.

2. Material and methods

2.1 Animals

A total of 36 male Sprague-Dawley rats (Charles River, St-Constant, QC, Canada) weighing 300-350g were used for the experiments. Animals were allowed 7 days of acclimation before the start of the experiments. Animals were group-housed (2 rats per cage) in polycarbonate cages (Ancare, Bellmore, NY, USA) on hardwood sawdust bedding (Beta chip, Northeastern Products Co, Warrenburg,

NY, USA) in a room with controlled temperature ($21 \pm 2^\circ \text{C}$) and maintained on a 12:12 h light: dark cycle. Rats received tap water and a standard laboratory rodent diet (Charles River Rodent chow 5075, St-Constant, QC, Canada) *ad libitum*. The experiment protocol was approved by the Institutional Animal Care and Use Committee of the Faculty of Veterinary Medicine of the University of Montreal prior to animal use and is in accordance with the guidelines of the Canadian Council on Animal Care.

Animals were tested on the different devices, explained further on, prior to surgery, for the establishment of baseline values, and after the development of neuropathic pain. Tests were always performed in the morning to avoid circadian variations.

2.2 Analytical Assay

The analytical assay of eugenol in plasma and nervous tissues was performed using tandem liquid chromatography-mass spectrometry according to a method previously published (Beaudry *et al.*, 2006).

2.3 Pharmacokinetics Study

The biodistribution of eugenol in the brain and spinal cord was assessed in rats ($n = 24$). Following oral administration of eugenol (40 mg/kg) and under isoflurane anesthesia (procedure taking less than 1 min), intracardiac blood samples (0,5 mL) were collected in sodium heparin tubes at predose, 0.25, 0.5, 1, 2, 4, 8, and 24 h (3 animals per time point). Blood samples were maintained on ice and centrifuged (3200 *g* for 10 min) within 30 min of collection. Rats were

decapitated immediately following the blood collection at each time point and the brain as well as the lumbar spinal cord were rapidly removed and frozen in isopentane (-60°C). All samples were kept at -80°C pending analysis.

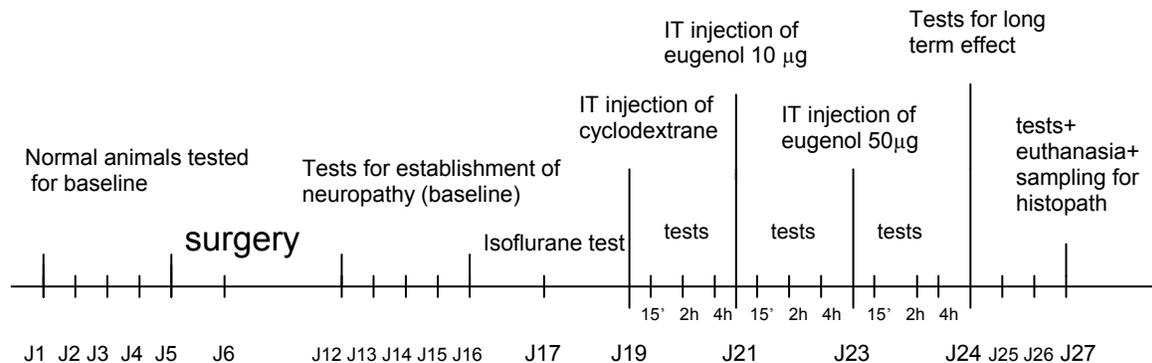
In order to assess the penetrability of eugenol in the CNS of rats, concentration-time profiles of eugenol in brain, spinal cord and plasma were constructed using the mean concentration values at each time point. Brain-to-plasma and spinal cord-to-plasma ratios were calculated by dividing the AUC_{0-t} of brain or spinal tissues by AUC_{0-t} of plasma.

2.4 Pharmacodynamic Study

A total of 12 rats were used for the pharmacodynamic study.

Experimental design

Rats underwent the surgery that induces chronic constriction of the sciatic nerve (Bennett and Xie, 1988) to develop neuropathic pain. Then eugenol was injected intrathecally between L6 and L7, under general anesthesia with isoflurane (procedure taking less than 1 min), at two different doses (10µg and 50µg) in. Prior to eugenol injections, cyclodextrin, eugenol's vehicle was injected as a control. Since all intrathecal injections were done under general anesthesia, the effect of isoflurane alone was also tested. Pain behaviours were evaluated with the Von Frey filaments and the Hargreaves apparatus. At the end of the study, 4 days after the last injection of eugenol at 50µg, spines were collected for histopathological evaluation. Motor coordination was evaluated with the rotarod treadmill with another group of rats.



ROTAROD

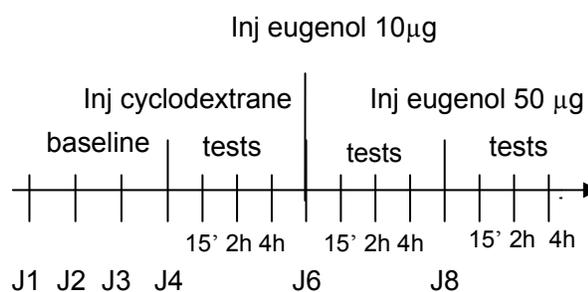


Figure 1 : Experimental design

Sciatic nerve constriction surgery

The chronic constriction injury (CCI) model was used (Bennett and Xie, 1988) to induce neuropathic pain. Animals were anaesthetised with 2% isoflurane, the right thigh was clipped and the skin disinfected using betadine and alcohol. Skin and biceps femoris incisions were made and the sciatic nerve was visualised in the thigh under a dissecting microscope, carefully isolated it from surrounding connective tissue. Four loose chromic 4.0 catgut ligatures with equal spacing were placed around the nerve, proximally to its trifurcation. The muscle layer and the skin were both sutured using 4.0 Vicryl. All animals recovered normally. None of

them showed any distress, excessive pain or auto mutilation during the study. Animals were allowed 5 days recovery before testing.

Evaluation of mechanical and thermal sensitivities to evaluate tactile allodynia and thermal hyperalgesia

Animals (n = 6) were evaluated with Von Frey filaments (Stoelting, Wood Dale, IL, USA) and the Hargreaves apparatus (IITC Life Science, CA, USA) (Hargreaves *et al*, 1988) during 5 days prior to surgery and for 5 days following surgery to evaluate the establishment of the neuropathic pain. Results from the last three days of the neuropathic pain evaluations were used as the neuropathy baseline.

To establish mechanical sensitivity, rats were placed on a customized platform as described by Pitcher *et al.*, (1999). Testing sessions began after 5 - 10 min habituation to the experimental setup, when the rat had stopped exploring the environment. Testing was done by applying the Von Frey filament through the grid floor on the central region of the plantar surface of the rat's hind paws, avoiding the foot pads. The filament was applied only when the rat was stationary on its 4 paws. A trial consisted of three applications of the different filaments ranging from 0.39 to 20.37g. Pressure was applied until buckling occurred and this was maintained for approximately 2 seconds. The test was stopped as soon as the animal removed its hind paw. The filament number was recorded to represent the paw withdrawal threshold when withdrawal occurred at least twice out of three trials.

Thermal hyperalgesia was evaluated using Hargreaves test. Each animal was placed in a chamber with Plexiglas walls. The ground floor plate was made of heated glass (27- 31°C). Animals were allowed to acclimate to the apparatus for 15 min prior to testing. Then radiant heat generated by a high intensity light bulb (40W) was directed to the plantar surface of the hind paw. The time (s) that the animal took to lift its paw from the floor was recorded. The baseline for each animal was calculated as the mean of three trials. Each trial was separated by a 10 - 15 min interval to avoid receptor sensitization. The cut off time of the radiant stimulation was set at 20 sec to minimise tissue injury.

After the development of the neuropathy and prior to injections, animals were anaesthetised with 2% isoflurane for less than one min and tested after 5 min recovery to evaluate the effect of the anaesthetic on the different tests.

Intrathecal cyclodextrin and eugenol injections

Injections were done under isoflurane anesthesia, with a 25G needle, between L6 and L7 vertebrae, after clipping and disinfection of the injection site. This procedure took less than one minute. Rats were then tested after 15 min, 2h and 4 h. At least one day of recovery was allowed between injections. All rats received the three injections.

Beta cyclodextrin, eugenol's vehicle, was first injected alone. A solution of 2% beta cyclodextrin (Sigma-Aldrich, St-Louis, MO, USA) in saline was prepared and 20 μ L of this solution was injected as a control to evaluate if the injection itself or the cyclodextrin had any effect on pain behavior. A dose of 10 μ g of

eugenol (Sigma–Aldrich, St-Louis, MO, USA) in 20 μ L of a cyclodextrin solution and a second dose of 50 μ g of eugenol in 20 μ L were injected to each rat the same way. Animals were all tested at 15 min, 2 and 4 h after each injection. After the last eugenol injection, rats were tested once daily for 4 consecutive days to evaluate if eugenol had a long term effect.

Evaluation of motor coordination

To verify if eugenol had an effect on motor coordination, intact animals (n= 6) were trained on the rotarod treadmill (ENV-576; Med Associates, St. Albans, Vermont, USA) and 3 consecutive days of evaluations were used to establish a baseline values. Daily injections of either cyclodextrin, eugenol 10 μ g or eugenol 50 μ g were done and animals were evaluated at 0,25, 2 and 4 h to evaluate possible effects on motor coordination. Again one day of recovery was allowed between injections. The rotarod was set to the acceleration mode of 5 to 35 revolutions per min over 5 min. The maximum time the animal stayed on the rotarod, up to 5 min, was recorded for each performance. A mean of 3 trials was used to represent each performance.

Histology and immunohistochemistry

On the day the animals were euthanised, spinal cords were removed and the lumbar enlargement of the spinal cord was fixed in 10% neutral buffered formalin for 48h before being cut and embedded in paraffin. Three μ m sections of the spinal cord were made for each rat and stained with hematoxylin-eosin-phloxine-saffran (HPS) to evaluate possible neuronal toxicity. To determine

astrocytic reactivity, immunohistochemical assessment of glial fibrillary acidic protein (GFAP) was conducted with the use of polyclonal antibodies (immunoglobulin fraction of rabbit antisera diluted in phosphate-buffered saline, pH 7.6, with 1% bovine serum albumin; BioGenex Laboratories, San Ramon, California, USA).

2.5 Data analysis and statistics

The statistical analyses of behavioural data conducted using a linear model with repeated measures performed with SAS (version 9.0; SAS Institute, Cary, North Carolina, USA). A priori contrasts were then computed to evaluate statistical significance. Baseline results were compared to results with neuropathy, and results from the neuropathy baseline to results following isoflurane anesthesia, cyclodextrin and eugenol injections. For the rotarod treadmill evaluations baseline results were compared to post injections results. Results are presented as means and standard errors of the mean. Analyses revealing P values < 0.05 were deemed to be statistically significant.

3. Results

3.1 Pharmacokinetics results

Eugenol biodistribution in brain and lumbar spinal cord is depicted in Figure 1. Mean spinal cord concentrations of eugenol were markedly higher than those observed in plasma and brain and declined slowly over the first 10 h and then seemed to rise again at 24 h. The overall exposure of eugenol in brain and

spinal cord relative to plasma are presented in Table 1. Brain-to-plasma and spinal cord-to-plasma ratios of eugenol were 3.3 and 6.7 respectively.

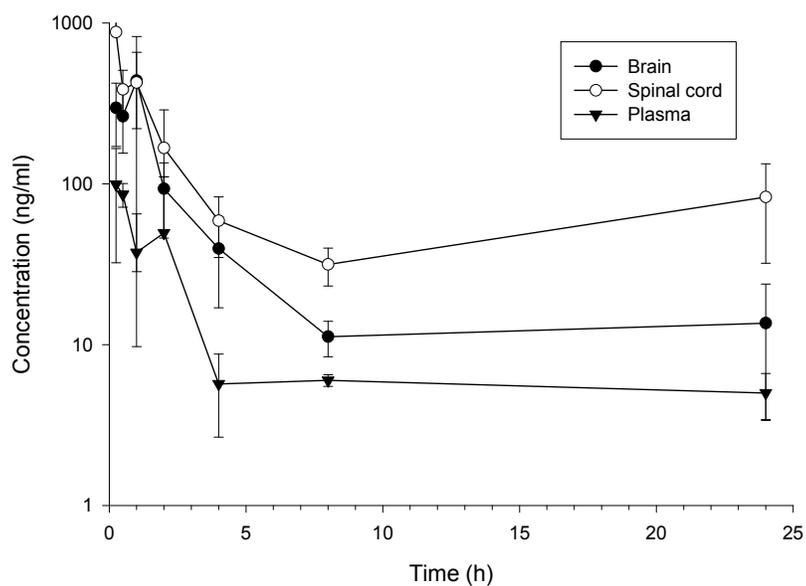


Figure 2: Mean (\pm SE) concentration profiles on semi-log scale of eugenol in brain, lumbar spinal cord and plasma following a single oral administration (40 mg/kg) in male Sprague-Dawley rats (n = 3 animals/time point).

PK parameters	Plasma	Brain	Spinal cord	Brain-to-plasma ratio	Spinal cord-to-plasma ratio
AUC _{0-t} ($\mu\text{g}\cdot\text{h}/\text{mL}$ or g)	276,25	910,16	2312,91	3,3	8,37
AUC _{0-inf} ($\mu\text{g}\cdot\text{h}/\text{mL}$ or g)	912,18	962,08	3241,27		
C _{max} ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	99	438,6	877,4		
T _{max} (h)	0,25	0,25	1		

AUC_{0-t}: area under curve from time zero to the last measurable concentration, AUC_{0-inf}: area under curve extrapolated to infinity, C_{max}: maximum plasma concentration, T_{max}: time to maximum plasma concentration, g: mass of central nervous tissue.

Table I: Pharmacokinetic parameters of eugenol in plasma, brain and spinal cord following oral administration of eugenol (40 mg/kg) in male Sprague-Dawley rats. Values calculated from mean plasmatic concentration results.

3.2 Pharmacodynamic results

Establishment of neuropathy

Tactile allodynia and thermal hyperalgesia (Figure 2) are clearly present during the last 3 days of the establishment of neuropathy ($p < 0.01$ day 3 and $p < 0.001$ days 4 and 5). Values for the left paw were not significantly different from baseline.

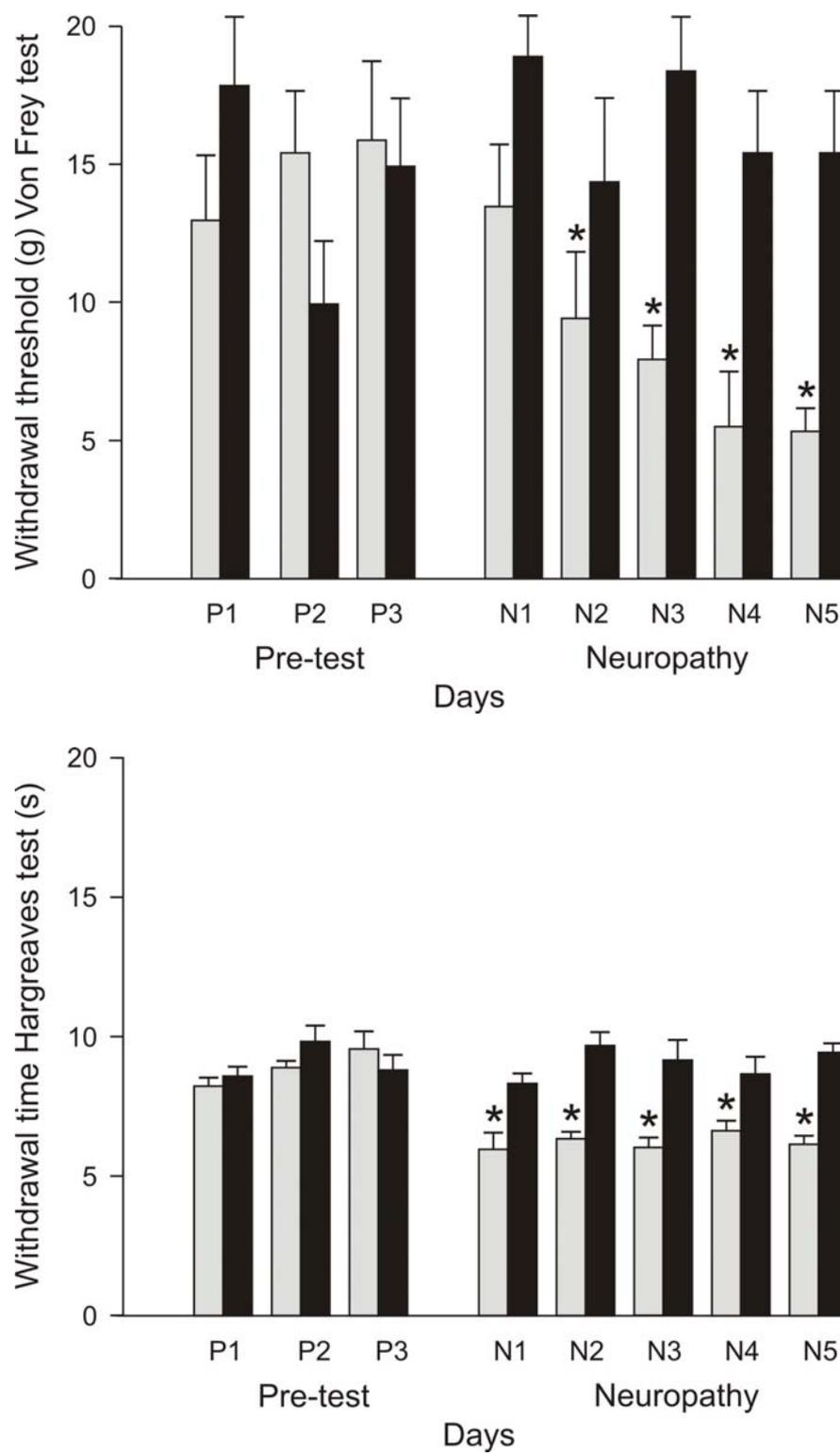


Figure 3: Von Frey and Hargreaves results (mean \pm SE) for baseline (pre-test) and neuropathy following CCI surgery of the right sciatic nerve in male

Sprague Dawley rats (n = 6). Rats were tested prior to surgery for baseline values during 3 consecutive days (P1-3) and on 5 consecutive days after the CCI surgery (N1-5) for the establishment of neuropathy. Hyperalgesia and allodynia was clearly established for the right paw whereas the left paw remained similar to baseline. Black bars = left paw, grey bars = right paw, * = statistically significant (see text for values).

For the checkup test with isoflurane, there was no statistically significant difference between isoflurane and the neuropathy results suggesting that isoflurane had no effect.

Effect of eugenol treatment on allodynia and thermal hyperalgesia

Thermal hyperalgesia and mechanical allodynia were assessed at 15 min, 2 h and 4 h following IT injections in the spinal fluid of cyclodextrin, eugenol 10 µg and eugenol 50 µg for both paws. No significant difference was seen with cyclodextrin when compared to neuropathic baseline results.

In the affected right paw (Figure 3 upper graph) treatment with the high dose of eugenol significantly decreased mechanical allodynia after 15min, 2h and 4h ($p < 0.05$; < 0.005 ; < 0.05 respectively), whereas the lower dose had an effect only 2h post injection ($p < 0.01$). No significant difference was noted for the left paw (values not shown).

Treatment with low dose of eugenol significantly decreased thermal hyperalgesia after 2h and 4h ($p < 0.0001$ and $p < 0.005$), and with the high dose ($p < 0.001$ and $p < 0.05$) in the affected right paw (Figure 3 lower graph).

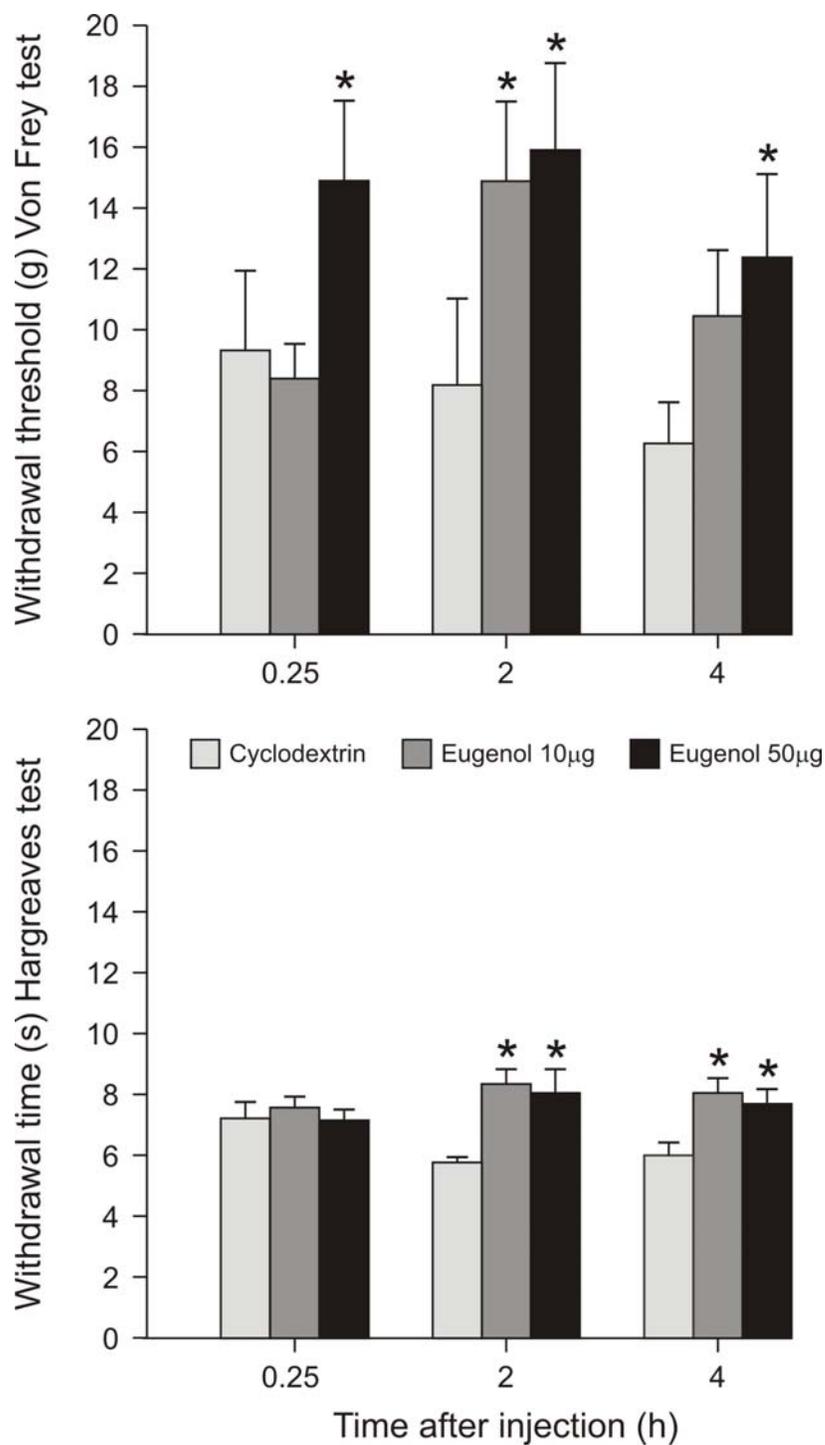


Figure 4: Intrathecal eugenol results for Von Frey and Hargreaves tests (Mean \pm SE) for right paw of male neuropathic Sprague-Dawley rats (n = 6). Upper graph: Effect of 10 μ g and 50 μ g of eugenol on allodynia (Von Frey test) compared to the cyclodextrin vehicle. Rats were tested at 15 min, 2 h and 4 h post

drug or vehicle administrations on separate days with one day recovery between evaluations. The low dose of eugenol decreased allodynia after 2 h only whereas the high dose decreased had an effect at all time points. Lower graph: Effect of 10 μg and 50 μg of eugenol on thermal hyperalgesia compared to the cyclodextrin vehicle. Rats were tested at 15 min, 2 h and 4 h post drug or vehicle administrations. Both doses of eugenol decreased thermal hyperalgesia at 2h and 4h. * = statistically significant (see text for values).

Effect of eugenol on motor coordination

No significant difference was observed at any time point between the pre-test baseline values and the cyclodextrin and eugenol injections (Figure 4) on the rotarod treadmill. This suggests that eugenol had no effect on motor coordination and that the alleviating effects of eugenol on neuropathy were due to the analgesic effect.

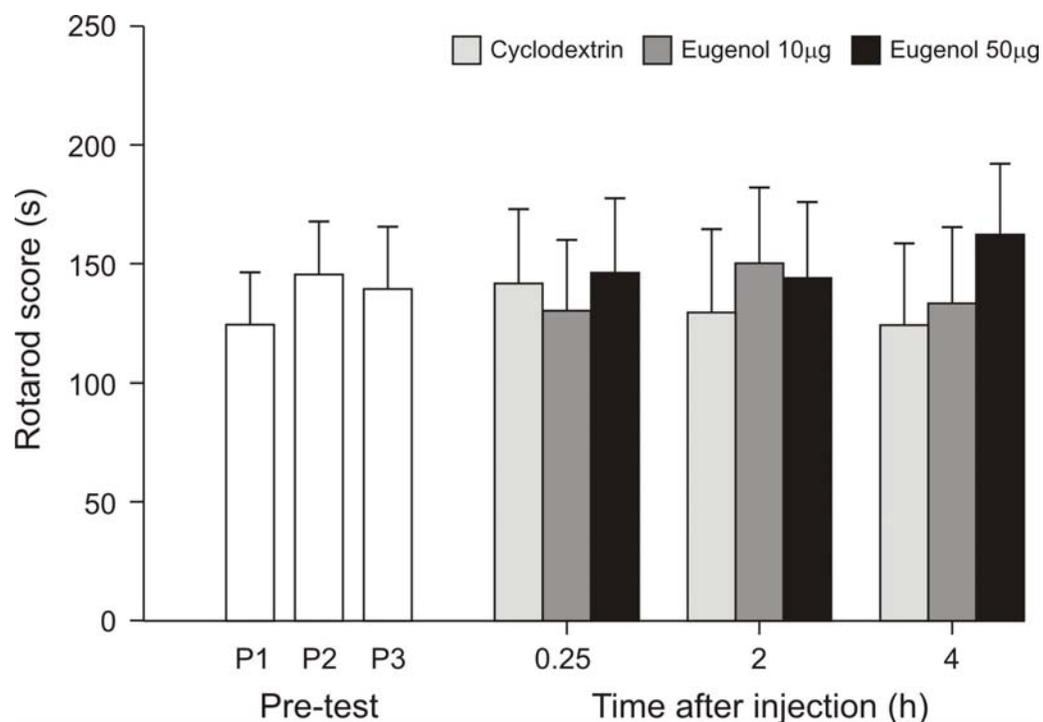


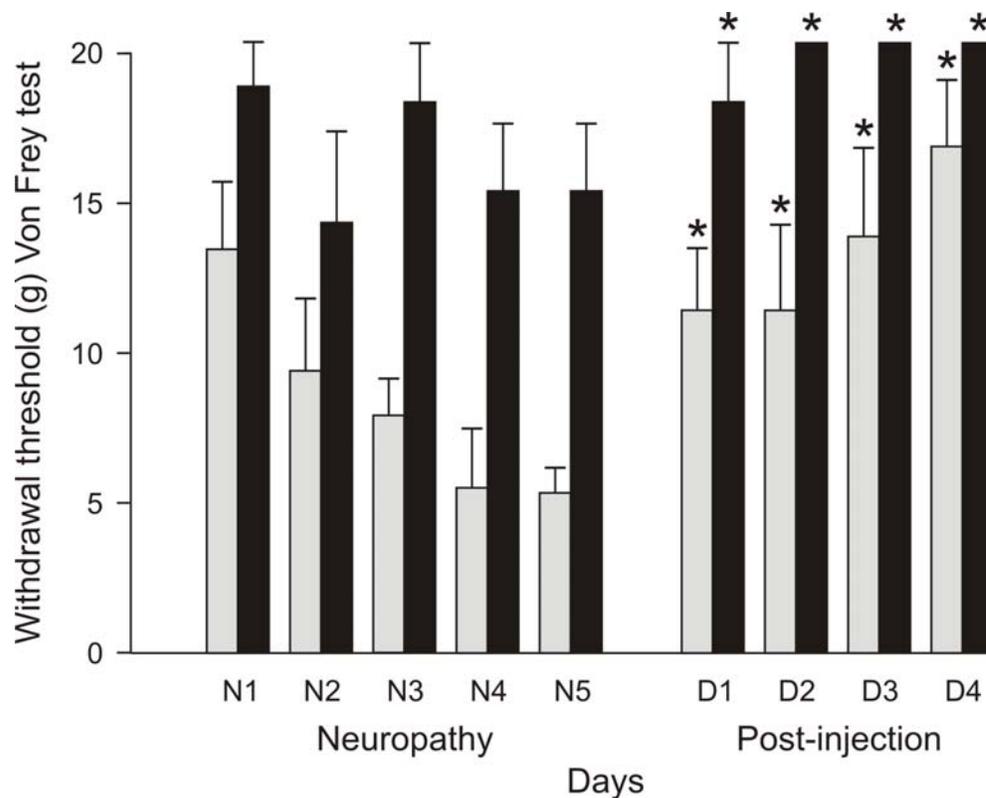
Figure 5: Rotarod treadmill scores (Mean \pm SE) of intact male Sprague-Dawley rats ($n = 6$) after injection of cyclodextrin, and eugenol (10 μg and 50 μg). Animals trained and tested for three days (P1-3) to establish a baseline. They were then tested at 15 min, 2 h and 4 h after injections on separate days with one day recovery between evaluations. No differences were found between pre-test and cyclodextrin or eugenol injections.

Long term effect of eugenol

Animals were tested daily for 4 consecutive days after the last 50 μg IT eugenol injection. Mechanical allodynia (Figure 5) was statistically different from neuropathic baseline results for days 1 to 4 ($p < 0.01$, $p < 0.01$, $p < 0.001$ and $p < 0.0001$ respectively) for the right paw. This suggests a prolonged analgesic effect of eugenol since values actually came back to the presurgical baseline. For the left

paw however, the 4 days were also statistically different from baseline (day 1 $p < 0.02$ and day 2-4 $p < 0.01$) which shows that eugenol may have an unpredictable effect on normal tactile transmission. Following the last behavioural evaluations, animals were euthanized and the lumbar enlargement of the spinal cord was collected for histology.

For thermal hyperalgesia (Figure 5), days 1, 3 and 4 are statistically different from neuropathic results ($p < 0.0001$, $p < 0.01$, $p < 0.05$ respectively) but not day 2 for the right paw. The values returned to presurgical baseline for days 1 and 3 but not for days 2 and 4. For the left paw, values for day 2, 3 and 4 were significantly different from the neuropathic baseline ($p < 0.01$, $p < 0.01$, $p < 0.001$ respectively) which shows that eugenol may have an inhibitory effect on the normal transmission of pain.



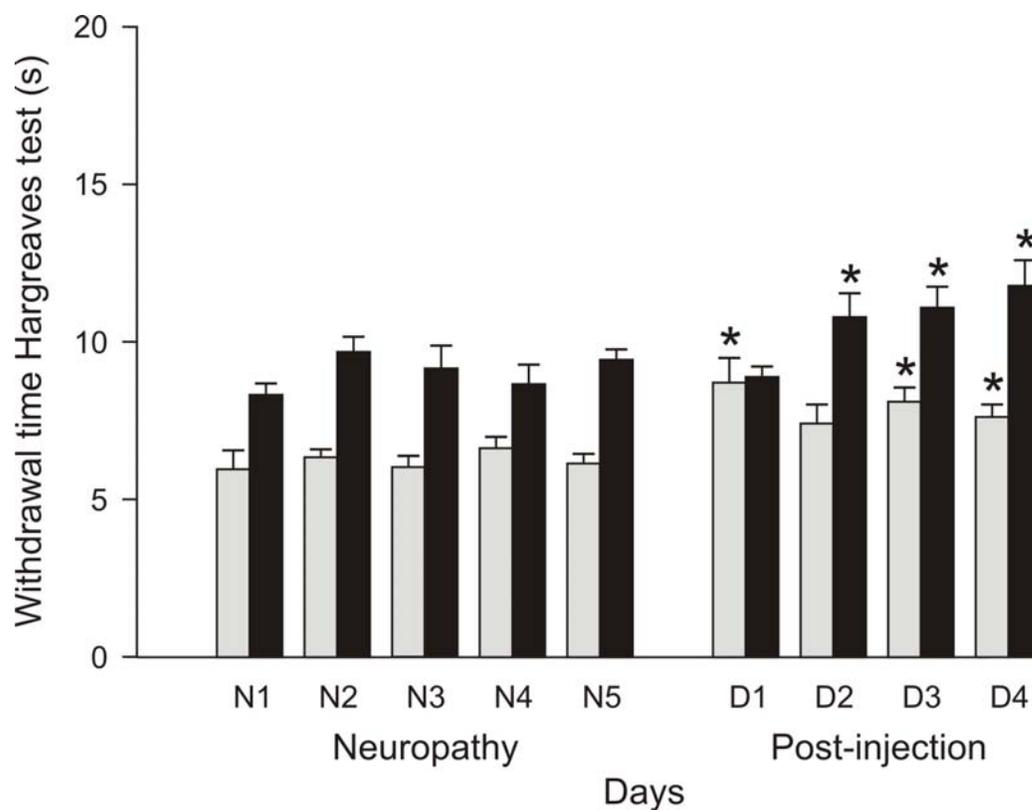


Figure 6: Von Frey and Hargreaves results (Mean \pm SE) for neuropathy and days following the last eugenol injection (50 μ g) after CCI surgery of the right sciatic nerve in male Sprague Dawley rats (n = 6). Rats were tested for 5 consecutive days after the CCI surgery (N1-5) for the establishment of neuropathy and during 4 days after the last eugenol injection (D1-4). Right paw values returned to baseline after injection of eugenol. Left paw values were also different from baseline. Black bars = left paw, grey bars = right paw * = statistically significant (see text for values).

Histological and immunohistochemical results

In all animals, no sign of toxicity or neuronal necrosis was found in the superficial layers of the dorsal horn on any of the lumbar spinal cord with the

hematoxylin-eosin-phloxin-saffran stain. Only normal neuronal tissue was observed (Figure 6 top). With the GFAP immunostaining only two animals showed a minimal astrocytic reactivity (Figure 6 bottom). Together, these findings suggest that no toxicity occurred following 50 μ g of eugenol intrathecally.

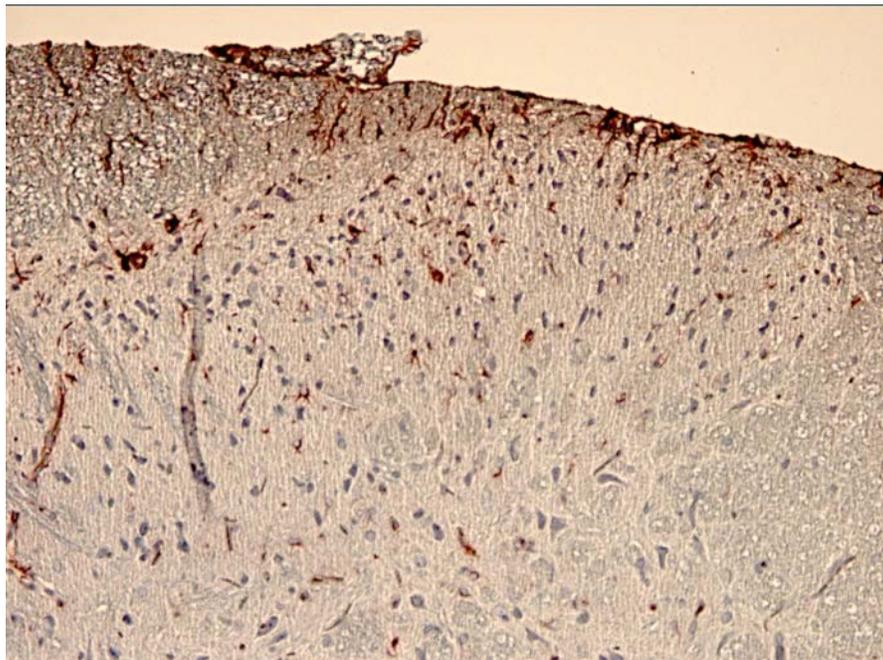
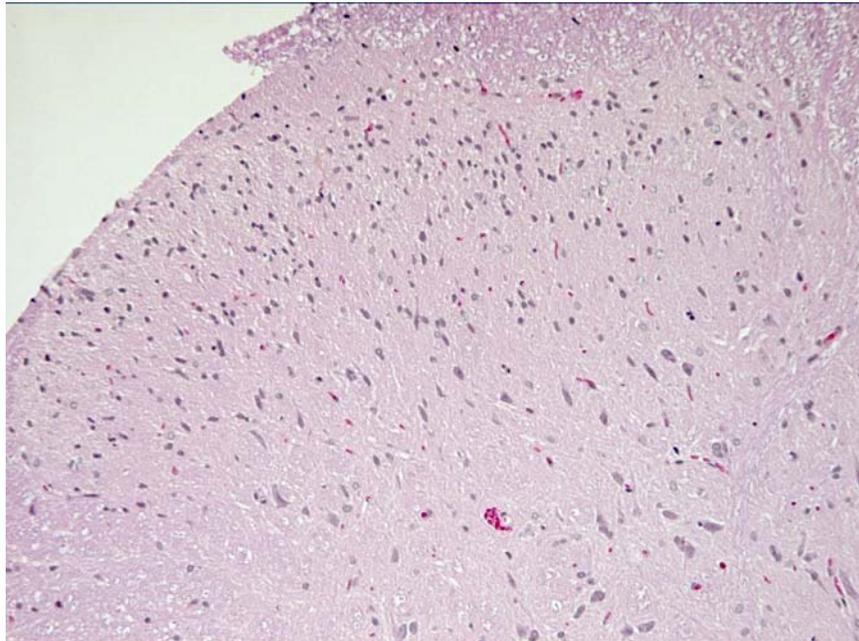


Figure 7: Dorsal horn lumbar spinal cord section (top) stained with hematoxylin-

eosin-phloxin-saffran staining showing normal neuronal tissue following intrathecal administration of 50µg of eugenol. Animals were euthanized 4 days after the last intrathecal eugenol injection. Lumbar spinal cord dorsal horn with GFAP immunostaining (bottom) showing minimal astrocytic reactivity (dark stains) following intrathecal administration of 50 µg of eugenol. Animals were euthanized 4 days after the last intrathecal eugenol injection. (Magnification X100)

4. Discussion

Neuropathic pain is a widespread chronic condition that affects animals and humans. It is the result of a nerve lesion or a dysfunction in the central or peripheral nervous system as defined by the international association for the study of pain (IASP). Some mechanisms are known to play a role in the development and maintenance of neuropathic pain implicating, amongst others, the NMDA receptors, the sodium channels and the vanilloid receptors. TRPV1 is a vanilloid receptor activated by capsaicin and eugenol. For acute inflammatory pain, TRPV1 has been shown to be increased in hind paw skin, sciatic nerve and dorsal root ganglia (DRG), following induction of inflammatory pain with complete Freund's adjuvant (CFA) injection (Carlton and Coggeshall, 2001; Ji *et al*, 2002). Oral or intrathecal administration of TRPV1 antagonists A-784168 and A-795614 have been shown to reduce CFA-induced thermal hyperalgesia and mechanical allodynia (Cui *et al*, 2006), as well as intrathecal administration of AMG 9810, a

TRPV1 antagonist (Yu *et al*, 2008). Furthermore, TRPV1 detected with immunohistochemical staining was increased in DRG for over 28 days following CFA injection (Luo *et al*, 2004) suggesting its implication in chronic pain. Yu *et al* (2008) showed that following CFA injection, TRPV1 protein expression was increased in all three types of DRG neurons: medium-sized myelinated A fibre neurons, small non-peptidergic neurons and small peptidergic neurons. Their results, together with the pharmacological results of the TRPV1 antagonist AMG 9810 provides evidence that TRPV1 plays a role in thermal hyperalgesia over a relatively long period. Moreover, they showed that TRPV1 participated in mechanical allodynia with a longer time effect compared to thermal hyperalgesia.

TRPV1 receptors are involved in nociceptive processing at the level of the DRG and sensory nerve endings, however this receptor may occupy a role in pain processing in other brain regions as well, such as the rostral ventromedial medulla, periaqueductal grey, solitary tract nucleus, hypothalamus, ventral thalamus, somatosensory cortex, anterior cingulate cortex and insula (Millan, 1999; 2002). No studies have presently evaluated the role of TRPV1 modulations in these regions of the central nervous system. Some natural vanilloid molecules blocking the TRPV1 such as olvanil, scutigeral, zingerone, guaiacol and eugenol are potential therapeutic targets for treatment of neuropathic pain. Eugenol demonstrated an action on TRPV1 receptors (Yang *et al*, 2003; Park *et al*, 2009). Our study aimed at determining the central spinal effect of eugenol on neuropathic pain after intrathecal injection although an oral administration could affect supraspinal centres and this could be evaluated by future studies.

Biodistribution in nervous tissue

The pharmacokinetics of eugenol in blood had previously been determined following an administration by gavage (Guénette *et al.* 2007). Our study determined the biodistribution of eugenol in the brain and lumbar spinal cord. The spinal cord-to-plasma ratio was higher than brain-to-plasma ratio suggesting eugenol penetrates nervous tissue readily and that the spinal cord contained more eugenol than the brain at all time points. This difference could be related to a difference of distribution of P-glycoproteins (P-gps) between the brain and spinal cord. P-gps and other transporter proteins present in the brain and spinal cord capillary endothelial cells function to limit cellular exposure to substrates via an active efflux mechanism (Matheny *et al.*, 2001). Future studies must be performed to explain the difference of distribution of eugenol between brain and spinal cord. The concentration of eugenol declines slowly and rises again after 24h. Guénette *et al.* (2007) showed that eugenol's half life was long and suggested an extravascular redistribution due to its lipophilic properties which are consistent with our results that suggest a redistribution.

Alleviation of pain:

The sciatic nerve constriction model was used to determine the analgesic properties of eugenol. Rats developed both hyperalgesia and allodynia following CCI surgery. These results differ from those of Guénette's study (2007) where rats developed hyperalgesia only following the sciatic nerve cuff-implanted model. The difference could therefore be linked to the sciatic nerve lesion that is different in the two models. In the present study, eugenol significantly reduced hyperalgesia

which is consistent with prior studies (Guenette *et al*, 2007; Park *et al*, 2009) as well as mechanical allodynia, consistent with other studies showing that a TRPV1 antagonist reduced mechanical allodynia (Cui *et al*, 2006; Culshaw *et al*, 2006; Beaudry *et al*, 2009). These results show that eugenol may have an effect on mechanical sensitivity as well. Central TRPV1 receptors at the level of the dorsal horn of the spinal cord, as well as in other brain regions could be associated with its effects on pain (Szallasi *et al*, 1994; Millan, 1999; 2002). Intrathecal administration of eugenol induced analgesia strongly suggests a central contribution of eugenol to the alleviation of pain, clarifying Guénette's study (2007), where both peripheral and central contributions could have contributed to the alleviation of pain following oral administration.

Long term analgesic effects of eugenol

The concentration of eugenol over time (Figure 1) shows that the spinal cord concentrations increased after 24h, suggesting a redistribution of eugenol from lipid stores to blood. This effect is consistent with our behavioral results, where the alleviation of pain in the right affected paw (figure 2) still occurs 4 days following the last eugenol injection suggesting a long term analgesic effect.

Furthermore eugenol had no effect on motor coordination as shown with our results of the rotarod test. No side effects were detected on any animals after the eugenol injections. No neuronal toxicity was noted in the dorsal horn of the lumbar spinal cord when examined microscopically 4 days after the last eugenol treatment (a minimal astrocytic reaction was noted in two animals only and was not significant). Altogether these results show that eugenol has a great potential for

the treatment of neuropathic pain. Its lipophilicity facilitates its accumulation in nervous tissue providing long term analgesia, by blocking TRPV1 receptors over a long time interval. It is known that TRPV1 receptors are up-regulated in the sciatic nerve constriction model (Kanai *et al*, 2005). It is therefore probable that they are up-regulated in physiological neuropathic pain as well and eugenol will then be more efficacious in that pain state.

The direct effect of the eugenol on the vanilloid receptors may not be the only explanation for its effectiveness in alleviating hyperalgesia and allodynia. Eugenol has an anti-inflammatory effect (Reddy and Lokesh, 1994). Inflammatory cytokines are known to induce or enhance pain, and glial cells in the spinal cord that release these cytokines following peripheral injury are important in central hyperalgesia (DeLeo *et al*, 2004). Lamina II pain relay neurons increase their activity following a local application of IL-1 beta, IL-6 and TNF alpha (Kawasaki *et al*, 2008). Interleukin-1-beta and TNF alpha inhibitors are known to reduce pain (Arend and Dayer, 1990) making these molecules new therapeutic strategies for the treatment of neuropathic pain. Interleukins and TNF alpha have been shown to be involved in neural sensitization of TRPV1 receptors (Nicol *et al*, 1997; Obreja *et al*, 2002). Eugenol could therefore inhibit central sensitisation by inhibiting the synthesis of cytokines. It has been demonstrated that phenolic compounds, such as resveratrol, block the synthesis of pro-inflammatory cytokines (Marier *et al*, 2005) and therefore eugenol could possibly block pro-inflammatory cytokines.

In conclusion, our results show that eugenol has a central effect to alleviate neuropathic in the chronic sciatic nerve constriction injury model. Its long lasting effect and no apparent toxic effects at the level of the spinal cord make it an

interesting candidate for future therapeutic strategies for the treatment of neuropathic pain. More experimentation is required to determine its effects following repeated long-term administrations.

Acknowledgements: We would like to thank Mr Guy Beauchamp for the statistical analyses and Marie-Thérèse Parent for the preparation of the figures.

REFERENCES

Arend WP, Dayer JM. 1990. Cytokines and cytokine inhibitors or antagonist in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* **33**: 305-315.

Beaudry F, Ross A, Lema PP, Vachon P. 2009. Pharmacokinetics of vanillin and its effects on mechanical hypersensitivity in rat model of neuropathic pain. *Phytother Res* (available on line).

Beaudry F, Guénette SA, Vachon P. 2006. Determination of eugenol in rat plasma by liquid chromatography-quadrupole ion trap mass spectrometry using a simple off-line dansyl chloride derivatization reaction to enhance signal intensity. *Biomed Chromatogr* **20**:1216-22.

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

Carlton SM, Coggeshall RE. 2001. Peripheral capsaicin receptors increase in the inflamed rat hindpaw: a possible mechanism for peripheral sensitization. *Neurosci Lett* **310**:53-56.

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

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

Chami N, Chami F, Bennis S, Trouillas J, Remmal A. 2004. Antifungal treatment with carvacrol and eugenol of oral candidiasis in immunosuppressed rats. *Braz J Infect Dis* **8**:217-226.

Chen F, Shi Z, Neoh KG, Kang ET. 2009. Antioxidant and antibacterial activities of eugenol and carvacol-grafted chitosan nanoparticles. *Biotechnol Bioeng* **104**:30-39.

Clapham DE. 1996. TRP is cracked, but is CRAC TRP? *Neuron* **16**:1069–1072.

Colbert HA, Smith TL, Bargmann CI. 1997. OSM-9, a novel protein with structural similarity to channels, is required for olfaction, mechanosensation, and olfactory adaptation in *Caenorhabditis elegans*. *J Neurosci* **17**:8259–8269.

Cui M, Honore P, Zhong C, Gauvin D, Mikusa J, Hernandez G, Chandran P, Gomtsyan A, Brown B, Bayburt EK, Marsh K, Bianchi B, McDonald H, Niforatos W, Neelands TR, Moreland RB, Decker MW, Lee CH, Sullivan JP, Faltynek CR.

2006. TRPV1 receptors in the CNS play a key role in broad-spectrum analgesia of TRPV1 antagonists. *J Neurosci* **26**:9385-9393.

Culshaw AJ, Bevan S, Christiansen M, Copp P, Davis A, Davis C, Dyson A, Dziadulewicz EK, Edwards L, Eggelte H, Fox A, Gentry C, Groarke A, Hallett A, Hart TW, Hughes GA, Knights S, Kotsonis P, Lee W, Lyothier I, McBryde A, McIntyre P, Paloumbis G, Panesar M, Patel S, Seiler MP, Yaqoob M, Zimmermann K. 2006. Identification and biological characterization of 6-aryl-7-isopropylquinazolinones as novel TRPV1 antagonists that are effective in models of chronic pain. *J Med Chem* **49**:471-474.

Dasgupta P, Fowler CJ. 1997. Chillies: From antiquity to urology. *Br J Urol* **80**:845-852.

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

DeLeo JA, Tanga FY, Tawfik VL. 2004. Neuroimmune activation and neuroinflammation in chronic pain and opioid tolerance/hyperalgesia. *Neuroscientist* **10**: 40-52.

García-Martínez C, Humet M, Planells-Cases R, Gomis A, Caprini M, Viana F, De La Pena E, Sanchez-Baeza F, Carbonell T, De Felipe C, Pérez-Paya E, Belmonte C, Messeguer A, Ferrer-Montiel A. 2002. Attenuation of thermal nociception and hyperalgesia by VR1 blockers. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**:2374-2379.

Guénette SA, Beaudry F, Marier JF, Vachon P. 2006. Pharmacokinetics and anesthetic activity of eugenol in male Sprague-Dawley rats. *J Vet Pharmacol Ther* **29**: 265-270.

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

Hardie RC, Minke B. 1993. Novel Ca²⁺ channels underlying transduction in *Drosophila* photoreceptors: Implications for phosphoinositide-mediated Ca²⁺ mobilization. *Trends Neurosci* **16**:371–376.

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

He M, Du M, Fan M, Bian Z. 2007. In vitro activity of eugenol against *Candida albicans* biofilms. *Mycopathologia* **163**:137-143.

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

Honore P, Wismer CT, Mikusa J, Zhu CZ, Zhong C, Gauvin DM, Gomtsyan A, El Kouhen R, Lee CH, Marsh K, Sullivan JP, Faltynek CR, Jarvis MF. 2005. A-425619 [1-isoquinolin-5-yl-3-(4-trifluoromethyl-benzyl)-urea], a novel transient receptor potential type V1 receptor antagonist, relieves pathophysiological pain associated with inflammation and tissue injury in rats. *J Pharmacol Exp Therap* **314**:410-421.

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

Jancso' N . 1968. Desensitization with capsaicin and related acylamides as a tool for studying the function of pain receptors. In *Pharmacology of Pain*, Lin K, Armstrong D, Pardo ED (ed). Pergamon, Oxford, UK; 33-55.

Ji RR, Samad TA, Jin SX, Schmoll R, Woolf CJ. 2002. P38 MAPK activation by NGF in primary sensory neurons after inflammation increases TRPV1 levels and maintains heat hyperalgesia. *Neuron* **36**:57-68.

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

Kawasaki Y, Shang L, Change JK, Ji RR. 2008. Cytokine mechanisms in central sensitization: distinct and overlapping role of interleukin-1-beta, interleukin-6, and tumor necrosis factor alpha in regulating synaptic and neuronal activity in the superficial spinal cord. *J Neurosci* **28**: 5189-5194.

Kozam G. 1977. The effect of eugenol on nerve transmission. *Oral Surg Oral Med* **O44**:799.

Laekeman SM, Hoof VL, Haemers A, Berghe VAD, Herman AG et Vlietink AK. 1990. Eugenol, a valuable compound for in-vitro experimental research and worthwhile for further in-vivo investigation. *Phytother Res* **4**:90-96.

Lawand NB, Willis WD, Westlund KN. 1997. Excitatory amino acid receptor involvement in peripheral nociceptive transmission in rats. *Eur J Pharmacol* **324**:169-177.

Lembeck F. 1987. Columbus, capsicum and capsaicin: Past, present and future. *Acta Physiol Hung* **69**:265-273.

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

Luo H, Cheng J, Han JS, Wan Y. 2004. Change of vanilloid receptor 1 expression in dorsal root ganglion and spinal dorsal horn during inflammatory nociception induced by complete Freund's adjuvant in rats. *Neuroreport* **15**:655-658.

Marier JF, Chen K, Prince P, Scott G, del Castillo JR, Vachon P. 2005. Production of ex vivo lipopolysaccharide-induced tumor necrosis factor-alpha, interleukin-1beta, and interleukin-6 is suppressed by trans-resveratrol in a concentration-dependent manner. *Can J Vet Res* **69**:151-154.

Matheny CJ, Lamb MW, Brouwer KR, Pollack GM. 2001. Pharmacokinetic and pharmacodynamic implications of P glycoprotein modulation. *Pharmacotherapy* **21**:778-796.

McGaraughty S, Chu KL, Brown BS, Zhu CZ, Zhong C, Joshi SK, Honore P, Faltynek CR, Jarvis MF. 2008. Contributions of central and peripheral TRPV1 receptors to mechanically evoked and spontaneous firing of spinal neurons in inflamed rats. *J Neurophysiol* **100**:3158-3166.

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

Millan MJ. 2002. Descending control of pain. *Prog Neurobiol* **66**:355-474.

Montell K, Rubin GM. 1989. Molecular characterization of the *Drosophila trp* locus: A putative integral membrane protein required for phototransduction. *Neuron* **2**:1313-1323.

Nelson EK. 1919. The constitution of capsaicin the pungent principle of capsicum. *J Am Chem Soc* **41**:1115-1117.

Newmark HL. 1996. Plant phenolics as potential cancer prevention agents. *Adv Exp Med Biol* **401**:25-34.

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

Nicol GD, Lopshire JC, Pafford CM. 1997. Tumor necrosis factor enhances analgesia in mice by a central action. *Eur J Pharmacol* **149**: 49-54.

Nishijima H, Uchida R, Kawakami N, Shimamura K, Kitamura K. 1998. Role of endothelium and adventitia on eugenol induced relaxation of rabbit ear artery precontracted by histamine. *J Smooth Muscle Res* **34**:123-137.

Obreja O, Shemlitz M, Poole S, Kress M. 2002. Interleukin-6 in combination with its soluble interleukin-6 receptor sensitizes rat skin nociceptors to heat, in vivo. *Pain* **96**: 57-62.

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

Park CK, Kim K, Jung SJ, Kim MJ, Ahn DK, Hong SD, Kim JS, Oh SB. 2009. Molecular mechanism for local anesthetic action of eugenol in the rat trigeminal system. *Pain* **144**:84-94.

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

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

Reddy AC, Lokesh BR. 1994. Studies on anti-inflammatory activity of spice principles and dietary n-3 polyunsaturated fatty acids on carrageenan-induced inflammation in rats. *Ann Nutr Metab* **38**:349-358.

Roayaie K, Crump JG, Sagasti A, Bargmann CI. 1998. The G alpha protein ODR-3 mediates olfactory and nociceptive function and controls cilium morphogenesis in *C. elegans* olfactory neurons. *Neuron* **20**:55–67.

Szallasi A, Blumberg PM. 1999. Vanilloid (Capsaicin) Receptors and Mechanisms. *Pharmacol Rev* **51**:159-212.

Szallasi A, Biro T, Szabo T, Modarres S, Petersen M, Klusch A, Blumberg PM, Krause JE, Sterner O. 1999. A non-pungent triprenyl phenol of fungal origin, scutigeral, stimulates rat dorsal root ganglion neurons via interaction at vanilloid receptors. *Br. J. Pharm* **126**:1351-1358.

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

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

Thresh LT. 1846. Isolation of capsaicin. *Pharm J* **6**:941.

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

Vriens J, Appendino G, Nilius B. 2009. Pharmacology of vanilloid transient receptor potential cation channels. *Mol Pharmacol* **75**:1262-1279.

Wes PD, Chevesich J, Jeromin A, Rosenberg C, Stetten G. 1995. TRPC1, a human homolog of a *Drosophila* store-operated channel. *Proc Natl Acad Sci USA* **92**:9652–9656.

Whittet TD. 1968. Pepperers, spicers and grocers—forerunners of the apothecaries. *Proc Roy Soc Med* **61**:801–806.

Wie MB, Won MH, Lee KH, Shin JH, Lee JC, Suh HW, Song DK, Kim YH. 1997. Eugenol protects neuronal cells from excitotoxic and oxidative injury in primary cortical cultures. *Neurosci Lett* **225**: 93-96.

Yang BH, Piao ZG, Kim YB, Lee CH, Lee JK, Park K, Kim JS, Oh SB. 2003. Activation of Vanilloid Receptor 1 (VR1) by Eugenol. *J Dent Res* **82**:781-785.

Yu L, Yang F, Luo H, Liu FY, Han JS, Xing GG, Wan Y. 2008. The role of TRPV1 in different subtypes of dorsal root ganglion neurons in rat chronic inflammatory nociception induced by complete Freund's adjuvant. *Mol Pain* **4**:61.

ANNEXES

Rats	Neuropathy	Eug 10 inj	Eug 10 2H	Eug 10 4H
10	8,4	11,48	20,37	20,37
11	13,81	11,48	11,48	11,48
12	5,79	5,37	5,37	5,37
13	6,42	8,52	20,37	8,52
14	8,37	5,37	11,48	8,52
15	7,18	8,52	20,37	8,52
means	8,33	8,46	14,91	10,46
Rats	Neuropathy	Eug 50 inj	Eug 50 2h	Eug 50 4H
10	8,4	20,37	20,37	11,48
11	13,81	11,48	20,37	20,37
12	5,79	5,37	5,37	5,37
13	6,42	20,37	20,37	20,37
14	8,37	11,48	8,52	8,52
15	7,18	20,37	20,37	8,52
means	8,33	14,91	15,90	12,44

Table I : Von Frey test values : comparison between neuropathy and low and high doses of eugenol (right paw).

Rats	neuropathy	Eug 10 inj	Eug 10 2H	Eug 10 4H
10	6,48	6,97	9,23	10,05
11	6,56	7,31	7,43	7,43
12	6,57	7,11	8,10	7,84
13	6,13	8,65	6,93	6,56
14	5,35	8,86	8,78	8,24
15	6,20	6,52	9,75	8,28
means	6,22	7,57	8,37	8,07
Rats	neuropathy	Eug 50 inj	Eug 50 2h	Eug 50 4H
10	6,48	8,27	7,64	7,37
11	6,56	6,45	8,35	8,62
12	6,57	5,81	6,12	6,92
13	6,13	7,24	7,34	6,69
14	5,35	6,70	7,38	6,96
15	6,20	8,30	11,51	9,71
means	6,22	7,13	8,06	7,71

Table II : Hargreaves test values : comparison between neuropathy and low and high doses of eugenol (right paw).

Rats	neuropathy	day1	day2	day3	day4	baseline
10	8,4	11,48	20,37	20,37	20,37	16,42
11	13,81	8,52	20,37	20,37	20,37	17,41
12	5,79	5,37	5,37	5,37	8,52	7,47
13	6,42	20,37	5,37	20,37	20,37	14,44
14	8,37	11,48	8,52	8,52	20,37	16,42
15	7,18	11,48	8,52	8,52	11,48	16,42
means	8,33	11,45	11,42	13,92	16,91	14,76

Table III : Von Frey test values : comparison between neuropathy, days post injection and baseline.

Rats	neuropathy	day1	day2	day3	day4	baseline
10	6,48	11,25	8,58	8,59	7,41	9,87
11	6,56	8,52	8,14	7,07	7,68	9,49
12	6,57	10,74	6,01	9,62	9,37	7,84
13	6,13	7,05	5,33	8,43	6,62	9,72
14	5,35	7,21	7,34	6,74	7,73	8,13
15	6,20	7,49	9,06	8,20	6,94	10,28
means	6,22	8,71	7,41	8,11	7,62	9,22

Table IV : Hargreaves test values : comparison between neuropathy, days post injection and baseline.

Rats	Baseline	Eug 10 2h	Eug 50 2h
1	114,84	119	120
2	228,17	300	300
3	93,00	128.67	98
4	90,33	167.67	146.33
5	91,33	102.33	86.33
6	183,00	82.33	113.33
means	133,44	209,5	172,67

Table V : Rotarod values : baseline and values at time of eugenol's maximal effect.

DISCUSSION

La douleur neuropathique se caractérise par le développement d'hyperalgésie et d'allodynie. L'hyperalgésie consiste en une augmentation de la perception du niveau algique suite à une stimulation douloureuse et l'allodynie est une perception douloureuse à la suite d'une stimulation non douloureuse.

L'eugénol avait précédemment montré un effet analgésique vis-à-vis de la douleur neuropathique suite à une administration orale chez le rat (Guénette *et al*, 2006). Cet effet serait dû à une action d'abord agoniste puis antagoniste sur les récepteurs TRPV1 (Transient Receptor Potential Vanilloid 1) (Yang *et al*, 2003 ; Park *et al*, 2009). Les récepteurs TRPV1 sont des récepteurs impliqués dans la transmission de la douleur au niveau de la corne dorsale de la moelle épinière et des terminaisons nerveuses sensorielles. Ils intègrent des stimuli douloureux, chimiques et physiques. Ces récepteurs sont aussi présents à différents niveaux du système nerveux central comme la médulla rostro-ventrale, la substance grise péri-aqueducale, l'hypothalamus, le thalamus, le cortex somatosensoriel, le cortex cingulé antérieur, l'insula (Millan, 1999 ; 2002) entre autres, ces régions étant toutes impliquées dans la transmission de la douleur. Des antagonistes de ce récepteur donnés par voie orale ou par voie intrathécale ont démontré un effet analgésique diminuant l'allodynie et l'hyperalgésie chez le rat (Cui *et al*, 2006). Certaines substances vanilloïdes antagonistes du TRPV1 sensibilisent dans un premier temps les neurones algogènes puis dans un deuxième temps ferment le pore du canal du récepteur vanilloïde entraînant ainsi une désensibilisation du

récepteur et une période réfractaire pendant laquelle il ne peut plus transmettre le message douloureux (Jancso et Jancso, 1949). Un blocage de ces récepteurs provoque ainsi une analgésie, ce que fait notamment l'eugénol. Le projet visait à étudier l'effet analgésique central de l'eugénol sur la douleur neuropathique en l'injectant directement au niveau lombaire, par injection intrathécale entre L6 et L7, sur un modèle de douleur neuropathique chez le rat. Nous voulions savoir quelle était la contribution des récepteurs présents au niveau de la corne dorsale de la moelle épinière dans l'effet analgésique par rapport à un effet à la fois central et périphérique suite à une administration *per os*, précédemment étudié par Guénette *et al* (2006).

Le projet s'est déroulé en deux parties :

- 1) Etude de la distribution de l'eugénol au niveau du système nerveux central du rat suite à une administration *per os*.

- 2) Etude de l'effet central de l'eugénol, injecté en intrathécal, sur la douleur neuropathique.

Pharmacocinétique de l'eugénol dans le SNC

Il était tout d'abord nécessaire de pouvoir estimer la pénétrabilité de l'eugénol au niveau du système nerveux, suite à une administration orale.

Lors de la première partie, de l'eugénol à la dose de 40 mg/kg fut administré à des rats Sprague-Dawley par voie orale. Des prélèvements de sang ont été réalisés sous anesthésie à l'isoflurane, avant le gavage ainsi qu'à 15 min, 30 min, 1h, 2h,

4h, 8h, et 24h après le gavage. A chaque temps, deux autres animaux ont aussi été euthanasiés pour prélèvement du cerveau et de la moelle épinière. Les prises de sang ont été centrifugées immédiatement puis congelées en attendant d'être analysées, de même que les échantillons du système nerveux. Les analyses ont été réalisées par chromatographie liquide en tandem avec la spectrométrie de masse selon la méthode développée par Beaudry *et al* (2005). Les valeurs obtenues ont montré que l'eugénol s'est significativement distribué dans le système nerveux central. Les concentrations observées dans le cerveau et la moelle étaient significativement supérieures aux concentrations plasmatiques. Les concentrations d'eugénol dans le cerveau et la moelle épinière (aire sous la courbe) furent comparées à la concentration d'eugénol dans le sang afin d'établir un ratio. Ce ratio était plus élevé pour la moelle épinière (8,4) que pour le cerveau (3,3) indiquant que l'eugénol se retrouve en plus grande quantité dans la moelle épinière que dans le cerveau. Ce phénomène pourrait s'expliquer éventuellement par une différence de distribution des glycoprotéines P entre le cerveau et la moelle épinière. Ces glycoprotéines, ainsi que d'autres protéines de transport sont présentes dans les cellules endothéliales des capillaires du système nerveux et servent à limiter la pénétrabilité de certaines substances dans le système nerveux en les excréant activement, les empêchant ainsi de franchir la barrière méningo-encéphalique. (Matheny *et al*, 2001). Une telle distribution a déjà été démontrée pour le dextrométorphane (Marier *et al*, 2005). D'autres études seraient nécessaires afin de confirmer cette hypothèse ou de démontrer d'autres mécanismes impliqués dans cette différence de distribution.

Après 24h on constate que la concentration d'eugénol, qui avait diminué progressivement au cours du temps, remonte quelque peu, et ce, surtout dans la

moelle épinière. Ceci suggère une redistribution de l'eugénol, menant ainsi à un probable effet rémanent. Ce phénomène est compréhensible par le fait que l'eugénol est un composé très lipophile qui a tendance à être stocké dans les graisses avant d'être à nouveau relâché progressivement dans les tissus.

Pharmacodynamie de l'eugénol dans un modèle de douleur neuropathique.

Dans la deuxième partie du projet nous avons induit une douleur neuropathique à des rats Sprague-Dawley suivant le modèle de ligature du nerf sciatique (Bennett et Xie, 1988) avant de leur injecter l'eugénol en intrathécal. Le modèle consiste en la pose chirurgicale de quatre ligatures lâches autour du nerf sciatique de la patte droite de l'animal. Avant la chirurgie les animaux ont été testés à l'aide des fils de Von Frey, qui mesurent l'allodynie tactile, ainsi qu'avec l'appareil de Hargreaves, qui mesure l'hyperalgésie thermique.

Les fils de Von Frey, de différents calibres, sont appliqués un-à-un sous les deux pattes postérieures du rat. Lorsque l'animal réagit en retirant sa patte le calibre du fil est noté. Plus le calibre du fil est fin lorsque l'animal réagit, plus le rat a développé de l'allodynie. Dans le test de Hargreaves, les animaux sont placés dans des boîtes en plexiglas individuelles et une lumière chauffante de 40W est appliquée à nouveau sous leurs pattes postérieures. Le temps que l'animal met à retirer sa patte de la source de chaleur est enregistré. Plus ce temps est court, plus l'animal a développé de l'hyperalgésie.

Après 5 jours de récupération post-chirurgicale les animaux ont été re-testés de la même façon afin de constater ou non le développement de la douleur neuropathique. Tous nos animaux se sont remis correctement de la chirurgie et ont

développé à la fois de l'hyperalgésie et de l'allodynie au niveau de leur patte droite, c'est-à-dire que leurs moyennes des essais dans les deux tests étaient inférieures à celle de la ligne de base établie avant la chirurgie. Les pattes gauches, non lésées, ont eu des valeurs identiques à celles de la ligne de base.

Précautions prises

Avant de commencer les injections d'eugénol, nous avons voulu nous assurer que l'isoflurane, gaz avec lequel les animaux allaient être anesthésiés, n'avait pas d'effet sur les deux tests. Nous avons donc anesthésié les animaux pendant environ une minute, temps que prendrait l'anesthésie lors de l'injection d'eugénol, puis nous les avons testés sur les deux appareils après cinq minutes de récupération.

Les valeurs obtenues après cette courte anesthésie sont restées identiques aux valeurs établies pour la neuropathie, suggérant que l'isoflurane n'a eu aucun effet sur le comportement des animaux et que l'intensité de leur douleur neuropathique est restée la même .

Nous avons également voulu nous assurer de l'innocuité du cyclodextrine, excipient de la préparation d'eugénol, en l'injectant, seul, aux animaux et en regardant leur comportement sur les deux tests. Nous l'avons injecté, en intrathécal, sous anesthésie gazeuse, entre L6 et L7, à une concentration de 2% puis nous avons testé les animaux 15 minutes, 2h et 4h après l'injection. L'injection n'a également eu aucun effet sur le comportement des animaux dans les deux tests et les valeurs sont restées identiques à celles établies pour la neuropathie.

Atténuation de la douleur par l'eugénol

Nous avons ensuite injecté l'eugénol, de la même façon, en intrathécal, entre L6 et L7 d'abord à la dose de 10 μ g dans 20 μ L (soit 0,5 μ g/ μ L), ensuite à la dose de 50 μ g dans 20 μ L (soit 2.5 μ g/ μ L) dans une solution de cyclodextrine 2%. Les deux doses ont été injectées aux mêmes animaux, à deux jours d'intervalle et les animaux ont été testés 15min, 2h et 4h après chaque injection.

Dans notre étude, l'eugénol a réduit significativement l'hyperalgésie développée par les animaux neuropathiques et ce aussi bien à la faible dose qu'à la forte dose. De plus l'eugénol a également diminué l'allodynie, également aux deux doses, ce qui est cohérent avec d'autres études montrant qu'un antagoniste du TRPV1 diminuait l'allodynie (Cui *et al*, 2006 ; Culshaw *et al*, 2006 ; Beaudry *et al*, 2009). L'eugénol aurait donc un effet sur la sensibilité mécanique, induisant la désensibilisation des récepteurs.

Des récepteurs TRPV1 ont été mis en évidence au niveau de la corne dorsale de la moelle épinière ainsi que dans différentes parties du cerveau (Szallasi *et al*, 1994; Millan, 1999; 2002). Le fait que l'eugénol injecté en intrathécal a induit de l'analgésie montre la contribution centrale de l'eugénol dans l'atténuation de la douleur.

Pour être sûrs que la diminution de la douleur montrée par les animaux était bien due à de l'analgésie et non à un éventuel effet sédatif de l'eugénol -qui, à plus fortes doses est reconnu pour avoir également des propriétés anesthésiques (Guénette *et al*, 2006)- nous avons testé un autre groupe d'animaux, sans lésions, sur l'appareillage rotarod. Ceci a été réalisé afin d'évaluer la coordination motrice des animaux suite à l'administration intrathécale d'eugénol. Cet appareil se

compose d'une roue sur laquelle marche le rat et qui tourne de plus en plus vite. Lorsque la vitesse devient trop rapide pour le rat, celui-ci se laisse tomber en bas de la roue. Lorsqu'un animal présente de l'incoordination motrice, comme dans le cas d'une sédation par exemple, celui-ci tient moins longtemps sur la roue et se laisse tomber plus rapidement. Nous avons testés six animaux avant et après les mêmes injections de cyclodextrine et d'eugénol pour voir si la coordination motrice était diminuée mais les résultats avant et après les injections se sont révélés similaires. Ce résultat nous confirme que l'atténuation de la douleur après les injections intrathécales d'eugénol étaient bien due à de l'analgésie entraînée par la désensibilisation des récepteurs TRPV1 plutôt qu'à un ralentissement de la coordination motrice des animaux qui aurait pu être dû à un éventuel effet sédatif de l'eugénol.

Effets à long terme de l'eugénol

Afin d'évaluer la durée de l'effet de l'eugénol, nous avons continué de tester les animaux pendant quatre jours après la dernière injection d'eugénol. Nous avons constaté que l'atténuation de la douleur sur la patte lésée était encore présente même 4 jours après la dernière injection, ce qui suggère un effet analgésique rémanent de l'eugénol. Cet effet est en accord avec nos données de biodistribution qui montrent qu'après 24h le taux d'eugénol remonte légèrement dans le sang et le cerveau mais surtout dans la moelle épinière, nous incitant à envisager une accumulation du composé dans le système nerveux et une redistribution aux tissus par la suite. L'eugénol bloquerait donc les récepteurs TRPV1 à long terme

provoquant une analgésie durable, ce qui fait de lui un composé au potentiel thérapeutique intéressant.

Des études ont montré qu'un des facteurs déterminants dans le développement et l'intensité de la douleur neuropathique serait la tendance individuelle à produire des cytokines pro-inflammatoires après une lésion nerveuse (Rutkowski *et al*, 1999). Lors de douleur neuropathique on voit apparaître par exemple de l'IL1 dans les cellules de Schwann (Wagner et Myers, 1996). Après induction du modèle CCI, du TNF (George *et al*, 1999) et de l'IL1 β augmentent dans le nerf sciatique lésé. L'IL1 β augmente aussi dans le nerf controlatéral (Kleinschnitz *et al*, 2005) et ce phénomène semble être lié aux récepteurs NMDA. On retrouve une infiltration de lymphocytes T lors de CCI et ce sont les lymphocytes T helper 1 qui produisent les cytokines pro-inflammatoires (Moalem *et al*, 2004). En règle générale, les cytokines pro-inflammatoires augmentent l'activité neuronale et sensibilisent les neurones. On sait aussi qu'une des voies de la sensibilisation neuronale induite par les cytokines impliquerait le TRPV1 (Obreja *et al*, 2002). Quand le niveau de TNF augmente, la proportion de neurones exprimant le TRPV1 via le récepteur à TNF, le TNFR1, augmente également (Hensellek *et al*, 2007). Des bloqueurs de TNF, comme l'etanercept, ont démontré un effet de diminution de l'hyperalgésie dans la douleur neuropathique (Sommer *et al*, 2001). Un composé phénolé proche de l'eugénol, le trans-resvératrol, a inhibé la production de TNF α , d'IL-1 β et d'IL6 *ex vivo* (Marier *et al*, 2005). De plus, l'eugénol a déjà prouvé une action anti-inflammatoire en bloquant la synthèse de thromboxane (Reddy et Lokesh, 1994), donc il se pourrait qu'il ait aussi une action sur les cytokines. De plus, comme

certains mécanismes du TRPV1 semblent reliés à des cytokines, l'eugénol pourrait peut-être exercer un mécanisme conjoint de blocage du récepteur et de certaines cytokines. Cela contribuerait à expliquer son effet rémanent. Il serait donc intéressant de réaliser des études afin de confirmer cette hypothèse.

Histologie

Nous avons également procédé au prélèvement des moelles épinières lombaires des animaux afin de réaliser des coupes histologiques pour déceler une éventuelle toxicité neuronale provoquée par l'eugénol car l'analgésie aurait pu aussi être due purement et simplement à une mort neuronale. En effet, la capsaïcine par exemple, autre vanilloïde, provoque une entrée massive de calcium à l'intérieur du neurone provoquant ainsi une mort cellulaire, alors que l'eugénol n'aurait pas cet effet. Pour le vérifier nous avons utilisé la coloration hématoxyline éosine et la technique immunohistochimique du GFAP. Aucune dégénérescence neuronale n'a été repérée sur aucune des lames au niveau des couches superficielles de la moelle épinière, lieu d'une plus grande concentration en récepteurs TRPV1 (Szallasi *et al*, 1994). Avec le GFAP deux animaux ont montré une légère réaction astrocytaire supérieure aux autres mais insuffisante pour être significative. L'eugénol serait donc un composé analgésique sécuritaire par rapport à la capsaïcine qui engendre une toxicité neuronale.

CONCLUSION GÉNÉRALE

Ce projet aura montré les capacités de l'eugénol, composé naturel issu du clou de girofle, à induire une analgésie durable sur la douleur neuropathique. L'eugénol aurait un effet central au niveau des récepteurs TRPV1 de la corne dorsale de la moelle épinière et du cerveau non seulement par son action lors d'injection intrathécale mais également par sa bonne distribution dans le système nerveux. L'effet pourrait également être dû à la modulation sur le système immunitaire. Des études précédentes avaient montré une action analgésique de l'eugénol sur la douleur neuropathique suite à une administration orale (Guénette *et al*, 2006), ce qui suggérerait un effet peut être à la fois périphérique et central. L'effet central étant désormais établi par notre étude, il resterait maintenant à se pencher sur l'effet périphérique en administrant l'eugénol dans la région du nerf lésé.

L'absence de toxicité au niveau neuronal et l'effet rémanent de l'eugénol font de ce composé un très bon candidat pour l'élaboration de traitements alternatifs pour la douleur neuropathique. Des expériences à plus long terme seraient souhaitables afin de déterminer plus précisément sa durée d'action. Quoiqu'il en soit, à la lumière des connaissances d'aujourd'hui, et dans le but d'élaborer de nouveaux traitements pour soigner la douleur neuropathique, moins coûteux et aux effets secondaires moindres, le clou de girofle mérite vraiment toute notre attention.

BIBLIOGRAPHIE

Aanonsen LM, Wilcox GL. 1987. Nociceptive action of excitatory amino acids in the mouse: Effects of spinally administered opioids, phencyclidine and sigma agonists. *J Pharmacol Exp Ther* **243**:9–19.

Aanonsen LM, Lei S, Wilcox GL. 1990. Excitatory amino acid receptors and nociceptive neurotransmission in rat spinal cord. *Pain* **41**:309–321.

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

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

Akopian AN, Sivilotti L, Wood JN. 1996. A tetrodotoxin-resistant voltage-gated sodium channel expressed by sensory neurons. *Nature* **379**:257-262.

Alajouanine T. 1957. La douleur et les douleurs. Paris : Masson.

Amaya F, Wang H, Costigan M, Allchorne AJ, Hatcher JP, Egerton J, Stean T, Morisset V, Grose D, Gunthorpe MJ, Chessell IP, Tate S, Green PJ, Woolf CJ.

2006. The voltage-gated sodium channel Nav1.9 is an effector of peripheral inflammatory pain hypersensitivity. *J Neurosci* **26**:12852-12860.

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

Beattie EC, Stellwagen D, Morishita W, Bresnahan JC, Ha BK, Von Zastrow M, Beattie MS, Malenka RC. 2002. Control of synaptic strength by glial TNF α . *Science* **295**:2282-2285.

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

Beaudry F, Ross A, Lema PP, Vachon P. 2009. Pharmacokinetics of vanillin and its effects on mechanical hypersensitivity in a rat model of neuropathic pain. *Phytother Res*. Accepted for publication.

Beaulieu P. 2005. *Pharmacologie de la douleur*. Montréal, QC, CAN. Les Presses de l' Université de Montréal.

Ben-Eliyahu S, Yirmiya R, Liebeskind JC, Taylor AN, Gale RP. 1991. Stress increases metastatic spread of a mammary tumor in rats: Evidence for mediation by the immune system. *Brain Behav Immun* **5**:193-205.

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

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

Bernstein JE, Bickers DR, Dahl MV, Roshal JY. 1987. Treatment of chronic postherpetic neuralgia with topical capsaicin. *J Am Acad Dermatol* **17**:93-96.

Besson JM, Guilbaud G, Abdelmoumene M, Chaouch A. 1982. Physiology of nociception *J Physiol* **78**:7-107.

Besson JM, Chaouch A. 1987. Peripheral and spinal mechanisms of nociception. *Physiol Rev* **67**:67-186.

Besson JM. 1999. The neurobiology of pain. *Lancet* **353**:1610-1615.

Bevan S, Docherty RJ. 1993. Cellular mechanisms of the action of capsaicin. In *Capsaicin in the Study of Pain*, Wood JN (ed). Academic Press, San Diego, CA; 27-44.

Bíró T, Maurer M, Modarres S, Lewin NE, Brodie C, Ács G, Ács P, Paus R, Blumberg PM. 1998a. Characterization of functional vanilloid receptors expressed by mast cells. *Blood* **91**:1332–1340.

Bíró T, Brodie C, Modarres S, Lewin NE, Ács P, Blumberg PM. 1998b. Specific vanilloid responses in C6 rat glioma cells. *Mol Brain Res* **56**:89–98.

Bliss TV, Lomo T. 1973. Long-lasting potentiation of synaptic transmission in the dentate area of the anaesthetized rabbit following stimulation of the perforant path. *J Physiol* **232**:331-356.

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

Brand L, Berman E, Schwen R, Loomans M, Janusz J, Bohne R, Maddin C, Gardner J, LaHann T, Farmer R, Jones L, Chiabrando C, Fanelli R. 1987. NE-19550: A novel, orally active antiinflammatory analgesic. *Drugs Expl Clin Res* **13**:259–265.

Bucci FA, Gabriels CF, Krohel GB. 1988. Successful treatment of postherpetic neuralgia with capsaicin. *Am J Ophthalmol* **106**:758–759.

Burgess SE, Gardell LR, Ossipov MH, Malan TP Jr, Vanderah TW, Lai J, Porreca F. 2002 .Time-dependent desending facilitation from the rostral ventromedial medulla maintains, but not initiate, neuropathic pain. *J Neurosci* **22**:5129-5136.

Cahusac PMB, Evans RH, Hill RG, Rodriquez R E, Smith DAS. 1984. The behavioural effects of an *N*-methylasspartate receptor antagonist following application to the lumbar spinalcord of conscious rats. *Neuropharmacology* **23**:719–724.

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

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

Chami N, Chami F, Bennis S, Trouillas J, Remmal A. 2004. Antifungal treatment with carvacrol and eugenol of oral candidiasis in immunosuppressed rats. *Braz J Infect Dis* **8**:217-226.

Chen F, Shi Z, Neoh KG, Kang ET. 2009. Antioxidant and antibacterial activities of eugenol and carvacrol-grafted chitosan nanoparticles. *Biotechnol Bioeng* **104**:30-39.

Cho JS, Kim TH, Lim JM, Song JH. 2008. Effects of eugenol on Na⁺ currents in rat dorsal root ganglion neurons. *Brain Res* **1243**:53-62.

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

Cooper JR, Bloom FE, Roth RH. 1996. *The Biochemical Basis of Neuropharmacology*, (7th edn). Oxford University Press, New York, Oxford.

Cruz F. 1998. Desensitization of bladder sensory fibers by intravesical capsaicin or capsaicin analogs. A new strategy for treatment of urge incontinence in patients with spinal detrusor hyperreflexia or bladder hypersensitivity disorders. *Int Urogynecol J* **9**:214–229.

Cui M, Honore P, Zhong C, Gauvin D, Mikusa J, Hernandez G, Chandran P, Gomtsyan A, Brown B, Bayburt EK, Marsh K, Bianchi B, McDonald H, Niforatos W, Neelands TR, Moreland RB, Decker MW, Lee CH, Sullivan JP, Faltynek CR. 2006. TRPV1 receptors in the CNS play a key role in broad-spectrum analgesia of TRPV1 antagonists. *J Neurosci* **26**:9385-9393.

Culshaw AJ, Bevan S, Christiansen M, Copp P, Davis A, Davis C, Dyson A, Dziadulewicz EK, Edwards L, Eggelte H, Fox A, Gentry C, Groarke A, Hallett A, Hart TW, Hughes GA, Knights S, Kotsonis P, Lee W, Lyothier I, McBryde A, McIntyre P, Paloumbis G, Panesar M, Patel S, Seiler MP, Yaqoob M, Zimmermann K. 2006. Identification and biological characterization of 6-aryl-7-isopropylquinazolinones as novel TRPV1 antagonists that are effective in models of chronic pain. *J Med Chem* **49**:471-474.

Cummins TR, Sheets PL, Waxman SG. 2007. The roles of sodium channels in nociception: implications for mechanisms of pain. *Pain* **131**:243-257.

D'Amour FE, Smith DL. 1941. A method for determining loss of pain sensation. *J Pharmacol Exp Ther* **72**:74-79.

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

Davies B, Morris T. 1993. Physiological parameters in laboratory animals and humans. *Pharm Res* **10**: 1093–1095.

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

De Groat WD. 1997. A neurologic basis for the overactive bladder. *Urology* **50**(Suppl6A):36–52.

Dickenson AH, Sullivan AF. 1987. Evidence for a role of the NMDA receptor in the frequency dependent potentiation of deep rat dorsal horn nociceptive neurones following C-fibre stimulation. *Neuropharmacology* **26**:1235–1238.

Donnerer J, Schuligoi R, Stein C, Amann R. 1993. Upregulation, release and axonal transport of substance P and calcitonin gene-related peptide in adjuvant inflammation and regulatory function of nerve growth factor. *Regul Pept* **46**:150-154.

Dougherty PM, Willis WD, Lenz FA. 1998. Transient inhibition of responses to thermal stimuli of spinal sensory tract neurons in monkeys during sensitization by intradermal capsaicin. *Pain* **77**:129-136.

Dray A, Bettaney J, Reuff C, Walpole CSJ, Wrigglesworth R. 1990. NE-19550 and NE-21610, antinociceptive capsaicin analogues: Studies on nociceptive fibers of the neonatal rat tail *in vitro*. *Eur J Pharmacol* **181**:289–293.

Dray A, Urban L. 1996. New pharmacological strategies for pain relief. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **36**:253–280.

Dubuisson D, Dennis SG. 1977. The formalin test: a quantitative study of the analgesic effects of morphine, meperidine, and brain stem stimulation in rats and cats. *Pain* **4**:161-174.

Egbert AM, Parks LH, Short LM, Burnett ML. 1990. Randomized trial of postoperative patient-controlled analgesia vs intramuscular narcotics in frail elderly men. *Arch Intern Med* **150**:1897-1903.

Endo T, Ogishima K, Tanaka H, Ohshima S. 1972. Studies on the anesthetic effects of eugenol in some fresh water fishes. *Bulletin of Japanese Society of Science Fisheries* **38**:761-767. (in Japanese with abstract in English).

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

Fields HL. 1987. *Pain*. New York, Mc Graw-Hill Book company.

Furness JB, Papka RE, Della NG, Costa M, Eskay RL. 1982. Substance P-like immunoreactivity in nerves associated with the vascular system of guinea-pigs. *Neuroscience* **7**:447-459.

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

Gamse R, Saria A. 1986. Nociceptive behaviour after intrathecal injections of substance P, neurokinin A and calcitonin gene-related peptide in mice. *Neurosci Lett* **70**:143-147.

García-Martínez C, Humet M, Planells-Cases R, Gomis A, Caprini M, Viana F, De La Pena E, Sanchez-Baeza F, Carbonell T, De Felipe C, Pérez-Paya E, Belmonte C, Messeguer A, Ferrer-Montiel A. 2002. Attenuation of thermal nociception and hyperalgesia by VR1 blockers. *Proc Natl Acad Sci USA* **99**:2374-2379.

Garibaldi JA, Greenlaw J, Choi J, Fotovatjah M. 1995. Treatment of post-operative pain. *CDA Journal* **23**:71-72.

Gauvin-Piquard A, Pichard-Leandri E. 1988. Expression de la douleur chez l'enfant. Dans *Pratique du traitement de la douleur*, François Boureau (ed). Paris, Doin; 113-122.

George A, Schmidt C, Weishaupt A, Toyka KV, Sommer C. 1999. Serial determination of tumor necrosis factor-alpha content in rat sciatic nerve after chronic constriction injury. *Exp Neurol* **160**:124-132.

Geppetti P, Holzer P. 1996. *Neurogenic Inflammation*. CRC Press, Boca Raton, FL.

Gerber G, Randic M. 1989. Excitatory amino acid-mediated components of synaptically evoked input from dorsal roots to deep dorsal horn neurons in the rat spinal cord slice. *Neurosci Lett* **106**:211–219.

Goldberg MP, Choi DW. 1993. Combined oxygen and glucose deprivation in cortical cell culture: calcium-dependent and calcium independent mechanisms of neuronal injury. *J Neurosci* **13**:3510-3524.

Guénette SA, Beaudry F, Marier JF, Vachon P. 2006. Pharmacokinetics and anesthetic activity of eugenol in male Sprague-Dawley rats. *J Vet Pharmacol Ther* **29**:265-270.

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

Guénette SA, Hélie P, Beaudry F, Vachon P. 2007a. Eugénol for anesthesia of African clawed frogs (*Xenopus laevis*). *Vet Anaesth Analg* **34** :164-170.

Guénette SA, Uhlund FC, Hélie P, Beaudry F, Vachon P. 2007b. Pharmacokinetics of Eugenol in Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture* **266**: 262-265.

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

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

Halassa MM, Fellin T, Hatdon PG. 2007. The tripartite synapse: roles for gliotransmission in health and disease. *Trends Mol Med* **13**:54-63.

Handwerker HO. 1996. Sixty years of C-Fibers recordings from animal and human skin nerves: historical notes. *Prog Brain Res* **113**:39-51.

Hao JX, Blakeman KH, Yu W, Hultenby K, Xu XJ, Wiesenfeld-Hallin Z. 2000. Development of a mouse model of neuropathic pain following photochemically induced ischemia in the sciatic nerve. *Exp Neurol* **163**:231-238.

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

Hartley DM, Kurth MC, Bjerkness L, Weiss JH, Choi DW. 1993. Glutamate receptor-induced Ca^{2+} accumulation in cortical cell culture correlates with subsequent neuronal degeneration. *J Neurosci* **13**:1993-2000.

Harvey JN. 2008. Update on treatment for neuropathic pain. *J Pain Palliat Care Pharmacother* **22**:54-57.

He M, Du M, Fan M, Bian Z. 2007. In vitro activity of eugenol against *Candida albicans* biofilms. *Mycopathologia* **163**:137-143.

Helliwell RJ, McLatchie LM, Clarke M, Winter J, Bevan S, Mc Intyre P. 1998. Capsaicin sensitivity is associated with the expression of the vanilloid (capsaicin) receptor (VR1) mRNA in adult rat sensory ganglia. *Neurosci Lett* **250**:177-180.

Hensellek S, Brell P, Schaible HG, Bräuer R, Segond von Banchet G. 2007. The cytokine TNF α increases the proportion of DRG neurones expressing the TRPV1 receptor via the TNFR1 receptor and ERK activation. *Mol Cell Neurosci* **36**:381-391.

Heritz DM, Blavais JG. 1996. Evaluation of urinary tract dysfunction. In *Female Urology*, Raz SW (ed). W.B. Saunders, Philadelphia; 89-96.

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

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

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

Hutchinson MR, Zhang Y, Brown K, Coats BD, Shridhar M, Sholar PW, Patel SJ, Crysdale NY, Harrison JA, Maier SF, Rice KC, Watkins LR. 2008. Non-stereoselective reversal of neuropathic pain by naloxone and naltrexone : involvement of toll-like receptor 4 (TLR4). *Eur J Neurosci* **28**:20-29.

Hylden JL, Wilcox GL. 1981. Intrathecal substance P elicits a caudally-directed biting and scratching behaviour in mice. *Brain Res* **217**:212-215.

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

Jadhav BK, Khandelwal KR, Ketkar AR, Pisal SS. 2004. Formulation and Evaluation of Mucoadhesive Tablets Containing Eugenol for the Treatment of Periodontal Disease. *Drug Dev Ind Pharm* **30**:195-203.

Jancsó N, Jancsó A. 1949. Desensitization of sensory nerve endings (in Hungarian). *Ki'se'rletes Orvostudomány* **2**(Suppl):15.

Jancsó-Gábor A, Szolcsányi J, Jancsó N. 1970. Stimulation and desensitization of the hypothalamic heat sensitive structures by capsaicin in rats. *J Physiol-London* **208**:449-459.

Kandel ER, Schwartz JH, Jessel TM. 2000. *Principle of Neural Science*. Elsevier/North-Holland, New York.

Keller SE, Weiss JM, Schleifer SJ, Miller NE, Stein M. 1981. Suppression of immunity by stress: Effect of a graded series of stressors on lymphocyte stimulation in the rat. *Science* **213**:1397-1400.

Kerr FWL. 1979. Craniofacial neuralgias. *Adv Pain Res Ther* **4**:283-295.

Kim D, Kim MA, Cho IH, Kim MS, Lee S, Jo EK, Choi SY, Park K, Kim JS, Akira S, Na HS, Oh SB, Lee SJ. 2007. A critical role of toll-like receptor 2 in nerve injury-induced spinal cord glial cell activation and pain hypersensitivity. *J Biol Chem* **282**:14975-14983.

Kim SH, Chung JM. 1992. An experimental model for peripheral neuropathy produced by segmental spinal nerve ligation in the rat. *Pain* **50**:355-363.

Kleinschnitz C, Brinkhoff J, Sommer C, Stoll G. 2005. Contralateral cytokine gene induction after peripheral nerve lesions: dependence on the mode of injury and NMDA receptor signaling. *Brain Res Mol Brain Res* **136**:23-28.

Kohn FD, Clifford CB. 2002. Biology and Disease of Rats. In *Laboratory Animal Medicine, (2nd Edn)*, Fox JG, Anderson LC, Franklin ML, Quimby FW (eds). Elsevier Science (USA), New York.

Kozam G. 1977. The effect of eugenol on nerve transmission. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* **44**:799-805.

Kruger L, Sampogna SL, Rodin BE, Clague J, Brecha N, Yeh Y. 1985. Thin-fiber cutaneous innervation and its intraepidermal contribution studied by labelling methods and neurotoxin treatment in rats. *Somatosensory Res* **2**:335-356.

Laekeman SM, Hoof VL, Haemers A, Berghe VAD, Herman AG, Vlietink AK. 1990. Eugenol, a valuable compound for in-vitro experimental research and worthwhile for further in-vivo investigation. *Phytother Res* **4**:90-96.

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

Lai JP, Douglas SD, Ho WZ. 1998. Human lymphocytes express substance P and its receptor. *J Neuroimmunol* **86**:80–86.

Laudenslager ML, Ryan SM, Drugan RC, Hyson RL, Maier SF. 1983. Coping and immunosuppression: inescapable but not escapable shock suppresses lymphocyte proliferation. *Science* **221**:568-70.

Lawand NB, Willis WD, Westlund KN. 1997. Excitatory amino acid receptor involvement in peripheral nociceptive transmission in rats. *Eur J Pharmacol* **324**:169-177.

Le Bars D, Dickenson AH, Besson JM. 1979a. Diffuse noxious inhibitory controls (DNIC). I. Effects on dorsal horn convergent neurones in the rat. *Pain* **6**:283-304.

Le Bars D, Dickenson AH, Besson JM. 1979b. Diffuse noxious inhibitory controls (DNIC). II. Lack of effect on non-convergent neurones, supraspinal involvement and theoretical implications. *Pain* **6**:305-327.

Lebeau P, Courtois G. 1929. *Traité de pharmacie chimique – Tome II*. Masson et Cie.

Lee BH, Won R, Baik EJ, Lee SH, Moon CH. 2000. An animal model of neuropathic pain employing injury to the sciatic nerve branches. *NeuroReport* **11**:657–661.

Lee MH, Yeon KY, Park CK, Li HY, Fang Z, Kim MS, Choi SY, Lee SJ, Lee S, Park K, Lee JH, Kim JS, Oh SB. 2005. Eugenol inhibits calcium currents in dental afferent neurons. *J Dent Res* **84**:848-851.

Lembeck F. 1983. Sir Thoma Lewis's nocifensor system, histamine and substance-P-containing primary afferent nerves. *TINS* **6**:106-108.

Liu XG, Sandkühler J. 1995. Long-term potentiation of C-fibers-evoked potentials in the rat spinal dorsal horn is prevented by spinal *N*-methyl-D-aspartic acid receptor blockage. *Neurosci Lett* **191**:43-46.

Liu X, Sandkühler J. 1997. Characterisation of long-term potentiation of C-fibers-evoked potentials in spinal dorsal horn of adult rat: essential role of NK1 and NK2 receptors. *J Neurophysiol* **78**:1973-1982.

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

Liu L, Lo YC, Chen IJ, Simon SA. 1997. The responses of rat trigeminal ganglion neurons to capsaicin and two nonpungent vanilloid receptor agonists, olvanil and glyceryl nonamide. *J Neurosci* **17**:4101–4111.

Lundberg JM. 1996. Pharmacology of cotransmission in the autonomic nervous system: Integrative aspects on amines, neuropeptides, adenosine triphosphate, amino acids, and nitric oxide. *Pharmacol Rev* **48**:113–177.

Maderspach K, Fajszki CS. 1982. B-Adrenergic receptors of brain cells. Membrane integrity implies apparent positive cooperativity and higher affinity. *Biochim Biophys Acta* **692**:469–478.

Malmberg AB, Yaksh TL. 1994. Capsaicin-evoked prostaglandin E2 release in spinal cord slices: relative effect of cyclooxygenase inhibitors. *Eur J Pharmacol* **271**:293-299.

Mantyh PW, Rogers SD, Honore P, Allen BJ, Ghilardi JR, Li J, Daughters RS, Lappi DA, Wiley RG, Simone DA. 1997. Inhibition of hyperalgesia by ablation of lamina I spinal neurons expressing the substance P receptor. *Science* **27**:275-279.

Marchand S. 1998. *Le phénomène de la douleur*. Chenelière/McGraw-Hill et Masson eds, Montréal et Paris.

Marchand S. 2005. Neurophysiologie de la douleur. In *Pharmacologie de la douleur*, Beaulieu P (ed). Les Presses de l'Université de Montréal, Québec, Canada.

Marier JF, Deschênes JL, Hage A, Seliniotakis E, Gritsas A, Flarakos T, Beaudry F, Vachon P. 2005a. Enhancing the uptake of dextromethorphan in the CNS of rats by concomitant administration of the P-gp inhibitor verapamil. *Life Sci* **77**:2911-2926.

Marier JF, Chen K, Prince P, Scott G, del Castillo JR, Vachon P. 2005b. Production of ex vivo lipopolysaccharide-induced tumor necrosis factor-alpha, interleukin-1beta, and interleukin-6 is suppressed by trans-resveratrol in a concentration-dependent manner. *Can J Vet Res* **69**:151-154.

Marsh SH, Stansfeld CE, Brown DA, Davey R, McCarthy D. 1987. The mechanism of action of capsaicin on sensory C-type neurons and their axons *in vitro*. *Neurosci* **23**:275-290.

Matheny CJ, Lamb MW, Brouwer KR, Pollack GM. 2001. Pharmacokinetic and pharmacodynamic implications of P glycoprotein modulation. *Pharmacotherapy* **21**:778-796.

Mayer ML, Westbrook GL. 1987. Permeation and block of N-methyl-D-aspartic acid receptor channels by divalent cations in mouse cultured central neurons. *J Physiol-London* **394**:501-527.

McGrath PA. 1990. *Pain in children*. New York, Guilford.

McMahon SB, Bennett DLH. 1997. Growth factors and pain. In *The Pharmacology of Pain*, Dickenson A, Besson JM (eds). Berlin: Springer Verlag; 135-165.

Melzack R, Wall PD. 1965. Pain mechanisms: a new theory. *Science* **150**:971-979.

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

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

Millan M. 2002. Descending control of pain. *Prog Neurobiol* **66**:354-474.

Miller MS, Buck SH, Sipes IG, Yamamura HI, Burks TF. 1982. Regulation of substance P by nerve growth factor: Disruption by capsaicin. *Brain Res* **250**:193-196.

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

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

Mogil JS, Wilson SG, Bon K, Lee SE, Chung K, Raber P, Pieper JO, Hain HS, Belknap JK, Hubert L, Elmer GI, Chung JM, Devor M. 1999. Heritability of nociception I: responses of 11 inbred mouse strain on 12 measures of nociception. *Pain* **80**:67-82.

Montell K, Rubin GM. 1989. Molecular characterization of the *Drosophila trp* locus: A putative integral membrane protein required for phototransduction. *Neuron* **2**:1313-1323.

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

Näsström J, Karlsson U, Post C. 1992. Antinociceptive actions of different classes of excitatory amino acid receptor antagonists in mice. *Eur J Pharmacol* **212**:21-29.

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

Newmark HL. 1996. Plant phenolics as potential cancer prevention agents. *Adv Exp Med Biol* **401**:25-34.

Nguyen MD, Julien JP, Rivest S. 2002. Innate immunity: the missing link in neuroprotection and neurodegeneration. *Nature Rev Neurosci* **3**:216-227.

Nicholls DG. 1994. Amino acids as neurotransmitters. In *Proteins, Transmitters and Synapses*. Blackwell Scientific Publications, Oxford; 155-185.

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

Nishijima H, Uchida R, Kawakami N, Shimamura K, Kitamura K. 1998. Role of endothelium and adventitia on eugenol induced relaxation of rabbit ear artery precontracted by histamine. *J Smooth Muscle Res* **34**:123-137.

NTP. 2000. Toxicology and Carcinogenesis Studies of Methyleugenol (CAS No. 93-15-2) in F344/N Rats and B6C3F1 Mice (Gavage Studies). Technical Report 491. Research Triangle Park, NC:National Toxicology Program, National Institute of Environmental Health Sciences.

Obata K, Katsura H, Miyoshi K, Kondo T, Yamanaka H, Kobayashi K, Dai Y, Fukuoka T, Akira S, Noguchi K. 2008. Toll-like receptor 3 contributes to spinal

glial activation and tactile allodynia after nerve injury. *J Neurochem* **105**:2249-2259.

Obreja O, Schmelz M, Poole S, Kress M. 2002. Interleukin-6 in combination with its soluble IL-6 receptor sensitises rat skin nociceptors to heat, in vivo. *Pain* **96**:57-62.

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

Ohkubo T, Kitamura K. 1997. Eugenol activates Ca²⁺-permeable currents in rat dorsal root ganglion cells. *J Dent Res* **76**:1737-1744.

Ossipov MH, Lai J, Malan TP Jr, Porreca F. 2000. Spinal and supraspinal mechanisms of neuropathic pain. *Ann NY Acad Sci* **909**:12-24.

Otsuka M, Konishi S, Yanagisawa M, Tsunoo A, Takagi H. 1982. Role of substance P as a sensory transmitter in spinal cord and sympathetic ganglia. *Ciba Found Symp* **91**:13-34.

Park CK, Li HY, Yeon KY, Jung SJ, Choi SY, Lee SJ, Lee S, Park K, Kim JS, Oh SB. 2006. Eugenol inhibits sodium currents in dental afferent neurons. *J Dent Res* **85**:900-904.

Park CK, Kim K, Jung SJ, Kim MJ, Ahn DK, Hong SD, Kim JS, Oh SB. 2009. Molecular mechanism for local anesthetic action of eugenol in the rat trigeminal system. *Pain* **144**:84-94

Parker I, Gundersen CB, Miledi R. 1986. Actions of pentobarbital on rat brain receptors expressed in *Xenopus* oocytes. *J Neurosci* **6**:2290-2297.

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

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

Pocock JM, Kettenmann H. 2007. Neurotransmitters receptors on microglia. *Trends Neurosci* **30**:527-535.

Porreca F, Burgess SE, Gardell LR, Vanderah TW, Malan TP Jr, Ossipov MH, Lappi DA, Lai J. 2001. Inhibition of neuropathic pain by selective ablation of brainstem medullary cells expressing the mu-opioid receptor. *J Neurosci* **21**:5281-5288.

Porreca F, Ossipov MH, Gebhart GF. 2002. Chronic pain and medullary descending facilitation. *Trends Neurosci* **25**:319-325.

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

Price DD. 1988. Measurement of pain: Sensory-discriminative features. Dans *Psychological and Neural Mechanisms of Pain*, DD Price (ed). New York, Raven press; 18-49.

Premkumar LS, Ahern GP. 2000. Induction of vanilloid receptor channel activity by protein kinase C. *Nature* **408**:985-90.

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

Randall LO, Selitto JJ. 1957. A method for measurement of analgesic activity on inflamed tissue. *Arch Int Pharmacodyn Ther* **111**:409-419.

Randic M, Jiang MC, Cerne R. 1993. Long-term potentiation and long-term depression of primary afferent neurotransmission in the rat spinal cord. *J Neurosci* **13**:5228-5241.

Reddy AC, Lokesh BR. 1994. Studies on anti-inflammatory activity of spice principles and dietary n-3 polyunsaturated fatty acids on carrageenan-induced inflammation in rats. *Ann nutr metab* **38**:349–358.

Reeh PW, Kress M. 1995. Effect of classic algogens. *Semin Neurosci* **7**:221-226.

Rutkowski JL, Tuite GF, Lincoln PM, Boyer PJ, Tennekoon GI, Kunkel SL. 1999. Signals for proinflammatory cytokine secretion by human Schwann cells. *J Neuroimmunol* **101**:47-60.

Sakurada T, Wako K, Sakurada C, Manome Y, Tan-no K, Sakurada S, Kisara K. 1996. Spinally-mediated behavioural responses evoked by intrathecal high-dose morphine: possible involvement of substance P in mouse spinal cord. *Brain Res* **724**:213-221.

Sakurada T, Wako K, Sugiyama A, Sakurada C, Tan-No K, Kisara K. 1998. Involvement of spinal NMDA receptors in capsaicin-induced nociception. *Pharmacol Biochem Be* **59**:339-345.

Sandkühler J. 2000. Learning and memory in pain pathways. *Pain* **88**:113-118.

Sasamura T, Sasaki M, Tohda C, Kuraishi Y. 1998. Existence of capsaicin-sensitive glutamatergic terminals in rat hypothalamus. *Neuroreport* **9**:2045-2048.

Sell AB, Carlini EA. 1996. Anesthetic action of methyleugenol and other eugenol derivatives. *Pharmacology* **14**:367-377.

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

Sladky KK, Swanson CR, Stoskopf MK, Loomis MR, Lewbart GA. 2001. Comparative efficacy of tricaine methanesulfonate and clove oil for use as anesthetics in red pacu (*Piaractus brachypomus*). *Am J Vet Res* **62**:337-342.

Sommer C, Schäfers M, Marziniak M, Toyka KV. 2001. Etanercept reduces hyperalgesia in experimental painful neuropathy. *J Peripher Nerv Syst* **6**:67-72.

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

Stephenson TP, Mundy AR. 1994. The urge syndrome. In *Urodynamics*, Mundy AR, Stephenson TP, Wein AJ (eds). Churchill Livingstone, Edinburgh; 263-275.

Stucky CL, Abrahams LG, Seybold VS. 1998. Bradykinin increases the proportion of neonatal rat dorsal root ganglion neurons that respond to capsaicin and protons. *Neurosci* **84**:1257-65.

Sung B, Na HS, Kim YI, Yoon YW, Han HC, Nahm SH, Hong SK. 1998. Supraspinal involvement in the production of mechanical allodynia by spinal nerve injury in rats. *Neurosci Lett* **246**:117-119.

Sung B, Lim G, Mao J. 2003. Altered expression and uptake activity of spinal glutamate transporters after nerve injury contribute to the pathogenesis of neuropathic pain in rats. *J Neurosci* **23**:2899-2910.

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

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

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

Szallasi A. 1995. Autoradiographic visualization and pharmacological characterization of vanilloid (capsaicin) receptors in several species, including man. *Acta Physiol Scand* **155** (Suppl. 629):1-68.

Szallasi A, Blumberg PM. 1999. Vanilloid (Capsaicin) Receptors and Mechanisms. *Pharmacol Rev* **51**:159-212.

Szallasi A, Biro T, Szabo T, Modarres S, Petersen M, Klusch A, Blumberg PM, Krause JE, Sterner O. 1999. A non-pungent triprenyl phenol of fungal origin, scutigeral, stimulates rat dorsal root ganglion neurons via interaction at vanilloid receptors. *Br J Pharm* **126**:1351-1358.

Szolcsányi J, Joó F, Jancsó-Gábor A. 1971. Mitochondrial changes in preoptic neurons after capsaicin desensitization of the hypothalamic thermodetectors in rats. *Nature* **299**:116-117.

Szolcsányi J. 1982. Capsaicin type pungent agents producing pyrexia. In *Handbook of Experimental Pharmacology*, Milton AS (ed). Spinger, Berlin; 437-478.

Szolcsányi J. 1993. Actions of capsaicin on sensory receptors. In *Capsaicin in the Study of Pain*, Wood JN (ed). Academic Press, San Diego; 1-26.

Taylor DCM, Pierau Fr-K, Szolcsányi J. 1984. Long-lasting inhibition of horseradish peroxidase (HRP) transport in sensory nerves induced by capsaicin pretreatment of the receptive field. *Brain Res* **298**:45-49.

Thresh LT. 1846. Isolation of capsaicin. *Pharm J* **6**:941.

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

Urban MO, Gebhart GF. 1999. Supraspinal contributions to hyperalgesia. *Proc Natl Acad Sci USA* **96**:7687-7692.

Vadakkan KI, Jia YH, Zhuo M. 2005. A behavioural model of neuropathic pain induced by ligation of the common peroneal nerve in mice. *J Pain* **6**:747-756.

Valtschanoff JG, Rustioni A, Guo A, Hwang SJ. 2001. Vanilloid receptor VR1 is both presynaptic and postsynaptic in the superficial laminae of the rat dorsal horn. *J Comp Neurol* **436**:225-35.

Villanueva L, Dickenson AH, Ollat H. 2004. *The pain system in normal and pathological states : a primer for clinicians*. IASP Press. Seattle.

Vriens J, Appendino G, Nilius B. 2009. Pharmacology of vanilloid transient receptor potential cation channels. *Mol Pharmacol* **75**:1262-1279.

Wagner R, Myers RR. 1996. Schwann cells produce tumor necrosis factor alpha: expression in injured and non-injured nerves. *Neuroscience* **73**:625-629.

Walczak JS, Pichette V, Leblond F, Desbiens K, Beaulieu P. 2005. Behavioural, pharmacological and molecular characterization of the saphenous nerve partial ligation : a new model of neuropathic pain. *Neuroscience* **132**:1093-1102.

Wall PD, Devor M, Inbal R, Scadding JW, Schonfeld D, Seltzer Z, Tomkiewicz MM. 1979. Autotomy following peripheral nerve lesions: experimental anaesthesia dolorosa. *Pain* **7**:103-111.

Wie MB, Won MH, Lee KH, Shin JH, Lee JC, Suh HW, Song DK, Kim YH. 1997. Eugenol protects neuronal cells from excitotoxic and oxidative injury in primary cortical cultures. *Neurosci Lett* **225**:93-96.

Willis WD Jr. 1997. Is central sensitization of nociceptive transmission in the spinal cord a variety of long-term potentiation? *Neuroreport* **8**:iii.

Willis WD. 2002. Long-term potentiation in spinothalamic neurons. *Brain Res Rev* **40**:202-214.

Willis WD, Coggeshall RE. 2004. *Sensory Mechanisms of the Spinal Cord, Primary Afferent Neurons and the Spinal Dorsal Horn* (3rd edn). Vol 1 et 2. Klüwer Academic/Plenum Publishers, USA.

Wood JN, Winter J, James IF, Rang HP, Yeats J, Bevan S. 1988. Capsaicin-induced ion fluxes in dorsal root ganglion cells in culture. *J Neurosci* **8**:3208–3220.

Wood JN (ed). 1993. *Capsaicin in the Study of Pain* Academic Press, San Diego, CA.

Yaari Y, Devor M. 1985. Phenytoin suppresses spontaneous ectopic discharge in rat sciatic nerve neuromas. *Neurosci Lett* **58**:117-122.

Yang BH, Piao ZG, Kim YB, Lee CH, Lee JK, Park K, Kim JS, Oh SB. 2003. Activation of Vanilloid Receptor 1 (VR1) by Eugenol. *J Dent Res* **82**:781-785.

Zanella JM, Burright EN, Hildebrand K, Hobot C, Cox M, Christoferson L, McKay WF. 2008. Effect of etanercept, a tumor necrosis factor-alpha inhibitor, on neuropathic pain in the rat chronic constriction injury model. *Spine* **33**:227-234.

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

Zeppetella G. 2009. Impact and management of breakthrough pain in cancer. *Curr opin support palliate care* **3**:1-6.