

Université de Montréal

**Localisation, mécanisme d'induction et rôle
physiopathologique du récepteur B1 des kinines dans des
modèles expérimentaux de douleur chez le rat**

par

Sébastien Talbot

Département de Physiologie, Université de Montréal

Faculté de Médecine

Thèse présentée à la Faculté de Médecine en vue de l'obtention du grade de
Docteur en Physiologie

Juin 2012

© Sébastien Talbot, 2012

Université de Montréal

Faculté de Médecine

Cette thèse intitulée:

**Localisation, mécanisme d'induction et rôle
physiopathologique du récepteur B1 des kinines dans des
modèles expérimentaux de douleur chez le rat**

présentée par :

Sébastien Talbot

a été évaluée par un jury composé des personnes suivantes :

Dr. Jean-Louis Schwartz, président-rapporteur

Dr. Réjean Couture, directeur de recherche

Dre. Hélène Girouard, membre du jury

Dr. Fernand Gobeil Jr., examinateur externe

Dre. Sylvie Marleau, représentante de la doyenne

À mon inspiration, Ghislain Talbot

À mon amour, Cynthia Carbonneau

À mon mentor, Dr Réjean Couture

REMERCIEMENTS

Mes premières pensées vont au Dr Réjean Couture pour son incroyable soutien au cours de mes études supérieures ainsi que pour la confiance qu'il m'a témoignée. Aussi, je tiens à souligner ses grandes qualités d'enseignant, son authenticité ainsi que son profond désir d'excellence.

J'aimerais également souligner la contribution intellectuelle et le soutien de mes collègues de laboratoire sans qui ce travail n'aurait pu se réaliser, en particulier à Dre Jenny Pena Dias, Jacques Sénécal, Dre Helaine de Brito Perreira, Emna Chahmi, Patrick Théberge-Turmel, Mylène Pouliot, Julie-Émilie Huot-Marchand et Dr Mahmoud Ali Ismael. Aussi, j'aimerais souligner la contribution scientifique et la grande cordialité de mes rapports avec les membres d'Imperial Tobacco Canada, incluant Dr James Chi-Jen Lin, Dr André Morin, Jean-Philippe Roy et Martine Lacasse.

Également, je tiens à remercier tous mes collaborateurs scientifiques et académiques, incluant, Dre Maria Martha Campos, Dre Josette Noël, Dr Christian Beauséjour, Dr Denis DeBlois, Dre Elvire Vaucher, Dr Didier Pruneau, Dre Nicole Leclerc, Dre Dalinda Liazoghli, Dre Pierrette Gaudreau, Carole Richard, Dr Luc Rochette, Dre Donata Rodi, Dr Michele Simonato, Cynthia Carbonneau, Dr Mohamed Abdouh, Dr Harout Hasséssian, Florence Dotigny, Dr Pierre Bissonnette, Yohan Lussier, Sandra Da Cal, Dre Magda Descorbeth, Julie Desroches, Yessica Haydée Gomez Sandoval, Magalie Pilon, Dre Madhu Anand-Srivastava, Dr Yuan Li, Dr Frank Cloutier, Dre Stéphanie Delemasure, Sabrina Bergeron, Marielle Morand-Contant, Gabrielle

Lemire, Julien Saint-Denis, Martin Dupuy. Ainsi que le personnel technique de l'Université de Montréal, soit : Marjolaine Homier (animalerie), Claude Gauthier (graphisme), Véronique Desjardins (informatique), Annabelle Côté (secrétariat), Johanne Payette (TGDE) et Michel Lauzon (microscopie confocale).

Un merci spécial à ma mère Pauline Talbot pour son amour et sa présence, à mon meilleur ami Samuel Gatien pour son support et à André Carbonneau pour tout son aide.

Finalement, je tiens à souligner le support financier que j'ai reçu du Fonds de la Recherche en Santé du Québec (FRSQ), des Instituts de Recherche en Santé du Canada (IRSC), de la Fondation Michael Smith (bourse de voyage), de Imperial Tobacco Canada (ITCAN) et de la Faculté des Études Supérieures et Postdoctorales de l'Université de Montréal (FESP) (bourse de passage direct, bourse d'excellence au doctorat).

RÉSUMÉ

Les kinines sont des peptides neuro- et vaso- actifs impliqués dans les processus hémodynamiques, inflammatoires et douloureux. Leurs effets biologiques sont produits par l'entremise de deux types de récepteurs couplés aux protéines G, soit B1 (B1R) et B2 (B2R). Le B1R est inductible, son expression est augmentée à la suite d'un dommage tissulaire ou de l'exposition à des endotoxines bactériennes (lipopolysaccharide bactérien (LPS)), à des cytokines pro-inflammatoires (interleukine-1 β (IL-1 β), facteur de nécrose tumorale- α (TNF- α)) ou à des espèces réactives oxygénées (ROS). Les travaux présentés dans cette thèse avaient pour objectif d'élucider et/ou de raffiner les connaissances sur 1) la localisation, 2) le mécanisme d'induction et 3) le rôle physiopathologique du B1R dans des modèles expérimentaux de douleur chez le rat. Nos données ont permis de démontrer pour la première fois que le B1R est augmenté de façon significative dans la moelle épinière du rat diabétique de type 1 où il est localisé sur les fibres sensorielles de type C, les astrocytes et les cellules de la microglie (1^{er} article). Également, l'inhibition de l'activation des cellules de la microglie supprime les neuropathies diabétiques, l'expression de médiateurs pro-inflammatoires ainsi que l'activité pro-nociceptive du B1R (2^e et 3^e articles). Finalement, nous avons démontré que la stimulation systémique du TRPV1 par la capsaïcine induit une surexpression du B1R au niveau microgliale, via un mécanisme impliquant l'augmentation de la production de ROS et possiblement de cytokines (4^e article). Ces données nous permettent de mieux comprendre les mécanismes impliqués dans l'expression et l'activité du B1R. Aussi, elles nous permettent d'imaginer de nouvelles stratégies pour prévenir l'induction du B1R (inhibition du TRPV1) ou son activité délétère (inhibition de l'activation des cellules de la microglie) dans la douleur inflammatoire et neuropathique.

Mots clés : Récepteur B1 des kinines, douleur, diabète, microglie, capsaïcine, TRPV1

ABSTRACT

Kinins are vaso- and neuro-active peptides involved in hemodynamic, inflammatory and pain processes. Their biological effects are mediated by two G Protein Coupled Receptors (GPCR), termed B2R (constitutive) and B1R (inducible). B1R is expressed following tissue damage or exposure to bacterial endotoxin (LPS), pro-inflammatory cytokines (IL-1 β , TNF- α) and increased reactive oxygen species (ROS) levels. The objectives of this doctoral thesis were to define 1) the localisation, 2) the mechanism of induction and 3) the pathophysiological role of B1R in experimental models of pain in rat. Our data showed that B1R is significantly upregulated on sensory C fibers, astrocytes and microglia in spinal cord of type 1 diabetic rat (paper #1). Moreover, pharmacological inhibition of microglia reversed diabetic pain neuropathy, reduced levels of pro-inflammatory mediators and prevented B1R pro-nociceptive activity (papers #2 and 3). Finally, our data showed that systemic stimulation of TRPV1 with capsaicin upregulated B1R expression, mainly on microglia, through the increase of ROS and possibly cytokines (paper #4). Altogether, these data increased our knowledge related to B1R mechanism of induction and B1R activity. Also, these data shed light on new strategies to prevent B1R expression (TRPV1 blockade) and B1R deleterious activity (inhibition of microglia activation) in inflammatory and neuropathic pain.

Keywords : Kinin B1 receptor, pain, diabetes, microglia, capsaicin, TRPV1

PRÉAMBULE

Mes travaux de recherche avaient pour objectif de déterminer 1) la localisation, 2) le mécanisme d'induction, et 3) le rôle pathophysiologique du récepteur B1 des kinines dans des modèles expérimentaux de douleur chez le rat. En bref, les kinines sont des peptides vaso- et neuro- actifs agissant via deux types de récepteurs couplés aux protéines G (GPCR) nommés B1 (B1R) et B2 (B2R). Le B2R est exprimé de façon constitutive sur plusieurs types de cellules et participe à la phase aiguë de l'inflammation ainsi qu'à la transmission de la douleur. Le B1R est quant à lui inducible et contribue à l'établissement de la chronicité de la douleur et de l'inflammation. Fait intéressant, des résultats récents démontrent que le B1R constitue une cible thérapeutique de choix dans le traitement des maladies inflammatoires chroniques telles que le diabète, l'arthrite, l'asthme, le cancer et la maladie d'Alzheimer. De plus, plusieurs antagonistes sélectifs, neuro-actifs ou non, ont été développés au fil des ans et permettent d'envisager un fort potentiel clinique pour ce récepteur. Cependant, les types cellulaires exprimant le B1R demeurent inconnus. En effet, aucun anticorps commercial ne remplit les critères de spécificité pour pouvoir être utilisé en immunohistochimie. Cet état de fait limite la compréhension du mécanisme d'action du B1R. Ainsi, le premier objectif de cette thèse visait à développer des outils et protocoles techniques permettant la localisation du B1R au niveau cellulaire.

Ainsi, de concert avec la Dre Pierrette Gaudreau, nous avons développé un agoniste fluorescent, nommé N^α-Bodipy-des-Arg⁹-BK, permettant de localiser de façon sélective le B1R. Au moyen de ce nouvel outil, nous avons procédé à la localisation du B1R dans la moelle épinière du rat diabétique de type 1. Celui-ci est induit 4 jours suivant l'administration aiguë de streptozotocine (STZ) au niveau intra-péritonéal. Notez que plusieurs études (mRNA et sites de liaisons) ont démontré que le B1R est surexprimé dans la moelle épinière des rats STZ. De plus, l'utilisation d'antagonistes sélectifs du B1R a permis de faire rétrocéder plusieurs complications du diabète incluant les neuropathies. Au cours de cette étude, nous avons caractérisé les propriétés pharmacologiques du N^α-Bodipy-des-Arg⁹-BK en plus de démontrer que l'utilisation de cet outil permettait une résolution suffisante pour la détection du B1R. Ainsi, nous avons démontré que le B1R est localisé sur les fibres sensorielles de type C, les astrocytes et les cellules de la microglie dans la moelle épinière de rat STZ.

De récentes études ont démontré que l'actuelle pharmacothérapie, utilisée dans le traitement des neuropathies diabétiques, est inadéquate. En effet, celle-ci laisse une majorité de patients aux prises avec des douleurs non traitées. D'ailleurs, ces traitements visent principalement à prévenir ou diminuer le niveau de stimulation des neurones. Ce type de stratégie est bien adapté pour le traitement des douleurs aiguës, mais est peu efficace dans le traitement des douleurs chroniques qui sont souvent caractérisées par une inflammation permanente. Aussi, plusieurs études tendent à démontrer que ce niveau d'inflammation est maintenu par les cellules immunes qui entretiennent une autostimulation avec les neurones. En effet, de récentes études ont

démontré que les cellules immunes (microglie) de la moelle épinière de rats souffrants de neuropathies diabétiques sont plus nombreuses et sont dans un état d'activation exacerbé relâchant une plus grande quantité de médiateurs inflammatoires que les cellules de la microglie d'animaux témoins. Ainsi, nous avons voulu évaluer la contribution du B1R microglial dans l'induction des neuropathies diabétiques. Brièvement, l'utilisation d'inhibiteurs pharmacologiques (minocycline et fluorocitrate) prévenant l'activation des cellules de la microglie a permis de faire rétrocéder de façon transitoire les neuropathies diabétiques, la relâche et l'expression de médiateurs pro-inflammatoires. De plus, la stimulation du B1R spinal augmente la sévérité des douleurs neuropathiques, un effet complètement prévenu par l'inhibition de l'activation des cellules de la microglie. Ainsi, cette étude présente la première démonstration que l'effet pro-nociceptif du B1R est dépendant du stade d'activation des cellules de la microglie. Notez que la contribution de la microglie et plus particulièrement du B1R microglial aux neuropathies diabétiques a fait l'objet d'une revue extensive de la littérature et d'une discussion dans le troisième article présenté dans cette thèse.

Tel que brièvement souligné plus haut, le B1R est inductible et donc absent ou non-fonctionnel en condition physiologique. Son expression est cependant augmentée à la suite d'un dommage tissulaire ou suivant l'exposition à des endotoxines bactériennes (lipopolysaccharide bactérien (LPS)), à des cytokines pro-inflammatoires (interleukine-1 β (IL-1 β), facteur de nécrose tumorale- α (TNF- α)) ou à des espèces réactives oxygénées (ROS). L'exposition à ces facteurs provoque l'activation de

seconds messagers et stimule les MAPK et la translocation du NF- κ B vers son promoteur nucléaire, ce qui mène à l'induction du B1R. Fait intéressant, de récentes études suggèrent que l'activation du TRPV1 stimule l'activation de la NADPH oxydase et augmente la quantité intracellulaire de ROS. D'ailleurs, le TRPV1 est bien connu pour son rôle dans la perception de la douleur, particulièrement l'hyperalgésie thermique. Ainsi, le quatrième article présenté dans cette thèse s'intéresse à l'effet de la stimulation aiguë du TRPV1 au moyen d'un agoniste sélectif exogène (capsaïcine) sur les niveaux d'expression du B1R. Brièvement, nous avons démontré que la stimulation du TRPV1 provoque l'induction du B1R et que son expression dépend d'une augmentation des niveaux de ROS et de cytokines pro-inflammatoires.

TABLE DES MATIÈRES

REMERCIEMENTS	iv
RÉSUMÉ	vi
ABSTRACT	vii
PRÉAMBULE	viii
TABLE DES MATIÈRES	xii
LISTE DES FIGURES	xvi
LISTE DES TABLEAUX	xvii
LISTE DES ABRÉVIATIONS	xviii
CHAPITRE I	1
REVUE DE LA LITTÉRATURE ET MISE EN CONTEXTE	1
1.0. La douleur	2
1.1. Considération historique	2
1.2. Définition	4
1.3. La nociception	5
1.4. Arc réflexe	6
1.5. Les nocicepteurs	7
1.6. Type de fibres nerveuses périphériques	8
1.7. Première et deuxième douleur	12
1.8. Nociception des viscères	14
1.9. Les voies ascendantes de la douleur	14
1.10. Voie descendante de la douleur	15
1.11. La douleur aiguë versus la douleur chronique	17
1.12. Allodynie	19
1.13. Hyperalgésie	21
1.14. Types de douleurs	22
1.15. Sensibilisation centrale	23
1.16. SNC et transmission de la douleur	25
1.17. Cellules gliales	25
1.17.1. Les cellules de la microglie	26

1.17.2.	Astrocytes.....	26
2.0.	Facteur de transcription.....	28
2.1.	Le complexe NF- κ B.....	28
3.0.	Médiateurs de la douleur	30
3.1.	Cytokines.....	30
3.1.1.	Interleukine.....	31
3.1.1.1.	Interleukine-1 β	32
3.1.2.	<i>TNF-α</i>	33
3.2.	<i>Monoxyde d'azote (NO)</i>	39
3.3.	Substance P.....	43
3.4.	Glutamate	45
4.0.	La capsaïcine	49
4.1.	TRPV1.....	49
5.0.	Le système kallibréine-kinines (KKS).....	54
5.1.	Les kinines.....	54
5.2.	Sous-types de récepteurs des kinines.....	58
5.3.	Expression des récepteurs des kinines	59
5.4.	La signalisation intracellulaire des kinines	60
5.5.	Action pro-inflammatoire du B1R.....	63
5.6.	Action pro-nociceptive du B1R.....	64
6.0.	Le diabète.....	66
6.1.	Le diabète de type 1	67
6.1.1.	Modèles expérimentaux de diabète.....	68
6.1.1.1.	Streptozotocine	68
6.2.	Diabète de type 2	70
6.3.	Complications associées au diabète	71
7.0.	Les neuropathies diabétiques.....	74
7.1.	Pathophysiologie des neuropathies diabétiques	76
7.1.1.	La voie du polyol.....	76
7.1.2.	La pompe Na ⁺ /K ⁺ ATPase	80
7.1.3.	Produit de glycation terminale (AGE).....	81

7.1.4.	Stress oxydatif (ROS)	83
7.1.5.	Le monoxyde d'azote et le stress oxydatif	88
7.1.6.	Microangiopathie	90
CHAPITRE II		93
8.0.	Article 1	94
8.1.	Problématique	94
8.2.	Objectif.....	94
8.3.	Méthode expérimentale	94
8.4.	Contribution	95
8.5.	Référence.....	95
9.0.	Article 2	109
9.1.	Problématique	109
9.2.	Objectif.....	109
9.3.	Méthode expérimentale	109
9.4.	Contribution	109
9.5.	Référence.....	109
10.0.	Article 3	127
10.1.	Problématique	127
10.2.	Objectif.....	127
10.3.	Contribution	127
10.4.	Référence.....	127
11.0.	Article 4	139
11.1.	Problématique	139
11.2.	Objectif.....	139
11.3.	Méthode expérimentale	139
11.4.	Contribution	140
11.5.	Référence.....	140

CHAPITRE III	158
12.0. Discussion et perspectives	159
12.1. Localisation	160
12.2. Modèle de diabète de type 1 induit par la STZ	164
12.3. Stimulation du TRPV1 par la capsaïcine	166
12.4. Le TRPV1 dans le diabète	169
12.5. Le rôle du B1R central et périphérique dans la douleur	176
12.6. Inhibiteurs de l'activité microgliale	178
12.7. Chronicité de la douleur – mécanisme intégratif	179
13.0. Conclusion	182
14.0. Références	185
CHAPITRE IV	229
ANNEXES	229
15.0. Accord figures	230
15.1. Accord figure 3	230
16.0. Curriculum Vitae	231

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Perception temporelle de la première et deuxième douleur	13
Figure 2 : Perception de l'allodynie et de l'hyperalgésie en fonction de l'intensité de la stimulation douloureuse	20
Figure 3 : Voie d'activation du NF- κ B par l'IL-1 β et le TNF- α	37
Figure 4 : Site de phosphorylation et d'activation du TRPV1.....	52
Figure 5 : Le système kallibréine-kinines	56
Figure 6 : Site d'action des enzymes impliquées dans le métabolisme des kinines	57
Figure 7 : Transduction des signaux suivant l'activation du récepteur B1 des kinines	61
Figure 8 : Les 4 grandes voies de la glucotoxicité présente chez les diabétiques	73
Figure 9 : L'influence des niveaux de glucose intracellulaire sur l'utilisation des voies biochimiques impliquées dans son métabolisme	77
Figure 10 : Les différentes voies biochimiques impliquées dans l'augmentation du stress oxydatif sous l'effet de l'hyperglycémie chronique	86
Figure 11 : Glycémie et insuliniémie de rats STZ traités ou non avec un antagoniste du TRPV1	172
Figure 12 : Niveau d'expression de l'ARNm du B1R dans l'aorte, le cortex rénal et la moelle épinière de rats STZ traités ou non avec un antagoniste sélectif du TRPV1	173
Figure 13 : Niveau d'expression protéique du B1R dans le cortex rénal de rats STZ traités ou non avec un antagoniste sélectif du TRPV1	174
Figure 14 : Densité des sites de liaison spécifiques du B1R dans le cortex rénal de rat STZ traités ou non avec un antagoniste sélectif du TRPV1	175
Figure 15 : Lien entre les récepteurs des kinines et TRPV1 dans la douleur neuropathique.....	181

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Types et caractéristiques des fibres sensorielles 12

LISTE DES ABRÉVIATIONS

aa	Acide aminé
ADN	Acide désoxyribonucléique
ADNc	ADN complémentaire
ADP	Adénosine diphosphate
AGE	Produit de glycation terminale
AGER	Récepteur des AGE
AMPA-R	Récepteur à l'acide α -amino-3-hydroxy-5-méthyl-4-isoxazolepropionique
AMPc	Adénosine cyclique monophosphate
AP-1	Protéine activatrice 1
APF1	Facteur de protéolyse ATP-dépendant 1
ARN	Aldose réductase
ARN	Acide ribonucléique
ARNm	ARN messenger
ATF2	Facteur de transcription activé 2
ATP	Adénosine triphosphate
B1R	Récepteur B1 des kinines
B2R	Récepteur B2 des kinines
BK	Bradykinine
CB	Cannabinoïde
CFA	Adjuvant de Freund
CKK	Cholécystokinine
CGRP	Peptide relié au gène de la calcitonine
COX-2	Cyclo-oxygénase 2
CSF	Liquide cérébro-spinal
Cx3CL1	Chémokine (C-X3-C motif) ligand 1

Da	Dopamine
DABK	Des-Arg ⁹ -BK
DAG	Diacylglycérol
Dn	Dynorphine
DPI	Diphénylèneiodinium
DPN	Neuropathie périphérique reliée au diabète
Drp1	Protéine reliée à la dynamine 1
EAAT	Transporteur d'acides aminés excitateurs
EGF	Facteur de croissance épidermale
eNOS	NOS endothéliale
ERK	Kinase de régulation du signal extracellulaire
FADD	Protéine FAS associée au domaine de la mort
GABA	Acide γ -aminobutyrique
GAPDH	Glyceraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase
GFAP	Protéine acide fibrillaire gliale
Glu	Glutamate
Gly	Glycine
GMPc	Guanosine cyclique monophosphate
GPCR	Récepteur couplé aux protéines G
HHEX	Homéobox exprimé au niveau hématopoïétique
HMWK	Kininogène de haut poids moléculaire
Hs	Histamine
I	Inositol
ICE	IL- β convertase
IL	Interleukine
IL-1 β	Interleukine -1 β
IKAP	Protéine associée au I-kappa beta

IKK	I κ B kinase
iNOS	NOS inductible
IP3	Inositol triphosphate
IR	Récepteur à l'insuline
IRAK	Kinase associée à l'interleukine 1
JNK	Kinase Janus activée
L-NNA	NG-nitro-L-Arginine
KA-R	Récepteur au kainate
KCNJ11	Canal potassique rectifiant de la sous-famille J11
KD	Kallidine
kDa	Kilodalton
KKS	Système kallicroïne-kinine
LMWK	Kininogène de bas poids moléculaire
L-NAME	L-NG-Nitroarginine methyl ester
LPS	Endotoxine bactérienne
LTP	Potentialisation à long terme
MAPK	Protéine kinase activatrice mitogène
mGluR	Récepteur métabotrope au glutamate
MI	Myoinositol
MKK6	MAP kinase kinase 6
MLK2	Kinase de lignage mixte 2
MLK3	Kinase de lignage mixte 3
MODY	Gène d'initiation du diabète juvénile
NA	Noradrénaline
NAC	N-acétyl-L-cystéine
NAD ⁺	Nicotinamide adénine dinucléotide
NADPH	Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate

NEMO	Modulateur essentiel du NK- κ B
NF-KB	Chaines légères du facteur nucléaire kappa des cellules B activées
NGF	Facteur de croissance neuronale
NIK	Kinase inductible du NF- κ B
NK-1R	Récepteur des tachykinines 1
NMDA	Acide N-méthyl-D-aspartique
nNOS	NOS neuronale
NO	Monoxyde d'azote
NOS	Enzyme de synthèse du monoxyde d'azote
NOTCH2	Protéine homologue du locus neurogénique 2
O ₂ ⁻	Anion superoxyde
ONOO-	Peroxynitrite
Op	Opiöide
PARP	Polymérase nucléaire polyADP-ribose
PAS	Acide périodique Schiff
PG	Prostaglandine
PI	Inositol phosphate
PiP	Phosphatidylinositol phosphate
PiP2	Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate
PKA	Protéine kinase A
PKC	Protéine kinase C
PKG-1	Protéine kinase dépendante du GMPC
PLC	Phospholipase C
PPARG	Récepteur gamma du proliférateur activé du peroxisome
RIP	Protéine d'interaction au récepteur
ROS	Espèces réactives oxygénées
RVM	Médulla rostroventrale

RTX	Résinifératoxine
5-HT	Sérotonine
S100 β	Protéine d'arrimage du calcium S100 beta
SERCA	Réticulum sarco/endoplasmique Ca ²⁺ ATPase
SEM	Écart standard à la moyenne
SIDA	Syndrome d'immunodéficience acquise
SN	Système nerveux
SNAP	Protéine associée au synaptosome
SNC	Système nerveux central
SNP	Système nerveux périphérique
SP	Substance P
STAT	Transducteur de signal et activateur de la transcription
STZ	Streptozotocine
TACE	Enzyme de conversion du TNF alpha
TCFL2	Facteur de transcription 2
TNF- α	Facteur de nécrose tumorale alpha
TRADD	Récepteur au TNF associé au domaine de la mort
TRAF	Facteur associé au récepteur du TNF
TRAF2	Facteur de recrutement du TNF 2
TRPV1	Récepteur aux vanilloïdes 1
TTX-R	Récepteur à la tétrodotoxine
UV-B	Ultraviolet-B
VgluT	Transporteur du glutamate
XAO	Xanthine oxydase

CHAPITRE I

**REVUE DE LA LITTÉRATURE ET MISE EN
CONTEXTE**

1.0. La douleur

1.1. Considération historique

Au cours de l'histoire, de nombreuses théories furent émises pour expliquer le rôle et l'origine de la douleur. En effet, les premières explications furent proposées par les philosophes de la Grèce antique. Aristote suggéra d'abord que la douleur était provoquée par des esprits maléfiques tentant de pénétrer le corps à travers les plaies. Hippocrate croyait, quant à lui, que la douleur était due à un mauvais amalgame des fluides corporels (McCaffery *et al.*, 1999). Au 11^e siècle, Avicenne émit l'idée que l'humain possédait un ensemble de sens, incluant entre autres le toucher et la douleur (Chen, 2011).

Le rôle et l'origine de la douleur demeurèrent nébuleux jusqu'à la Renaissance, où il fut avancé que la douleur avait une origine exogène au corps et correspondait à un acte de punition de Dieu. En 1644, le scientifique français René Descartes suggéra que la douleur est une perturbation qui passe le long des nerfs pour atteindre le cerveau (McCaffery *et al.*, 1999). Cette théorie correspond au fondement moderne de la compréhension de la douleur, passant d'une expérience spirituelle/mystique, à une sensation physique/mécanique. Le travail de Descartes et d'Avicenne préfigure la fondation de *la théorie de la spécificité* qui soutient que la douleur possède des mécanismes propres, distincts du toucher et des autres sens. Au cours des 18^e et 19^e siècles, il fut suggéré que la douleur est plus qu'une modalité sensitive, mais également un état émotionnel influencé par la force des stimuli, conception

correspondant au fondement de *la théorie intensive*. Au milieu des années 1890, *la théorie de la spécificité* était soutenue par les physiologistes et médecins, tandis que les psychologues supportaient *la théorie intensive*. Les expériences de Henry Head et Max Von Frey ont eu raison de *la théorie intensive* (McCaffery *et al.*, 1999). Puis, en 1955, les Drs Sinclair et Weddel développent les fondements de *la théorie périphérique* qui suggère que les fibres nerveuses innervant la peau (excluant les cheveux) sont toutes identiques et que la douleur provient de l'intense stimulation de celles-ci (Chen, 2011).

Finalement une nouvelle théorie fut avancée en 1965 dans un article intitulé « *Pain Mechanisms: A New Theory* » publié dans la revue *Science* par les Drs Ronald Melzack et Patrick D. Wall, connue comme *la théorie du portillon* (Wall *et al.*, 1980). Cette théorie demeure à ce jour le fondement de la neurobiologie de la douleur. Brièvement, les auteurs suggèrent que plusieurs types de neurones de différents diamètres et phénotypes transmettent des influx vers la moelle épinière et que la stimulation d'un sous-type de ces neurones peut inhiber le passage d'un influx provenant d'un autre type neuronal (Wall *et al.*, 1980). Cette théorie explique, entre autres, l'effet analgésique de masser une zone endolorie. En effet, ils ont démontré que la stimulation des neurones de large diamètre (toucher, pression, vibration) inhibe la transmission des influx des neurones de plus faible diamètre (chaleur, douleur).

1.2. Définition

L'*International Association for Study of Pain* définit la douleur comme « une expérience sensorielle et émotionnelle désagréable associée à un dommage tissulaire ou potentiel, ou décrit en ces termes » (Chen, 2011). La douleur est donc une sensation désagréable initiée par un dommage tissulaire. Elle peut être provoquée par un traumatisme (brûlure, plaie, choc) ou une maladie, ainsi que par un mauvais fonctionnement du système nerveux (SN) (von Hehn *et al.*, 2012). Habituellement, elle correspond à un signal d'alarme de l'organisme dont l'intégrité physique est menacé (Woolf, 2010a). Par exemple, un individu exposé à un stimulus douloureux retire son membre de la source nociceptive afin de le protéger. D'ailleurs, la sensation douloureuse disparaît immédiatement après avoir retiré le membre en danger ou lorsque celui-ci est soigné. Notez que ce type de retrait est d'origine réflexe (voir 1.4). Il s'avère cependant que la douleur peut persister dans le temps, une situation cliniquement définie comme douleur chronique (voir 1.11). En outre, la douleur est un symptôme plutôt commun se retrouvant dans la plupart des pathologies. Ainsi, la douleur est la raison la plus fréquente de consultation clinique. En effet, la douleur affecte grandement la qualité de vie des gens. Ainsi, le traitement ou le soulagement des douleurs est primordial pour le bien-être des patients (Woolf, 2010b).

1.3. La nociception

Le fait de percevoir la douleur est qualifié de nociception. Ce processus implique plusieurs éléments du système nerveux périphérique (SNP) et central (SNC) dans des mécanismes et voies complexes et extrêmement bien régulés, impliquant : 1) transduction sensorielle, 2) transmission, 3) modulation et 4) perception de la douleur (Woolf, 2010b).

1) La transduction sensorielle correspond à la transformation des stimuli mécaniques, thermiques et chimiques en signal électrochimique au niveau des terminaisons nerveuses sensorielles spécialisées (Woolf, 2010b). Les fibres nociceptives captent les influx nerveux par l'entremise des nocicepteurs (voir 1.5), qui forment un dense réseau de prolongements au niveau du derme. L'activation des nocicepteurs est limitée à des stimuli de hautes intensités, pouvant entraîner un dommage tissulaire (Woolf, 2010b). Notez qu'il existe une pléthore de différents nocicepteurs, chacun possédant ses propres spécificités, faisant des réponses nociceptives des réponses hautement discriminatives. D'ailleurs, la stimulation des nocicepteurs entraîne l'activation de différents seconds messagers intracellulaires qui participent au processus de transmission (2) en activant d'autres protéines et processus intracellulaires (Woolf *et al.*, 2007). Ces processus entraînent l'entrée massive de cations dans les neurones, induisant une dépolarisation membranaire et, lorsque le neurone atteint son seuil de déclenchement, la génération d'un influx nerveux (Woolf *et al.*, 2007). Celui-ci est ensuite dirigé de la périphérie vers les neurones de 2^e ordre de la corne dorsale de la moelle épinière. Lorsque l'influx nerveux atteint la corne dorsale de la moelle épinière, le signal est transmis de façon concomitante aux neurones de 2^e ordre et aux

interneurones via des signaux électro- (synapses) chimiques (neurotransmetteurs) (Woolf, 2007).

L'étape dite de modulation (3) se fait par les neurones qui régulent la transmission synaptique avant que l'influx n'atteigne les centres supraspinaux (perception désagréable). Ce type de régulation ne sera pas traité en détail ici. En bref, il implique des noyaux cérébraux ainsi que des interneurones de la moelle épinière qui jouent un rôle activateur et inhibiteur sur la transmission de l'influx nerveux vers les centres supra-spinaux (Woolf, 2007). Le message nerveux reçu par le cerveau initie le processus de perception (4) qui comprend, entre autres, la perception de la douleur, l'intégration de l'information (cortex : apprentissage; hippocampe mémoire) et l'initiation des réponses autonomes et motrices (Beggs *et al.*, 2008)

1.4.Arc réflexe

Les interneurones spinaux stimulés lors du processus de transmission des influx nerveux peuvent induire un rapide signal de retrait du membre en danger par la stimulation des fibres motrices efférentes de la corne ventrale de la moelle épinière (Robbins et al., 2010). Ce type de réponses, nommé arc réflexe, est beaucoup plus rapide que la réponse descendante du cerveau, et permet donc de réduire au minimum le dommage tissulaire. Le réflexe est donc un mécanisme de réponse intégré du SNC qui n'implique pas la volonté (Robbins et al., 2010).

1.5. Les nocicepteurs

Le Dr Charles Scott Sherrington a fait la première démonstration de l'existence des nocicepteurs en 1906 (Sherrington *et al.*, 1906). En effet, celui-ci utilisa différents types de stimulation cutanée d'intensité variable et montra que certains types de réponses, telles que le réflexe de retrait, étaient exclusivement observées suivant d'intense stimulation douloureuse. Celui-ci postula alors qu'une sous-population de récepteurs spécifiques, qu'il nomma nocicepteurs, était spécialisée dans la perception de la douleur (Burke, 2007). Brièvement, les nocicepteurs se déclinent en deux grandes populations, soit les récepteurs métabotropes (*récepteur couplé aux protéines G* (GPCR)) et ionotropes (canal ionique). Ceux-ci sont exprimés sur les terminaisons nerveuses des fibres sensorielles, mais également présents à la surface des axones et des dendrites (Woolf *et al.*, 2007). Les nocicepteurs sont également exprimés à la surface de structures (muscle, viscère et tendon) ne jouant pas un rôle primaire dans la transmission des influx nerveux douloureux (Woolf *et al.*, 2007).

De façon générale, le type de nocicepteurs exprimé est caractéristique du type de fibres sensorielles sur lequel il se retrouve. Sommairement, 3 grandes familles de nocicepteurs sont dénombrées: 1) mécaniques, 2) thermiques et 3) polymodaux.

1) Les nocicepteurs mécaniques sont activés par la piqûre, le pincement ou la torsion de la peau (Woolf *et al.*, 2007) et sont majoritairement exprimés par les fibres afférentes de type A δ (voir 1.6).

2) Les nocicepteurs thermiques, comme leur nom l'indique, sont stimulés par des températures élevées ($> 45^{\circ} \text{C}$) ou basses ($< 15^{\circ} \text{C}$) et sont majoritairement exprimés par les fibres sensorielles de type C (non myélinisées) (voir 1.6).

3) Les nocicepteurs polymodaux ne possèdent pas de réponse spécifique et répondent à la fois à des stimuli nociceptifs mécaniques, thermiques et chimiques. Ils sont exprimés par les fibres sensorielles de type C et représentent environ 70 % de tous les nocicepteurs (Woolf *et al.*, 2007).

Finalement, il existe un dernier type de nocicepteurs n'ayant aucun rôle dans la réponse douloureuse aiguë. En effet, les nocicepteurs secondaires doivent être sensibilisés en présence de médiateurs inflammatoires pour être activés et participer à la perception des stimuli douloureux (Julius *et al.*, 2001).

1.6. Type de fibres nerveuses périphériques

Il existe trois types de fibres nerveuses : a) motrices, b) autonomes et c) sensorielles.

a) Les fibres motrices se déclinent en deux groupes majeurs, soit $A\alpha$ et $A\gamma$. Les fibres $A\alpha$ régulent le niveau de contraction des muscles squelettiques et permettent le mouvement, tandis que les fibres $A\gamma$ modulent l'activité des muscles squelettiques (Robbins *et al.*, 2010).

b) Les fibres autonomes sont désignées comme pré-ganglionnaires et post-ganglionnaires. Comme leur nom l'indique, les fibres pré-ganglionnaires (sympathiques, parasympathiques ou cholinergiques) font la liaison entre le SNC et les ganglions,

tandis que les fibres post-ganglionnaires font la liaison entre les ganglions et l'organe cible (Robbins *et al.*, 2010).

c) Tel que résumé dans le tableau 1, il existe également quatre types de fibres sensorielles, soit $A\alpha$, $A\beta$, $A\delta$ et C (Julius *et al.*, 2001). Celles-ci font la liaison entre les nocicepteurs du SNP et le SNC (corne dorsale de la moelle épinière et le cerveau), permettent donc la transmission des influx nerveux afférents vers le SNC. Elles sont de type bipolaire. Cela signifie que leur corps cellulaire se retrouve dans le ganglion de la racine dorsale de la moelle épinière (DRG), dont les dendrites se projettent vers le site d'acquisition des influx nerveux (par exemple, la peau) et les terminaisons se projettent dans la corne dorsale de la moelle épinière pour y faire synapse avec les interneurons et les neurones de 2^e ordre (Julius *et al.*, 2001). La classification des fibres sensorielles est basée sur les équations de Frankenhaeuser-Huxley (Kumar *et al.*, 2005). Celles-ci permettent de caractériser les fibres en fonction de leur vitesse de conduction des influx nerveux, leur niveau de myélinisation et leur épaisseur (Julius *et al.*, 2001). Par ailleurs, de nouveaux modèles mathématiques sont encore développés actuellement pour arriver à une caractérisation et une classification encore plus précises des fibres sensorielles. Cependant, ce niveau de précision de cette classification excède les besoins de cette thèse. Il est toutefois important de retenir que le diamètre de la fibre ainsi que l'épaisseur de sa gaine de myéline influencent positivement la vitesse de propagation des influx nerveux (Julius *et al.*, 2001). En terminant, un dernier type de fibre, insensible à la stimulation douloureuse, appelé nocicepteur silencieux, vient d'être caractérisé. Ces fibres semblent seulement être

activées en condition inflammatoire (Millan, 1999; Willis *et al.*, 1997) et ne seront pas traitées en profondeur ici.

i) Les fibres $A\alpha$, aussi désignées comme Ia, sont les fibres ayant la plus importante gaine de myéline et le plus gros diamètre. Il s'agit de fibres non cutanées et non nociceptives qui font synapses avec les fibres musculaires et transmettent des informations relatives à la vitesse de contraction de celles-ci (Kumar *et al.*, 2005).

ii) Les fibres $A\beta$, aussi connues sous l'appellation type II, sont sensibles à l'étirement. En fait, elles transmettent des informations relatives à la position et la longueur des muscles et participent à la proprioception. Les fibres $A\beta$ sont de grosses fibres myélinisées (2^e couche la plus importante) à conduction rapide, qui encodent les informations non nociceptives telles que le toucher, la pression et la vibration (Kumar *et al.*, 2005). Cependant, les fibres $A\beta$ peuvent également participer à la modulation de la douleur dans les conditions pathologiques (Millan, 1999; Ness, 2000). Notez que les fibres $A\beta$ projettent dans les couches III, IV et V de la corne dorsale, et expriment spécifiquement l'isolectine. Ce type de fibre ne possède pas de réponse adaptative. Cela signifie qu'elles continuent de conduire même lorsque le muscle ne change plus de longueur.

iii) Les fibres $A\delta$ sont des fibres myélinisées de petit calibre responsables de la réponse rapide à la douleur (première réponse) (Kumar *et al.*, 2005). La douleur qu'elles transmettent est perçue comme vive et aiguë. Les fibres $A\delta$ sont légèrement myélinisées, ont un diamètre d'environ (1-5 μm) et atteignent des vitesses de conduction d'environ 20 m/s. Cette réponse est précise (origine de la douleur bien

définie) (Julius *et al.*, 2001). Elles transmettent des informations relatives au froid et à la pression; elles se projettent principalement au niveau de la laminae I et II de la corne dorsale de la moelle épinière, mais également sur les laminae III et IV. La protéine NF-200 est exprimée par ces fibres, ce qui permet de les localiser. Finalement, les fibres A δ seraient responsables de la portion afférente de l'arc réflexe (voir 1.4) (Julius *et al.*, 2001).

iv) Les fibres de type C sont des fibres sensorielles afférentes se projetant dans les laminae superficielles (I et II) de la corne dorsale de la moelle épinière. Ces fibres sont non myélinisées et de faible diamètre (0.2-1.5 μm). Elles possèdent donc une vitesse de conduction lente, limitée à 2m/s (Kumar *et al.*, 2005). Puisque cette vitesse est inférieure à celle des fibres A δ , elles sont responsables de la perception diffuse de la douleur (appelée deuxième douleur). Cette sensation est de longue durée, mal localisée et souvent décrite comme une douleur sourde. Par ailleurs, les fibres C font synapses avec les neurones de 2^e ordre des laminae supérieures de la corne de la moelle épinière, plus précisément au niveau de la substance gélatineuse (lamina II). En outre, les fibres de type C sont considérées comme polymodales puisqu'elles répondent aux stimuli thermiques (chaud, froid), mécaniques (seuil élevé) et chimiques (ions potassiques, acétylcholine, sérotonine, prostaglandine, substance P, bradykinine, histamine et protons (H⁺)) (Almeida *et al.*, 2004). Plus précisément, elles sont stimulées par la douleur, la chaleur et la démangeaison. Notez que les fibres de type C représentent environ 70 % des afférences nociceptives du corps en plus de participer au maintien de son homéostasie, étant sensibles à l'hypoxie, l'hypoglycémie et l'hypo-osmolarité, ainsi qu'à l'hyperthermie (Julius *et al.*, 2001).

Tableau 1 : Types et caractéristiques des fibres sensorielles

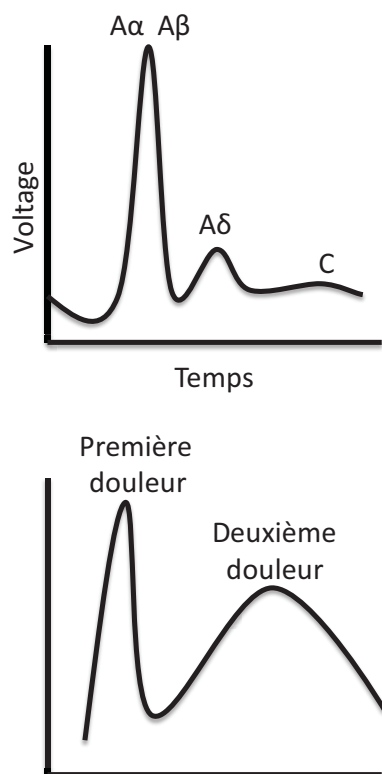
Type de fibres	Information véhiculée	Myélinisée	Diamètre (μm)	Vitesse de conduction (m/s)
A α	Proprioception	Oui	13 - 20	80 - 120
A β	Toucher	Oui	6 - 12	35 - 90
A δ	Douleur (mécanique, thermique)	Faiblement	1 - 5	5 - 40
C	Douleur (mécanique, thermique et chimique)	Non	0.2 - 1.5	0.5 - 2

Adapté de Julius (Julius *et al.*, 2001)

1.7. Première et deuxième douleur

Tel qu'observé sur la figure 1, les différences de vitesse de conduction entre les deux types de fibres nerveuses nociceptives (A δ et C) expliquent la façon particulière dont on ressent la douleur lorsqu'on se blesse. Initialement, une douleur aiguë et bien localisée laissant place à une douleur plus diffuse et plus sourde (Julius *et al.*, 2001). Ce délai provient directement de la vitesse de conduction différente entre les fibres A δ et C qui fait que leur message n'atteint pas le cerveau au même moment. La sensation initiale provient de la transmission d'influx nerveux par les fibres A δ , tandis que la « douleur lente » est issue de la stimulation des fibres C non myélinisée (Julius *et al.*, 2001).

Figure 1 : Perception temporelle de la première et deuxième douleur.



Les fibres $A\delta$ sont myélinisées et possèdent donc des vitesses de conduction supérieures à celles des fibres non myélinisées, telles que les fibres C. Ainsi, les influx nerveux transmis par les fibres $A\delta$ atteignent les centres supraspinaux plus rapidement que ceux acheminés par les fibres C. Ceci a pour conséquence la perception en deux temps des influx nerveux douloureux. Adapté de Julius (Julius *et al.*, 2001)

1.8. Nociception des viscères

La propagation des influx nerveux provenant des viscères est transmise par les fibres A δ et de type C; les fibres A β ne participant pas à ce processus. En effet, la stimulation de nocicepteurs à faible seuil d'activation stimule les réflexes vagues, incluant la nausée. Il semble que la perception des douleurs viscérales est largement dépendante de l'intensité de la stimulation. De plus, seulement une quantité relativement faible de nocicepteurs est présente sur les viscères, suggérant que la perception sensorielle est également tributaire de la sommation temporelle des influx nerveux. Ainsi, la perception de la douleur viscérale est très diffuse. En effet, une même fibre nerveuse innerve plusieurs organes ou viscères, ce qui provoque ce type de perception (Millan, 1999).

1.9. Les voies ascendantes de la douleur

Les fibres afférentes pénètrent dans la moelle épinière ou dans les régions supraspinales via les nerfs crâniens V, VII, IX et X (Almeida *et al.*, 2004). Elles font alors synapses avec les neurones de 2^e ordre qui acheminent les influx nerveux vers le cerveau, permettant l'intégration du signal. Ces neurones de 2^e ordre sont organisés en différents faisceaux en fonction du type de fibre avec lequel ils font synapses, le lieu d'où ils proviennent, ainsi que l'endroit où ils se projettent. Notez que la voie majeure impliquée dans l'acheminement des influx nerveux douloureux vers le cerveau est la voie spino-thalamique (Almeida *et al.*, 2004). Les nerfs qui forment cette voie proviennent majoritairement de la laminae I de la corne dorsale de la moelle épinière,

mais également des laminae II, IV, VI, VII, VIII et X (Craig, 1991; Millan, 1999; Rajpal *et al.*, 2007; Zhang *et al.*, 2000). Cette voie est également impliquée dans la perception de la démangeaison, du toucher et de la température (Craig, 1991; Millan, 1999; Rajpal *et al.*, 2007; Zhang *et al.*, 2000). En outre, il existe d'autres voies ascendantes de la douleur, soit la voie spino-réticulée (nociception et contrôle moteur) (Millan, 1999), spino-mésencéphalique (mécanisme descendant activateur ou inhibiteur de la douleur; possède également des fonctions autonomes) (Djoughri *et al.*, 1998; Djoughri *et al.*, 1997), spino-parabrachiale (douleur viscérale) (Blomqvist *et al.*, 1992; Buritova *et al.*, 1998), spino-hypothalamique (stimuli douloureux et non douloureux des viscères, muscles et tendons) (Katter *et al.*, 1991) et spino-cervicale (composante émotionnelle de la douleur) (Lu, 1989).

1.10. Voie descendante de la douleur

Il existe un système descendant de modulation (activateur ou inhibiteur) et de contrôle de la perception douloureuse (Millan, 2002). L'une des voies de modulation les mieux connues comprend le réseau décrit entre la substance grise périaqueducale, la médulla rostroventrale (RVM) et la moelle épinière, et connue sous l'appellation RVM. Celle-ci contient autant des neurones excitateurs qu'inhibiteurs. Ainsi, son activation peut entraîner, selon les circonstances, une facilitation ou une inhibition de la sensation douloureuse (Tracey *et al.*, 2007). Le contrôle descendant de la douleur a généralement un effet exciteur sur les grosses fibres afférentes (non nociceptives), et inhibiteur sur les petites fibres afférentes non myélinisées (nociceptives) (Millan,

2002). Ce type de réponse provient du cerveau et a pour objectif de moduler la quantité d'influx nociceptif parvenant au SNC. De façon simpliste, les fibres descendantes activent ou inhibent directement les fibres afférentes en faisant synapse avec elles dans la corne dorsale de la moelle épinière et indirectement via l'action d'interneurones (Heinricher *et al.*, 2009; Vanegas *et al.*, 2004).

Plusieurs médiateurs contribuent à ces voies descendantes tels que le *glutamate* (Glu) (voir 3.4), le *peptide relié au gène de la calcitonine* (CGRP), la *substance P* (SP) (voir 3.3), la *cholécystokinine* (CKK), les *prostaglandines* (PG) et l'*histamine* (Hs) (Vanegas *et al.*, 2004). Ceux-ci sont associés à une facilitation de la transmission des influx nerveux, tandis que l'*acide gamma amino-butyrique* (GABA), la *glycine* (Gly), les *cannabinoïdes* (CB) et les *opioïdes* (Op) sont souvent impliqués dans l'inhibition de la nociception (Vanegas *et al.*, 2004). De plus, il existe d'autres voies descendantes, dites enképhalinerigiques, qui réduisent l'activation des afférences nociceptives via l'inhibition post-synaptique des neurones de 2^e ordre au niveau spinal (Vanegas *et al.*, 2004). En fait, ces neurones libèrent certains opioïdes endogènes tels que les β -endorphines, les enképhalines et les *dynorphines* (Dn) qui agissent via les récepteurs aux opioïdes (μ , δ et κ) (Vanegas *et al.*, 2004). En plus de son effet inhibiteur, la Dn possède également une activité pro-nociceptive par la stimulation du récepteur κ . Entre autres médiateurs, la sérotonine (5-HT) possède des effets inhibiteurs lorsqu'elle active les récepteurs 5-HT₃ et 5-HT_{1B}, et un effet pro-nociceptif par les récepteurs 5-HT_{1A} (Vanegas *et al.*, 2004). Certaines études suggèrent également que le *récepteur*

des tachykinines-1 (NK-1R), localisé au niveau de la laminae 1 de la corne dorsale de la moelle épinière, participe au contrôle descendant de la douleur (voie RVM) par l'activation de la relâche de 5-HT (Vanegas *et al.*, 2004). Toujours au niveau de la corne dorsale de la moelle épinière, il semble que la *noradrénaline* (NA) possède un rôle activateur par l'activation des récepteurs α_1 , et inhibiteur par l'activation des récepteurs α_2 , tandis que la *dopamine* (Da) est activatrice par la stimulation des récepteurs D1, et inhibitrice par les récepteurs D2 (Vanegas *et al.*, 2004).

1.11. La douleur aiguë versus la douleur chronique

Tel que décrit précédemment, la douleur sert une cause physiologique fondamentale, soit celle de prévenir le dommage tissulaire excessif (Julius *et al.*, 2001; Woolf *et al.*, 2000). Le seuil de déclenchement de la douleur doit être suffisamment élevé pour ne pas interférer avec les activités quotidiennes, mais tout de même assez bas pour réduire le dommage au minimum (Woolf *et al.*, 2000). Ce seuil nociceptif n'est pas fixe, il est adaptatif. Ainsi, il peut être abaissé ou augmenté selon les situations (Julius *et al.*, 2001; Woolf *et al.*, 2000). Lors d'un dommage tissulaire mécanique ou infectieux, une situation de douleur aiguë, on assiste à une réponse défensive du corps par l'activation du système immunitaire et la libération de facteurs de croissance et de médiateurs inflammatoires. Ce mélange inflammatoire (cytokines, facteurs de croissance, kinines, purines, amines, prostaglandines et protons) (Woolf *et al.*, 2000) agit par : 1) activation directe des nocicepteurs induisant la douleur aiguë et la 2) sensibilisation du système nerveux somato-sensoriels (Woolf *et al.*, 2007). En effet, la sensibilisation du SN permet de protéger (prévenir le dommage supplémentaire) de

la région enflammée, pour permettre au corps de soigner la zone blessée (Julius *et al.*, 2001). Ce type de plasticité résulte parfois en une réponse mal adaptée, ce qui provoque une sensibilisation à long terme et le développement de la douleur chronique. Celle-ci n'agit alors plus à titre de réponse défensive à une insulte tissulaire, mais bien comme une pathologie (Julius *et al.*, 2001) .

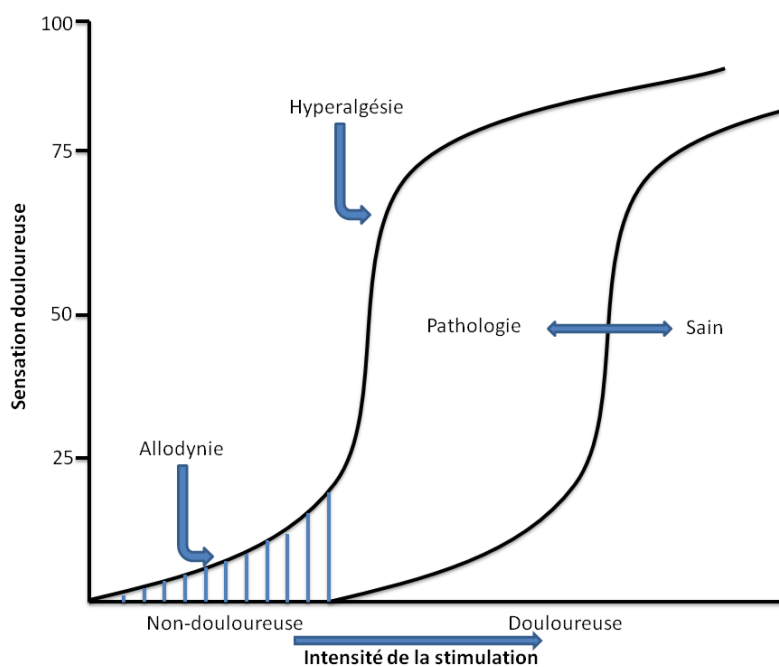
Brièvement, la sensibilisation persistante des nocicepteurs, telle qu'observée en situation de douleur chronique, résulte en deux manifestations cliniques majeures, soit l'allodynie (voir 1.12) et l'hyperalgésie (voir 1.13) (Julius *et al.*, 2001). En outre, une douleur est considérée comme chronique que si elle persiste pour une période de plus de 3 mois (Turk *et al.*, 2000) ou lorsqu'elle perdure plus longtemps que la période attendue de guérison (Turk *et al.*, 2000). Étant donné que la douleur est éprouvée sur une longue période de temps, elle influence grandement les activités quotidiennes des patients, ainsi que leur qualité de vie. En effet, une étude menée auprès d'une population hétérogène de patients souffrant de douleur chronique, a révélé que 21 % d'entre eux souffrent ou ont souffert de dépression reliée à leur douleur, que 61 % se disent incapables d'occuper un emploi, et que 46 % estiment que le traitement de leur douleur est inadéquat. De plus, seulement 2 % des personnes interrogées sont prises en charge par des cliniques de traitement de la douleur (Breivik *et al.*, 2006).

1.12. Allodynie

L'allodynie est définie comme une perception douloureuse à un stimulus non douloureux (Woolf *et al.*, 1992) (voir figure 2). Par exemple, certains patients allodyniques ressentent une sensation douloureuse au contact de leur vêtement ou des draps de leur lit. On comprend ainsi que cette manifestation clinique est hautement incapacitante et affecte grandement la qualité de vie des patients atteints. L'allodynie peut se manifester suivant des stimulations mécaniques (statiques – pressions (Attal *et al.*, 1999); dynamiques – frottements (LoPinto *et al.*, 2006)) ou thermiques (Hofstetter *et al.*, 2005). Brièvement, l'allodynie est présente dans plusieurs pathologies telles que les neuropathies, neuralgies post-herpétiques, fibromyalgies et, dans certains cas de migraine. Notez que l'étiologie mécanistique de l'allodynie reste à définir. Par contre, il semble que la perte de certains neurones, dont la cause varie d'une pathologie à l'autre, induit une réorganisation des sites de projections des fibres sensorielles (mécaneoréceptrices (A β) (Woolf *et al.*, 1992) et thermoréceptrices (A δ) (Khan *et al.*, 2002)). En fait, les fibres sensorielles afférentes forment de nouveaux prolongements collatéraux au niveau des laminae supérieures de la corne dorsale de la moelle épinière (Woolf *et al.*, 1992). Cela mène à la formation de nouvelles synapses entre les neurones afférents non nociceptifs (fibres A β et certaines fibres A δ) et des neurones de 2^e ordre généralement impliqués dans la transmission d'influx nerveux douloureux (et qui faisaient originalement synapses avec les fibres afférentes de type C) (Pitcher *et al.*, 2000). D'ailleurs, les fibres afférentes qui forment les nouveaux prolongements collatéraux adoptent un phénotype et génotype pro-inflammatoire leur octroyant la capacité de synthétiser des médiateurs excitateurs (SP, glutamate) (Pitcher *et al.*,

2000). Ces neurotransmetteurs leur permettent de stimuler les neurones des voies ascendantes supra-spinales (Pitcher *et al.*, 2000).

Figure 2 : Perception de l'allodynie et de l'hyperalgésie en fonction de l'intensité de la stimulation douloureuse



L'allodynie est une sensation douloureuse perçue suivant une situation non-douloureuse tandis que l'hyperalgésie est une sensation douloureuse exacerbée en condition pathologique. Adapté de www.MedScape.org

1.13. Hyperalgésie

L'hyperalgésie est définie comme une sensation douloureuse dont la perception est exacerbée (Julius *et al.*, 2001) (voir figure 2). Il existe deux types majeurs d'hyperalgésies, soit thermique ou soit mécanique. Notez que les mécanismes exacts à l'origine de l'hyperalgésie restent à être identifiés. L'hyperalgésie est présente dans plusieurs pathologies inflammatoires chroniques telles que le diabète, l'arthrite et celles suivant une lésion du système nerveux ou secondaires à certaines formes de cancers (Mizumura, 1997). Il semble que la génération de l'hyperalgésie thermique implique les fibres A δ et les afférences primaires non myélinisées (type C peptidergiques et non peptidergiques) (Cervero, 2009). De plus, certaines études suggèrent que l'hyperalgésie est une conséquence de l'inflammation chronique. En effet, la présence de nombreux médiateurs pro-inflammatoires, de l'augmentation du stress oxydatif, de nombreuses chémokines et de cellules immunitaires activées (voir 1.17) contribuent à sensibiliser de façon excessive et prolongée les neurones afférents (Cervero, 2009). Ce phénomène, connu sous le terme de sensibilisation centrale, facilite la génération et le passage d'influx nerveux dans les afférences sensibles, en plus d'initier la génération de décharges ectopiques ainsi que la décharge de neurones collatéraux (sensibilisés par la soupe pro-inflammatoire) (Latremolière *et al.*, 2009). Ainsi, la stimulation de nocicepteurs mène à une sommation temporelle et spatiale des influx douloureux afférents vers les centres supra-spinaux, ce qui résulte en la perception exacerbée de la stimulation initiale, et donc de l'hyperalgésie (Latremolière *et al.*, 2009).

1.14. Types de douleurs

Tel que revue par Woolf (Woolf *et al.*, 2007), la douleur se décline en trois grandes formes difficiles à distinguer. La douleur nociceptive est un mécanisme physiologique de protection de l'organisme, essentielle pour détecter et minimiser le contact avec des stimuli nociceptifs et potentiellement dangereux (Woolf *et al.*, 2007). Il s'agit du type de douleur perçu lorsqu'on touche à un objet tranchant, qu'on se brûle ou qu'on se cogne. Ce type de douleur est seulement perceptible suivant d'intenses stimulations. Son rôle protectif requiert une attention et une action immédiates, généralement sous forme de réflexe de retrait du membre endolori. La douleur nociceptive implique un grand nombre de fibres nerveuses et génère de puissants influx. Ainsi, l'activation de ces réseaux neuronaux prime sur la plupart des autres fonctions du corps et circuits neuronaux (Woolf *et al.*, 2007).

Le deuxième type de douleur est la douleur inflammatoire. Celle-ci est également adaptative et protectrice. Elle induit la sensibilisation du membre ou de la plaie endoloris ayant pour effet de protéger cette région du corps pour permettre la guérison. Cette hypersensibilité typique résulte donc en l'allodynie (voir 1.12) et l'hyperalgésie (voir 1.13). Bien que ce type de douleur soit adaptative, il s'avère parfois nécessaire de réduire son intensité, tel qu'observé chez les patients aux prises avec une inflammation chronique (arthrite rhumatoïde ou situation de dommages tissulaires sévères et prolongés) (Woolf *et al.*, 2007).

Finalement, le dernier type de douleur est la douleur pathologique. Celle-ci ne joue pas de rôle protectif, est non modulable et résulte du fonctionnement anormal du système nerveux (SN). Ce type de douleur peut résulter d'un dommage au SN (neuropathie) ou d'un désordre du SN (fibromyalgie, syndrome du colon irritable, céphalée de tension et cystite interstitielle). La douleur pathologique est le type de douleur pour lequel le besoin de raffinement des traitements est le plus grand. En résumé, la douleur nociceptive est déclenchée en présence d'intenses stimuli nociceptifs. La douleur inflammatoire est secondaire à une blessure et la douleur pathologique est une « fausse alarme » déclenchée par un mauvais fonctionnement du SN (Woolf *et al.*, 2007).

1.15. Sensibilisation centrale

La douleur inflammatoire et pathologique est caractérisée par la présence de douleur en absence de stimuli. Il s'avère que le SN subit d'importants changements structurels (plasticité) lorsqu'il est exposé à des médiateurs inflammatoires et facteurs de croissance. Ces changements se produisent au niveau des nocicepteurs qui deviennent sensibilisés en condition inflammatoire (Woolf *et al.*, 2007). En fait, les neurones acquièrent un stade d'hyperexcitation dans lequel ils peuvent déclencher de façon spontanée des potentiels d'actions (décharges ectopiques) (Devor, 2009). Ces changements, ainsi que d'autres, sont observés aux niveaux périphérique et central, et ont pour conséquence de faciliter la transmission des influx nerveux, phénomène connu comme la sensibilisation centrale (Woolf, 2011). Celle-ci résulte en l'abaissement du seuil de décharge des potentiels d'action, ainsi qu'en l'augmentation

de l'amplitude, de la durée et de la distribution spatio-temporelle des influx nerveux. Conséquemment, une sensation douloureuse peut être perçue en l'absence totale de stimulus (Woolf, 2011). En conclusion, l'élucidation des changements dans le système, le lieu et la manière dont ils surviennent, ainsi que les mécanismes moléculaires impliqués dans ces processus, présentent un énorme potentiel thérapeutique et doivent faire l'objet d'études approfondies. Également, il semble que certaines personnes possèdent une sensibilité génétique à développer des douleurs chroniques (Woolf, 2011). Ainsi, définir la population à risque et trouver des outils pharmacologiques appropriés pour les soulager constituent également une avenue à investiguer davantage (Woolf, 2010a).

En fait, l'étude des mécanismes de la douleur s'est surtout concentrée sur la moelle épinière. Par contre, de récentes données obtenues grâce à la neuro-imagerie ont permis de mettre en lumière les niveaux d'activation de certains noyaux cérébraux en situation de douleur chronique. Entre autres, ces études ont permis l'élaboration d'une « matrice de la douleur » (Moisset *et al.*, 2007). D'ailleurs, l'intensité, le temps, la qualité et les associations émotionnelles ainsi que le rôle de la distraction, de l'humeur et de l'attention dans l'intégration de la douleur, ont pu être révélés grâce à ces travaux (Bingel *et al.*, 2008). De plus, ces données démontrent l'existence d'une réorganisation de certains noyaux cérébraux normalement non impliqués dans la transmission de la douleur, révélant le phénomène de plasticité neuronale et de sensibilisation centrale (Moisset *et al.*, 2007) (voir 1.16).

1.16. SNC et transmission de la douleur

Les nocicepteurs présents sur les fibres afférentes A δ et C permettent de percevoir la douleur qu'ils transmettent ensuite au niveau de la moelle épinière. Les neurones de 2^e ordre amènent alors les influx nerveux vers les centres supérieurs pour l'intégration de l'information. Cependant, il semble que certaines cellules immunes du SNC participent au processus de transmission des influx nerveux (Zhuo *et al.*, 2011). Notez que ces cellules jouant un rôle immun au niveau basal, acquièrent un phénotype et génotype pro-inflammatoire en situation de douleur chronique, et peuvent ainsi moduler le niveau de perception des influx nerveux douloureux (Tsuda *et al.*, 2005). Nous allons nous attarder plus spécifiquement sur le rôle des cellules gliales (microglies et astrocytes) dans la modulation des influx nerveux douloureux ascendants (Tsuda *et al.*, 2005).

1.17. Cellules gliales

Les cellules gliales sont des cellules non neuronales présentes au niveau du SNC (Barres, 2008). Il est d'ailleurs estimé que, pour chaque neurone du SNC, il existe une cellule gliale qui le supporte. La traduction du terme grec *glia* en français signifie colle. Cette définition du rôle des cellules gliales comme la colle du SNC est bien sûr un peu simpliste (Barres, 2008). En fait, elles jouent un rôle dans le maintien de l'homéostasie du SNC via la formation de la myéline, le support et la protection des neurones (Jessen *et al.*, 1980). Plus spécifiquement, elles entourent les neurones et contribuent à les maintenir en place, elles régulent leur apport en nutriments et oxygène, elles les protègent des pathogènes et éliminent les cellules mortes du SNC

(Barres, 2008). Fait intéressant, on croyait, et ce durant plus d'un siècle, que les cellules gliales ne participaient pas à la neurotransmission. Il s'avère cependant que cette conception est fautive, bien que les mécanismes mis en cause ne soient pas encore totalement compris (Araque *et al.*, 1999).

1.17.1. Les cellules de la microglie

Le rôle des cellules de la microglie en condition physiologique ainsi que dans la transmission de la douleur est exhaustivement décrit à la section 10.0.

1.17.2. Astrocytes

Astrocyte est un terme grec signifiant cellule étoilée (Matyash *et al.*, 2010). Notez que ces cellules se retrouvent exclusivement au niveau de la moelle épinière et du cerveau. Il fut rapidement établi (19^e siècle) que les astrocytes constituent une population extrêmement hétérogène, initialement divisée en deux classes selon leur localisation au niveau des zones cérébrales (matière grise ou blanche) (Matyash *et al.*, 2010). En outre, les travaux d'Emsley et Macklis (Emsley et Macklis, 2006) révélaient récemment que ces cellules se déclinaient plutôt en neuf types distincts, soulignant également une importante variabilité des niveaux d'expression des astrocytes dans les différentes régions du cerveau ainsi que la co-existence de plusieurs types d'astrocytes dans une même région. D'ailleurs, il s'avère que les astrocytes sont généralement identifiables par l'expression de la protéine acide fibrillaire gliale (GFAP), bien que certains sous-types n'expriment que la protéine d'arrimage du calcium S100 beta

(S100 β) (Matyash et al., 2010). Notez cependant que cette classification est réalisée en condition non-pathologique et que celle-ci devrait être davantage complexe en situation inflammatoire. D'ailleurs, le rôle précis de chacun des sous-types d'astrocytes demeure à définir (Matyash et al., 2010). Il est cependant démontré qu'ils contribuent au support biochimique des neurones et cellules de l'endothélium vasculaire, à la formation de la barrière hémato-encéphalique (régulation des échanges de nutriments entre le SNP et le SNC), à créer une réserve de nutriments pour le SNC (approvisionnement des cellules), au maintien de l'homéostasie ionique du milieu extracellulaire et à la réparation du SNC lors de traumatismes physiques (Gao *et al.*, 2010; Scholz *et al.*, 2007). En outre, certains travaux réalisés au milieu des années 1990 ont démontré que les astrocytes contribuaient à propager les « vagues » calciques sur de grandes distances (Torres *et al.*, 2012). Brièvement, les astrocytes sont liés par des jonctions de type Gap pour former un syncytium (Bennett *et al.*, 2003). Ainsi, le calcium voyage en vagues par l'entremise du passage d'influx nerveux d'un astrocyte à l'autre. En somme, les influx voyagent directement d'une cellule à l'autre (propagation de contact) ou par la relâche d'*acides aminés excitateurs* (EAA) qui stimulent les astrocytes adjacents (Newman, 2001). De plus, il semble que les astrocytes ont la capacité de relâcher certains neurotransmetteurs excitateurs tels que le glutamate (voir 3.4). D'ailleurs, le passage des vagues calciques s'avère suffisant pour permettre la relâche du glutamate qui peut alors agir sur les neurones pré- et post-synaptiques (Parpura *et al.*, 2000). Cette dernière aptitude des astrocytes révèle alors leur capacité de communiquer avec les neurones et de moduler leur niveau d'excitation (potentiel membranaire) (Fiacco *et al.*, 2009). De fait, une conception

originale de la synapse est maintenant mise de l'avant. Il s'agit du concept de synapse tripartite comprenant les neurones pré- (afférences sensitives primaires) et post- (neurones de 2^e ordre) synaptiques, ainsi que les astrocytes (Araque *et al.*, 1999; Scholz *et al.*, 2007). Il s'avère que ceux-ci expriment la plupart des neuromédiateurs inflammatoires ainsi que leurs récepteurs. Ainsi, les neurotransmetteurs relâchés par les afférences sensitives peuvent stimuler de façon concomitante les neurones de 2^e ordre et les astrocytes (Milligan *et al.*, 2009). Ces derniers relâchent à leur tour certains médiateurs contribuant au processus de sensibilisation des neurones de 1^{er} et 2^e ordres, phénomène à l'origine de la sensibilisation centrale (voir 1.15) et des douleurs chroniques (voir 1.11) (Araque *et al.*, 1999).

2.0. Facteur de transcription

2.1. Le complexe NF-κB

Les chaînes légères du facteur nucléaire de transcription kappa des cellules B activées (NF-κB) est un complexe protéique qui contrôle la transcription de l'ADN et fut découvert par le Dr David Baltimore en 1986 (Sen *et al.*, 1986). Ce complexe est ubiquitaire et il est impliqué dans la réponse inflammatoire. En effet, il est activé en situation de stress cellulaire ou suivant l'exposition à des cytokines pro-inflammatoires (*Interleukine-1beta* (IL-1β) et le *facteur de nécrose tumorale – alpha* (TNF-α)), *espèces réactives oxygénées* (ROS), lumière ultraviolette, bactéries ou antigènes viraux (Tergaonkar, 2006). Le NF-κB est également impliqué dans la plasticité synaptique et la mémoire. De plus, des défauts de régulation du NF-κB sont reliés au développement de certains cancers et maladies auto-immunes (Garg *et al.*,

2002). Le NF- κ B fait partie de la classe des facteurs de transcription à action rapide. En effet, son activation ne nécessite la synthèse d'aucune protéine (contrastant avec la voie de c-Jun ou du *transducteur de signal et activateur de la transcription* (STAT)) (Tergaonkar, 2006).

En situation non-inflammatoire, le NF- κ B (formé des protéines p50/p65) est séquestré dans le cytoplasme des cellules par une famille d'inhibiteur nommée I κ B (formant le *modulateur essentiel du NF- κ B* (NEMO) (Hayden *et al.*, 2012) (voir figure 3). Le I κ B masque les séquences de signalisation nucléaire du NF- κ B (Ghosh *et al.*, 2012). L'activation du NF- κ B est d'abord initiée via la dégradation du complexe NEMO (Baker *et al.*, 2011). En fait, la stimulation d'un récepteur membranaire mène à l'activation d'une protéine, le *I κ B kinase* (IKK) qui va ensuite phosphoryler le complexe NEMO (sérines 32 et 36), menant à son ubiquitination et à sa dégradation par la voie du protéasome (Hayden *et al.*, 2012). Une fois libéré de l'emprise de NEMO, le NF- κ B peut ensuite se déplacer au noyau et se lier aux gènes possédant une région d'*acide désoxyribonucléique* (ADN) spécifique pour le NF- κ B (soit : un motif GGGRNNYYCC ou HGGARNYYCC) (Hayden *et al.*, 2011). La sous-unité p65 est alors phosphorylée ce qui mène à la transcription du gène et à différents effets physiologiques, tel que l'augmentation de la réponse inflammatoire (Baker *et al.*, 2011). Également, le NF- κ B induit la transcription de gènes impliqués dans la formation du complexe NEMO ce qui a pour effet de réfréner sa propre expression, ce type de réponse étant impliquée dans une boucle de rétrocontrôle négatif (Hayden *et al.*, 2012). En terminant, le NF- κ B peut-être activé par une voie non canonique

(Hayden *et al.*, 2012). Celle-ci implique la *kinase inductible du NF- κ B* (NIK), qui phosphoryle la sous-unité p100 menant à la formation de p52 qui forme ensuite un dimère avec RelB (sous-type de NF- κ B) et active la transcription de certains gènes spécifiques (Hayden *et al.*, 2011). Le NF- κ B constitue une cible thérapeutique importante dans le traitement du cancer et des maladies inflammatoires (Baker *et al.*, 2011). En outre, certaines drogues telles que le disulfiram (alcoolisme) et olmesartan (hypertension) furent développées pour inhiber la cascade de signalisation du NF- κ B (Ghosh *et al.*, 2012).

3.0.Médiateurs de la douleur

3.1.Cytokines

Les cytokines sont considérées comme de petites molécules de signalisation impliquées dans la communication intercellulaire (Goodman *et al.*, 2006), principalement au niveau de la modulation du système immunitaire et du développement embryonnaire (Saito, 2001). Les cytokines forment une famille très large de molécules, incluant des protéines, peptides et glycoprotéines (Goodman *et al.*, 2006). Le niveau physiologique de circulation des cytokines est de l'ordre du picomole et leur niveau augmente d'environ 1000 fois en condition inflammatoire ou infectieuse, par opposition aux hormones qui ont des niveaux circulant de l'ordre du nanomole et dont le niveau peut être augmenté de 10 fois (Goodman *et al.*, 2006). Les cytokines peuvent être sécrétées par virtuellement toutes les cellules nucléées (majoritairement par les cellules endothéliales, épithéliales et immunes), ce qui

contraste avec les hormones généralement sécrétées par une cellule spécifique (par exemple, T3 sécrété par la glande thyroïde) (Goodman *et al.*, 2006). Bien sûr, chaque cytokine possède son propre récepteur membranaire qui, lorsqu'il est activé, induit une cascade d'évènements intracellulaires pouvant mener aux changements d'expression de plusieurs gènes pro- ou anti- inflammatoires (Schafers *et al.*, 2008). Notez que les cytokines sont divisées en 5 types majeurs, soit les interférons, les facteurs de nécrose tumorale, les facteurs de croissance, les chémokines et les interleukines (Schafers *et al.*, 2008). Dans le cadre de cette thèse, nous nous concentrerons sur le rôle de deux cytokines pro-inflammatoires, soit l'*interleukine-1 β* (IL-1 β) et le *facteur de nécrose tumorale- α* (TNF- α).

3.1.1. Interleukine

Le terme interleukine référait initialement aux molécules ayant une action sur les leucocytes. En fait, *inter* signifie interaction, tandis que *leukin* désigne leucocyte (Ren *et al.*, 2009). Cette définition est maintenant obsolète, puisque de nouvelles molécules nommées interleukines (IL) ne possèdent pas d'action sur les leucocytes. En effet, il est maintenant évident que la plupart des cellules peuvent sécréter des IL et peuvent être stimulées par celles-ci. Actuellement, plus de 35 types d'IL ont été découvertes, possédant chacune des actions variées.

3.1.1.1. Interleukine-1 β

L'interleukine-1 β (IL- β), aussi connue sous l'appellation de cataboline, est une cytokine pro-inflammatoire encodée chez l'humain sur le chromosome 2 (113.59Mb), en compagnie de 8 autres cytokines dans le « cytokine gene cluster » (Auron *et al.*, 1984). L'IL- β fut découverte par Gery en 1972 et initialement nommée *facteur d'activation des lymphocytes* (LAF) (Gery *et al.*, 1972). C'est seulement en 1985 qu'on réalisa que la LAF était en fait deux protéines distinctes, soit l'interleukine-1 α et l'interleukine-1 β (March *et al.*, 1985). L'IL-1 β est hautement inductible. Elle est sécrétée et possède des actions paracrines et autocrines, tandis que l'IL-1 α , également inductible, est exclusivement exprimée à la surface des cellules (Vezzani *et al.*, 2008). En fait, IL-1 β est produite sous la forme d'une pro-protéine et elle est clivée par une caspase de type 1, nommée IL- β convertase (ICE), menant à la formation de la protéine active (163 *acides aminés* (aa); 17.5 *Kilodalton* (kDa)) (Bensi *et al.*, 1987). Notez qu'il existe un anticorps monoclonal, le canakinumab, qui permet de sélectivement capturer l'IL-1 β circulant, prévenant ainsi l'activation de son récepteur et son action pro-inflammatoire (Dhimolea, 2010). D'ailleurs, IL-1 β et IL-1 α possèdent le même récepteur nommé *récepteur à l'interleukine-1* (IL-1R). L'IL-1R est un récepteur de type tyrosine kinase (voir figure 3) couplé à la voie du *gène de réponse primaire de la différenciation des cellules myéloïdes* (MyD88) / *kinase associé à l'interleukine 1* (IRAK) / *facteur 6 associé au récepteur du TNF* (TRAF6) (Medzhitov, 2001; Medzhitov *et al.*, 1998; Muzio *et al.*, 1997). TRAF6 est connu pour activer *MAP kinase kinase 6* (MKK6), ce qui entraîne l'activation des *protéines kinase activatrice mitogène* (MAPK) p38 et la *kinase Janus activée* (JNK), ainsi que pour

activer NIK menant à la phosphorylation de la *protéine associée au I-kappaB* (IKAP) et à la translocation nucléaire du facteur de transcription NF- κ B (voir 2.1) (Ghosh *et al.*, 2012). Brièvement, cette cytokine joue un rôle clé dans la réponse inflammatoire et elle est également impliquée dans une variété de processus cellulaires tels que la prolifération, la différenciation et l'apoptose (Ren *et al.*, 2009). Il fut démontré que la sécrétion d'IL-1 β mène à l'expression centrale de la *cyclo-oxygénase 2* (COX-2), ce qui contribue au développement de la douleur inflammatoire (Ren *et al.*, 2009). En effet, IL-1 β est d'un intérêt très particulier, puisqu'elle est sécrétée dans les conditions inflammatoires et de douleurs neuropathiques (Ren *et al.*, 2009), et puisque sa concentration est augmentée dans le *liquide cérébro-spinal* (CSF) de patients souffrant de douleur chronique (Alexander *et al.*, 2012). L'utilisation d'anticorps a permis de faire rétrocéder la douleur chez des souris aux prises avec des douleurs neuropathiques (Ren *et al.*, 2009). De plus, la délétion génétique de l'IL-1R ou l'augmentation des niveaux endogènes de l'antagoniste circulant de l'IL-1R, limite le développement des neuropathies chez les souris ayant subi un *dommage nerveux périphérique* (PNI) (Wolf *et al.*, 2006). Des données similaires sont rapportées chez des souris invalidées pour le gène de IL-1 β (Honore *et al.*, 2006).

3.1.2. TNF- α

Le TNF- α fut initialement découvert par le Dr Granger (Kolb *et al.*, 1968) et le Dr Ruddle (Ruddle *et al.*, 1968), en 1968. Le Dr Granger a rapporté la découverte d'un facteur cytotoxique produit par les lymphocytes et nommé lymphotoxine (Ruddle *et*

al., 1968). En 1984, l'*ADN complémentaire* (ADNc) du TNF- α fut cloné pour la première fois (Old, 1985; Pennica *et al.*, 1984). Il s'avère que le gène responsable de l'expression du TNF- α se retrouve sur le chromosome 6p21.3 humain. Celui-ci mesure près de 3 Kb et contient 4 exons (Old, 1985). Le TNF- α est d'ailleurs composé de 212 aa arrangés en protéines transmembranaires (26 kDa). La forme soluble du TNF- α est relâchée par le clivage protéolytique de son précurseur transmembranaire par l'*enzyme de conversion du TNF alpha* (TACE, également nommée ADAM17) (Belarbi *et al.*, 2012). La TACE génère une forme soluble (17 kDa) et une forme membranaire de TNF- α (Belarbi *et al.*, 2012). La forme soluble, ayant des actions autocrines et paracrines, forme un homotrimère en solution via la formation de liaisons non covalentes. En outre, la forme membranaire est également active et semble impliquée dans la communication intercellulaire (Belarbi *et al.*, 2012).

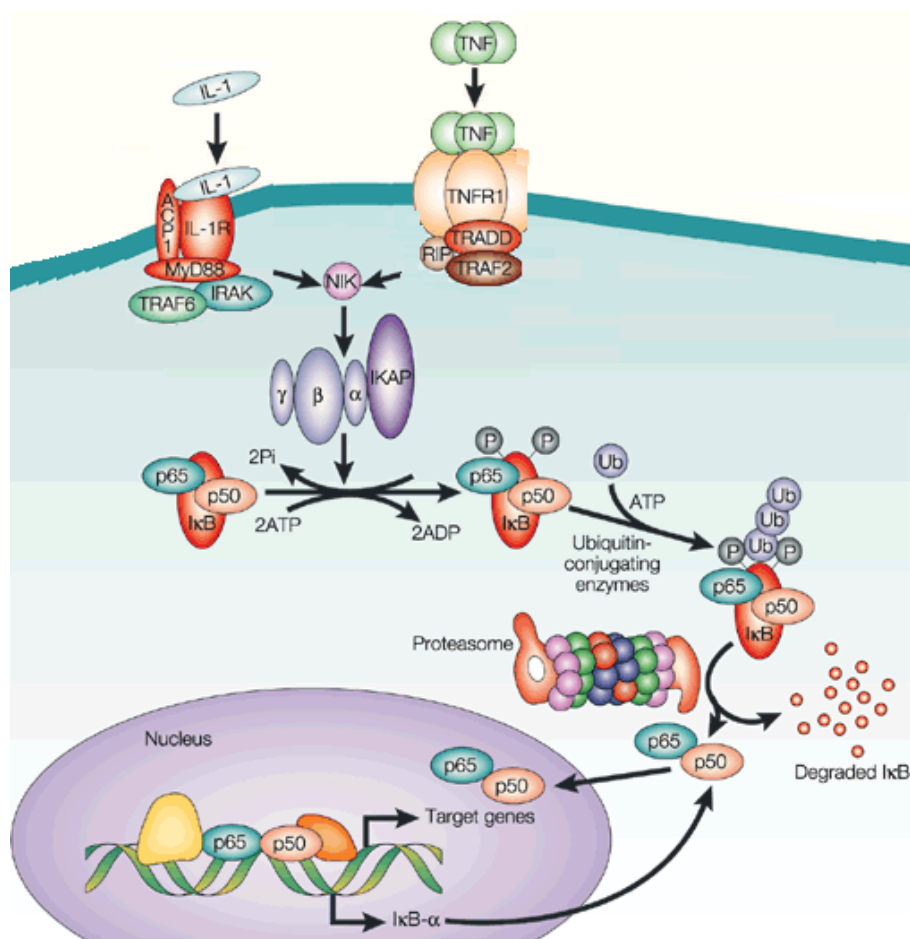
Le TNF- α génère son activité en stimulant deux types de récepteurs transmembranaires ci-nommés TNF-R1 (p55/p60) et TNF-R2 (p75/p80) (Belarbi *et al.*, 2012). Le TNF-R1 (constitutif) est exprimé sur la plupart des cellules et peut être activé par la forme membranaire et circulante du TNF- α , par opposition au TNF-R2 (inductible) qui est exclusivement exprimé sur les cellules immunitaires, et dont l'activation est limitée aux formes membranaires de TNF- α (Leung *et al.*, 2010). La liaison du TNF- α à son récepteur induit un changement de conformation de celui-ci, ce qui permet le recrutement du récepteur au TNF associé au domaine de la mort (TRADD) (Leung *et al.*, 2010). Notez que les TNF-R sont des récepteurs de type

tyrosine kinase. En résumé, les TNF-R sont impliqués dans l'activation de trois voies de signalisation majeures : 1) activation de la voie NF- κ B, 2) activation de la voie JNK/MAPK et p38/MAPK et 3) activation de la voie caspase 3 (apoptose cellulaire) (Chen *et al.*, 2002; Wajant *et al.*, 2003).

- 1) La voie du NF- κ B (voir 2.1). L'activation de TRADD (voir figure 3) mène à la mobilisation du *facteur 2 de recrutement du TNF* (TRAF2) et de la *protéine d'interaction au récepteur* (RIP) (Bouwmeester *et al.*, 2004; Wajant *et al.*, 2003). TRAF2 provoque l'arrivée du complexe IKK, qui est alors activé par l'activité sérine-thréonine kinase de RIP. IKK va alors phosphoryler la sous-unité inhibitrice IK β α . Cette dernière relâche ensuite le NF- κ B qui peut alors se déplacer dans le noyau pour aller activer son promoteur nucléaire.
- 2) Le TNF- α est fortement lié à l'activation de la voie JNK (stress), modérément à la voie p38, et faiblement à la voie du *récepteur kinase extracellulaire* (ERK) (Wajant *et al.*, 2003). Brièvement, l'activation de TRADD provoque le recrutement du complexe TRAF2/Rac qui, par l'entremise de plusieurs protéines de l'axe des *kinases de lignages mixtes 2* (MLK2)/MLK3, mène à la phosphorylation de la *MAP kinase kinase 7* (MKK7). Cette dernière active directement JNK qui se déplace au noyau et active les facteurs de transcription c-Jun et *facteur de transcription activé 2* (ATF2).

3) L'activation de TNF-R1 mène parfois à l'apoptose (Micheau *et al.*, 2003). Par contre, cette voie joue un rôle mineur dans la myriade d'actions pro-inflammatoires du TNF- α . De plus, l'activation de la voie NF- κ B a un rôle inhibiteur dans l'activité pro-apoptotique du TNF- α . Brièvement, le *facteur associé au récepteur du TNF* (TRAF) recrute la *protéine FAS associée au domaine de la mort* (FADD) qui active la caspase 8. L'accumulation d'une quantité suffisante de caspase 8 entraîne le recrutement d'autres caspases, incluant la caspase 3, puis à l'apoptose cellulaire (Wajant *et al.*, 2003).

Figure 3 : Voie d'activation du NF- κ B par l'IL-1 β et le TNF- α



L'interleukine-1 β (IL-1 β) et le facteur de nécrose tumorale alpha (TNF- α) activent respectivement leur récepteur membranaire, soit l'IL-1R et le TNF-R. Ces récepteurs de type tyrosine kinase mènent, via le recrutement de nombreux seconds messagers, à l'activation de la kinase inductible du NF- κ B (NIK). NIK induit alors la phosphorylation du complexe NEMO (formé des sous-unités p65, p50 et I κ β) entraînant l'ubiquitination de la sous-unité I κ β . Le complexe est alors dirigé vers le protéasome où la sous-unité I κ β est détruite. Les sous-unités p50/p65 se dirigent alors vers le noyau où elles initient la synthèse de certains gènes pro-inflammatoires. Adapté de Nguyen (Nguyen *et al.*, 2002).

Adénosine diphosphate (ADP); Adénosine triphosphate (ATP); Gène de réponse primaire de la différenciation myéloïde (MyD88); Kinase associée à l'interleukine 1 (IRAK); Facteur associé au récepteur du TNF 2 (TRAF2); Facteur associé au récepteur du TNF 6 (TRAF6); Phosphatase acide 1 (ACP1); Protéine d'interaction au récepteur (RIP); Ubiquitine (Ub).

Le TNF- α possède une grande variété d'actions qu'il mène généralement de concert avec IL-1 β et IL-6 (Leung *et al.*, 2010). Le TNF- α est une puissante cytokine pro-inflammatoire connue pour jouer un rôle clé dans l'initiation de la réponse inflammatoire et douloureuse (Belarbi *et al.*, 2012). Le TNF- α , également connu sous le vocable cachexine, est surtout connu pour son rôle dans la régulation des cellules immunitaires (Chatzidakis *et al.*, 2010). De plus, il semble être pro-pyrogène, pro-apoptotique, pro-inflammatoire, anti-tumorigénique, et semble faire rétrocéder la réplication virale (Andrade *et al.*, 2011). Le TNF- α est impliqué dans plusieurs fonctions du SNC (McCoy *et al.*, 2008), incluant la régulation de l'activation des cellules de la microglie (voir 1.17.1) (Merrill, 1991), la régulation de la transmission glutamatergique (voir 3.4) (Pickering *et al.*, 2005) et synaptique (Beattie *et al.*, 2002). D'ailleurs, on retrouve des niveaux élevés de TNF- α dans plusieurs pathologies neuro-inflammatoires telles que la maladie d'Alzheimer (Paganelli *et al.*, 2002) et le Parkinson (Mogi *et al.*, 1994). Fait intéressant, l'activité du TNF- α peut être prévenue au moyen d'anticorps monoclonaux bloquants, ci-nommés infliximab (traitement de la maladie de Crohn (Van den Brande *et al.*, 2003)), adalimumab (traitement de l'arthrite rhumatoïde (Kempner, 1999)) et certolizumab (traitement de l'arthrite rhumatoïde (Kaushik *et al.*, 2005)) ou au moyen d'une protéine de fusion prenant la forme d'un récepteur circulant, soit etanercept (traitement de l'arthrite rhumatoïde (Peppel *et al.*, 1991)). De plus, des biopsies nerveuses de patients souffrants de neuropathies ont montré une augmentation des niveaux de TNF- α , particulièrement sur les cellules de Schwann (Empl *et al.*, 2001). Par ailleurs, les neuropathies induites par le *syndrome d'immunodéficience acquise* (SIDA) et la chimiothérapie (traitement du cancer)

induisent une relâche massive de TNF- α , ce qui mène au développement de neuropathies périphériques (Drory *et al.*, 1998; Lin *et al.*, 1997). Aussi, l'administration exogène de TNF- α dans les ganglions de la racine dorsale (DRG) de la moelle épinière, mène au développement de neuropathies (Shubayev *et al.*, 2002). En fait, de nombreuses études ont révélé que le TNF- α contribue au développement des neuropathies périphériques et centrales (Jancalek *et al.*, 2010; Schafers *et al.*, 2003a; Watkins *et al.*, 2000; Watkins *et al.*, 1995). Pour ce faire, le TNF- α , via l'activation de p38 MAPK (Schafers *et al.*, 2003b), potentialise l'activation des cellules gliales (Ji *et al.*, 2006), contribue à la plasticité neuronale et à la *potentialisation à long terme* (LTP) (Beattie *et al.*, 2002), ainsi qu'à la relâche d'*adénosine triphosphate* (ATP) (pro-neuropathique) (Suzuki *et al.*, 2004). Finalement, le TNF- α augmente l'activité du *récepteur à la tétrodotoxine* (TTX-R) (Jin *et al.*, 2006) ainsi que la conductance des ions K⁺ (Czeschik *et al.*, 2008) menant à l'hyperexcitabilité neuronale, soit la sensibilisation des nocicepteurs.

3.2. Monoxyde d'azote (NO)

Les travaux du Dr Culotta (1992) ont permis de démontrer pour la première fois qu'un gaz, le monoxyde d'azote (NO), peut jouer un rôle dans la neurotransmission (Culotta *et al.*, 1992). Il s'avère que le NO joue un rôle clé dans la transmission de la douleur, la défense immunitaire, la mort cellulaire ainsi que dans la motilité cellulaire (Miclescu *et al.*, 2009). Brièvement, la L-arginine et l'oxygène sont transformés en monoxyde d'azote et L-citruline, sous l'action de *l'enzyme de synthèse du monoxyde d'azote* (NOS) (Miclescu *et al.*, 2009). Il existe 3 isoformes de NOS, nommées en

fonction de leur localisation, soit NOS *neuronale* (nNOS), NOS *endothéliale* (eNOS) et NOS *inductible* (iNOS). La iNOS est induite par plusieurs facteurs tels que l'exposition à des *endotoxines bactériennes* (LPS) ou à des cytokines pro-inflammatoires (Knowles *et al.*, 1994). L'isoforme prédominante du SNC est la nNOS, bien qu'on retrouve également la eNOS au niveau des vaisseaux sanguins cérébraux ainsi que des astrocytes (Wiencken *et al.*, 1999). Les nNOS et eNOS génèrent de faible quantité de NO comparativement à la iNOS. Celle-ci peut en effet générer suffisamment de NO pour tuer les micro-organismes qui envahissent le corps (MacMicking *et al.*, 1997). Notez que les différentes isoformes de NOS sont encodées par des chromosomes distincts et possèdent une homologie de séquence d'environ 50 à 60% (Stuehr *et al.*, 1997).

Fait intéressant, les NOS sont seulement actives sous forme d'homodimère. Elles sont formées de deux sous-unités catalytiques, soit l'oxygénase (site de liaison de la L-arginine, de l'oxygène, de la tétrahydrobioptérine et de l'hème) et la réductase (site de liaison du NADPH et du FAD) (Stuehr *et al.*, 1997). Ces deux sous-unités sont liées entre elles par un complexe calcium/calmoduline. Notez que le complexe des eNOS et nNOS possède une faible affinité pour le calcium. Ainsi, ces enzymes ne sont pas actives en condition physiologique (Förstermann *et al.*, 1995). Pour être actives, elles doivent être exposées à des concentrations élevées de calcium. Ce phénomène contraste avec la iNOS dont le complexe calcium/calmoduline possède une affinité élevée pour le calcium (Förstermann *et al.*, 1995). En conclusion, une fois exprimée, les niveaux physiologiques de calcium sont suffisants pour mener à l'activation

prolongée de la iNOS (en présence de cofacteurs et substrats appropriés) (Stuehr et al., 1997).

Le NO est reconnu pour activer l'*enzyme guanylate cyclase* (GC) (une enzyme soluble et distribuée dans le cytoplasme cellulaire) et produire du *guanosine cyclique monophosphate* (GMPc) (Miclescu et al., 2009). Celui-ci est un second messager très important au niveau cardiovasculaire (vasodilatation) et au niveau du SNC (transmission synaptique) (Miclescu et al., 2009). Le GMPc active certains seconds messagers tels que la *protéine kinase dépendante du GMPc* (PKG-1). La PKG-1 est exprimée dans la moelle épinière et participe à la transmission synaptique des influx nerveux douloureux (Qian et al., 1996; Schmidt et al., 2002) via la synthèse de la SP (médiateur douloureux) (Tegeder et al., 2004), phénomène contribuant au développement de l'hyperalgésie (Meller et al., 1992; Tao et al., 2000; Xu et al., 2007). L'axe NO-GC-GMPc active également d'autres seconds messagers. En fait, l'activité antidouleur de certaines drogues impliquées dans le traitement des douleurs neuropathiques telles que le tramadol (Dal et al., 2006), la clonidine (Ge et al., 2006), la gabpentine (Mixcoatl-Zecuatl et al., 2006) et l'indométhacine (Ventura-Martinez et al., 2004) s'explique en partie par le blocage de ces seconds messagers. En outre, le NO semble participer au processus de sensibilisation centrale (Miclescu et al., 2009). En effet, le NO pourrait agir sur les fibres A δ innervant la corne dorsale de la moelle épinière contribuant à la relâche de la SP et du CGRP (Aimar et al., 1998; Riedel et al., 2001). De plus, une grande partie de l'activité pro-nociceptive de l'*acide N-méthyl-D-aspartique* (NMDA) (hyperalgésie secondaire) (Meller et al., 1993; Urban et al., 1999) et des prostaglandines (Mollace et al., 2005) serait reliée à la relâche

secondaire de NO. D'ailleurs, l'administration intracutanée de NO chez l'humain produit une vive douleur (dose dépendante) (Holthusen *et al.*, 1994). Également, l'administration intrathécale de donneur du NO induit de la douleur (Roche *et al.*, 1996), alors que le blocage des NOS avec le *L-NG-Nitroarginine methyl ester* (L-NAME) (bloqueur non sélectif des NOS) produit une analgésie (Bredt *et al.*, 1991). Aussi, Moore a démontré que le blocage de la biosynthèse du NO avait un effet anti-nociceptif chez la souris (Moore *et al.*, 1991). Fait intéressant, la délétion génétique ou l'inhibition pharmacologique de la nNOS supprime l'hypersensibilité mécanique présente dans des modèles de douleurs neuropathiques associées à un dommage nerveux (Guan *et al.*, 2007). L'utilisation d'animaux invalidés pour la iNOS a démontré que cette enzyme participe à la régénération tissulaire secondaire à un dommage nerveux (Levy *et al.*, 2001). De plus, elle est augmentée en situation inflammatoire induite par le zymosan (Guhring *et al.*, 2001) et participe au développement de l'hypersensibilité douloureuse dans des modèles de douleurs neuropathiques et inflammatoires (Sung *et al.*, 2004). La fonction de la eNOS dans la douleur est plus marginale. Elle participe à la vasodilatation des vaisseaux en condition inflammatoire, contribuant à l'arrivée de cellules immunes et à la sévérité de l'inflammation, ce qui peut mener au développement d'une douleur chronique (Salerno *et al.*, 2002). En outre, le NO peut réagir avec des radicaux libres intracellulaires tels que l'anion superoxyde, pour former le *peroxynitrite* (ONOO⁻) une molécule extrêmement réactive. D'ailleurs, les *espèces réactives oxygénées* (ROS) ou le *stress nitrosatif* (RNS) sont des médiateurs inflammatoires importants qui sont

impliqués dans les maladies neurodégénératives, les maladies cardiovasculaires et la douleur (Ndengele *et al.*, 2008; Wang *et al.*, 2004).

3.3. Substance P

La *substance P* (SP) fut découverte en 1931 par Ulf von Euler et John H. Gaddum, pour sa capacité à induire la contraction des intestins. En fait, la SP est un neuropeptide, plus spécifiquement un undécapeptide (Arg-Pro-Lys-Pro-Gln-Gln-Phe-Phe-Gly-Leu-Met) qui agit à titre de neurotransmetteur et de neuromodulateur (Datar *et al.*, 2004; Harrison *et al.*, 2001). Celui-ci appartient à la classe des tachykinines, dont le nom provient de leur capacité à causé la contraction rapide des tissus (Carter *et al.*, 1990). Les tachykinines sont caractérisées par la présence d'une séquence C-terminale consensus (Phe-X-Gly-Leu-Met-NH₂ où X est un acide aminé aromatique ou aliphatique). Les gènes codant pour les tachykinines sont traduits sous formes de pro-protéines, soit de préprotachykinines (Datar *et al.*, 2004). Celles-ci, sous l'action protéolytique de plusieurs enzymes, produisent la SP ainsi que les neurokinines A et B et les neuropeptides K et gamma (Datar *et al.*, 2004). Brièvement, les tachykinines sont des neurotransmetteurs excitateurs produisant des effets comportementaux, vasodilatateurs et musculo-constricteurs (Datar *et al.*, 2004). Il existe 3 *récepteurs des tachykinines* (NK-1R, NK-2R et NK-3R), tous des GPCR qui sont préférentiellement couplés à la protéine G α_q . Ainsi, leur stimulation induit l'activation de la phospholipase C, le clivage du phosphoinositol biphosphate (PIP₂), la production de *diacylglycérol* (DAG) et d'*inositol triphosphate* (IP₃) (Datar *et al.*, 2004). Ce dernier

va se lier à son récepteur (IP₃R) présent à la surface du réticulum endoplasmique, ce qui induit un changement de conformation des canaux calciques voltage dépendant, et une augmentation de la concentration de calcium intracellulaire (Maggi, 1995). Les trois récepteurs des tachykinines possèdent des affinités différentes pour chaque tachykinine. En effet, le NK-1R est préférentiellement stimulé par SP>NKA>NKB, tandis que NK-2R l'est par NKA>NKB>SP et le NK-3R par NKB>NKA>SP (Gerard *et al.*, 1991). La stimulation du NK-1R par la SP induit l'internalisation du complexe, de façon clathrine dépendante, vers les endosomes acidifiés où le complexe est métabolisé. La SP est alors dégradée, tandis que le NK-1R est recyclé et ré-exprimé à la membrane (Grady *et al.*, 1995). Le gène responsable de la production de la substance P, Tac1, contient des éléments de liaisons à différents promoteurs, incluant l'*adénosine cyclique monophosphate* (cAMP), la *protéine activatrice 1* (AP-1), AP-4, et le *facteur de croissance épidermale* (EGF) (Kovacs *et al.*, 2006). En bref, AP-1 est un élément de réponse cellulaire activé par les c-Fos et c-Jun, régulant l'expression de plusieurs gènes importants dans la réponse inflammatoire (Hess *et al.*, 2004) ainsi que dans les processus cellulaires de prolifération et d'apoptose (Ameyar *et al.*, 2003). Notez que l'activation de ces éléments de réponses est souvent reliée à l'exposition à des cytokines pro-inflammatoires, de même qu'à des facteurs de croissance. La SP est un élément central de la transmission douloureuse étant co-exprimée avec le glutamate (voir 3.4) dans les afférences sensitives primaires (De Felipe *et al.*, 1998). D'ailleurs, la SP potentialise les effets du NMDA, contribuant à l'exacerbation de la perception douloureuse (Donkin *et al.*, 2009). En effet, elle permet, à titre de neurotransmetteur, de stimuler les neurones de 2^e ordre dans la corne dorsale de la moelle épinière et de

permettre la transmission des influx douloureux au cerveau (Harrison *et al.*, 2001). Aussi, la SP est relâchée par les terminaisons dendritiques des afférences sensibles au niveau de la peau, des muscles et des articulations, contribuant ainsi au développement de l'inflammation neurogénique (Datar *et al.*, 2004). Fait intéressant, la capsaïcine, (voir 4.1) lorsqu'elle est administrée localement, possède des effets anti-nociceptifs. Ce type de traitement est d'un intérêt particulier dans le traitement des douleurs fibromyalgiques et arthritiques. Il est d'ailleurs prouvé que l'effet anti-nociceptif de la capsaïcine est produit par la déplétion de la SP des afférences sensibles. De plus, des souris invalidées pour la SP et le NKA montrent une diminution significative de la perception de la douleur mécanique, thermique et chimique (Datar *et al.*, 2004; De Felipe *et al.*, 1998). De plus, il semble que l'absence de SP dans les fibres de type C, chez les rats *naked mole*, rendent ceux-ci insensibles à la douleur (Park *et al.*, 2003).

3.4. Glutamate

Le glutamate, découvert en 1866 par le Dr Karl Heinrich Leopold Ritthausen, est un des 20 acides aminés essentiels (Miller *et al.*, 2011b). Celui-ci est encodé par les codons GAA et GAG. En plus de l'absorption exogène via l'alimentation, six différents processus enzymatiques ont été identifiés dans la synthèse *in vivo* du glutamate (Miller *et al.*, 2011b).

Le glutamate agit également à titre de neurotransmetteur, ayant entre autres un rôle dans la potentialisation à long terme, l'apprentissage et la douleur (McEntee *et al.*, 1993; Miller *et al.*, 2011b). D'ailleurs, le glutamate est le neurotransmetteur excitateur

le plus abondant chez les vertébrés, étant présent dans 30 à 70 % des neurones du DRG et du ganglion trijumeau chez l'humain (Averill *et al.*, 2004; Wanaka *et al.*, 1987). Celui-ci est synthétisé dans le corps cellulaire de neurones afférents, soit le DRG, et est transporté de façon rétrograde jusqu'aux terminaisons nerveuses (Averill *et al.*, 2004) où il est stocké dans des vésicules pré-synaptiques au moyen de *transporteurs du glutamate* (VGluT) (Averill *et al.*, 2004) qui, sous l'effet de la dépolarisation membranaire (d'origine électrique, chimique ou inflammatoire) (Miller *et al.*, 2011b), sont relâchées (Lawand *et al.*, 2000). Le glutamate peut alors agir sur l'un de ses récepteurs post-synaptiques. Ceux-ci se divisent en deux types, soit métabotropes (mGluR) et ionotropes (NMDA-R). Notez que les NMDA-R se divisent également en plusieurs sous-types, ci-nommées en fonction du type de molécule pouvant les stimuler (récepteur au *α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid* (AMPA-R) et récepteur au kainate (KA-R)) (Lodge, 2009). D'ailleurs, les récepteurs métabotropes sont divisés en 3 groupes nommés I, II et III (Miller *et al.*, 2011b). Les récepteurs du groupe I (mGluR1, 5) sont situés sur les neurones post-synaptiques et préférentiellement couplés à la protéine G α q (Miller *et al.*, 2011b). Ainsi, une fois activés, les mGluR 1, 5 entraînent l'activation des PLC et l'augmentation intracellulaire de calcium (Miller *et al.*, 2011b). Ce groupe de récepteurs mGluR est donc en partie responsable de l'activité pro-nociceptive du glutamate (Miller *et al.*, 2011b). Alternativement, les récepteurs du groupe II (mGluR 2, 3) et III (mGluR4, 6-8) sont situés au niveau des neurones pré-synaptiques (mGluR4, 6-8) et couplés à la sous-unité G α i. Ainsi, leur activation inhibe la formation d'adénylate cyclase et réduit l'activité pro-nociceptive du glutamate (Miller

et al., 2011b). Quant aux récepteurs ionotropes, ils sont formés d'hétérotrimères, possédant chacun une pharmacologie propre (Miller *et al.*, 2011b). Tel que revu exhaustivement par Miller (Miller *et al.*, 2011b), la relâche de glutamate *in-vivo* ou son administration *ex-vivo* entraîne une dépolarisation membranaire et est, de ce fait, considérée comme une molécule excitatrice (Miller *et al.*, 2011b). Typiquement, le glutamate relâché dans la fente synaptique agit sur le récepteur ionotrope NMDA dont l'activation entraîne l'entrée non sélective de cations (sodium et calcium) (Miller *et al.*, 2011b). Le NMDA-R possède également un mode d'activation dépendant du voltage qui, à l'état passif, est inactif (Miller *et al.*, 2011b). En effet, le pore du canal du NMDA-R est bloqué par des ions magnésium extracellulaires (Miller *et al.*, 2011b). En outre, l'activation des récepteurs AMPA par le glutamate entraîne l'entrée de calcium (Miller *et al.*, 2011b). L'augmentation intracellulaire de calcium mène à l'activation de la *protéine kinase C* (PKC) et à la phosphorylation du NMDA-R, ce qui provoque un changement de conformation du NMDA-R et soustrait le pore au blocage par le magnésium (Miller *et al.*, 2011b). Ceci permet l'entrée de cations et entraîne la dépolarisation membranaire et la génération d'influx nerveux. Le glutamate en excès est recapté par des transporteurs spécifiques, dits *transporteurs d'acides aminés excitateurs* (EAAT), présents sur les cellules gliales et sur les neurones (Tao *et al.*, 2004). En bref, le glutamate est un puissant neurotransmetteur exciteur impliqué dans de nombreuses pathologies telles que l'épilepsie, la maladie d'Alzheimer et la douleur chronique (Hynd *et al.*, 2004). Fait intéressant, le glutamate sert de précurseur à la synthèse du neurotransmetteur inhibiteur de l'*acide γ -aminobutyrique* (GABA). Cette réaction est catalysée par la glutamate décarboxylase, qu'on retrouve surtout au

niveau du cerveau et du pancréas. Le GABA est le pendant inhibiteur du glutamate et agit à ce titre de modulateur négatif de l'activité excitatrice du glutamate. En condition inflammatoire telle que dans les synoviocytes de patients souffrant d'arthrite, on constate des niveaux significativement plus élevés de glutamate, ce qui pourrait contribuer au développement de la douleur (McNearney *et al.*, 2004; McNearney *et al.*, 2000). En fait, l'activité pro-nociceptive du glutamate est étroitement liée à la relâche d'autres médiateurs inflammatoires. Brièvement, l'activation du *récepteur aux vanilloïdes 1* (TRPV1) par la capsaïcine (voir 4.1)(Jin *et al.*, 2009) ou l'activation du récepteur B1 des kinines (B1R) par son agoniste (voir 5.1)(Couture *et al.*, 2001), augmente la relâche de glutamate. Également, le glutamate entraîne la relâche d'adénosine (Liu *et al.*, 2002), de CGRP et la formation de NO (voir 3.2) (Jackson *et al.*, 1999) contribuant au processus nociceptif. Contrairement à la SP et au CGRP, aucune étude ne supporte le rôle du glutamate dans la génération de l'inflammation neurogénique (vasodilatation et œdème) (Miller *et al.*, 2011b). En outre, des souris invalidées pour la glutaminase (homozygote) meurent à la naissance. (Masson *et al.*, 2006). Par contre, des animaux hétérozygotes démontrent une diminution de la réponse nociceptive à la pression mécanique ainsi qu'à la douleur thermique (Kayser *et al.*, 2007). Miller (Miller *et al.*, 2011b) a revu de façon extensive l'effet activateur de différents agonistes des récepteurs au glutamate sur l'hyperalgésie thermique et mécanique, l'augmentation de l'activité motrice, et la réponse défensive comportementale. Notez que les antagonistes des récepteurs au glutamate tels que MK801 et *acide 2R-amino-5-phosphonoalérique* (DL-AP5), possèdent des effets anti-nociceptifs.

4.0. La capsaïcine

La capsaïcine, le 8-methyl-N-vanillyl-6-nonenamide, issu de la plante du genre *capsicum* constitue le principe actif du piment fort et représente une molécule unique parmi les irritants naturels. En effet, son application ainsi que son ingestion induit une phase d'excitation neuronale initiale suivie d'une phase réfractaire à l'excitabilité (Szallasi *et al.*, 1999). En fait, la capsaïcine appliquée à forte dose induit la déplétion des neurotransmetteurs excitateurs des fibres sensorielles de type C, un effet dit de désensibilisation (Szallasi *et al.*, 1999). Cette capacité bien particulière est à la base de nombreuses applications thérapeutiques de la capsaïcine, entre autres dans le soulagement des douleurs neuropathiques post-herpétiques ainsi que secondaires au diabète (Hautkappe *et al.*, 1998). Fait intéressant, il semble que la capsaïcine agit en stimulant le *récepteur 1 aux vanilloïdes* (TRPV1).

4.1. TRPV1

En 1997, l'équipe du Dr David Julius clone le premier récepteur aux vanilloïdes, le TRPV1 (Caterina *et al.*, 1997), ce qui représente une avancée significative dans la compréhension des mécanismes moléculaires responsables de la perception de la douleur thermique et chimique (Szallasi *et al.*, 2007). En effet, le TRPV1 est un canal cationique non sélectif (calcium > sodium) activé par la chaleur nociceptive (> 43 °C), l'acidité (H⁺) et la capsaïcine (Caterina *et al.*, 1997). Notez que l'activation des neurones exprimant le TRPV1 entraîne une augmentation de la relâche dendritique de SP et CGRP qui mène au développement de l'inflammation neurogénique (Malmberg *et al.*, 2004). En outre, des animaux invalidés pour le gène du TRPV1, présentent une

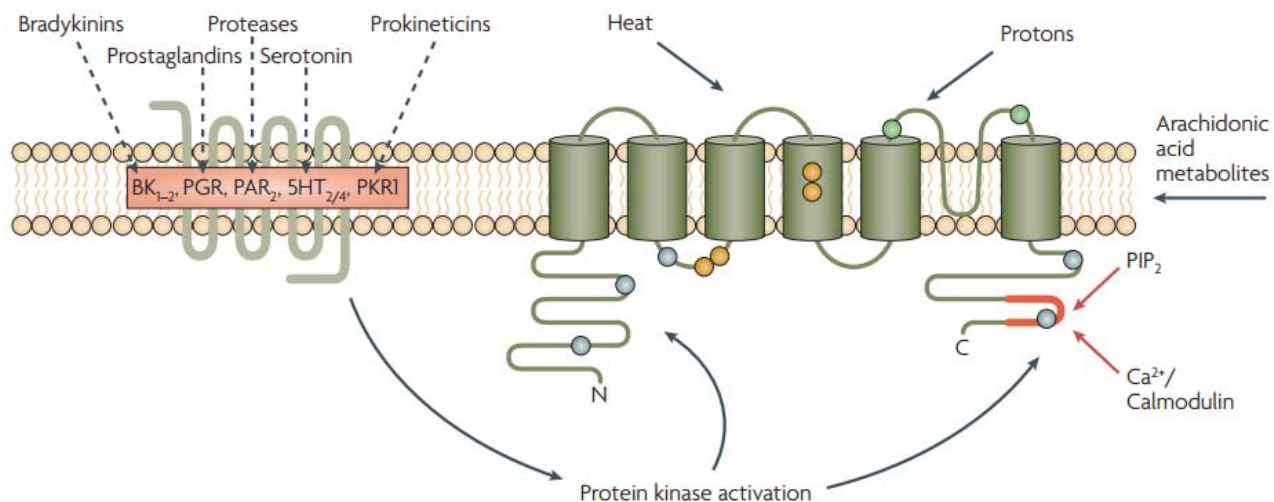
hypoalgésie thermique lorsque stimulés par l'*adjuvant de Freund* (CFA) (Caterina *et al.*, 2000).

Brièvement, le TRPV1, tout comme les autres membres de la famille des TRP s'organise en tétramère dont chaque monomère est formé de 6 passages transmembranaires, dont l'espace entre les segments 5 et 6 forme un pore (Wang *et al.*, 2005). De façon générale, les fibres de type C et les fibres A δ expriment le TRPV1 au niveau de leurs projections périphériques et centrales (Szallasi *et al.*, 2007). Le TRPV1 est également présent sur les cellules immunes du SNC, ainsi que sur certains noyaux supra-spinaux tels que le cortex cingulaire (Szallasi *et al.*, 2007).

Tel qu'observé sur la figure 4, une importante quantité de médiateurs présents dans la mélange inflammatoire ont été décrits comme menant à la sensibilisation du TRPV1. Entre autres, les *prostaglandines* (PG), les *bradykinines* (BK) et les *facteurs de croissance neuronale* (NGF) activent, par l'entremise de seconds messagers, les PKC (Numazaki *et al.*, 2002; Premkumar *et al.*, 2000) et *protéines kinases A* (PKA) (Bhave *et al.*, 2002) qui phosphorylent les extrémités N ou C-terminales du TRPV1, induisant un changement de sa conformation tridimensionnelle, facilitant son ouverture (Szallasi *et al.*, 2007). Alternativement, l'activation de protéines phosphatases fait rétrocéder la phosphorylation de l'extrémité C-terminale du TRPV1, ce qui augmente son seuil d'activation (Mohapatra *et al.*, 2005).

De concert avec les phénomènes de sensibilisation, il semble que le TRPV1 peut également être régulé au niveau transcriptionnel et post-transcriptionnel (Szallasi *et al.*, 2007). D'ailleurs, l'expression du TRPV1 est augmentée sur les fibres de type C d'animaux souffrant de différentes pathologies telles que dans le syndrome du colon irritable (Yiangou *et al.*, 2001) et de l'incontinence fécale (Chan *et al.*, 2003), ainsi que sur les fibres A δ de rat ayant subi une ligature du nerf sciatique (Rashid *et al.*, 2003). De plus, l'expression du TRPV1 est également augmentée sur les fibres A δ de patients souffrant de neuropathies diabétiques (Ma, 2002). En outre, certaines études rapportent la perte de fibres sensorielles de type C chez certains patients souffrant de neuropathies périphériques (Lauria *et al.*, 2006).

Figure 4: Sites de phosphorylation et d'activation du TRPV1.



La stimulation de différents récepteurs pro-inflammatoires par leur ligand entraîne l'activation des protéines kinases intracellulaires. Celles-ci phosphorylent ensuite certains résidus des extrémités N- et C- terminales du TRPV1, abaissant son seuil de déclenchement. Sont aussi représentés, les sites de perception de la chaleur et de l'acidité du TRPV1. Tiré avec permission de Szallasi (Szallasi *et al.*, 2004). Récepteur 1 des prokinéticines (PKR1), Récepteur 2 et de la sérotonine (5HT_{2/4}), Récepteurs B1 et B2 des kinines (BK₁₋₂), Récepteur des prostaglandines (PGR) et Récepteur 2 des protéases (PAR₂).

Tout compte fait, le développement d'antagonistes sélectifs du TRPV1 présente un intérêt thérapeutique certain. En effet, contrairement aux cibles pharmacologiques traditionnelles qui visent le blocage de la transmission des influx nerveux, le blocage du TRPV1 cible plutôt un nocicepteur, soit une protéine impliquée dans la perception de la douleur (Wang *et al.*, 2005). Tel que revue par Szallasi (Szallasi *et al.*, 2007), la plupart des compagnies pharmaceutiques ont développé une gamme élargie d'antagonistes visant ce récepteur, incluant : GlaxoSmithKline, Neurogen/Merck, Amgen, Novartis, Abbott, AstraZeneca, Johnson and Johnson, Janssen, Bayer, Takeda, Vertex, Pacific Corp., Euro-Celtique, Digital-Biotech, Schwartz, Renovis/Pfizer, Grünenthal, Glenmark et Purdue. On rapportait récemment que le AMG517 (Amgen) serait étudié en phase I pour le traitement de la douleur aiguë, le SB-705498 (Glaxo) en phase II pour le traitement des migraines, et le MK-2295 (Merck) en phase II pour le traitement de la douleur aiguë (Szallasi *et al.*, 2007). Ainsi, les antagonistes du TRPV1 présentent un potentiel thérapeutique dans le traitement des douleurs musculo-squelettiques (Mezey *et al.*, 2000; Szallasi *et al.*, 2007), gastro-intestinales (Mezey *et al.*, 2000), dans les infections urinaires (Dinis *et al.*, 2004) ainsi que dans l'inflammation du système respiratoire (toux, asthme, bronchoconstriction) (Geppetti *et al.*, 2006) et du système cardiovasculaire (vasodilatation induisant la migraine) (Geppetti *et al.*, 2005). Il est cependant permis de croire que le blocage du TRPV1 empêche la perception de la chaleur nociceptive, ce qui pourrait éventuellement amener certains accidents (brûlures) (Woolf, 2010a).

5.0. Le système kallibréine-kinines (KKS)

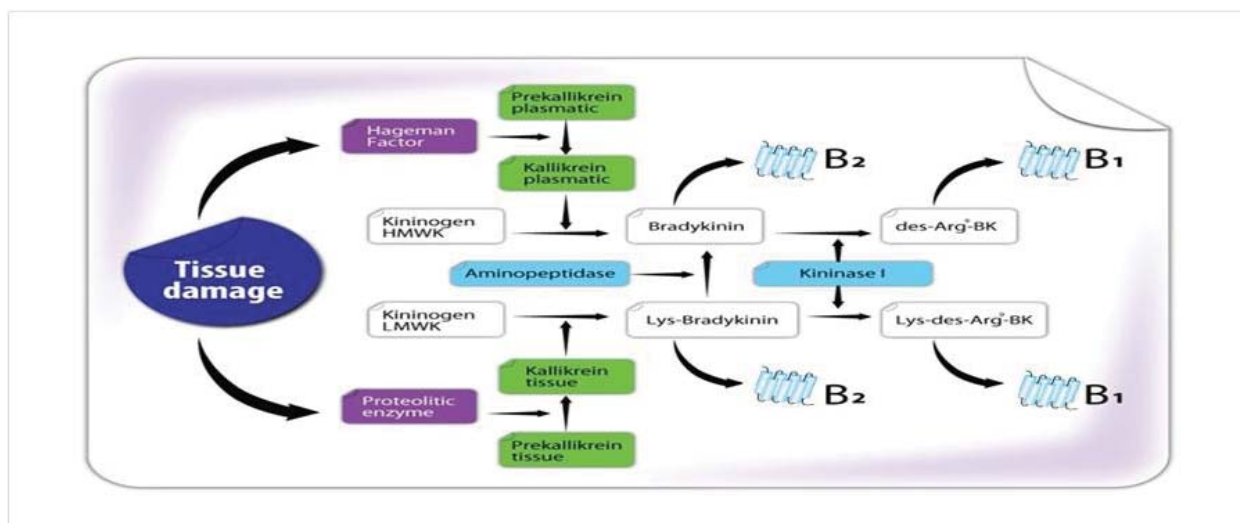
Le système *kallibréine-kinines* (KKS) est composé de trois éléments majeurs : les kallibréines (enzymes), les kininogènes (précurseurs) et les kinines (métabolites enzymatiques) (Leeb-Lundberg *et al.*, 2005). Le système KKS fait partie intégrante du mécanisme de défense humorale participant, entre autres, à l'induction de la réponse inflammatoire (Tang *et al.*, 2011). En situation de dommages modérés, les kallibréines et les kinines jouent un rôle immunitaire en étant impliquées dans le recrutement des protéases du milieu extracellulaire et des neutrophiles (Tang *et al.*, 2011). En situation d'inflammation sévère, l'activité de ce système est amplifiée et active une cascade de réactions inflammatoires qui contribuent à la destruction tissulaire et à l'inflammation chronique (Stadnicki *et al.*, 2011).

5.1. Les kinines

Les kinines appartiennent à un groupe de peptides de 9-11 acides aminés qui incluent: la *bradykinine* (BK), son métabolite actif, la *des-Arg⁹-BK* (DABK) ainsi que la *kallidine* (KD) et la T-kinine (Couture *et al.*, 2001). D'ailleurs, la séquence de la BK (H-Arg1-Pro2-Pro3-Gly4-Phe5-Ser6-Pro7-Phe8-Arg9-OH) est la séquence consensus de cette famille de peptides (Leeb-Lundberg *et al.*, 2005). Tel qu'observé sur la figure 5, la BK et la KD sont générées suivant le clivage protéolytique de leurs précurseurs respectifs, soit les *kininogènes de haut* (HMWK) et de *bas poids moléculaires* (LMWK), par des protéases sériques plasmatiques et tissulaires nommées kallibréines (Bhoola *et al.*, 1992). Une fois libérés, il s'avère que ces peptides subissent une

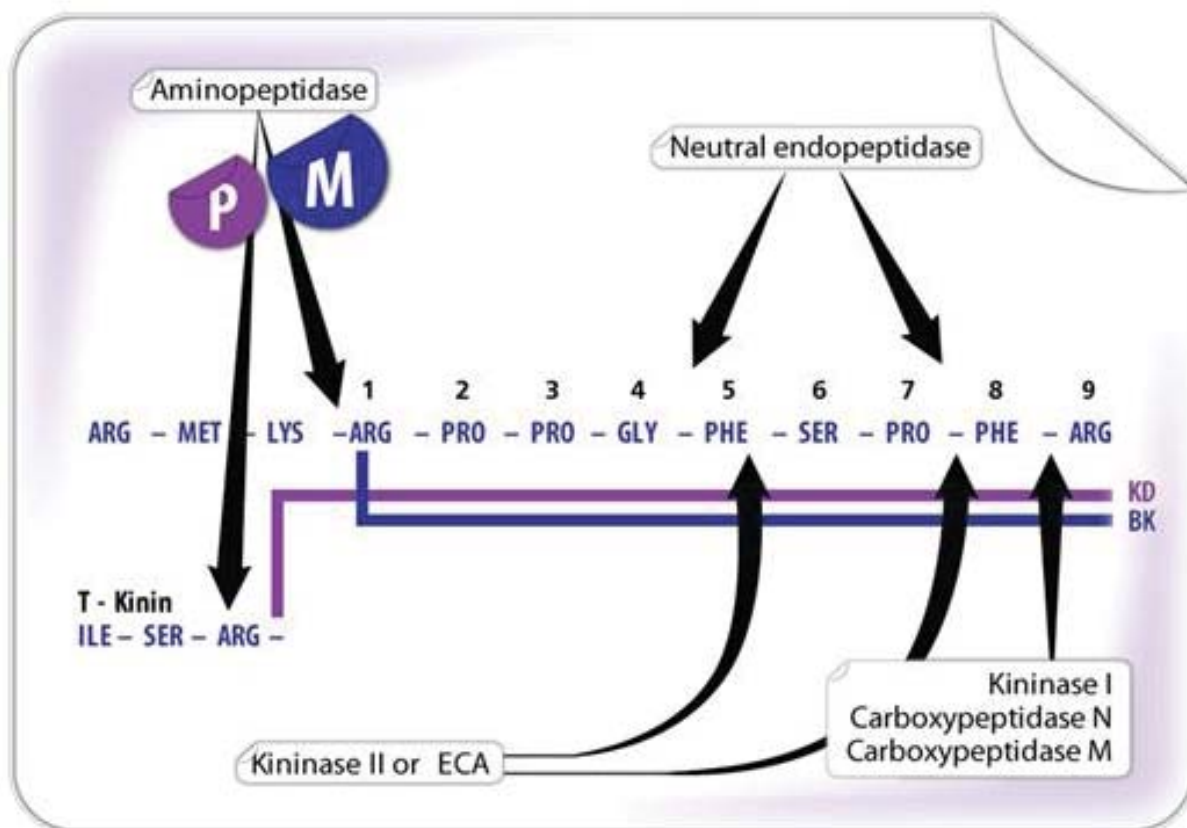
dégradation rapide par des amino-, carboxy- et endopeptidases présents dans les tissus et fluides biologiques (Leeb-Lundberg *et al.*, 2005). Tel qu'observé sur la figure 6, les principales enzymes impliquées dans le métabolisme des kinines sont (1) la kininase I (carboxypeptidases M et N) qui enlève l'arginine en position 9, pour produire la des-Arg⁹-BK (DABK), (2) l'endopeptidase neutre (enképhalinase) qui clive la partie C-terminale de la BK pour enlever la phénylalanine 8 et l'arginine 9, et (3) la kininase II (aussi connue sous la désignation d'enzyme de conversion de l'angiotensine (ACE)) qui clive la partie C-terminale de la BK pour produire la BK (1-7), ainsi que la sérine 6 et proline 7 pour produire la BK (1-5). La BK (1-5) est le métabolite final des kinines, et ne possède pas d'activité physiologique. En outre, la KD et la T-kinine sont également sujettes à l'activité d'aminopeptidases qui les transforment en BK (Murphey *et al.*, 2000). Notez que la T-kinine n'a été, jusqu'à présent, uniquement identifiée que chez le rat (Okamoto *et al.*, 1983).

Figure 5 : Le système kallibréine-kinines



Le dommage tissulaire entraîne l'activation du facteur de Hageman menant à la maturation des kallibréines tissulaires et plasmatiques. Celles-ci entraînent le clivage protéolytique des kininogènes de haut (HMWK) et bas poids moléculaires (LMWK), résultant en la formation des agonistes sélectifs du récepteur B₂ des kinines, soit la bradykinine et la lys-bradykinine. Ceux-ci peuvent ensuite être métabolisés par la kininase I menant à la formation des agonistes sélectifs du récepteur B₁ des kinines, soit la des-Arg⁹-BK et la lys-des-Arg⁹-BK. Adapté de Rodi (Rodi *et al.*, 2005).

Figure 6 : Sites d'action des enzymes impliquées dans le métabolisme des kinines



Sites de clivage de différentes enzymes impliquées dans le métabolisme des kinines. Adapté de Gabra (Gabra *et al.*, 2003a). Arginine (Arg), Bradykinine (BK), Enzyme de conversion de l'angiotensine (ECA). Glycine (Gly), Isoleucine (Ile), Kallidine (KD), Lysine (Lys), Méthionine (Met), Phénylalanine (Phe), Proline (Pro), Sérine (Ser).

5.2. Sous-types de récepteurs des kinines

La classification initiale des récepteurs des kinines fut établie avec des critères pharmacologiques selon l'ordre de puissance et d'affinité à différents agonistes et antagonistes. On retrouve ainsi le *récepteur B1* (B1R) et le *récepteur B2* des kinines (B2R) (Regoli *et al.*, 1990) (Marceau *et al.*, 1998b). Les agonistes endogènes de ce dernier sont la BK et la lys-BK, tandis que leurs métabolites (la des-Arg⁹-BK et la Lys-des-Arg⁹-BK) sont les agonistes endogènes du B1R (Marceau *et al.*, 2004). Le clonage des récepteurs des kinines chez l'humain et d'autres espèces a d'ailleurs permis de confirmer la classification pharmacologique des récepteurs. De plus, ces études ont montré que les récepteurs des kinines sont des GPCR possédant sept segments transmembranaires. D'ailleurs, leur structure et leur séquence révèle que ceux-ci sont des GPCR de classe A appartenant à la famille 1 (famille de la rhodopsine). Ainsi, les récepteurs des kinines sont préférentiellement couplés aux sous-types Gαq/11 et Gαi des GPCR (Leeb-Lundberg *et al.*, 2005).

Le clonage du B1R humain (353 aa) révèle une homologie de séquence de 36 % avec le B2R humain (364 aa) (Menke *et al.*, 1994) alors que l'homologie est de 30 % entre le B1R (334 aa) et le B2R (366 aa) murin (Pesquero *et al.*, 1996). Fait intéressant, la sensibilité pharmacologique des récepteurs varie d'une espèce à l'autre (Regoli *et al.*, 2001). En effet, les B1R de l'humain et du lapin ne possèdent pas la même affinité pharmacologique pour certains ligands endogènes et exogènes que ceux de la souris, du rat et du cochon d'Inde (Regoli *et al.*, 1994; Regoli *et al.*, 2001). Ainsi, le B1R humain possède une sensibilité supérieure pour les ligands possédant un résidu lysine

en position N-terminale (i.e. Lys-des-Arg⁹-bradykinine) par opposition à la souris et au rat (i.e. des-Arg⁹-bradykinine) (Hess *et al.*, 2001).

5.3. Expression des récepteurs des kinines

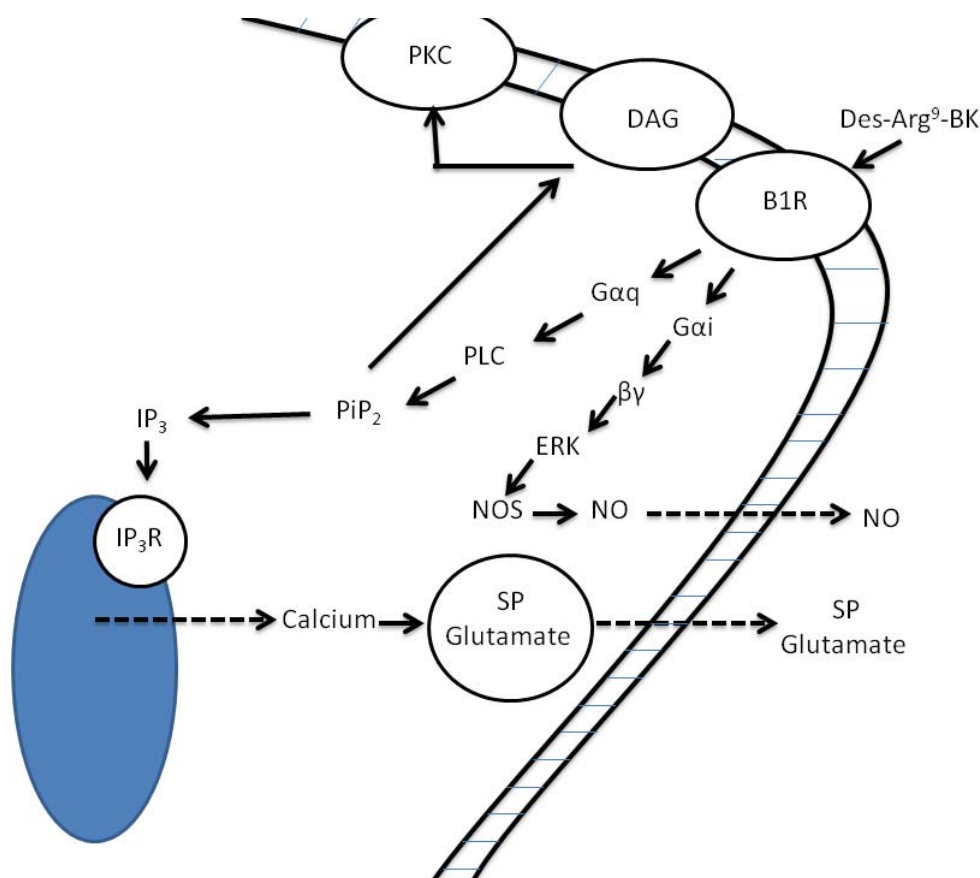
Le B2R est exprimé de façon ubiquitaire (tissus périphériques et centraux) et constitutive. Il génère la majorité des actions physiologiques des kinines. Le B1R possède, quant à lui, un faible niveau d'expression (virtuellement absent) dans les tissus sains (Marceau *et al.*, 2004) alors que son expression augmente suivant l'exposition à différents médiateurs pro-inflammatoires tels que certaines cytokines (IL-1 β , TNF- α) et endotoxines bactériennes, ainsi qu'en situation de stress oxydatif élevé et d'hyperglycémie chronique (diabète) ou de dommage tissulaire (Couture *et al.*, 2004; deBlois *et al.*, 2001; Marceau *et al.*, 1998a). L'expression du B1R est principalement relayée par les MAPK et le facteur de transcription nucléaire (NF- κ B) (voir 2.1) (Campos *et al.*, 1999; Ni *et al.*, 1998b; Schanstra *et al.*, 1998; Zhou *et al.*, 1998). Notez que l'analyse de la séquence 5' non-codante du B1R (1369 paires de bases) révèle la présence de sites de liaisons pour différents facteurs de transcription tels que NF- κ B, *facteur de protéolyse ATP-dépendant 1* (APF1) et AP-1 (Bachvarov *et al.*, 1996; Ni *et al.*, 1998a; Ni *et al.*, 1998b). Également, il semble exister une deuxième région promotrice dans l'intron II du B1R, bien que moins importante dans la régulation de l'expression du B1R. En outre, plusieurs études indiquent que le NF- κ B joue un rôle clé dans la régulation de l'expression du B1R. En effet, l'utilisation de bloqueurs pharmacologiques du NF- κ B, tant *in vitro* (Sardi *et al.*, 2002) qu'*in vivo* (Campos *et al.*, 1999; Morand-Contant *et al.*, 2010), permet de faire rétrocéder

l'expression du B1R. Ces données suggèrent une explication possible pour l'induction du B1R dans le diabète. En effet, il semble que l'hyperglycémie chronique chez le diabétique promeuve la transcription nucléaire du NF- κ B (Chen *et al.*, 2003).

5.4. La signalisation intracellulaire des kinines

Tel que présenté dans la figure 7, les récepteurs des kinines sont majoritairement couplés aux protéines G α q/11 et G α i (Calixto *et al.*, 2004). En fait, la stimulation de ces récepteurs induit le clivage protéolytique du *phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate* (PIP₂) par la *phospholipase C* (PLC), ainsi que l'activation subséquente de la PKC de même que la formation d'IP₃ et de DAG (Leeb-Lundberg *et al.*, 2005). L'augmentation intracellulaire d'IP₃ active son récepteur sur le réticulum endoplasmique (IP3R), entraînant l'ouverture des canaux *sarco/endoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase* (SERCA) et l'augmentation de calcium intracellulaire (Leeb-Lundberg *et al.*, 2005). En outre, la stimulation du B1R peut entraîner, selon le type cellulaire, l'activation subséquente de la phospholipase A2 (Couture *et al.*, 2001), de la phospholipase D (Couture *et al.*, 2001), des MAPK (Medeiros *et al.*, 2004), du NF- κ B (Morand-Contant *et al.*, 2010) et de la *nicotinamide adenine dinucleotide phosphate-oxydase* (NADPH) oxydase (Dias *et al.*, 2010; Talbot *et al.*, 2011a).

Figure 7: Transduction des signaux suivant l'activation du récepteur B1 des kinines.



La stimulation du récepteur B1 des kinines entraîne l'activation de la protéine Gαq. Celle-ci active la phospholipase C (PLC) qui clive le phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate (PIP₂) en Diacylglycérol (DAG) et inositol-3-phosphate (IP₃). L'IP₃ active son récepteur membranaire (IP₃R), menant à l'augmentation intracellulaire de calcium et à la relâche de certains médiateurs pro-inflammatoires (substance P (SP) et glutamate) contenus dans les vésicules pré-synaptiques. La stimulation du B1R entraîne également l'activation de la protéine Gαi, libérant ces sous-unités βγ qui vont à leur tour stimuler la kinase de régulation du signal extracellulaire (ERK), puis la iNOS et finalement entraîner la relâche de NO. Adapté de Gabra (Gabra et al., 2003a).

L'augmentation intracellulaire de calcium entraîne la relâche de vésicules pré-synaptiques contenant des médiateurs pro-inflammatoires tels que le glutamate et la SP (Couture *et al.*, 2001) ainsi que la production et la relâche de PG et de NO.

Notez que la production de NO suivant la stimulation du B1R est principalement attribuable à l'activation de la iNOS, tel que démontré par certaines études menées sur des cellules endothéliales humaines de poumons de rats préalablement exposés à des cytokines pro-inflammatoires, donc exprimant la eNOS et la iNOS (Zhang *et al.*, 2007). En effet, dans ce modèle, la production de NO suivant la stimulation du B1R est indépendante du blocage de la eNOS et complètement prévenue par le pré-traitement avec le 1400W, un bloqueur spécifique de la iNOS (Zhang *et al.*, 2007). De plus, cette augmentation de NO semble indépendante de la concentration intracellulaire de calcium puisqu'elle est maintenue en présence de BAPTA-AM (chélateur de calcium) (Brovkovych *et al.*, 2011). Tel que discuté précédemment, l'activation de la iNOS est indépendante de la concentration de calcium et principalement régulée par la présence de certains co-facteurs et substrats (Kuhr *et al.*, 2010). Cependant, il semble que la stimulation du B1R libère les sous-unités $\beta\gamma$ de la protéine G α i et mènerait à l'activation de la voie Src/Ras/Raf/MEK/ERK (Kuhr *et al.*, 2010). ERK entraînerait alors la phosphorylation de la sérine 745 de la iNOS, induisant son activation (Kuhr *et al.*, 2010).

De plus, la stimulation du B1R augmente la production de ROS (Dias *et al.*, 2010), de cytokines pro-inflammatoires (IL-1 β , TNF- α) (Cunha *et al.*, 2007), de chémokines (*Chemokine (C-X3-C motif) ligand 1* (Cx3CL1) et Cx3CL5) et diminue celle de cytokines anti-inflammatoires (IL-4) (Talbot *et al.*, 2012a). L'action de ces médiateurs sur leur récepteur membranaire entraîne la translocation nucléaire du NF- κ B, lui-même connu pour induire l'expression du B1R. Ainsi, la stimulation du B1R induit une boucle de rétroaction positive menant à l'augmentation de sa propre expression (Phagoo *et al.*, 2001).

5.5. Action pro-inflammatoire du B1R

Le B1R joue un rôle clé dans la génération de l'inflammation, étant impliqué dans la vasodilatation et l'augmentation de perméabilité vasculaire (œdème) (Abdouh *et al.*, 2003; Campos *et al.*, 2001; Fernandes *et al.*, 2003; Leeb-Lundberg *et al.*, 2005; Pruneau *et al.*, 2010), l'augmentation de la température corporelle (Caldeira *et al.*, 1998; Coelho *et al.*, 1997; Pesquero *et al.*, 2000) et dans la douleur (Calixto *et al.*, 2000; Calixto *et al.*, 2004; Campos *et al.*, 2006; Couture *et al.*, 2001; Dray, 1997; Dray *et al.*, 1993; Gabra *et al.*, 2006; Gabra *et al.*, 2003a; Leeb-Lundberg *et al.*, 2005). Brièvement, le B2R est décrit comme un médiateur clé de la phase aiguë de l'inflammation et de la douleur (Tonussi *et al.*, 1997; Walker *et al.*, 1996). En effet, la stimulation du B2R est rapidement suivie de son internalisation et de sa désensibilisation (Bachvarov *et al.*, 2001; Leeb-Lundberg *et al.*, 2005) contrastant avec le B1R qui n'est pas internalisé ni désensibilisé (Zhou *et al.*, 2000) et qui est impliqué dans la génération et le maintien de la chronicité de l'inflammation et de la

douleur (Leeb-Lundberg *et al.*, 2005). En outre, la stimulation du B2R (Phagoo *et al.*, 1999) et du B1R (Phagoo *et al.*, 2001) augmente les niveaux d'ARNm du B1R ainsi que sa stabilisation membranaire (Enquist *et al.*, 2007).

5.6. Action pro-nociceptive du B1R

Les souris invalidées pour le B1R (Pesquero *et al.*, 2000) ne présentent pas d'hypersensibilité dans des modèles animaux de douleur inflammatoire induits par la ligature du nerf sciatique (Ferreira *et al.*, 2005), la formaline (Ferreira *et al.*, 2002), le CFA (Ferreira *et al.*, 2001), ainsi que par le diabète de type 1 (Gabra *et al.*, 2005b). De plus, les études pharmacologiques suggèrent un rôle clé du B1R dans l'induction de l'hyperalgésie thermique, mécanique et chimique induite par l'exposition à certains médiateurs pro-inflammatoires tels que les cytokines (Lee, 1989b), la formaline (Campos *et al.*, 1995; Chichorro *et al.*, 2004; Correa *et al.*, 1993; Doolittle *et al.*, 1989), le zymosan (Belichard *et al.*, 2000), le CFA (Fox *et al.*, 2003; Perkins *et al.*, 1993), le phorbol myristate acetate (Ferreira *et al.*, 2008) et le LPS (Cunha *et al.*, 2007). Certaines données suggèrent également que le blocage du B1R supprime les neuropathies induites par le cancer, tel que démontré chez des rats traités à la vincristine (Bujalska *et al.*, 2009a; Bujalska *et al.*, 2009b) et chez des rats souffrant de mélanome (cancer de la peau) (Fujita *et al.*, 2010) ou du cancer des os (Sevcik *et al.*, 2005).

L'effet bénéfique des antagonistes du B1R fut aussi démontré dans des modèles classiques de neuropathies, soit chez des rats ayant subi l'une des interventions suivantes : ligature du nerf sciatique (Werner *et al.*, 2007), contusion de la moelle épinière (Rajpal *et al.*, 2007), dommage d'un nerf périphérique (Ferreira *et al.*, 2005; Petcu *et al.*, 2008; Rashid *et al.*, 2004) ou constriction du nerf infra-orbital (Luiz *et al.*, 2010), de même que chez les rats ayant subi un traumatisme du plexus brachial (Quintao *et al.*, 2008). De plus, le B1R joue un rôle clé dans la sensibilisation de la peau à l'irradiation par les *ultraviolet-B* (UV-B) (Perkins *et al.*, 1993). Toutefois, des antagonistes peptidiques du B1R et du B2R sont sans effet analgésique dans le traitement de la douleur postopératoire chez le rat (Leonard *et al.*, 2004).

Plusieurs études ont démontré un effet bénéfique des antagonistes du B1R dans le traitement des douleurs neuropathiques dans des modèles animaux de diabète de types 1 et 2 (Dias *et al.*, 2007; Gabra *et al.*, 2005c; Gabra *et al.*, 2003b; Gabra *et al.*, 2002; Ismael *et al.*, 2008; Kakoki *et al.*, 2010; Lungu *et al.*, 2007; Talbot *et al.* 2010). Aussi, des études en autoradiographie quantitative ont permis de révéler une augmentation des sites de liaison du B1R dans la moelle épinière du rat diabétique (Ismael *et al.*, 2008; Lee, 1989a; Lungu *et al.*, 2007; Talbot *et al.*, 2009). En plus de leur efficacité dans le traitement des neuropathies diabétiques, plusieurs études ont démontré le potentiel thérapeutique des antagonistes du B1R dans le traitement des autres complications du diabète, telles que les rétinopathies (Abdouh *et al.*, 2003; Abdouh *et al.*, 2008; Pruneau *et al.*, 2010; Simard *et al.*, 2002; Wilkinson-Berka *et al.*, 2004), l'hypertension (Cloutier *et al.*, 2000; de Sousa Buck *et al.*, 2002; Dias *et al.*,

2010; Ismael *et al.*, 2008; Lawson *et al.*, 2005; Lungu *et al.*, 2007; Morand-Contant *et al.*, 2010; Mori *et al.*, 2008; Qadri *et al.*, 2002; Spillmann *et al.*, 2002; Tschöpe *et al.*, 2008) et les néphropathies (Lawson *et al.*, 2005; Schanstra *et al.*, 1999)

6.0. Le diabète

Le mot diabète dérive du terme Grec *diabanein* qui signifie passage, en référence à la production excessive d'urine (Kumar *et al.*, 2005). Le terme diabète, sans qualificatif, réfère au diabète *mellitus* (diabète sucré) qui se traduit par la production excessive d'urine (glycosurie) (Kumar *et al.*, 2005). Brièvement, le diabète est le résultat d'une hyperglycémie chronique qui est la conséquence d'une hypoinsulinémie (diabète de type 1) ou de l'absence/diminution de la réponse à l'insuline (diabète de type 2) (Kumar *et al.*, 2005). Ainsi, l'hyperglycémie chronique produit les symptômes classiques du diabète, soit la polyurie (urination fréquente), la polydipsie (soif augmentée) et la polyphagie (faim augmentée) (Kumar *et al.*, 2005). Bien que les deux types de diabètes provoquent les mêmes symptômes, il est possible de les distinguer en mesurant la quantité de peptides C dans le sérum; celle-ci est représentative de la production endogène d'insuline (Kumar *et al.*, 2005).

L'Organisation mondiale de la santé évalue qu'au moins 171 millions de personnes souffraient de diabète en 2000, ce qui représentait 2,8 % de la population mondiale (Wild *et al.*, 2004). Il est d'ailleurs évalué que l'incidence du diabète progresse de 6 % par année (Fernyhough *et al.*) et que le nombre de patients atteints aura doublé d'ici 2030 (Wild *et al.*, 2004). En 2010, on estimait que 26 millions d'Américains étaient

atteints de diabète, dont 7 millions étaient non diagnostiqués, ainsi que 57 millions d'autres individus qui présentaient une condition pré-diabétique (Wild et al., 2004). Ainsi, le coût des traitements pour le diabète aux États-Unis est évalué à 132 milliards de dollars par année. En outre, 1,9 million de Canadiens étaient atteints du diabète en 2006 pour un coût d'environ 13.2 milliards de dollar. Le diabète de type 2 est présent dans toutes les populations du monde, bien que davantage dans les populations des pays industrialisés. Toutefois, l'augmentation de la prévalence du diabète est la plus marquée dans les pays émergents d'Afrique et d'Asie (Wild *et al.*, 2004). Ce phénomène demeure inexpliqué, quoiqu'il semble corrélé avec l'adoption de la diète nord-américaine.

6.1. Le diabète de type 1

Il est estimé que le diabète de type 1 représente environ 10 % des cas de diabète en Amérique du Nord et en Europe. Le diabète de type 1 est considéré comme idiopathique ou auto-immun (Kumar *et al.*, 2005). Il n'existe actuellement aucun traitement ou moyen préventif pour prévenir le développement du diabète de type 1, faisant ainsi de cette pathologie une maladie chronique. De plus, il s'agit d'une condition potentiellement mortelle. En effet, les malades doivent recevoir quotidiennement une ou plusieurs injections d'insuline pour survivre. De récents travaux, actuellement en phase clinique, suggèrent qu'une transplantation du pancréas (Noguchi, 2010) ou d'ilots pancréatiques (Noguchi, 2009) pourrait traiter le diabète de type 1.

Tel que brièvement mentionné plus haut, il s'avère que le diabète de type 1 est une maladie auto-immune. En effet, les lymphocytes T (Rother, 2007) attaquent et détruisent les cellules β pancréatiques, menant à une déficience en production d'insuline et, éventuellement, à une augmentation chronique des niveaux de glucose sanguin et urinaire. Aussi, le développement de ce type de diabète implique des facteurs génétiques ainsi que des facteurs environnementaux tels que l'exposition à certains antigènes dans la nourriture (Bluestone *et al.*, 2010). En effet, une importante exposition aux protéines du blé (Knip *et al.*, 2008) et au lait de vache (Virtanen *et al.*, 1994) ainsi qu'une déficience en vitamine D (Mathieu *et al.*, 2005) constituent d'importants facteurs de risques.

6.1.1. Modèles expérimentaux de diabète

Veillez vous référer à la section 10.0 de cette thèse pour plus de détails sur les modèles génétiques et expérimentaux de diabète de types 1 et 2.

6.1.1.1. Streptozotocine

La *streptozotocine* (STZ) est un agent de chimiothérapie de type glucosamine-nitrosourea obtenu à partir de la culture de *Streptomyces achromogenes*. La STZ est couramment utilisée pour induire le diabète de type 1 chez les rongeurs ainsi que pour l'étude des complications associées au diabète, telles que les *neuropathies périphériques* (DPN).

La STZ est sélectivement transportée dans les cellules β du pancréas via les transporteurs du glucose GLUT2. En effet, la structure de la STZ est semblable à celle du glucose. Ainsi, une fois que la STZ a pénétré dans les cellules β du pancréas (insulino-sécrétrice), elle va induire l'apoptose. L'hypoinsulinémie mène ultimement au développement de l'hyperglycémie chronique. Essentiellement, la STZ cause des dommages directs à l'ADN via l'alkylation de celle-ci, ou par l'intermédiaire de la formation de ROS (voir 7.1.4) et de peroxy-nitrite (voir 7.1.5) (Fehsel *et al.*, 1995; Schnedl *et al.*, 1994; Turk *et al.*, 1993b). Les dommages générés à l'ADN induisent l'activation de la *polymérase nucléaire enzymatique poly(ADP-ribose)* (PARP), qui synthétise alors une grande quantité de polymère de type *adénosine diphosphate* (ADP)-ribose. Celui-ci est impliqué dans la réparation de l'ADN. Notez que cette réaction utilise une grande quantité de substrat, soit le *nicotinamide adénine dinucléotide* (NAD^+) (Delaney *et al.*, 1995; LeDoux *et al.*, 1988). Ainsi, la diminution des niveaux de NAD^+ ralentit la synthèse d'ATP, induisant un important déficit énergétique, ce qui mène à la mort des cellules β (Berger, 1985). D'ailleurs, il semble que la STZ ne parvient pas à induire le diabète chez des souris dont le gène PARP est invalidé. Ces données montrent le rôle clé du PARP dans la toxicité des cellules β par la STZ (Burkart *et al.*, 1999). Finalement, la STZ promeut la génération d'anions superoxydes dans les cellules β pancréatiques. Ceux-ci limitent l'activité du cycle de Krebs contribuant à diminuer la synthèse d'ATP et à induire la mort des cellules β (Nukatsuka *et al.*, 1990; Sofue *et al.*, 1991). En outre, les effets de la STZ sont considérés comme spécifiques aux cellules β pancréatiques. Cependant, certaines études ont relevé que la STZ affecte d'autres tissus exprimant le transporteur GLUT2

tels que les reins, le foie et les muscles squelettiques (Johnston *et al.*, 2007; Petzold *et al.*, 1978). De plus, il semble que son injection intracérébroventriculaire induit une forme sporadique de la maladie d'Alzheimer (Lester-Coll *et al.*, 2006).

6.2. Diabète de type 2

Le diabète de type 2, non insulino-dépendant, est une maladie d'origine métabolique caractérisée par une hyperglycémie chronique. Celle-ci est le résultat d'une perte de sensibilité des *récepteurs à l'insuline* (IR), en combinaison ou non avec une déficience de production de celle-ci (Kumar *et al.*, 2005). En effet, les IR sont exposés de façon chronique à des niveaux élevés de glucose sanguin d'origine alimentaire. Ce type d'exposition entraîne une désensibilisation des IR. Ainsi, cela réduit les niveaux d'activation de leur second messager intracellulaire, ce qui a pour effet de réduire l'expression membranaire des protéines GLUT, des transporteurs de glucose (Klatt *et al.*, 2000). Celles-ci sont exprimées au niveau intracellulaire et leur expression membranaire est reliée à l'activation des IR, à l'exercice physique ainsi qu'au haut taux de glucose qui circule. Brièvement, les protéines GLUT sont les transporteurs exclusifs du glucose. Plusieurs sous-types de ces transporteurs existent en fonction du type de tissus où ils sont exprimés. Ainsi, une diminution de l'activité des IR diminue l'expression membranaire des GLUT, empêchant le glucose sanguin de pénétrer les cellules et induisant une hyperglycémie chronique (Klatt *et al.*, 2010). Ainsi, l'initiation du diabète de type 2 est réversible et il peut généralement être prévenu par la modification de la diète alimentaire du patient, ainsi que par la réalisation d'un rigoureux programme d'exercice physique. Notez que le diabète de type 2 est

diagnostiqué sur la base du taux de glucose sanguin à jeun (≥ 7.0 mmol/L), d'un test de tolérance au glucose (≥ 11.1 mmol/L) ou via la mesure du taux d'hémoglobine glyquée ($\geq 7\%$) (Klatt *et al.*, 2010).

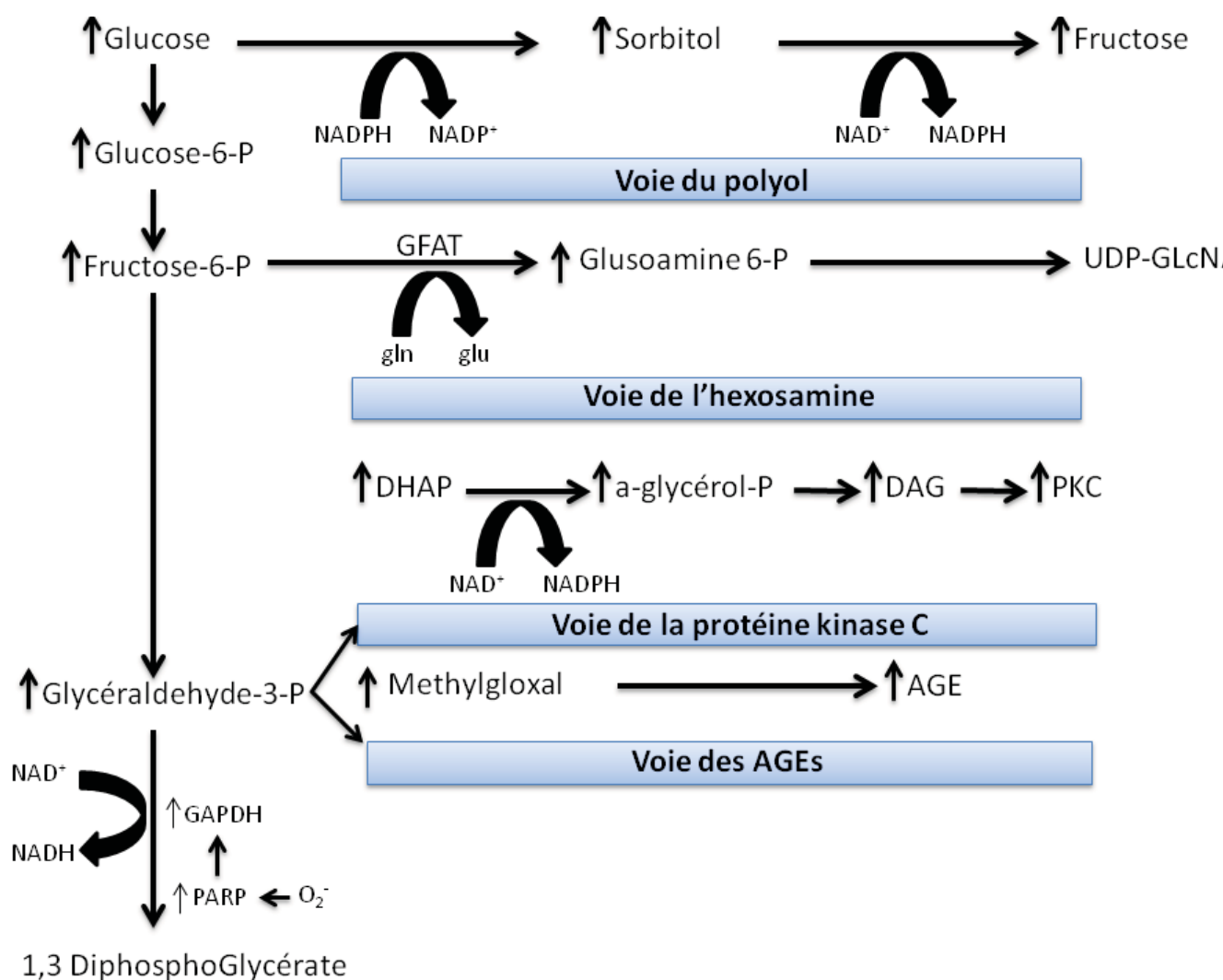
Le diabète de type 2 représente 90 % de la population diabétique des pays industrialisés (Kumar *et al.*, 2005). Son développement dépend de facteurs génétiques et environnementaux, dont les suivants : le tabagisme, l'obésité, une diète riche en gras saturés, l'alcoolisme, la sédentarité, un taux de cholestérol élevé, l'hypertension artérielle, le syndrome métabolique ou de Cushing (Kumar *et al.*, 2005). D'importants efforts ont récemment été déployés pour identifier les gènes prédisposant au diabète de type 2. Parmi les facteurs de risques génétiques notons l'expression : du *facteur de transcription 2* (TCFL2), du *récepteur gamma du proliférateur activé du peroxisome* (PPARG), du *canal potassique rectifiant de la sous-famille J11* (KCNJ11), de la *protéine homologue du locus neurogénique 2* (NOTCH2), de l'*homéobox exprimé au niveau hématopoïétique* (HHEX) et du *gène d'initiation du diabète juvénile* (MODY) (Groop *et al.*, 2008; Lyssenko, 2008). D'ailleurs, l'expression élevée des gènes MODY serait directement responsable d'environ 5 % de tous les cas de diabète de type 2 (Billings *et al.*, 2010).

6.3. Complications associées au diabète

L'hyperglycémie associée au diabète (types 1 et 2) affecte tous les organes et types cellulaires chez le patient et elle est associée à une surproduction de ROS (Nishikawa

et al., 2007). Tel que présenté dans la figure 8, quatre voies de signalisation majeures secondaires à l'élévation des niveaux de glucose sanguin existent dans le diabète, soit : l'augmentation du flux de polyol, l'augmentation de la voie de l'hexosamine, la suractivation de la PKC et, finalement, la formation de *produits de glycation terminale* (AGE) (Brownlee, 2001). Ainsi, le déséquilibre de ces voies de signalisation a comme répercussions les quatre complications majeures associées au diabète, soit: la rétinopathie, la néphropathie, l'hypertension et les neuropathies (Hammes *et al.*, 2003; Houstis *et al.*, 2006).

Figure 8 : Les 4 grandes voies de la glucotoxicité présente chez les diabétiques.



L'hyperglycémie chronique entraîne une augmentation des niveaux d'anion superoxyde ($O_2^{\cdot-}$) qui inhibe la glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase (GAPDH). Conséquemment, on assiste à un ralentissement de la glycolyse et à une accumulation des différents métabolites du glucose. L'accumulation de glucose entraîne un déséquilibre de la voie du polyol menant à la formation de sorbitol. L'augmentation des niveaux de fructose 6-phosphate (fructose 6-P) perturbe la voie de

l'hexosamine et produit ainsi plus de N-acetylglucosamine (GLcNAc). La glycéraldéhyde-3-phosphate (glycéraldéhyde-3-P) augmente la production de produits de glycation terminale (AGE) et l'activité de la protéine kinase C (PKC). Tiré de Brownlee (Brownlee, 2001). Diacylglycérol (DAG), dihydroxyacétone phosphate (DHAP), nicotidamide adénine dinucléotide phosphate (NAD⁺), nicotidamide adénine dinucléotide phosphate réduit (NADH), poly(adénylribose) polymérase (PARP), uridine diphosphate (UDP).

7.0. Les neuropathies diabétiques

Tel qu'établi dans le *Diabetes control and complications trial* (Crofford, 1995), la définition utilisée pour décrire les neuropathies diabétiques est : «*the presence of symptoms and/or signs of peripheral nerve dysfunction in people with diabetes after exclusion of other causes*». Les neuropathies sont donc des affections permanentes du système neurologique caractérisées par une perte progressive de la fonction des fibres nerveuses. Aussi, elles sont la principale cause de neuropathies dans les pays développés, et sont la plus importante source de mortalité, morbidité et amputations chez les diabétiques (Chan *et al.*, 2011). Notez que les neuropathies diabétiques se présentent préférentiellement sous la forme de neuropathies périphériques qui consistent en des affections du système nerveux périphérique (Guastella *et al.*, 2009).

La prévalence des neuropathies diabétiques est proportionnelle à la durée d'exposition au diabète et semble potentialisée par le mauvais contrôle de la glycémie. Ainsi, 10 %

des patients diabétiques diagnostiqués depuis 1 an rapportent des épisodes de neuropathies, comparativement à 50 % des patients diagnostiqués depuis plus de 25 ans. Il est généralement admis que 30 % des patients souffrent de neuropathies périphériques (Vincent *et al.*, 2011).

Il existe une pléthore de symptômes associés aux neuropathies diabétiques. Cependant, ceux-ci sont toujours associés et dépendants du type de fibres nerveuses affectées. En effet, les symptômes peuvent inclure des affections des systèmes moteurs, sensitifs et autonomes. Ainsi, les affections neuropathiques peuvent toucher tous les organes tels que le système digestif, le cœur et les organes sexuels et, bien que certains patients diagnostiqués soient asymptomatiques, la plupart rapportent des douleurs ou des pertes de fonction de leurs membres tels que pieds, mains et bras (Ziegler, 2008) .

Le diagnostic se fait sur la base d'un examen physique pratiqué par un médecin au moyen de tests électrophysiologiques, comme l'évaluation de la conduction nerveuse et l'électromyographie. Ces tests permettent respectivement de déterminer si la conduction nerveuse des patients est compromise, et d'évaluer la qualité de la réponse des muscles à une stimulation électrique. Certains examens indirects, comme l'évaluation de la glycémie sanguine, de la pression artérielle, de la fréquence cardiaque, de la force des muscles, de la qualité des réflexes ainsi que de la sensibilité aux changements d'orientation spatiale, peuvent également conduire au diagnostic de neuropathies chez le patient (Guastella *et al.*, 2009).

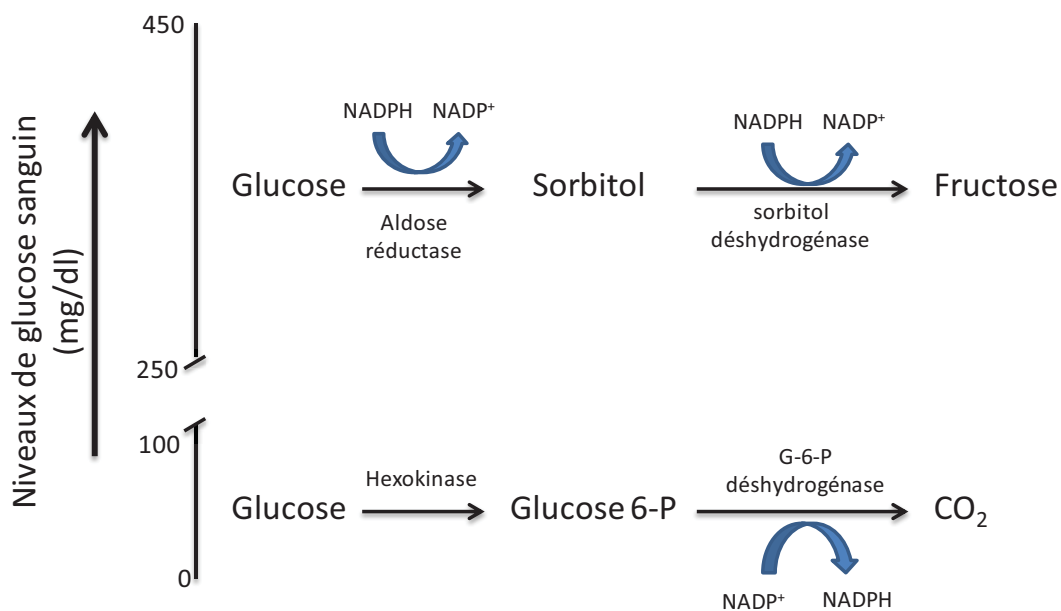
7.1. Pathophysiologie des neuropathies diabétiques

Les facteurs et mécanismes exacts menant au développement des neuropathies périphériques restent à identifier. Par contre, il est généralement admis que le développement de la maladie serait d'origine multifactorielle. Aussi, les principales théories pointent vers certains mécanismes biochimiques comme contributeurs des formes symétriques de la maladie, incluant, entre autres: le déséquilibre des voies du polyol (voir 7.1.1) et son effet sur l'activité des canaux Na^+/K^+ ATPase (voir 7.1.2), la formation d'AGE (voir 7.1.3), la génération de stress oxydatif (voir 7.1.4), NO (voir 7.1.5) et les microangiopathies (voir 7.1.6). Ces mécanismes peuvent aussi bien impliquer une dégénération axonale primaire qu'une démyélinisation secondaire (Oates, 2002).

7.1.1. La voie du polyol

En condition physiologique, le glucose cellulaire est converti en pyruvate sous l'action de diverses enzymes impliquées dans la glycolyse. En outre, lors d'une hyperglycémie, il se produit un changement dans le métabolisme du glucose. Tel qu'observé sur la figure 9, le glucose excédentaire n'est plus oxydé par la voie de la glycolyse, mais est plutôt redirigé vers la voie des polyols (Oates, 2002).

Figure 9 : L'influence des niveaux de glucose intracellulaire sur l'utilisation des voies biochimiques impliquées dans son métabolisme.



En présence de niveaux physiologiques de glucose, celui-ci est métabolisé par la voie de la glycolyse comparativement à l'utilisation de la voie du polyol empruntée en condition d'hyperglycémie. Adapté de Kaul (Kaul *et al.*, 2001). Glucose-6-phosphate (G-6-P; Glucose-6-P), Nicotidamide adénine dinucléotide phosphate (NAD⁺), nicotidamide adénine dinucléotide phosphate réduit (NADH).

La voie du polyol implique une séquence intracellulaire de réactions chimiques ayant pour finalité la conversion du glucose en fructose. Cette même voie implique deux réactions énergie-dépendante qui sont catalysées par des enzymes spécifiques. La première étape, catalysée par l'*aldose réductase* (AR), transforme le glucose en sorbitol et produit comme réaction secondaire l'oxydation de la nicotidamide adénine dinucléotide phosphate (NADPH est converti en NADP⁺). L'étape finale est catalysée par le sorbitol déshydrogénase qui convertit le sorbitol en fructose et réduit le nicotidamine adénine dinucléotide (NAD⁺ est réduite en NADH) (Uehara *et al.*, 2004). Ces deux enzymes possèdent un Km relativement élevé, ce qui signifie que le facteur limitant de cette réaction est la quantité de substrat disponible. En outre, l'augmentation de la concentration cellulaire de sorbitol provoque une déplétion en *myoinositol* (MI) qui est un médiateur important dans plusieurs voies de signalisation intracellulaires. Les hauts niveaux de glucose sanguin induisent la saturation des récepteurs membranaires du MI, prévenant son entrée dans la cellule. Également, l'accumulation intracellulaire de sorbitol favorise l'expulsion du MI cellulaire (Finegold *et al.*, 1983).

Brièvement, l'*inositol* (I) est un polyol carbocyclique impliqué dans plusieurs fonctions intracellulaires, puisqu'il agit comme base structurale de nombreux seconds messagers tels que l'*inositol phosphate* (PI) ainsi que le *phosphatidylinositol phosphate* (PIP). De plus, le MI s'avèrerait le sous-type d'inositol le plus abondant dans la cellule (Klatt *et al.*, 2000).

Ainsi, le déficit en MI perturbe le métabolisme des phospho-inositides, la production de DAG ainsi que la production IP₃. Ceux-ci agissent comme des seconds messagers impliqués dans plusieurs voies de signalisation, entre autres via l'action de la PKC. Ainsi, la diminution des niveaux de DAG et d'IP₃ réduit l'activation de la PKC qui joue, quant à elle, un rôle d'activateur de la pompe Na⁺/K⁺ ATPase (Yokota *et al.*, 2003). La perturbation de l'activité de la pompe Na⁺/K⁺ ATPase engendre la réduction de la concentration intracellulaire de potassium ainsi qu'une augmentation des niveaux de sodium. Le déséquilibre de l'homéostasie de ses ions contribue directement à générer les neuropathies diabétiques par le biais d'anomalies de conductance. En outre, l'augmentation de la concentration de sodium affecte le transport membranaire sodium-dépendant. Le sodium est entre autres impliqué dans le transport de certains acides aminés ainsi que du MI, contribuant de ce fait à une boucle d'auto-amplification (Das Evcimen *et al.*, 2007; Oates, 2008).

Finalement, la perturbation de la voie du polyol a plusieurs autres conséquences physiologiques. En effet, les niveaux cellulaires d'antioxydants tels que le NADPH sont diminués, ce qui provoque une augmentation de la concentration de ROS (voir 7.1.4.). Des mécanismes de répression intracellulaire sont alors mis en branle, impliquant une augmentation de la production d'antioxydants tels que le glutathion et l'oxyde nitrique (NO) (voir 7.1.5.). Finalement, l'augmentation de la concentration en fructose génère un accroissement de la formation d'AGE (voir 7.1.3.). En effet, le fructose serait 10 fois plus actif que le glucose pour produire des réactions de glycosylation (Sato *et al.*, 2006). L'utilisation de certains inhibiteurs de l'AR

(synthèse du polyol) dans des modèles d'animaux diabétiques a permis de retarder l'apparition des neuropathies. Cependant, leur efficacité demeure à confirmer chez l'humain (Oates, 2008).

7.1.2. La pompe Na⁺/K⁺ ATPase

La pompe Na⁺/K⁺ATPase est une enzyme membranaire ubiquitaire qui assure le transport de trois ions sodium vers l'extérieur de la cellule et l'entrée de deux ions potassium. Ce transporteur agit de manière énergie-dépendante via l'hydrolyse d'une molécule d'ATP en ADP. L'activité de cette pompe contribue au maintien de l'homéostasie de la cellule, en régulant les gradients physiologiques du sodium et du potassium. Aussi, elle assure le maintien du potentiel de membrane, ce qui permet la conduction nerveuse (Robbins *et al.*, 2010). L'activité de la pompe Na⁺/K⁺ ATPase peut être perturbée par l'effet de l'hyperglycémie sur la voie du polyol et par l'activité de la PKC. Ceux-ci engendrent des pertes de conduction nerveuse et contribuent à la génération des neuropathies diabétiques (Takigawa *et al.*, 2000; Krishnan *et al.*, 2008).

La perturbation de la pompe Na⁺/K⁺ ATPase induit une diminution de la concentration de potassium disponible dans la cellule, ce qui perturbe également la fonction des pompes voltages-dépendantes Ca²⁺/K⁺, provoquant une hypercalcémie. Cette augmentation intracellulaire de calcium est, quant à elle, responsable d'une dégénérescence axonale directe, ce qui contribue aussi à l'induction des neuropathies. Ces affirmations sont supportées par les études de Gispén (Gispén *et al.*, 1994) qui

démontrent que le calcium intracellulaire est augmenté dans plusieurs tissus d'animaux diabétiques. Finalement, il a été démontré que l'élévation intra-axonale de calcium peut induire des dommages irréversibles aux fibres nerveuses (Creange *et al.*, 2006).

7.1.3. Produit de glycation terminale (AGE)

Les AGE sont un groupe hétérogène de molécules formées par le biais de réactions non enzymatiques entre un sucre (glucose ou fructose) et d'autres molécules telles que des acides aminés, des protéines, des lipides et des acides nucléiques (Ramasamy *et al.*, 2011). Le produit de la réaction initiale forme une base de *Schiff* qui se réarrange spontanément en produit *Amadori*. Les réactions initiales dans le cycle de formation des AGE peuvent être réversibles en fonction de la quantité de substrat disponible (glucose). Ainsi, en condition de glycémie normale, la génération des précurseurs des AGE est réversible. Par contre, lors d'une hyperglycémie, les précurseurs formés ne peuvent être dégradés (Ramasamy *et al.*, 2011). Il s'ensuit alors une série de plusieurs réactions incluant une déshydratation, des cycles d'oxydo-réduction, ainsi que d'autres réarrangements menant à la formation des AGE (Sugimoto *et al.*, 2008).

Une caractéristique clé des AGE est leur grande réactivité combinée à leur capacité à se lier de façon covalente à n'importe quelle protéine. Ainsi, la liaison d'AGE aux protéines empêche celles-ci de bien accomplir leur rôle (Wada *et al.*, 2005). En effet, ils peuvent affecter des protéines importantes dans la formation de la matrice cellulaire

d'un organe ou de la membrane basale, ainsi que des protéines structurales de la paroi des vaisseaux. Aussi, les AGE possèdent des récepteurs cellulaires spécifiques nommés *récepteurs des AGE* (AGER) (Bierhaus *et al.*, 2005). De façon générale, l'activation de ces récepteurs contribue à stimuler la production de ROS et de médiateurs pro-inflammatoires. Plus spécifiquement, les AGE sont connus pour affecter la myéline des fibres nerveuses qui est alors sujette à la phagocytose par les macrophages, ce qui contribuerait à la démyélinisation par segment typiquement observée sur les fibres nerveuses des sujets souffrant de neuropathies diabétiques (Bierhaus *et al.*, 2005). Aussi, les AGE pourraient interférer directement avec des protéines du cytosquelette axonal, comme la tubuline, les neurofilaments et l'actine. La modification de ces protéines pourrait entraîner l'atrophie et la dégénération de l'axone et affecter le transport axonal. Finalement, la glycation de protéines de la matrice extracellulaire (laminine) par les AGE affecterait négativement la capacité intrinsèque de réparation des fibres nerveuses modifiées (Cameron *et al.*, 1991).

L'accumulation d'AGE dans différents types cellulaires chez le patient diabétique est corrélée avec la plupart des complications associées à l'hyperglycémie telles que la rétinopathie, la néphropathie, l'hypertension ainsi que les neuropathies (Sato *et al.*, 2006). De plus, des inhibiteurs spécifiques de la formation des AGE comme l'aminoguanidine, ont démontré des effets bénéfiques dans ces pathologies. Plus spécifiquement, il a été observé que la prise d'aminoguanidine améliore la vitesse de conduction nerveuse et le flux sanguin neuronal dans des modèles animaux de neuropathies. Finalement, les causes environnementales telles que le tabagisme et

l'alimentation contribuent à augmenter directement (ingestion) ou indirectement la formation d'AGE. Une attention particulière portée par les patients à ces facteurs permet de contrôler la quantité d'AGE circulant et de réduire les dommages associés à ceux-ci (Cameron *et al.*, 1991).

7.1.4. Stress oxydatif (ROS)

Une cellule ou organisme est en situation de stress oxydatif lorsque le niveau de production d'espèces oxydantes excède leur capacités anti-oxydantes. De manière générale et physiologique, la respiration aérobie, dépendante de l'oxygène, génère des radicaux libres tels que l'*anion superoxyde* (O_2^-) (Klatt *et al.*, 2000). En effet, la mitochondrie, par le biais de la respiration cellulaire et de la chaîne d'électrons, est la principale source de radicaux libres cellulaires. Outre la chaîne de respiration électronique, certaines enzymes intracellulaires sont impliquées dans la génération d'espèces réactives oxygénés. Les plus connues sont la NADPH oxydase et la *xanthine oxydase* (XAO) (Harrison, 2002).

Brièvement, la NADPH oxydase est une enzyme membranaire ubiquitaire formée de 6 sous-unités, soit Rac (1 ou 2), et 5 sous-unités phox (gp91, p22, p40, p47 et p67). Le rôle primaire de la NADPH oxydase est de participer au processus de défense immunitaire en produisant des ROS, soit l'*anion superoxyde*. La NADPH oxydase génère l'*anion superoxyde* (O_2^-) via le transfert d'un électron du complexe NADPH à un oxygène. Cette réaction génère également une molécule de $NADH^+$ ainsi qu'une

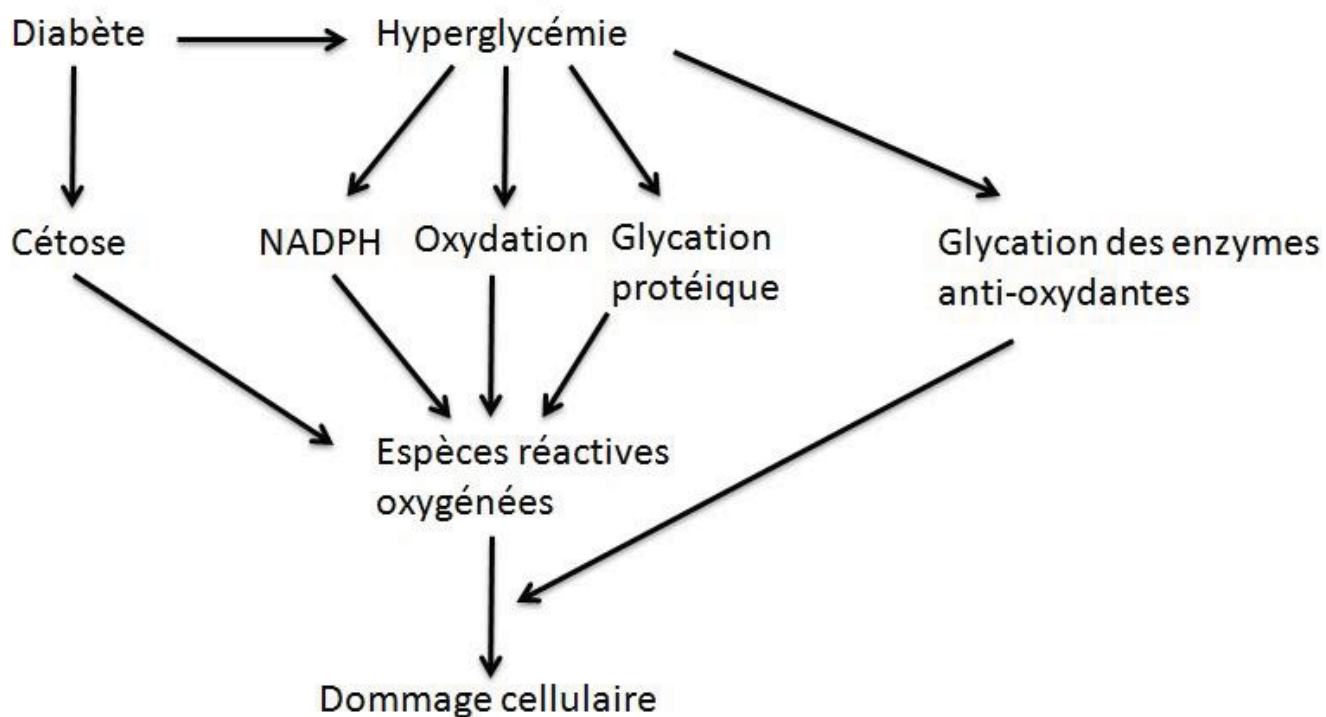
molécule d'hydrogène libre, soit : $\text{NADPH} + 2\text{O}_2 \leftrightarrow \text{NADP}^+ + 2\text{O}_2^{\circ-} + \text{H}^+$. Notez que la majeure partie de l'anion superoxyde générée par la NADPH oxydase l'est dans les phagosomes des neutrophiles et est utilisée pour détruire les microorganismes (bactéries) phagocytés par ces cellules. Par ailleurs, il est prouvé que l'anion superoxyde inhibe certains processus clés des bactéries et initierait la peroxydation lipidique de leurs membranes cellulaires causant leur mort. En outre, il existe deux inhibiteurs majeurs de la NADPH oxydase, soit l'apocynine et le *diphenyleneiodinium* (DPI) (Park *et al.*, 2009). Ceux-ci sont surtout utilisés dans le traitement de l'athérosclérose (Curtiss, 2009). En somme, l'apocynine prévient l'assemblage des sous-unités de la NADPH oxydase, tandis que le DPI agit comme un inhibiteur irréversible de la NADPH oxydase en se liant de façon covalente à la sous-unité p47 phox du complexe, empêchant ainsi son fonctionnement (Tew, 1993).

La XAO est une enzyme membranaire ubiquitaire qui catalyse l'oxydation de l'hypoxanthine en xanthine, puis la transformation de la xanthine en acide urique (Harrison, 2002). La XAO génère majoritairement du peroxyde d'hydrogène, bien que dans certaines circonstances elle soit impliquée dans la génération d'anions superoxydes (Harrison, 2002). En terminant, il existe plusieurs inhibiteurs de la XAO, soit l'allupurinol (Pacher *et al.*, 2006), l'oxypurinol (Spector, 1988) (traitement de la goutte) et l'acide phytique (antioxydant dans le traitement du cancer du colon) (Vucenik *et al.*, 2003).

Les radicaux libres ayant pour base l'oxygène sont nommés espèces réactives oxygénées (ROS) et sont caractérisés par leur très haute réactivité due à la présence d'un de leurs électrons de valence qui est non apparié. De manière générale, les ROS peuvent endommager et modifier la fonction de l'*acide ribonucléique* (ARN), de l'ADN ainsi que des protéines, et sont impliquées dans le processus normal de vieillissement des organismes. En outre, les radicaux libres ainsi générés ne produisent pas nécessairement une situation de stress oxydant, puisque le corps possède plusieurs mécanismes de défense contre les radicaux libres. En effet, ils peuvent être détruits par plusieurs enzymes telles que la superoxyde dismutase, la catalase et la glutathione peroxydase, ainsi que par les vitamines A, C (acide ascorbique) et E (tocophérol) (Figuroa-Romero *et al.*, 2008).

L'hyperglycémie chronique observée dans le diabète insulino- et non insulino-dépendant, entraîne la génération de ROS dans la cellule par plusieurs mécanismes. Tel qu'observé sur la figure 10, le glucose peut entraîner la génération d'AGE qui peuvent être oxydants (Baynes *et al.*, 1999). Aussi, l'hyperglycémie entraîne une suractivation de la voie des polyols qui contribue à diminuer les ratios $\text{NADPH}/\text{NADP}^+$, ce qui a pour conséquence de réduire les défenses antioxydantes de la cellule (Baynes *et al.*, 1999).

Figure 10 : Les différentes voies biochimiques impliquées dans l'augmentation du stress oxydatif sous l'effet de l'hyperglycémie chronique.



L'hyperglycémie observée chez les diabétiques entraîne une augmentation de l'activité de la nicotinamide adénine dinucléotide phosphate (NADPH) oxydase, de l'oxydation et de la glycation protéique et des enzymes antioxydantes (réduit leur activité). De plus, l'insuffisance rénale chez les diabétiques provoque des cas de cétose métabolique. Toutes ces voies ont pour effet d'augmenter les niveaux d'espèces réactives oxygénées. Celles-ci peuvent ensuite induire des dommages cellulaires.

Adapté de Jain (Jain, 2006)

Les travaux de Xia (Xia *et al.*, 1994) et King (King *et al.*, 1996) démontrent que l'hyperglycémie entraîne la suractivation de la PKC, soit via la synthèse de DAG, par l'activation de la PLC ou par l'inhibition de la DAG kinase. Ainsi, la PKC induit une surproduction de ROS en activant la NADPH oxydase mitochondriale (Inoguchi *et al.*, 2000). Ainsi, les anions superoxydes mitochondriaux inhibent l'activité de la *glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase* (GAPDH) qui, en fonction de plusieurs mécanismes, est impliquée dans le maintien de la balance antioxydante cellulaire.

La génération excessive de ROS induite par l'hyperglycémie ainsi que l'incapacité des neurones à détruire ces radicaux libres causent la perte progressive des organelles et le mauvais fonctionnement de la membrane et du noyau cellulaire (Nishikawa *et al.*, 2000). La longueur des axones rend ces derniers particulièrement sensibles aux neuropathies. En outre, elles sont directement en contact avec les vaisseaux sanguins et possèdent une large population de mitochondries (responsables de la production de la plus grande partie des ROS cellulaires). L'exposition des mitochondries aux ROS réduit progressivement leur activité et cause un déficit énergétique qui précipite la dégénération axonale présente dans la neuropathie diabétique. Les mitochondries sont également un centre névralgique de la régulation de la survie et de l'apoptose cellulaire. Ainsi, les atteintes aux mitochondries provoquent l'apoptose des axones neuronaux, par un processus impliquant l'activation des caspases (Palau *et al.*, 2009; Qi *et al.*, 2003). Préalablement, les mitochondries endommagées entrent dans un processus d'autodestruction appelé mitoptose. Ce processus est régulé en fonction des cycles de fusion et de fission des mitochondries. La fission des mitochondries est,

entre autres, régulée par la *protéine reliée à la dynamine 1* (Drp1) qui se déplace du cytosol cellulaire à la mitochondrie en situation de stress (Twig *et al.*, 2008). Notez que les niveaux de Drp1 sont élevés dans des modèles *in vivo* et *in vitro* de polyneuropathies diabétiques. Celle-ci participe à la dysfonction mitochondriale en réduisant la production d'ATP, provoquant ainsi la dégénérescence axonale (Leininger *et al.*, 2006).

Certaines études ont montré que le blocage du stress oxydatif via une modification de l'apport alimentaire en antioxydant avait permis de réduire les niveaux de ROS cellulaires chez des animaux diabétiques. En effet, l'administration d'acide alpha-lipoïque, de *N-acétyl-L-cystéine* (NAC), de vitamines A, C (acide ascorbique) et E (tocophérol), ou de resvératrol (vin rouge), a même permis de faire reculer les neuropathies affectant ces animaux. Par contre, plusieurs études menées chez l'humain avec certains de ces antioxydants présentent des résultats contradictoires qui ne permettent pas, pour le moment, de conclure à un réel bénéfice de la prise d'antioxydants pour traiter les neuropathies diabétiques (Pop-Busui *et al.*, 2006).

7.1.5. Le monoxyde d'azote et le stress oxydatif

Pour une description du NO, des mécanismes impliqués dans sa formation ainsi que pour son rôle physiologique, veuillez vous référer à la section 3.2. de cette thèse. Brièvement, on note une activation de la iNOS en condition inflammatoire, tel qu'observé dans le diabète (Kaneki *et al.*, 2007). En fait, la iNOS est suractivée dans

certains types cellulaires tels que les kératinocytes, les macrophages et les leucocytes. L'excès de NO est connu pour stimuler la NADPH oxydase, ce qui augmente la production de ROS (Muller *et al.*, 2009). La xanthine oxydase mitochondriale contribue également à ce processus. Aussi, les ROS formées par l'hyperglycémie peuvent réagir avec le NO cellulaire et circulant. La réaction des ROS avec le NO produit des molécules comme les nitrosiles et peroxytrinitrites (Muller *et al.*, 2009). Ceux-ci sont des ROS extrêmement réactifs, plus particulièrement avec les groupements thiols des protéines du groupe des *protéines associées aux synaptosomes* (SNAP) dont SNAP 25, ce qui cause la destruction des cônes de régénération des neurones impliqués dans la réparation des fibres nerveuses. Ainsi, les ROS, via la réaction avec le NO, empêchent la régénération des axones détruits lors des neuropathies diabétiques (Zochodne *et al.*, 2005). De nouvelles études suggèrent que les cellules endothéliales ayant un déficit en NO contribuent à générer les microangiopathies (voir 7.1.6.). Cette déplétion en NO produirait directement et indirectement un déficit de la microcirculation neuronale, une hypoxie nerveuse, et influencerait négativement le fonctionnement de la mitochondrie (diminution de la production d'énergie) (Yamagishi *et al.*, 2011). Il n'y a actuellement aucune thérapie qui vise le métabolisme de l'oxyde nitrique. En effet, le déséquilibre des niveaux de NO est davantage considéré comme un effet secondaire au développement des neuropathies diabétiques plutôt qu'un facteur contribuant à leur initiation.

7.1.6. Microangiopathie

La microangiopathie signifie une affection des petits vaisseaux sanguins caractérisée par le rétrécissement et l'affaiblissement de ceux-ci. Cette affection induit alors leur saignement, la fuite de protéines dans le milieu extracellulaire ainsi que le ralentissement du flux sanguin (Yamagishi *et al.*, 2011).

Certaines cellules telles que les cellules endothéliales régulent la quantité de glucose qu'elles absorbent en fonction de sa concentration sanguine, ne possédant aucune régulation enzymatique. Elles sont, en effet, insensibles à l'insuline circulante (Klatt *et al.*, 2010). Ainsi, l'hyperglycémie observée chez le diabétique produit une entrée massive de glucose dans les cellules endothéliales des vaisseaux sanguins qui entraîne une surproduction de AGE (voir 7.1.3.). Ces protéines glyquées ne fonctionnent plus normalement, ce qui provoque une microangiopathie caractéristique formée par le rétrécissement de la membrane basale, en partie produite par la duplication des cellules endothéliales ainsi que par l'affaiblissement du vaisseau. Également, Fagerberg (Fagerberg, 1959) rapporte une accumulation de protéines *acide périodique Schiff* (PAS) dans la paroi des vaisseaux de patients et d'animaux diabétiques, contribuant à leur épaissement. L'épaississement des vaisseaux qui irriguent les fibres nerveuses mène progressivement à leur occlusion, d'abord partielle, puis totale, ce qui induirait respectivement une diminution du flot sanguin nerveux (Cameron *et al.*, 1991) et une ischémie, privant ainsi les neurones de leur apport en oxygène et en nutriments. L'occlusion produit alors la dégénérescence et le mauvais fonctionnement

des axones neuronaux caractéristiques aux neuropathies. De plus, la microangiopathie des vaisseaux irriguant les neurones affecte les capacités intrinsèques de régénération et de réparation des fibres nerveuses (Kennedy *et al.*, 2002). En terminant, bien que plusieurs recherches concluent à la présence de microangiopathie chez les patients souffrant de neuropathies diabétiques, il n'y a pas de consensus quant à la contribution réelle de celle-ci au processus de dégénérescence axonale. En effet, certains suggèrent que la microangiopathie n'est qu'un facteur aggravant dans l'induction des neuropathies.

En résumé, les informations contenues dans la section introduction de cette thèse présentent les mécanismes fondamentaux impliqués dans la génération et la perception de la douleur, les voies impliquées dans sa transmission ainsi que son rôle physiologique et pathologique. Notez que le rôle de certaines cellules du système immunitaire, principalement les microglies et les astrocytes de la moelle épinière, dans la génération de la douleur chronique est également abordé. De plus, les principales molécules impliquées dans la transmission et la génération de la douleur sont décrites. D'ailleurs, une attention particulière est portée sur le système kallibréine-kinine et plus particulièrement sur le récepteur B1 des kinines. Finalement, les complications associées au diabète de types 1 et 2 sont présentées, et tout particulièrement les voies impliquées dans la génération des neuropathies diabétiques.

Ces différentes informations devraient permettre au lecteur d'apprécier l'intérêt ainsi que les conclusions du travail expérimental poursuivi dans cette thèse dont l'objectif est d'affiner les connaissances sur la localisation, les mécanismes d'induction et le rôle physiopathologique du récepteur B1 des kinines dans des modèles expérimentaux de douleur chez le rat.

CHAPITRE II

ARTICLES

8.0. ARTICLE 1

8.1. Problématique

Certaines études suggèrent un rôle clé pour le récepteur B1 des kinines dans l'induction et le maintien des neuropathies diabétiques. Cependant, la localisation cellulaire du B1R dans la moelle épinière des animaux diabétiques, ainsi que dans d'autres modèles expérimentaux, demeure très fragmentaire dû à l'absence d'anticorps spécifique dirigé contre ce récepteur. Néanmoins, cette information s'avère essentielle dans la compréhension du rôle pro-nociceptif du B1R.

8.2. Objectif

Développer et caractériser une sonde spécifique permettant de localiser, en microscopie confocale, les cellules exprimant le B1R dans la moelle épinière du rat diabétique de type 1.

8.3. Méthode expérimentale

Au moyen d'une procédure de chimie organique (non traitée en détail ici), un agoniste sélectif du B1R (des-Arg⁹-BK) fut couplé à un fluorophore (N^α-Bodipy) pour former un agoniste fluorescent ([N^α-Bodipy]-des-Arg⁹-BK). Ensuite, nous avons caractérisé la sélectivité du [N^α-Bodipy]-des-Arg⁹-BK pour le B1R versus B2R en réalisant des courbes de déplacement en autoradiographie quantitative. Ces résultats ont révélé une haute sélectivité de la sonde permettant l'immunolocalisation du B1R.

Des rats Sprague-Dawley mâles ont été rendus diabétiques suivant l'administration intrapéritonéale de STZ (65 mg/kg). L'induction du diabète et celle du B1R (ARNm, sites de liaisons spécifiques) ont été confirmées chez les rats STZ. Des sections coronales non fixées de moelle épinière thoracique ont été exposées au [N^α-Bodipy]-des-Arg⁹-BK ainsi qu'à des anticorps spécifiques et analysées en microscopie confocale.

8.4.Contribution

ST a fait le design expérimental, a réalisé les expériences, a analysé les données et a écrit la première version du manuscrit. PTT et JS ont réalisés les expériences en autoradiographie. DL a réalisé la culture primaire des cellules de la microglie. PG a synthétisé le ligand fluorescent. RC a participé à l'interprétation des résultats et au design expérimental et a écrit la version finale du manuscrit.

8.5.Référence

Talbot Sébastien, Théberge-Turmel P, Liazoghli D, Sénécal J, Gaudreau P and Couture R. Cellular localization of kinin B1 receptor in the spinal cord of streptozotocin-diabetic rats with a fluorescent agonist, [Nalpha-Bodipy]-des-Arg⁹-bradykinin. *J Neuroinflammation*. **2009**. Mar 26;6(1):11. PMID: 19323833.

Research

Open Access

Cellular localization of kinin B₁ receptor in the spinal cord of streptozotocin-diabetic rats with a fluorescent [N^α-Bodipy]-des-Arg⁹-bradykinin

Sébastien Talbot , Patrick Théberge-Turmel , Dalinda Liazoghli , Jacques Sénécal , Pierrette Gaudreau and Réjean Couture

Published: 26 March 2009

Received: 5 November 2008

Journal of Neuroinflammation 2009, **6**:111 doi:10.1186/1742-2094-6-111

Accepted: 26 March 2009

This article is available from: <http://www.jneuroinflammation.com/content/6/1/111>

© 2009 Talbot et al; licensee BioMed Central Ltd.

This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<http://creativecommons.org/licenses/by/2.0>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Abstract

Background: The kinin B₁ receptor (B₁R) is upregulated by pro-inflammatory cytokines, bacterial endotoxins and hyperglycaemia-induced oxidative stress. In animal models of diabetes, it contributes to pain polyneuropathy. This study aims at defining the cellular localization of B₁R in thoracic spinal cord of type I diabetic rats by confocal microscopy with the use of a fluorescent agonist, [N^α-Bodipy]-des-Arg⁹-BK (BdABK) and selective antibodies.

Methods: Diabetes was induced by streptozotocin (STZ; 65 mg/kg, i.p.). Four days post-STZ treatment, B₁R expression was confirmed by quantitative real-time PCR and autoradiography. The B₁R selectivity of BdABK was determined by assessing its ability to displace B₁R [¹²⁵I]-HPP-desArg¹⁰-Hoe 140 and B₂R [¹²⁵I]-HPP-Hoe 140 radioligands. The *in vivo* activity of BdABK was also evaluated on thermal hyperalgesia.

Results: R was increased by 18-fold (mRNA) and 2.7-fold (binding sites) in the thoracic spinal cord of STZ-treated rats when compared to control. BdABK failed to displace the B₂R radioligand but displaced the B₁R radioligand (IC₅₀ = 5.3 nM). In comparison, IC₅₀ values of B₁R selective antagonist R-715 and B₁R agonist des-Arg⁹-BK were 4.3 nM and 19 nM, respectively. Intraperitoneal BdABK and des-Arg⁹-BK elicited dose-dependent thermal hyperalgesia in STZ-treated rats but not in control rats. The B₁R fluorescent agonist was co-localized with immunomarkers of microglia, astrocytes and sensory C fibers in the spinal cord of STZ-treated rats.

Conclusion: The induction and up-regulation of B₁R in glial and sensory cells of the spinal cord in STZ-diabetic rats reinforce the idea that kinin B₁R is an important target for drug development in pain processes.

Background

Kinins are vasoactive peptides and central mediators acting through the activation of two G-protein-coupled receptors (R) denoted as B₁ and B₂ [1,2]. The B₂R is widely and constitutively expressed in central and peripheral tissues and is activated by its preferential agonists bradykinin (BK) and Lys-BK. The B₁R is activated by the active metabolites des-Arg⁹-BK and Lys-des-Arg⁹-BK and has a low level of expression in healthy tissues. The latter receptor is upregulated after exposure to pro-inflammatory cytokines, bacterial endotoxins, and hyperglycaemia-induced oxidative stress [3-7].

An important role for kinin B₁R has been postulated in nociception and pain [8-10]. B₁R knock out mice are less sensitive to pro-inflammatory pain stimuli and to spinal sensitization [11-13]. B₁R partakes to mechanical and/or thermal hyperalgesia induced by cytokines [14,15] through peripheral protein kinase C activation [16] and in the formalin test [17,18]. It also contributes to neuropathic pain after peripheral nerve injury [18-23] or after the induction of type 1 diabetes with streptozotocin (STZ) [24-27] and type 2 diabetes with high glucose feeding [7,28,29]. Thermal hyperalgesia was evoked by intraspinal stimulation of B₁R in STZ-diabetic rats [9].

Basal expression of B₁R was reported in the rat and human spinal cord dorsal horn as well as in rat dorsal root ganglion and small caliber primary sensory neurons [30-32]. Autoradiographic B₁R binding sites are increased and distributed all over the grey matter of the spinal cord after peripheral nerve injury [22] and in models of diabetes [7,29,33]. This spatial distribution of B₁R binding sites suggests that this receptor is not limited to primary sensory afferents but could also be present on spinal cord microglia and astrocytes.

To consolidate the role of B₁R in pain polyneuropathy, its cellular distribution was investigated in the spinal cord of STZ-induced B₁R with a newly developed fluorescent agonist named [N α -Bodipy]-des-Arg⁹-BK (BdABK). The B₁R selectivity of BdABK was determined by assessing its ability to displace B₁R ([¹²⁵I]-HPP-desArg¹⁰-Hoe 140) and B₂R ([¹²⁵I]-HPP-Hoe 140) radioligands by autoradiography. Moreover, the displacement of BdABK fluorescent labeling by B₁R antagonists (R-715 and SSR240612) was assessed by confocal microscopy. We also investigated the *in vivo* activity of BdABK in comparison with its native agonist on thermal hyperalgesia in both STZ-treated and control rats. Appropriate selective antibodies were used in confocal microscopy to co-localize B₁R on astrocytes, microglia and sensory C fibers in STZ-diabetic rats. The induction and overexpression of B₁R in the spinal cord of STZ-diabetic rats was confirmed by qPCR and autoradiography. Experiments were achieved 4 days after STZ admin-

istration because previous studies showed that spinal cord B₁R was maximally up-regulated and engaged in thermal hyperalgesia 2 days after STZ treatment [9,33].

Methods

Animals and treatments

All research procedures and the care of the animals were in compliance with the guiding principles for animal experimentation as enunciated by the Canadian Council on Animal Care and were approved by the Animal Care Committee of our University. Male Sprague-Dawley rats (200-225 g, Charles River, St-Constant, Que., Canada) were housed two per cage, under controlled conditions of temperature (23 °C) and humidity (50%), on a 12 h light-dark cycle and allowed free access to normal chow diet (Charles River Rodent) and tap water.

STZ treatment

Rats were used 5 days after their arrival and injected under low light with freshly prepared STZ (65 mg/kg; i.p.; Sigma-Aldrich, Oakville, ON, Canada). Age-matched controls were injected with vehicle (sterile saline 0.9%, pH. 7.0) [33]. Glucose concentrations were measured, with a commercial blood glucose-monitoring kit (Accusoft; Roche Diagnostics, Laval, Que., Canada), in blood samples obtained from the tail vein, in non-fasting animals, before STZ injection, and 4 days after treatment. Only STZ-treated rats whose blood glucose concentration was higher than 20 mM were considered as diabetic.

Synthesis of [N α -Bodipy]-des-Arg⁹-BK

BdABK was synthesized using 4,4-difluoro-5,7-dimethyl-4-bora-3a, 4a-diaza-s-indacene-3-propionic acid succinimidyl ester (BODIPY[®] FL SE, Molecular Probes/Invitrogen Canada Inc, Burlington, ON; emission 510 nm) and des-Arg⁹-BK (Bachem Bioscience inc., King of Prussia, PA, USA). Des-Arg⁹-BK was solubilized in 100 mM NaHCO₃ 0.1 M (pH 8.4), at a concentration of 1 mg/ml and two equivalents of BODIPY[®] FL SE, solubilized in degassed dimethyl sulfoxide, at a concentration of 5 mg/ml was added. Completion of the reaction was achieved in 2 h, at ambient temperature, under continuous agitation. The fluorescent peptide was lyophilized and purified by C18 reverse-phase HPLC as previously described [34,35]. The purity of the peptide was \geq 98% as assessed by analytical HPLC (UV and fluorescence detection).

Tissue preparation for autoradiography and microscopy

Four days after injection of STZ, rats were anaesthetized with CO₂ inhalation and then decapitated. Upper thoracic spinal cord (T3-T7) was removed and frozen in 2-methylbutane (cooled at -40 °C following exposure to liquid nitrogen) and stored at -80 °C. Few days later, spinal cords were mounted in a gelatin block and serially cut into 20- μ m thick coronal sections with a cryostat. Thus the sec-

tions were thaw-mounted on 0.2% gelatin-0.033% chromium potassium sulfate-coated slides and kept at -80°C for 1 month to allow the adhesion of sections to the coverslip glasses.

Confocal microscopy

Slides preparation

On the day of experiments, sections were thawed at room temperature for 10 min to enhance sections adhesion. They were pre-incubated for 10 min in 25 mM PIPES- NH_4OH buffer (pH 7.4) to allow degradation of endogenous kinins which could occupy receptors. Sections were exposed for 90 min to 50 μM BdABK. Thereafter, slides were washed twice (1 min) in PIPES and fixed with 4% para-formaldehyde [36]. Slides were washed three times (5 min) and then exposed to 1 M of glycine for 90 min to eliminate autofluorescence from aldehyde-fixed tissue. Tissues were permeabilized for 45 min with 0.1% Triton X-100.

Immunolabeling protocol

Slides were incubated with a blocking buffer (25 mM PIPES buffer supplemented with 3% bovine serum albumin (BSA) and 3% donkey serum) to prevent non-specific labeling. Antibodies were diluted in blocking buffer. A direct marker of DNA (TOPRO-3; Molecular Probes, Eugene, OR) was used at concentration of 1:5000. Rabbit anti-Ionized calcium binding adapter molecule 1 (anti-IBA-1, Wako, Richmond, VA) at a concentration of 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ was used to label microglia [37-39]. Chicken anti-Glial fibrillary acidic protein (anti-GFAP, Chemicon, Hornby, ON) at a concentration of 1:500 was used as a specific marker of astrocytes [40]. Rabbit anti-calcitonin-gene-related peptide (CGRP) (Chemicon, Hornby, ON) at a concentration of 1:2000 was used as marker of sensory C fibers [41]. Mouse anti-transient receptor potential vanilloid 1 (TRPV1) (Chemicon, Hornby, ON) at a concentration of 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ was used to label capsaicin receptor expressed on primary afferents [42]. Secondary antibodies were rhodamine anti-mouse (Chemicon, Hornby, ON) 1:500; cy5 anti-chicken (Chemicon, Hornby, ON) 1:500 and rhodamine anti-rabbit (Chemicon, Hornby, ON) 1:500.

Coverslip and microscopy

Slides were washed 3 times (5 min), mounted with coverslip, fixed with mowiol (12 h at room temperature) and

stored at -4°C for 1 month or used in confocal microscopy.

SYBR green-based quantitative RT-PCR

Four days after injection of STZ, rats were anaesthetized with CO_2 inhalation and then decapitated. The thoracic spinal cord (T1-T2) was isolated and approximately 10 mg of tissue were put in RNA later stabilization reagent (QIAGEN, Valencia, CA, USA). Total RNA was extracted from tissue according to the manufacturer's instructions. First-strand cDNA synthesized from 400 ng total RNA with random hexamer primers was used as template for each reaction with the QuantiTect Rev Transcription Kit (QIAGEN). SYBR Green-based real-time quantitative PCR using Mx3000p device for signal detection (Stratagene, La Jolla, CA, USA) was performed as described [43]. PCR was performed in SYBR Green Master mix (QIAGEN) with 300 nM of each primer. For standardization and quantification, rat 18S was amplified simultaneously. The primer pairs were designed by Vector NTI software and used [6] (Table 1).

PCR conditions were as follows: 95°C for 15 min, followed by 46 cycles at 94°C for 15 s, 60°C for 30 s and 72°C for 30 s. The cycle threshold (Ct) value represents the cycle number at which a fluorescent signal rises statistically above background [44]. The relative quantification of gene expression was analyzed by the $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ method [45].

Quantitative autoradiography

Specific binding sites of [^{125}I]-HPP-desArg 10 -Hoe 140 and [^{125}I]-HPP-Hoe 140

The radioligands for kinin B $_1$ R, HPP-desArg 10 -Hoe140 (3-(4 hydroxyphenyl) propionyl-desArg 9 -D-Arg 0 [Hyp 3 , Thi 5 , D-Tic 7 , Oic 8]Bradykinin) and kinin B $_2$ R, HPP-Hoe140 (3-(4 hydroxyphenyl) propionyl-D-Arg 0 [Hyp 3 , Thi 5 , D-Tic 7 , Oic 8]Bradykinin) were synthesized and kindly provided by Dr Witold Neugebauer (Dept Pharmacology, University of Sherbrooke, Sherbrooke, Que., Canada). They were iodinated by the chloramine T method [46]. On the day of experiments, sections were incubated at room temperature for 90 min in 25 mM PIPES- NH_4OH buffer (pH 7.4) containing: 1 mM 1,10-phenanthroline, 1 mM dithiothreitol, 0.014% bacitracin, 0.1 mM captopril, 0.2% bovine

Table 1: PCR primer pairs used in this study

	Sequences	Position	Gen Bank
18S Forward	5' TCA ACT TTC GAT GGT AGT CGC CGT 3'	363 – 386	X01117
18S Reverse	5' TCC TTG GAT GTG GTA GCC GTT TCT 3'	470 - 447	
B $_1$ receptor Forward	5' GCA GCG CTT AAC CAT AGC GGA AAT 3'	367 – 391	NM_030851
B $_1$ receptor Reverse	5' CCA GTT GAA ACG GTT CCC GAT GTT 3'	478 - 454	

serum albumin (protease free) and 7.5 mM magnesium chloride in the presence of 200 pM of [¹²⁵I]-HPP-desArg¹⁰-Hoe 140 or [¹²⁵I]-HPP-Hoe 140 (specific activity: 2000 cpm/fmol or 1212 Ci/mmol) [29,33]. Non-specific binding was determined in the presence of 1 μM of unlabeled B₁R antagonist: R-715 (AcLys [D-βNal⁷, Ile⁸]des-Arg⁹-BK) [1] or of 1 μM of unlabeled B₂R antagonist: Hoe 140 (Icatibant or JE 049, Jerini AG, Berlin, Germany) [47]. At the end of the incubation period, slides were transferred sequentially through four rinses of 4 min each in 25 mM PIPES (pH 7.4; 4 °C) dipped for 15s in distilled water (4 °C) to remove the excess of salts, and then air-dried. Kodak Scientific Imaging Films BIOMAX™ MR® (Amersham Pharmacia Biotech Canada) were juxtaposed onto the slides in the presence of [¹²⁵I]-microscales and exposed at room temperature for 7 days. The films were developed (GBX developer) and fixed (GBX fixer). Autoradiograms were quantified by densitometry using an MCID™ image analysis system (Imaging Research, St. Catharines, ON, Canada). A standard curve from [¹²⁵I]-microscales was used to convert density levels into femtomoles per milligram of protein [48]. Specific binding was determined by subtracting values of nonspecific binding from that of total binding.

Specificity of BdABK

To assess the specificity of BdABK for B₁R, competition curves were performed in autoradiography by incubating 200 pM of [¹²⁵I]-HPP-desArg¹⁰-Hoe 140 with increasing concentrations (10⁻¹⁰ to 10⁻⁶ M) of R-715 (selective B₁R antagonist, kindly provided by Dr Domenico Regoli, Pharmacology, University of Ferrara, Italy), des-Arg⁹-BK (dABK, selective B₁R agonist, Bachem Bioscience inc., King of Prussia, PA, USA) and BdABK. Moreover, competition curves were performed by incubating 200 pM of [¹²⁵I]-HPP-Hoe 140 with increasing concentrations (10⁻¹⁰ to 10⁻⁶ M) of Hoe 140 (selective B₂R antagonist) and BdABK. Each concentration of each competitor was tested on 4 sections per rat from 7 different rats. Those sections were exposed to the film, and total binding was calculated as described above. Moreover, the specificity of BdABK was determined in confocal microscopy by the displacement of fluorescent labeling with the addition of 10⁻⁵ M R-715 or SSR240612 [(2R)-2-(((3R)-3-(1,3-benzodioxol-5-yl)-3-[[6-methoxy-2-naphthyl]sulfonyl]amino]propanoyl)amino)-3-(4-[2R, 6S]-2,6 dimethylpiperidinyl)methyl]phenyl)-N-isopropyl-N-ethylpropanamide hydrochloride] (kindly provided by Dr Pierre Carayon, Sanofi-Aventis, Montpellier, France) [18] to the incubation medium.

Microglial cell culture

Primary cell culture method

Mixed glial cultures were prepared following the protocol of McCarthy and de Vellis [49] with some modifications. Briefly, forebrains were dissected out from one litter of 2-

day-old Sprague-Dawley rat pups and the meninges were stripped off before enzymatic and mechanical dissociation. For enzymatic dissociation, HBSS containing 0.25% trypsin (Gibco 15090-046) was used. The tissue-trypsin suspension was incubated for 20 min at 37 °C in a water bath with intermittent shaking. After the waiting time for the trypsin digestion is over we added to the tissue-trypsin suspension a mixture of prewarmed DMEM/Dnase I (Sigma DN-25, Dnase I final concentration 0.25 mg/ml) followed by an incubation for 4 min at 37 °C. The resulting suspension was dispersed by a mild mechanical trituration which consisted in the passage through 18-, 22- and 25- gauge needles. This cell suspension was then filtered through 70 μm strainer (BD Falcon 352350). After extensive washes in prewarmed HBSS, these dissociated cells were resuspended and plated in 75-cm² Falcon tissue-culture flasks (BD Biosciences) previously coated with 10 μg/ml poly-D-lysine (PDL). These mixed cells were growing at 37 °C and 5% CO₂ in DMEM (Gibco) supplemented with 10% FBS, penicillin (100 units/ml), and streptomycin (100 mg/ml). The media was changed every 2 or 3 days thereafter.

At 10 days-*in-vitro*, a confluent monolayer of astrocytes was apparent, on top of which oligodendrocyte precursor cells and a loosely attached layer of phase-bright microglia was obtained. Microglia were collected by shaking the flasks for 1 h at 200 rpm at 37 °C and 5% CO₂. Dislodged cells were resuspended and grown in culture medium for microglia [RPMI medium 1640 (Gibco) supplemented with 10% FBS, L-glutamine (1 mM), sodium pyruvate (1 mM), penicillin (100 units/ml), and streptomycin (100 mg/ml)]. The cells were allowed to adhere to the surface of PDL-coated coverslips (30 min at 37 °C and 5% CO₂), and nonadherent cells were rinsed off.

Microglia cells preparation for confocal microscopy

Briefly, confluent cells were exposed to 300 nM of BK for 24 h to induce B₁R [50,51]. Control cells were exposed to vehicle. After incubation with BdABK, cells were washed, then fixed and permeabilized with 100% methanol previously stored at -20 °C. The fixed cells were then processed as described for immunostaining.

Thermal hyperalgesia

Thermal hyperalgesia was assessed according to the method described by Hargreaves et al., 1988 [52] with minor modifications. Briefly, rats were placed (unrestrained) within a Plexiglass enclosure on a transparent glass floor and allowed to acclimatize for 20–30 min. An infrared beam that constitutes the noxious heat stimulus (Plantar test, Ugo Basile, Italy) was moved beneath the plantar surface of the hind paw. Thermal nociceptive threshold was defined as the latency (seconds) between the heat stimulus (46 °C) onset and the paw withdrawal using a feedback-controlled shut-down unit. A cut-off time of 33

s was used to avoid tissue damage. Each paw was tested three times alternatively at minimum intervals of 3 min between stimulation to avoid sensitization of the hind paw. The rats were trained on several days prior to testing B₁R agonists. Thereafter, the thermal nociceptive threshold was assessed on 3 consecutive days as follows: day 1: baseline, saline and the first dose of des-Arg⁹-BK and BdABK (22.5 µg/kg); day 2: des-Arg⁹-BK and BdABK (225 µg/kg); day 3: des-Arg⁹-BK and BdABK (2250 µg/kg). Agonists were injected intraperitoneally at 1 h apart. This series of experiments was conducted in 3 control and 3 STZ-diabetic rats because the quantity of BdABK available for *in vivo* study was restricted. Thermal hyperalgesia was calculated as a percentage of the maximum possible effect (% MPE) according to the following formula: % MPE = (100 × (drug latency minus baseline latency)/(cut-off time minus baseline latency)) [9]. The baseline latency corresponds to the average of the first three measurements.

Statistical analyses

All data were expressed as means ± S.E.M. obtained from *n* rats. Statistical significance was determined with Student's *t*-test for unpaired samples or a one-way analysis of variance (ANOVA) followed by post-hoc Dunnett test for multiple comparisons. IC₅₀ values were calculated by Graph Pad Prism 4.0 (GraphPad software, USA). Only probability (*P*) values less than 0.05 were considered to be statistically significant.

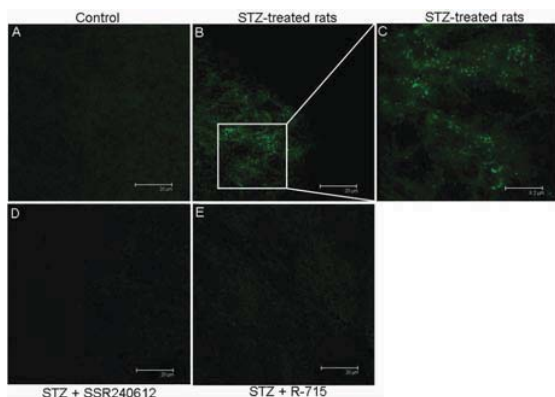


Figure 2
[N α -Bodipy]-des-Arg⁹-BK (BdABK) selectivity for B₁R was evaluated by confocal microscopy. While B₁R labeling in the presence of BdABK was absent in thoracic spinal cord of control rats (A), it was shown as green dots in STZ-treated spinal cord (B, and enlarged in C). B₁R labeling was absent in STZ-treated spinal cord when BdABK (50 µM) was co-incubated with 10⁻⁵M SSR240612 (D) or 10⁻⁵M R-715 (E). Background staining represents non specific autofluorescence. Scale bars = 20 µm (A, B, D, E) and 8.2 µm (C). Pictures are representative of a minimum of 4 sections per rat from 4 different STZ-diabetic rats.

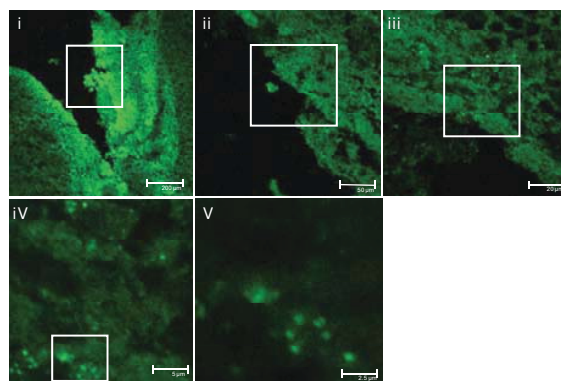


Figure 1
B₁R distribution in thoracic spinal cord of STZ-treated rats was shown by confocal microscopy with [N α -Bodipy]-des-Arg⁹-BK. Shown are pictures from low (i) to high magnification (V) of the dorsal horn. Scale bars = 200, 50, 20, 5 and 2.5 µm, respectively from (i) to (V). Pictures are representative of a minimum of 4 sections per rat from 4 different STZ-diabetic rats.

Results

B₁R fluorescent labeling and selectivity of BdABK

Figure 1 illustrates B₁R labeling with BdABK from low (i) to high (V) magnification (green dots) in dorsal horn of thoracic spinal cord of STZ-treated rats. As depicted in Figure 2, BdABK showed no labeling in control thoracic spinal cord (A), while the labeling of B₁R was apparent in thoracic spinal cord of STZ-treated rats as revealed by green dots (B). Selectivity and specificity of the labeling were demonstrated by the absence of BdABK labeling in STZ-spinal cord sections when the B₁R antagonists SSR240612 (D) and R-715 (E) were added at 10⁻⁵M.

B₁R and B₂R binding and IC₅₀ value of BdABK

Competition experiments using 200 pM [¹²⁵I]-HPP-desArg¹⁰-Hoe 140 and 10⁻¹⁰ to 10⁻⁶ M of des-Arg⁹-BK, R-715, or BdABK revealed that kinin analogues decreased in a concentration-dependent manner the binding of [¹²⁵I]-HPP-desArg¹⁰-Hoe 140 in the thoracic spinal cord of STZ-treated rats (Fig. 3). The rank order of potency to inhibit total B₁R binding sites was R-715 = BdABK > des-Arg⁹-BK with IC₅₀ values of 4.3 ± 0.2 nM, 5.3 ± 0.1 nM and 19 ± 0.2 nM, respectively. In contrast, BdABK (10⁻¹⁰ to 10⁻⁶M) failed to inhibit the binding of 200 pM [¹²⁵I]-HPP-Hoe 140 to B₂R in the thoracic spinal cord of STZ-treated rats (Fig. 4). In comparison, same concentrations of Hoe 140 displaced B₂R binding sites with IC₅₀ value of 1.33 ± 0.1 nM.

BdABK mediated *in vivo* thermal hyperalgesia

The *in vivo* effect of BdABK on pain behavior was assessed by determining its ability to induce thermal hyperalgesia upon intraperitoneal injection in STZ-treated rats. As

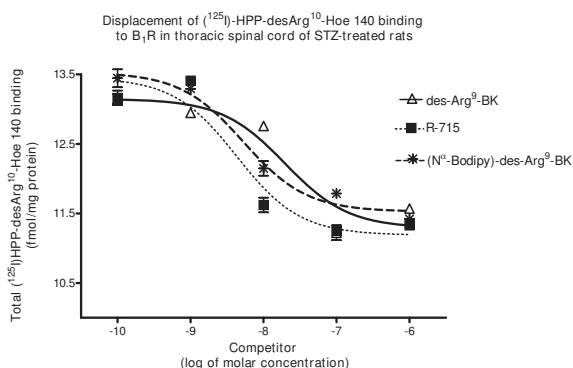


Figure 3
[N α -Bodipy]-des-Arg⁹-BK selectivity for B₁R was evaluated by quantitative autoradiography. R-715 (selective B₁R antagonist), des-Arg⁹-BK (selective B₁R agonist) and [N α -Bodipy]-des-Arg⁹-BK (fluorescent agonist of B₁R) displaced in a concentration-dependent manner, from 10⁻¹⁰ to 10⁻⁶ M, the total binding of 200 pM [¹²⁵I]-HPP-desArg¹⁰-Hoe 140 to B₁R. Data are means \pm SEM of 4 sections per rat from 7 different rats for each compound.

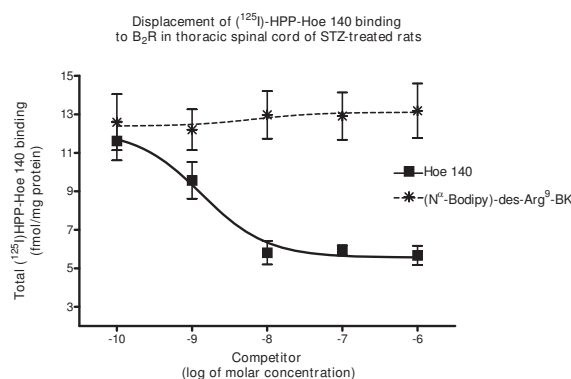


Figure 4
[N α -Bodipy]-des-Arg⁹-BK affinity for B₂R was evaluated by quantitative autoradiography. Increasing concentration (10⁻¹⁰ to 10⁻⁶ M) of Hoe 140 (selective B₂R antagonist) displaced total binding of 200 pM [¹²⁵I]-HPP-HOE-140 to B₂R. In contrast, same concentrations of [N α -Bodipy]-des-Arg⁹-BK (fluorescent B₁R agonist) did not displace the B₂R radioligand. Data are means \pm SEM of 4 sections per rat from 7 different rats for each compound.

expected, BdABK and des-Arg⁹-BK had no significant effect on the nociceptive threshold in control rats, yet both agonists caused thermal hyperalgesia in STZ-diabetic rats at 0.225 and 2.25 mg/kg. These effects were dose-dependent and significant when compared to saline or control (Fig. 5). BdABK was however slightly but significantly less potent than des-Arg⁹-BK to induce hyperalgesia at the highest dose. As exemplified by des-Arg⁹-BK, this response peaked at 15 min post-injection and was reversible after 30 min (Fig. 6).

B₁R mRNA expression assessed by qPCR

A low basal expression of kinin B₁R mRNA was detected in the spinal cord of control rats (Fig. 7). This expression was significantly increased (18-fold) in the spinal cord of STZ-diabetic rats.

Density of B₁R binding sites assessed by quantitative autoradiography

As presented in Figure 8, quantitative *in vitro* autoradiography showed an increase density of specific B₁R binding sites throughout the grey matter of the thoracic spinal cord in STZ-treated rats when compared to age-matched control spinal cord. B₁R binding sites (2.4 fmol/mg protein) in spinal cord of STZ-treated rats were 2.7-fold greater than those measured in control rats (0.9 fmol/mg protein).

B₁R colocalized on microglial cells in thoracic spinal cord

Figure 9 shows the colocalization of BdABK, TOPRO-3 and anti-IBA-1 in STZ thoracic spinal cord. Data suggest that B₁R is present on spinal microglial cells in STZ-diabetic rats.

B₁R colocalized in primary cultured microglial cells

Figure 10 shows the colocalization of BdABK, TOPRO-3 and anti-IBA-1 in primary microglial cell culture. B₁R was induced by a pre-treatment with 300 nM BK. About 95 \pm 2% of the primary cell culture showed a positive labeling

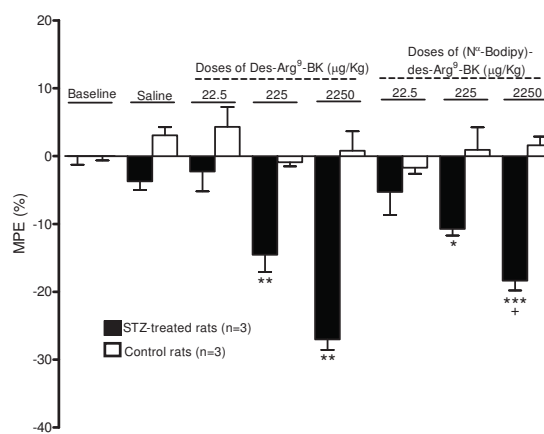


Figure 5
The ability of intraperitoneally injected [N α -Bodipy]-des-Arg⁹-BK and its native agonist, des-Arg⁹-BK, to alter the paw withdrawal threshold in STZ-treated and control rats. Data represent maximal effects and are the average of 3 readings taken at 9, 12 and 15 min post-injection in 3 rats per group. Statistical comparison to control (*) and 2250 μ g/kg des-Arg⁹-BK (+) are indicated by * + P < 0.05; ** P < 0.01; *** P < 0.001.

Change in nociceptive threshold to des-Arg⁹-BK (2.25 mg/kg, ip) in STZ-treated rats

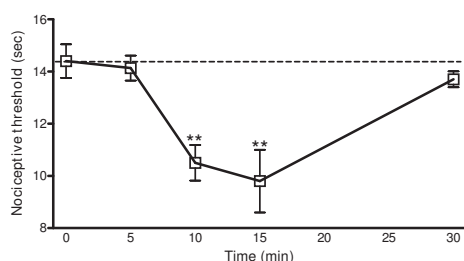


Figure 6
Time-course effect of des-Arg⁹-BK (2.25 mg/kg, i.p.) on the nociceptive threshold in STZ-treated rats. Data are means \pm SEM of 3 rats. Statistical comparison to time 0 (*) is indicated by ** $P < 0.01$.

with anti-IBA-1 confirming cell purity. Data suggest that B₁R can be induced *in vitro* on microglial cells.

B₁R colocalized on sensory C fibers in thoracic spinal cord

Figure 11 shows the colocalization of BdABK, anti-TRPV1 and anti-CGRP in the thoracic spinal cord of STZ-treated rats. Data suggest that B₁R and TRPV1 are co-localized on sensory C fibers in STZ-diabetic rats.

B₁R colocalized on astrocytes in thoracic spinal cord

Figure 12 shows the colocalization of BdABK and anti-GFAP in the spinal cord of STZ-treated rats. Data suggest that B₁R is also present on spinal astrocyte cells in STZ-diabetic rats.

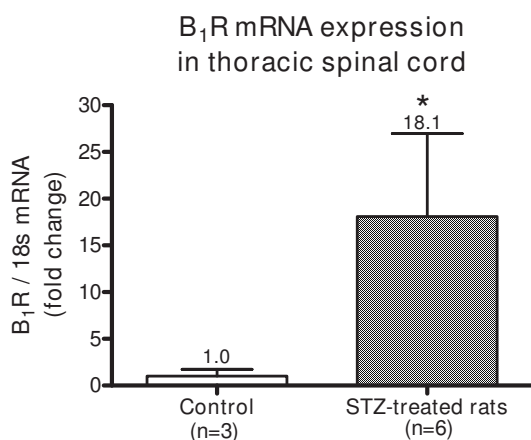


Figure 7
B₁R mRNA expression in STZ-treated and control thoracic spinal cords was measured by quantitative real-time PCR. Data are means \pm SEM of (3 to 6) rats. Statistical comparison with control is indicated by * $P < 0.05$.

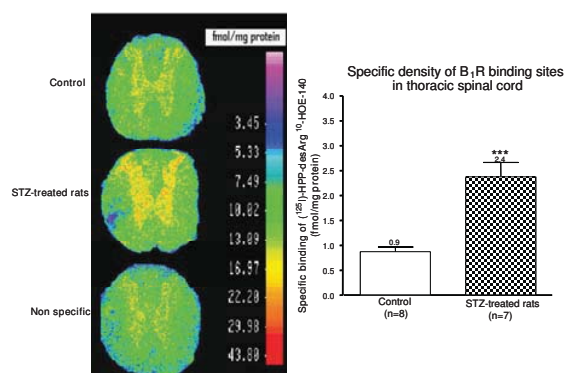


Figure 8
B₁R binding sites in STZ-treated and control thoracic spinal cords were measured by quantitative autoradiography. Specific density of B₁R binding sites are means \pm SEM of (7 to 8) rats. Statistical comparison with control is indicated by *** $P < 0.001$.

Discussion

This study is using a newly developed selective and high affinity fluorescent ligand enabling the cellular localization of B₁R on unfixed tissue. It provides the first evidence that B₁R is localized on microglial cells, astrocytes and sensory C fibers in the thoracic spinal cord of STZ-diabetic rats. This study also highlights the early upregulation of B₁R (mRNA and binding sites) in the thoracic spinal cord of hyperglycaemic STZ-treated rats.

Diabetes induces B₁R expression

STZ-diabetic rats provide an accessible model for studying the expression, the pharmacology and physiopathology of the B₁R in the central nervous system. Pharmacological data showed that functional B₁R was expressed in spinal cord of STZ-treated rats; its spinal activation led to sympathetically mediated increases of blood pressure and heart rate [53] and to thermal hyperalgesia [9]. Further autoradiographic and functional evidence for B₁R induction was demonstrated in the lung [54], spinal cord [33], retina [6,55] and brain [56] of STZ-diabetic rats. However, this is the first report on mRNA expression in thoracic spinal cord of STZ-diabetic rats by qPCR. Hyperglycaemia associated with type 1 diabetes can activate NF- κ B [57] which is known to induce B₁R [2,3,58]. Moreover, oxidative stress associated with diabetes was reported to be involved in the induction of B₁R [6,7,29,59].

[N^α-Bodipy]-des-Arg⁹-BK selectivity for B₁R

Experiments by autoradiography confirm that BdABK is highly selective for B₁R and does not bind to B₂R. Indeed, BdABK failed to displace the B₂R radioligand [¹²⁵I]-HPP-Hoe-140 while it displaced the B₁R radioligand, [¹²⁵I]-

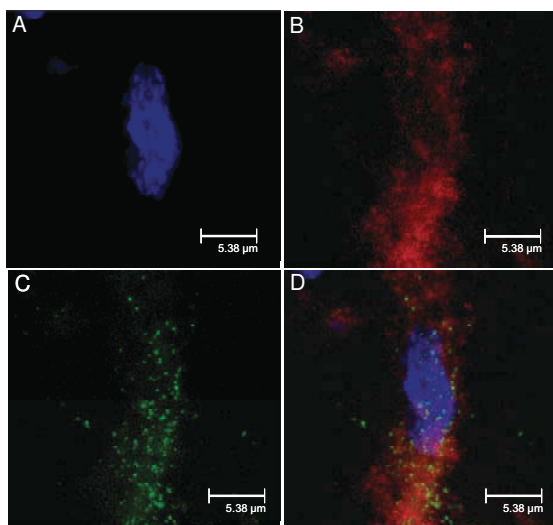


Figure 9
STZ-treated thoracic spinal cord was exposed to TOPRO-3, a specific fluorescent dye for DNA (A). Microglia was identified with anti-IBA-1 (B). The B₁R was stained with the selective fluorescent agonist, BdABK (C). Colocalization of the three markers is shown in panel D. TOPRO-3 dye is blue (ext: 642 nm/em: 661 nm), anti-IBA-1 dye is red (ext: 550 nm/em: 570 nm) and BdABK dye is green (ext: 505 nm/em: 515 nm). Scale bar = 5.38 μm. Pictures presented are representative of a minimum of 4 sections per rat from 4 different animals.

HPP-desArg¹⁰-Hoe 140, with an IC₅₀ of 5.3 ± 0.1 nM in thoracic spinal cord of STZ-treated rats. Results also evidenced that B₂R binding sites were displaced by the selective antagonist, Hoe 140, with an IC₅₀ value of 1.3 ± 0.1 nM while B₁R binding sites were displaced by the natural B₁R agonist, des-Arg⁹-BK (IC₅₀ = 19 ± 0.2 nM) and by R-715, a selective B₁R peptide antagonist (IC₅₀ = 4.3 ± 0.2 nM). Comparison of IC₅₀ values suggests that the affinity of the B₁R agonist is increased by the addition of the Bodipy molecule. The stabilization of the N-terminus part of the peptide may contribute to prevent its degradation.

The reason for using 50 μM BdABK was based on preliminary study. The concentration of fluorescent probe needed to get a consistent labeling was higher than the IC₅₀ value most likely because BdABK binds to B₁R non-covalently and can be eliminated during the washout period of tissue sections. Signal amplification with radioactivity is also expected to be greater than that achieved with a fluorescent probe. BdABK showed no labeling in thoracic spinal cord of control rats which is in accordance with the inducible character of the B₁R and its virtual absence in healthy tissues. The elimination of B₁R label-

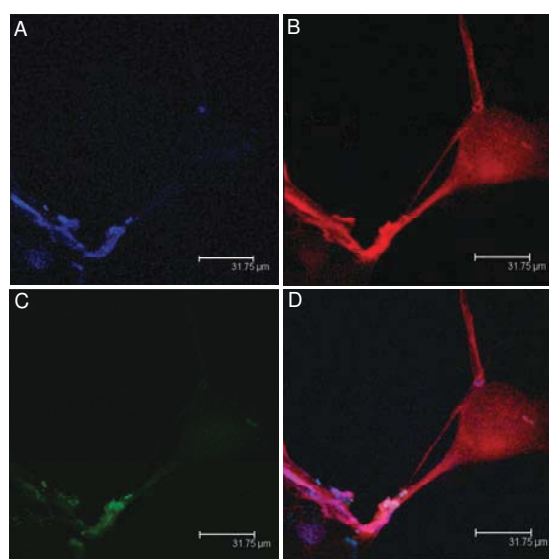


Figure 10
Rat microglial primary cultured cells were exposed for 24 h to 300 nM BK to increase B₁R expression. Then, they were exposed to TOPRO-3, a specific fluorescent dye for DNA (A), to anti-IBA-1, a specific antibody against microglia (B) and BdABK to stain B₁R (C). Colocalization of the three markers is shown in panel D. TOPRO-3 dye is blue (ext: 642 nm/em: 661 nm), anti-IBA-1 dye is red (ext: 550 nm/em: 570 nm) and BdABK dye is green (ext: 505 nm/em: 515 nm). Scale bar = 31.75 μm. Pictures presented are representative of 4 cultured cells samples from 4 different animals.

ling with BdABK after co-incubation with R-715 or SSR240612 confirms the specificity of the B₁R fluorescent ligand.

Interestingly, BdABK maintained its biological activity as B₁R agonist *in vivo*. Data obtained on the Hargreaves test revealed that BdABK was only slightly less potent than des-Arg⁹-BK to cause thermal hyperalgesia upon peripheral administration. This is consistent with the transient thermal hyperalgesia previously reported in the tail-flick test after intrathecal injection of des-Arg⁹-BK in rats made diabetics with STZ 24 h earlier [9]. Likewise, Gabra and Sirois [24] showed that intraperitoneal administration of des-Arg⁹-BK (400 μg/kg) in STZ-treated rats significantly reduced the paw withdraw threshold in the hot plate and tail-flick test.

Localization of B₁R

B₁R on microglial cells

Previous work by Noda and coworkers [50,51] showed that B₁R can be expressed in cultured rat microglia exposed to

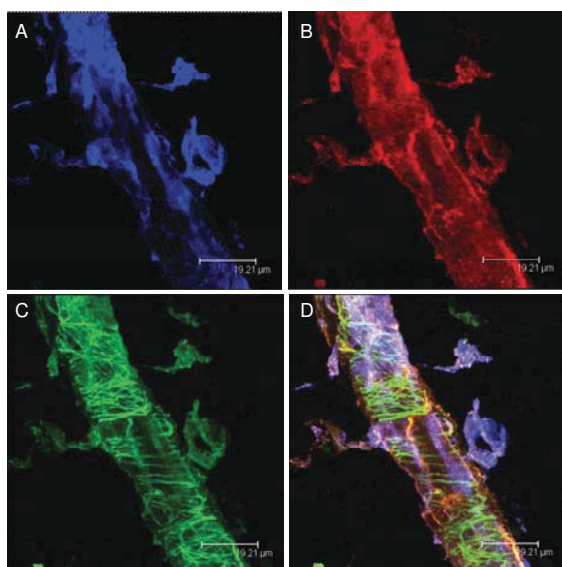


Figure 11
STZ-treated spinal cord was exposed to anti-CGRP, a selective antibody of sensory C fibers (A). TRPV1 was labeled with anti-TRPV1 another marker of sensory C fibers (B). The B_1R was stained with the selective fluorescent agonist, BdABK (C). Colocalization of the three markers is shown in panel D. Anti-CGRP dye is blue (ext: 650 nm/em: 680 nm), anti-TRPV1 dye is red (ext: 550 nm/em: 570 nm), and BdABK dye is green (ext: 505 nm/em: 515 nm). Scale bar = 19.21 μ m. Pictures presented are representative of a minimum of 4 sections per rat from 4 different animals.

BK. We confirmed this result by using our fluorescent ligand in the same condition, thus providing additional evidence of its ability to bind B_1R in a pure rat microglia model. BK acting via B_2 receptors induces elevation of intracellular calcium leading to the phosphorylation and activation of NF- κ B by protein kinase C [60]. NF- κ B upregulates B_1R upon binding to its nuclear promoter [2].

A recent study has demonstrated that B_1R is involved in microglial migration toward rat brain lesion sites [61]. The presence of B_1R on spinal microglial cells is in keeping with a recent study suggesting that activated dorsal horn microglia is a crucial component of STZ-induced tactile allodynia, mediated in part, by extracellular signal-regulated protein kinase signaling [62]. Importantly, the development of tactile and cold allodynia in a rat model of insulin-resistance was blocked by the B_1R antagonist SSR240612 [28] and by two antioxidants (N-acetyl-L-cysteine and alpha-lipoic acid) known to prevent the induction of B_1R [7,29]. Taken together, these results suggest a critical role for microglial B_1R in generation of tactile allodynia, a manifestation of pain polyneuropathy. It

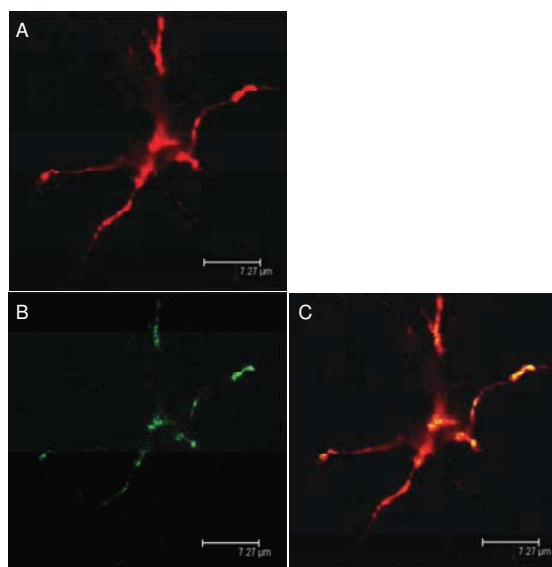


Figure 12
STZ-treated spinal cord was exposed to anti-GFAP, a specific antibody against astrocytes (A) and to BdABK (B). Colocalization between B_1R and the astrocytes is shown in panel C. Anti-GFAP dye is red (ext: 550 nm/em: 570 nm) and BdABK dye is green (ext: 505 nm/em: 515 nm). Scale bar = 7.27 μ m. Pictures presented are representative of a minimum 4 sections per rat from 4 different animals.

is possible that microglial B_1R is also involved in STZ-induced thermal hyperalgesia as this response was abolished by B_1R antagonists [5,24,27] and was absent in B_1R knockout mice treated with STZ [26].

B_1R on astrocytes

In addition, the present study provides the first evidence that thoracic spinal cord astrocytes bear the B_1R in STZ-diabetic rats. Astrocyte B_1R may represent another target for neuropathic or chronic pain. Emerging evidence suggests a critical role for astrocytes in the passage from acute to chronic and neuropathic pain. It seems that intracellular calcium level oscillation in astrocytes could spread through astrocytic network and thereby facilitate the formation of new synapses. These new synapses could establish neuronal contacts for maintaining and spreading pain sensation [63]. Moreover, astrocytes are known to release various inflammatory mediators that promote neuroimmune activation and can sensitize primary afferent sensory neurons contributing to development of neuropathic pain [64].

B_1R on sensory C fibers

Immunohistochemical data showed the presence of B_1R in DRG and superficial laminae of spinal cord dorsal horn

[30-32]. Those studies suggested a basal expression of B₁R in primary sensory C fibers of normal rat. This is consistent with the expression of B₁R in sensory C fibers of STZ-treated rats as revealed by the co-localization of B₁R, CGRP and TRPV1. Horowitz [65] described the crucial role of small A-delta and C fibers in generation of diabetic polyneuropathy and their sensitivity to hyperglycaemia. Ueda's studies [66,67] support the hypothesis that the generation of neuropathic pain is related to alterations in gene and protein expression in primary sensory neurons which could contribute to demyelination of A-delta fibers through the down-regulation of myelin protein such as MBP, MPZ and PMP22. Demyelinated A-delta fibers sprout and synapse with A-beta fibers resulting in the enhancement of pro-nociceptive neurotransmitter release which generated allodynia. The presence of B₁R on sensory C fibers is in agreement with an earlier pharmacological study that showed that the stimulation of B₁R with an agonist in the spinal cord of STZ-diabetic rats provokes thermal hyperalgesia via the release of substance P [9].

Basal B₁R expression in control rats

Authors failed to observe specific fluorescent labelling for B₁R in normal rats which is rather consistent with the negligible level of B₁R mRNA and binding sites. Moreover, intrathecal injection of B₁R agonists or antagonists failed to cause behavioural, cardiovascular or nociceptive responses in control rats, suggesting that the basal expression of B₁R is not functional in naïve rats [9,53]. Thus the function of the B₁R detected by immunohistochemistry in the spinal cord of rodents and human remains elusive. It is feasible that B₁R in control animals is uncoupled to G protein as demonstrated for other G-protein-coupled receptors [68,69]. Although it is possible that the immunological approach is more sensitive, we have evidence (unpublished data) showing that the commercially available B₁R antibodies (M-19) from SantaCruz Biotechnologies (Santa Cruz, CA, USA) are not specific for immunohistochemical detection since B₁R labeling persists in spinal cord isolated from B₁R knockout mice. The latter B₁R antibodies remain however suitable for Western blot analysis, suggesting that immunohistochemical studies reported with B₁R antibodies remain to be validated with the appropriate controls in mutant mice.

Conclusion

[N α -Bodipy]-des-Arg⁹-BK was found selective for B₁R with an IC₅₀ value of 5.3 \pm 0.1 nM in the rat spinal cord. Furthermore, BdABK maintains its biological activity as agonist as evidenced by its ability to induce thermal hyperalgesia in STZ-treated rats. This new fluorescent ligand enabled the detection of B₁R in primary microglial cell culture and on microglial cells, astrocytes and sensory C fibers in the thoracic spinal cord of STZ-diabetic rats. Because all these cells have been implicated in neuro-

pathic pain, the induction and up-regulation of the B₁R on these elements consolidate the idea that kinin B₁R is an important target for drug development in pain processes.

List of abbreviations

B₁R: kinin B₁ receptor; STZ: streptozotocin; qPCR: quantitative real-time PCR; BK: Bradykinin; BdABK: [N α -Bodipy]-des-Arg⁹-BK; BSA: bovine serum albumin; anti-IBA-1: anti-Ionized calcium binding adapter molecule 1; anti-GFAP: anti-Glial fibrillary acidic protein; anti-CGRP: anti-calcitonin-gene-related peptide; anti-TRPV1: anti-transient receptor potential vanilloid 1.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Authors' contributions

ST performed animal treatments, Hargreaves test, real-time PCR analysis, confocal microscopy experiments and draft the manuscript. PTT helped designed the confocal microscopy protocol. DL performed *in vitro* microglia experiments. JS made cryostat tissue sections and autoradiography experiments. PG synthesized the fluorescent agonist. RC designed the study and revised the manuscript.

Acknowledgements

This work was supported by Grant-in-aids from the Canadian Diabetes Association (OG-3-07-2428-RC) and Canadian Institutes of Health Research (MOP-79471). S.T. holds a Studentship from the FRSQ (Fonds de la Recherche en Santé du Québec). Authors acknowledge Ms Julie Desrosches and Dr Pierre Beaulieu for giving us access to the Hargreaves Apparatus and to Mr Michel Lauzon for his expert assistance in confocal microscopy.

References

- Regoli D, Nsa Allogho S, Rizzi A, Gobeil FJ: **Bradykinin receptors and their antagonists.** *Eur J Pharmacol* 1998, **348**:1-10.
- Leeb-Lundberg LM, Marceau F, Müller-Esterl W, Pettibone DJ, Zuraw BL: **International union of pharmacology. XLV. Classification of the kinin receptor family: from molecular mechanisms to pathophysiological consequences.** *Pharmacol Rev* 2005, **57**:27-77.
- Marceau F, Bachvarov DR: **Kinin receptors.** *Clin Rev Allergy Immunol* 1998, **16**:385-401.
- deBlois D, Horlick RA: **Endotoxin sensitization to kinin B(1) receptor agonist in a non-human primate model: haemodynamic and pro-inflammatory effects.** *Br J Pharmacol* 2001, **132**:327-35.
- Couture R, Girolami JP: **Putative roles of kinin receptors in the therapeutic effects of angiotensin I-converting enzyme inhibitors in diabetes mellitus.** *Eur J Pharmacol* 2004, **500**:467-85.
- Abdouh M, Talbot S, Couture R, Hasséssian HM: **Retinal plasma extravasation in streptozotocin-diabetic rats mediated by kinin B(1) and B(2) receptors.** *Br J Pharmacol* 2008, **154**:136-43.
- Ismael MA, Talbot S, Carbonneau CL, Beauséjour CM, Couture R: **Blockade of sensory abnormalities and kinin B(1) receptor expression by N-Acetyl-L-Cysteine and ramipril in a rat model of insulin resistance.** *Eur J Pharmacol* 2008, **589**:66-72.
- Calixto JB, Cabrini DA, Ferreira J, Campos MM: **Kinins in pain and inflammation.** *Pain* 2000, **87**:1-5.
- Couture R, Harrisson M, Vianna RM, Cloutier F: **Kinin receptors in pain and inflammation.** *Eur J Pharmacol* 2001, **429**:161-76.

10. Rodi D, Couture R, Ongali B, Simonato M: **Targeting kinin receptors for the treatment of neurological diseases.** *Curr Pharm Design* 2005, **11**:1313-26.
11. Ferreira J, Campos MM, Pesquero JB, Araújo RC, Bader M, Calixto JB: **Evidence for the participation of kinins in Freund's adjuvant-induced inflammatory and nociceptive responses in kinin B1 and B2 receptor knockout mice.** *Neuropharmacol* 2001, **41**:1006-12.
12. Ferreira J, Campos MM, Araújo R, Bader M, Pesquero JB, Calixto JB: **The use of kinin B1 and B2 receptor knockout mice and selective antagonists to characterize the nociceptive responses caused by kinins at the spinal level.** *Neuropharmacol* 2002, **43**:1188-97.
13. Pesquero JB, Araujo RC, Heppenstall PA, Stucky CL, Silva JA Jr, Walthert T, Oliveira SM, Pesquero JL, Paiva AC, Calixto JB, Lewin GR, Bader M: **Hypoalgesia and altered inflammatory responses in mice lacking kinin B1 receptors.** *Proc Natl Acad Sci USA* 2000, **97**:8140-5.
14. Perkins MN, Kelly DL: **Induction of bradykinin B1 receptors in vivo in a model of ultra-violet irradiation-induced thermal hyperalgesia in the rat.** *Br J Pharmacol* 1993, **110**:1441-4.
15. Davis AJ, Perkins MN: **The involvement of bradykinin B1 and B2 receptor mechanisms in cytokine-induced mechanical hyperalgesia in the rat.** *Br J Pharmacol* 1994, **113**:63-8.
16. Ferreira J, Trichês KM, Medeiros R, Cabrini DA, Mori MA, Pesquero JB, Bader M, Calixto JB: **The role of kinin B1 receptors in the nociception produced by peripheral protein kinase C activation in mice.** *Neuropharmacology* 2008, **54**:597-604.
17. Corrêa CR, Calixto JB: **Evidence for participation of B1 and B2 kinin receptors in formalin-induced nociceptive response in the mouse.** *Br J Pharmacol* 1993, **110**:193-8.
18. Gougat J, Ferrari B, Sarran L, Planchenault C, Poncet M, Maruani J, Alonso R, Cudennec A, Croci T, Guagnini F, Urban-Szabo K, Martinolle JP, Soubrié P, Finance O, Le Fur G: **SSR240612 [(2R)-2-[(3R)-3-(1,3-benzodioxol-5-yl)-3-[[[6-methoxy-2-naphthyl]sulfonyl]amino]propanoyl]amino]-3-(4-[[2R, 6S)-2,6-dimethylpiperidinyl]methyl]phenyl)-N-isopropyl-N-methylpropanamide hydrochloride], a new nonpeptide antagonist of the bradykinin B1 receptor: biochemical and pharmacological characterization.** *J Pharmacol Exp Ther* 2004, **309**:661-9.
19. Eckert A, Segond G von Banchet, Sopper S, Petersen M: **Spatio-temporal pattern of induction of bradykinin receptors and inflammation in rat dorsal root ganglia after unilateral nerve ligation.** *Pain* 1999, **83**:487-97.
20. Levy D, Zochodne DV: **Increased mRNA expression of the B1 and B2 bradykinin receptors and antinociceptive effects of their antagonists in an animal model of neuropathic pain.** *Pain* 2000, **86**:265-71.
21. Petersen M, Eckert AS, Segond G von Banchet, Heppelmann B, Klusch A, Kniffki KD: **Plasticity in the expression of bradykinin binding sites in sensory neurons after mechanical nerve injury.** *Neuroscience* 1998, **83**:949-59.
22. Petcu M, Dias JP, Ongali B, Thibault G, Neugebauer W, Couture R: **Role of kinin B1 and B2 receptors in a rat model of neuropathic pain.** *Int Immunop* 2008, **8**:188-96.
23. Werner MF, Kassuya CA, Ferreira J, Zamprônio AR, Calixto JB, Rae GA: **Peripheral kinin B(1) and B(2) receptor-operated mechanisms are implicated in neuropathic nociception induced by spinal nerve ligation in rats.** *Neuropharmacology* 2007, **53**:48-57.
24. Gabra BH, Sirois P: **Role of bradykinin B(1) receptors in diabetes-induced hyperalgesia in streptozotocin-treated mice.** *Eur J Pharmacol* 2003, **5**:458:329.
25. Gabra BH, Sirois P: **Hyperalgesia in non-obese diabetic (NOD) mice: a role for the inducible bradykinin B1 receptor.** *Eur J Pharmacol* 2005, **514**:61-7.
26. Gabra BH, Merino VF, Bader M, Pesquero JB, Sirois P: **Absence of diabetic hyperalgesia in bradykinin B1 receptor-knockout mice.** *Regul Pept* 2005, **127**:245-8.
27. Gabra BH, Benrezzak O, Pheng LH, Duta D, Daull P, Sirois P, Nantel F, Battistini B: **Inhibition of type I diabetic hyperalgesia in streptozotocin-induced Wistar versus spontaneous gene-prone BB/Worchester rats: efficacy of a selective bradykinin B1 receptor antagonist.** *J Neuropathol Exp Neurol* 2005, **64**:782-9.
28. Dias JP, Ismael MA, Pilon M, de Champlain J, Ferrari B, Carayon P, Couture R: **The kinin B1 receptor antagonist SSR240612 reverses tactile and cold allodynia in an experimental rat model of insulin resistance.** *Br J Pharmacol* 2007, **152**:280-7.
29. Lungu C, Dias JP, França CE, Ongali B, Regoli D, Moldovan F, Couture R: **Involvement of kinin B1 receptor and oxidative stress in sensory abnormalities and arterial hypertension in an experimental rat model of insulin resistance.** *Neuropeptides* 2007, **41**:375-87.
30. Ma QP: **The expression of bradykinin B(1) receptors on primary sensory neurons that give rise to small caliber sciatic nerve fibers in rats.** *Neuroscience* 2001, **107**:665-73.
31. Ma QP, Heavens R: **Basal expression of bradykinin B(1) receptor in the spinal cord in humans and rats.** *Neuroreport* 2001, **12**:2311-4.
32. Wotherspoon G, Winter J: **Bradykinin B1 receptor is constitutively expressed in the rat sensory nervous system.** *Neurosci Lett* 2000, **294**:175-8.
33. Ongali B, Campos MM, Petcu M, Rodi D, Cloutier F, Chabot JG, Thibault G, Couture R: **Expression of kinin B1 receptors in the spinal cord of streptozotocin-diabetic rat.** *Neuroreport* 2004, **15**:2463-6.
34. Faure MP, Gaudreau P, Shaw I, Cashman NR, Beaudet A: **Synthesis of a biologically active fluorescent probe for labelling of neurotensin receptors.** *J Histochem Cytochem* 1994, **42**:755-763.
35. Veyrat-Durebex C, Pomerleau L, Langlois D, Gaudreau P: **Internalization and trafficking of the human and rat growth hormone-releasing hormone receptor.** *J Cell Physiol* 2005, **203**:335-344.
36. Witting C: **Immunofluorescence studies on formalin-fixed and paraffin-embedded material.** *Beitr Pathol* 1977, **161**:288-91.
37. Kanazawa H, Ohsawa K, Sasaki Y, Kohsaka S, Imai Y: **Macrophage/microglia-specific protein Iba1 enhances membrane ruffling and Rac activation via phospholipase C-gamma-dependent pathway.** *J Biol Chem* 2002, **277**:20026-32.
38. Babcock AA, Kuziel WA, Rivest S, Owens T: **Chemokine expression by glial cells directs leukocytes to sites of axonal injury in the CNS.** *J Neurosci* 2003, **23**:7922-30.
39. Simard AR, Soulet D, Gowing G, Julien JP, Rivest S: **Bone marrow-derived microglia play a critical role in restricting senile plaque formation in Alzheimer's disease.** *Neuron* 2006, **49**:489-502.
40. Krum JM, Rosenstein JM: **Transient coexpression of nestin, GFAP, and vascular endothelial growth factor in mature reactive astroglia following neural grafting or brain wounds.** *Exp Neurol* 1999, **160**:348-60.
41. Chaudhry N, de Silva U, Smith GM: **Cell adhesion molecule L1 modulates nerve-growth-factor-induced CGRP-IR fiber sprouting.** *Exp Neurol* 2006, **202**:238-49.
42. Gronberg DA, Niimi A, Dinh QT, Cosio B, Hew M, Fischer A, Chung KF: **Increased expression of transient receptor potential vanilloid-1 in airway nerves of chronic cough.** *Am J Respir Crit Care Med* 2004, **170**:1276-80.
43. Aoki S, Su Q, Li H, Nishikawa K, Ayukawa K, Hara Y, Namikawa K, Kiryu-Seo S, Kiyama H, Wada K: **Identification of an axotomy-induced glycosylated protein, AIGP1, possibly involved in cell death triggered by endoplasmic reticulum-Golgi stress.** *J Neurosci* 2002, **22**:10751-60.
44. Wada R, Tiffet C, Proia RL: **Microglial activation precedes acute neurodegeneration in Sandhoff disease and is suppressed by bone marrow transplantation.** *Proc Natl Acad Sci USA* 2000, **97**:10954-9.
45. Livak KJ, Schmittgen TD: **Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method.** *Methods* 2001, **25**:402-8.
46. Hunter WM, Greenwood FC: **Preparation of iodine-131 labelled human growth hormone of high specific activity.** *Nature* 1962, **194**:495-6.
47. Hock FJ, Wirth K, Albus U, Linz W, Gerhards HJ, Wiemer G, Henke S, Breipohl G, König W, Knolle J: **Hoe 140 a new potent and long acting bradykinin-antagonist: in vitro studies.** *Br J Pharmacol* 1991, **102**:769-73.
48. Nazarali AJ, Gutkind JS, Saavedra JM: **Calibration of 125I-polymer standards with 125I-brain paste standards for use in quantitative receptor autoradiography.** *Neurosci Methods* 1989, **30**:247-53.
49. McCarthy KD, de Vellis J: **Preparation of separate astroglial and oligodendroglial cell cultures from rat cerebral tissue.** *J Cell Biol* 1980, **85**:890-902.

50. Noda M, Kariura Y, Amano T, Manago Y, Nishikawa K, Aoki S, Wada K: **Expression and function of bradykinin receptors in microglia.** *Life Sci* 2003, **72**:1573-81.
51. Noda M, Kariura Y, Amano T, Manago Y, Nishikawa K, Aoki S, Wada K: **Kinin receptors in cultured rat microglia.** *Neurochem Int* 2004, **45**:437-42.
52. Hargreaves K, Dubner R, Brown F, Flores C, Joris J: **A new and sensitive method for measuring thermal nociception in cutaneous hyperalgesia.** *Pain* 1988, **32**:77-88.
53. Cloutier F, Couture R: **Pharmacological characterization of the cardiovascular responses elicited by kinin B(1) and B(2) receptor agonists in the spinal cord of streptozotocin-diabetic rats.** *Br J Pharmacol* 2000, **130**:375-85.
54. Vianna RM, Ongali B, Regoli D, Calixto JB, Couture R: **Up-regulation of kinin B1 receptor in the lung of streptozotocin-diabetic rat: autoradiographic and functional evidence.** *Br J Pharmacol* 2003, **138**:13-22.
55. Abdouh M, Khanjari A, Abdelazziz N, Ongali B, Couture R, Hasséssian HM: **Early upregulation of kinin B1 receptors in retinal microvessels of the streptozotocin-diabetic rat.** *Br J Pharmacol* 2003, **140**:33-40.
56. Campos MM, Ongali B, De Souza Buck H, Schanstra JP, Girolami JP, Chabot JG, Couture R: **Expression and distribution of kinin B1 receptor in the rat brain and alterations induced by diabetes in the model of streptozotocin.** *Synapse* 2005, **57**:29-37.
57. Yerneni KK, Bai W, Khan BV, Medford RM, Natarajan R: **Hyperglycemia-induced activation of nuclear transcription factor kappaB in vascular smooth muscle cells.** *Diabetes* 1999, **48**:855-64.
58. Schanstra JP, Bataillé E, Marin Castaño ME, Barascud Y, Hirtz C, Pesquero JB, Pecher C, Gauthier F, Girolami JP, Bascands JL: **The B1-agonist [des-Arg10]-kallidin activates transcription factor NF-kappaB and induces homologous upregulation of the bradykinin B1-receptor in cultured human lung fibroblasts.** *J Clin Invest* 1998, **101**:2080-91.
59. El Midaoui A, Ongali B, Petcu M, Rodi D, de Champlain J, Neugebauer W, Couture R: **Increases of spinal kinin receptor binding sites in two rat models of insulin resistance.** *Peptides* 2005, **26**:1323-30.
60. Pan ZK, Ye RD, Christiansen SC, Jagels MA, Bokoch GM, Zuraw BL: **Role of the Rho GTPase in bradykinin-stimulated nuclear factor-kappaB activation and IL-1beta gene expression in cultured human epithelial cells.** *J Immunol* 1998, **160**:3038-45.
61. Ifuku M, Färber K, Okuno Y, Yamakawa Y, Miyamoto T, Nolte C, Merrino VF, Kita S, Iwamoto T, Komuro I, Wang B, Cheung G, Ishikawa E, Ooboshi H, Bader M, Wada K, Kettenmann H, Noda M: **Bradykinin-induced microglial migration mediated by B1-bradykinin receptors depends on Ca2+ influx via reverse-mode activity of the Na+/Ca2+ exchanger.** *J Neurosci* 2007, **27**:13065-73.
62. Tsuda M, Ueno H, Kataoka A, Tozaki-Saitoh H, Inoue K: **Activation of dorsal horn microglia contributes to diabetes-induced tactile allodynia via extracellular signal-regulated protein kinase signaling.** *Glia* 2008, **56**:378-86.
63. Hansson E: **Could chronic pain and spread of pain sensation be induced and maintained by glial activation?** *Acta Physiol* 2006, **187**:321-7.
64. Moalem G, Tracey DJ: **Immune and inflammatory mechanisms in neuropathic pain.** *Brain Res Rev* 2006, **51**:240-64.
65. Horowitz SH: **Recent clinical advances in diabetic polyneuropathy.** *Curr Opin Anaesthesiol* 2006, **19**:573-8.
66. Ueda H: **Molecular mechanisms of neuropathic pain-phenotypic switch and initiation mechanisms.** *Pharmacol Ther* 2006, **109**:57-77.
67. Ueda H: **Peripheral mechanisms of neuropathic pain – involvement of lysophosphatidic acid receptor-mediated demyelination.** *Mol Pain* 2008, **4**:11.
68. Lohse MJ, Benovic JL, Codina J, Caron MG, Lefkowitz RJ: **β-arrestin: A protein that regulates β-adrenergic receptor function.** *Science* 1990, **248**:1547-1550.
69. Seachrist JL, Ferguson SS: **Regulation of G protein-coupled receptor endocytosis and trafficking by Rab GTPases.** *Life Sci* 2003, **74**:225-35.

Publish with **BioMed Central** and every scientist can read your work free of charge

"BioMed Central will be the most significant development for disseminating the results of biomedical research in our lifetime."

Sir Paul Nurse, Cancer Research UK

Your research papers will be:

- available free of charge to the entire biomedical community
- peer reviewed and published immediately upon acceptance
- cited in PubMed and archived on PubMed Central
- yours — you keep the copyright

Submit your manuscript here:

http://www.biomedcentral.com/info/publishing_adv.asp



Accord journal

Dear Mr. Talbot,

Copyrights to articles published in Journal of Neuroinflammation are held by the authors, not by the journal or the publisher. For more information, please see <http://www.biomedcentral.com/about/license>.

Robert Mrak

Editor-in-Chief

Dear,

I would need your permission (copyright) to include in my doctoral thesis the following paper that we published in your journal:

Talbot Sébastien, Theberge-Turmel P, Liazoghli D, Senecal J, Gaudreau P and Couture R. Cellular localization of kinin B1 receptor in the spinal cord of streptozotocin-diabetic rats with a fluorescent agonist, [Nalpha-Bodipy]-des-Arg9-bradykinin. J Neuroinflammation. 2009. Mar 26;6(1):11. PMID: 19323833.

All the best,

Sébastien Talbot

Université de Montréal

9.0. ARTICLE 2

9.1. Problématique

Le premier article de cette thèse démontre que le B1R est localisé sur les cellules de la microglie dans la moelle épinière du rat diabétique de type 1. D'ailleurs, plusieurs études démontrent que la microglie joue un rôle central dans l'induction des neuropathies dans plusieurs modèles animaux de douleur.

9.2. Objectif

Investiguer le rôle de la microglie dans l'expression et l'activité pro-nociceptive du B1R.

9.3. Méthode expérimentale

Des rats Sprague-Dawley mâles ont été rendus diabétiques suivant l'administration intrapéritonéale de STZ (65 mg/kg). L'induction du diabète (glycémie, insulïnémie), du B1R (*ARN messenger* (ARNm), sites de liaisons spécifiques), la sévérité des neuropathies diabétiques (allodynies tactile et au froid) ainsi que le niveau d'activation des cellules de la microglie (intensité du marquage Iba-1) furent évalués chez des rats STZ ayant reçu ou non des inhibiteurs de l'activation des cellules de la microglie (fluorocitrate ou minocycline) ainsi que des antagonistes du B1R (R-715 ou SSR240612). De plus, l'activité pro-nociceptive du B1R fut évaluée chez ces animaux suivant l'administration intraspinale d'un agoniste du B1R (des-Arg⁹-BK).

9.4. Contribution

ST a réalisé les expériences, a analysé les résultats, a fait le design expérimental et a écrit la première version du manuscrit. EC a aidé dans la réalisation des expériences. JPD a réalisé les implantations intrathécales. RC a participé à l'analyse des résultats et au design expérimental et a écrit la version finale du manuscrit.

9.5. Référence

Talbot Sébastien, Chahmi E, Pena Dias J and Couture R. Key role for spinal dorsal horn microglial kinin B1 receptor in early diabetic pain neuropathy. *J Neuroinflammation*. **2010**. Jun 29;7(1):36. PMID: 20587056.

RESEARCH

Open Access

Key role for spinal dorsal horn microglial kinin B₁ receptor in early diabetic pain neuropathy

Sébastien Talbot, Emna Chahmi, Jenny Pena Dias and Réjean Couture

Abstract

Background: The pro-nociceptive kinin B₁ receptor (B₁R) is upregulated on sensory C-fibres, astrocytes and microglia in the spinal cord of streptozotocin (STZ)-diabetic rat. This study aims at defining the role of microglial kinin B₁R in diabetic pain neuropathy.

Methods: Sprague-Dawley rats were made diabetic with STZ (65 mg/kg, i.p.), and 4 days later, two specific inhibitors of microglial cells (fluorocitrate, 1 nmol, i.t.; minocycline, 10 mg/kg, i.p.) were administered to assess the impact on thermal hyperalgesia, allodynia and mRNA expression (qRT-PCR) of B₁R and pro-inflammatory markers. Spinal B₁R binding sites (¹²⁵I)-HPP-desArg¹⁰-Hoe 140) were also measured by quantitative autoradiography. Inhibition of microglia was confirmed by confocal microscopy with the specific marker Iba-1. Effects of intrathecal and/or systemic administration of B₁R agonist (des-Arg⁹-BK) and antagonists (SSR240612 and R-715) were measured on neuropathic pain manifestations.

Results: STZ-diabetic rats displayed significant tactile and cold allodynia compared with control rats. Intrathecal or peripheral blockade of B₁R or inhibition of microglia reversed time-dependently tactile and cold allodynia in diabetic rats without affecting basal values in control rats. Microglia inhibition also abolished thermal hyperalgesia and the enhanced allodynia induced by intrathecal des-Arg⁹-BK without affecting hyperglycemia in STZ rats. The enhanced mRNA expression (B₁R, IL-1 β , TNF- α , TRPV1) and Iba-1 immunoreactivity in the STZ spinal cord were normalized by fluorocitrate or minocycline, yet B₁R binding sites were reduced by 38%.

Conclusion: The upregulation of kinin B₁R in spinal dorsal horn microglia by pro-inflammatory cytokines is proposed as a crucial mechanism in early pain neuropathy in STZ-diabetic rats.

Background

According to the World Health Organization, over 300 millions of people worldwide will be diagnosed with diabetes mellitus by the year 2025. Diabetes leads to micro- and macro-vascular complications such as hypertension, retinopathy, nephropathy, sensory and autonomic polyneuropathies [1]. Patients with diabetic sensory neuropathy experience a variety of aberrant sensations including spontaneous pain, hyperalgesia and hypersensitivity to non-painful stimuli, which is commonly known as allodynia [2,3]. Epidemiological data demonstrated that peripheral diabetic polyneuropathy affects 50-60% of dia-

betic patients and nowadays is recognized as the most difficult pain to treat since it is largely resistant to commercially available treatments [3-5]. The lack of knowledge regarding the exact mechanism leading to diabetes-induced neuropathic pain put emphasis on the need to identify cellular and molecular targets to develop new therapeutic approaches.

Recent studies highlighted a primary role for the inducible kinin B₁ receptor (B₁R) in mediation of nociception and diabetes-induced neuropathic pain [6,7]. Kinins are defined as pro-inflammatory and vasoactive peptides, which act through the activation of two G-protein-coupled receptors (R) denoted as B₁ and B₂ [8,9]. The B₂R is widely and constitutively expressed in central and peripheral tissues and is activated by its preferential agonists bradykinin (BK) and Lys-BK. The B₁R is activated by the

active metabolites des-Arg⁹-BK and Lys-des-Arg⁹-BK and has a low level of expression in healthy tissues [10]. The latter receptor is upregulated after exposure to pro-inflammatory cytokines, bacterial endotoxins, hyperglycemia-induced oxidative stress and diabetes [11-13]. B₁R knockout mice are less sensitive to pro-inflammatory pain stimuli, spinal sensitization and diabetic hyperalgesia [14,15]. Pharmacological studies support a role for B₁R in mechanical and/or thermal hyperalgesia induced by cytokines [16], formalin [17] and in neuropathic pain induced by peripheral nerve injury [18] or as consequence of type 1 and 2 diabetes mellitus [15,19-21]. Autoradiography studies showed a widespread distribution of kinin B₁R binding sites in the spinal cord of diabetic rats [19,21-23]. This is consistent with the presence of B₁R on neuronal and non-neuronal elements, including sensory C-fibres, astrocytes and microglia as revealed by confocal microscopy in the spinal cord of streptozotocin (STZ)-diabetic rats [22].

Microglia, known as macrophages of the central nervous system (CNS), have for primary function to phagocytose debris and other pathogens in the CNS [24]. Nevertheless, emerging evidence suggests an important role played by spinal microglial cells in STZ-induced pain neuropathy. For instance, microglial activation and the generation of neuropathies in STZ-diabetic rats were both prevented by Gabapentin treatment [25]. Moreover, spinal microglial cells are upregulated in neuropathic pain models of nerve injury [26,27]. Dorsal horn microglia activation is thought to play a pivotal role in diabetes-induced neuropathy via a MAPKp38 α signaling pathway, which was found essential for cytokines synthesis and release [28,29].

The present study aimed at defining the role played by spinal dorsal horn microglial kinin B₁R in a classical rat model of diabetes-induced pain neuropathy by using two inhibitors of microglial cells. Formally, were tested fluorocitrate, a specific inhibitor of microglia Krebs cycle [30], and minocycline, a broad spectrum tetracycline antibiotic, which inhibits microglia activity by preventing the translocation of the transcriptional nuclear factor kappa B (NF- κ B) to its nuclear promoter [31]. The specific objectives were to: 1) determine whether microglia inhibitors can prevent thermal hyperalgesia and tactile allodynia induced by spinal activation of B₁R with the selective agonist des-Arg⁹-BK in STZ-diabetic rats; 2) compare the acute inhibition of B₁R and microglial function on tactile and cold allodynia; 3) determine the effect of microglia inhibition on the expression of B₁R and pro-inflammatory markers (IL-1 β , TNF- α , TRPV1) by real-time RT-PCR; 4) correlate changes of B₁R mRNA levels with those of B₁R binding sites by quantitative autora-

diography; 5) measure the immunoreactivity of Iba-1 as marker of microglia. This study was carried out in the early phase of diabetes (4 days post-STZ) when allodynia, spinal kinin B₁R up-regulation and thermal hyperalgesia upon intrathecal injection of des-Arg⁹-BK were found to occur [7,23].

Methods

Animals and treatments

All research procedures and the care of the animals were in compliance with the guiding principles for animal experimentation as enunciated by the Canadian Council on Animal Care and were approved by the Animal Care Committee of our University. Male Sprague-Dawley rats (225-250 g, Charles River, St-Constant, Que, Canada) were housed two per cage, under controlled conditions of temperature (23°C) and humidity (50%), on a 12 h light-dark cycle and allowed free access to normal chow diet (Charles River Rodent) and tap water.

Intrathecal implantation of catheter

Four days after arrival, rats were chronically implanted, under isoflurane anaesthesia, with an indwelling intrathecal (i.t.) polyethylene catheter (PE-10; Intramedic, Clay Adams, NJ, USA) at the vertebral mid-lumbar level (L2 to L4) through an incision made in the dura at the atlanto-occipital junction [7]. This catheter was used for intrathecal drug injections. On the day of surgery and for the 2 subsequent days, rats received antibiotics trimethoprim and sulphadiazine (Tribrissen 24%, 30 mg/kg, s.c., Schering Canada Inc., Pointe Claire, Que, Canada) and the analgesic ketoprofen (Anafen, 5 mg/kg, s.c., Merial Canada Inc., Baie d'Urfé, Que, Canada).

STZ treatment

Five days after intrathecal implantation, rats were injected under a low light condition with freshly prepared STZ (65 mg/kg, i.p.; Zanosar, McKesson, Montreal, Que, Canada). Age-matched controls were injected with vehicle (sterile saline 0.9%, pH. 7.0). Blood glucose was measured with a commercial blood glucose-monitoring kit (Accusoft; Roche Diagnostics, Laval, Que, Canada) from a drop of blood obtained from the tail vein, in non-fasting animals. Only STZ-treated rats whose blood glucose concentration was higher than 20 mM at day 4 were used and considered as diabetic.

Tactile allodynia

Four days after STZ treatment, tactile allodynia was assessed by measuring the hindpaw withdrawal threshold to the application of a calibrated series of 6 von Frey filaments (bending forces of 2, 4, 6, 8, 10 and 15 g) (Stoelting, Wood Dale, IL, USA) using a modification of the up-down method [32]. Starting with the filament that has the

lowest force (2 g), the filament was applied perpendicularly to the mid-plantar surface with sufficient force to cause the filament to buckle slightly. Brisk withdrawal or paw flinching was considered as the positive response. Each filament was applied five times to each paw (for 6-8 s per stimulation, with an inter stimulus interval of 1-2 min). Minimum recording of 5 positive responses (50%) out of 10 stimulations for both paws was considered to be the threshold (in grams). Absence of a response (less than 5 withdrawals) prompted use of the next graded filament of increasing weight. The cut-off of a 15 g filament was selected as the upper limit for testing, since stiffer filaments tended to raise the entire limb rather than to buckle, substantially changing the nature of the stimulus. Control rat withdrawal threshold was between 10 and 12 g.

Cold allodynia

Four days after STZ treatment, cold allodynia was assessed using the acetone drop method [33]. An acetone bubble formed at the end of a standard plastic syringe was placed to the plantar surface of the hindpaws. Acetone was applied five times to each paw at intervals of 3-5 min. Control rats either ignored the stimulus or occasionally responded with a small and brief withdrawal. Allodynic rats responded with prompt and intense paw withdrawal or escape behaviour to acetone application. The frequency of paw withdrawal was expressed as a percentage (the number of paw withdrawals ÷ number of trials × 100).

Tail-flick test

Intrathecally implanted rats were housed permanently in the testing laboratory under continuous light to prevent the endogenous release of opioids which could alter the nociceptive threshold [34]. Testing began four days after STZ treatment by placing awake rats in a plastic restraining box. The nociceptive threshold was taken as the reaction time to remove the tail from above a source of noxious radiant heat. The intensity of the heat stimulus was set to elicit a tail-flick within 8-10 s. A 25 s cut-off time was used to prevent tissue damage. Four groups of rats (control, STZ-vehicle, STZ-fluorocitrate and STZ-minocycline, n = 5) were tested for a maximum of three consecutive days and euthanized with CO₂ inhalation after the last test. Fluorocitrate (1 nmol, i.t.) or minocycline (10 mg/kg, i.p.) was administered 3 h prior to the tail-flick test protocol. During the first two days, rats received only 20 µl of artificial cerebrospinal fluid (aCSF) as training experiments and to ensure that the intrathecal catheter is patent. On the following day, each testing trial lasted 1 h and consisted of 13 measurements of tail-flick latency, spaced by 5 min intervals. The initial three measurements were used to determine baseline latency. One

minute prior to the 4th reading (t = 15 min) the vehicle (aCSF) was intrathecally injected. Fifteen min later, the tested B₁R agonist (des-Arg⁹-BK, 9.6 nmol or 10 µg) was injected through the same route (t = 30 min) and its effect on the tail-flick latency was measured 1 min later and on three subsequent readings. Then substance P (6.6 nmol or 10 µg) was injected intrathecally to assess the specificity of B₁R blockade on microglia.

Spinal cord preparation

For autoradiography, 4-day STZ-diabetic rats (without intrathecal catheter) were anesthetized with CO₂ inhalation and then decapitated. Thoracic spinal cord (T3-T7) was removed and frozen in 2-methylbutane (cooled at -40°C following exposure to liquid nitrogen) and stored at -80°C. For microscopy, rats were anesthetized with sodium pentobarbital (80 mg/kg, i.p.) and perfused transcardially with 0.1 M PBS (pH 7.4) (300 ml in 3 min), followed by 4% paraformaldehyde in PBS (500 ml in 5 min). The thoracic spinal cord (T3-T7) was removed and post-fixed by immersion in paraformaldehyde (60 min at 4°C) and washed in PBS [35]. Few days later, spinal cord segments were mounted in a gelatin block and serially cut into 20-µm thick coronal sections with a cryostat. Sections were then thaw-mounted on Fisherbrand Superfrost disposable microscope slides (Fisher Scientific, ON, Canada) and kept at -80°C for 1 month to allow the adhesion of sections to the coverslip glasses.

Quantitative autoradiography

The radioligand for kinin B₁R, HPP-desArg¹⁰-Hoe140 (3-(4 hydroxyphenyl) propionyl-desArg⁹-D-Arg⁰(Hyp³,Thi⁵,D-Tic⁷,Oic⁸)Bradykinin) was synthesized at the National Research Council of Canada (NRC, Montreal, Que, Canada) and iodinated by the chloramine T method [36]. Quantitative *in vitro* autoradiography was conducted as described previously [23]. Briefly, sections were incubated at room temperature for 90 min in 25 mM PIPES-NH₄OH buffer (pH 7.4) containing: 1 mM 1,10-phenanthroline, 1 mM dithiothreitol, 0.014% bacitracin, 0.1 mM captopril, 0.2% bovine serum albumin (protease free) and 7.5 mM magnesium chloride in the presence of 200 pM of (¹²⁵I)-HPP-desArg¹⁰-Hoe 140 (specific activity: 2000 cpm/fmol or 1212 Ci/mmol). Non-specific binding was determined in the presence of 1 µM of unlabeled B₁R antagonist: R-715 (AcLys(D-βNal⁷,Ile⁸)des-Arg⁹-BK) [8]. At the end of the incubation period, slides were transferred sequentially through four rinses of 4 min each in 25 mM PIPES (pH 7.4; 4°C) dipped for 15 s in distilled water (4°C) to remove the excess of salts, and then air-dried. Kodak Scientific Imaging Films BIOMAX™ MR* (Amersham Pharmacia Biotech Canada) were juxtaposed onto the slides in the

presence of (¹²⁵I)-microscales and exposed at room temperature for 6 days. The films were developed (GBX developer) and fixed (GBX fixer). Autoradiograms were quantified by densitometry using an MCID™ image analysis system (Imaging Research, St. Catharines, ON, Canada). A standard curve from (¹²⁵I)-microscales were used to convert density levels into femtomoles per milligram of proteins [37]. Specific binding was determined by subtracting values of nonspecific binding from that of total binding.

Confocal microscopy

On the day of experiments, slides of spinal cords were briefly (10 min) thawed at room temperature (RT) to enhance sections adhesion. Then, sections were washed for 10 min in 0.1 M PBS buffer (pH 7.4) and incubated for 30 min (RT) in blocking buffer (PBS containing 3% bovine serum albumin, 3% donkey serum and 0.5% triton X-100) to prevent non-specific labeling. Sections were incubated 2 h (RT) with the blocking buffer containing 2 µg/ml of the primary antibody rabbit anti-Ionized calcium binding adapter molecule-1 (anti-Iba-1, Wako, Richmond, VA, USA) [22]. Sections were washed 3 times (5 min) and incubated 90 min (RT) with PBS containing 1:500 of the secondary antibody rhodamine anti-rabbit (ext: 550 nm; em: 570 nm) (Chemicon, Hornby, ON, Canada). Slides were washed 3 times (5 min), mounted with coverslip, fixed with Vectashield (Vector Laboratories, Burlington, ON, Canada) 12 h (RT) and stored at -4°C for up to 1 month. The examination was limited to the dorsal horn under confocal microscope (Leica Confocal microscope, Richmond Hill, ON, Canada), using the krypton laser (568 nm).

Quantification of Iba-1 immunolabelling

Leica confocal program was used to quantify the mean pixel energy of Iba-1 in the spinal dorsal horn. A minimum of 4 slides from 4 different rats were measured. In everyone slide, relative background energy was subtracted from the mean pixel energy.

SYBR green-based quantitative RT-PCR

Four days after injection of STZ, rats were anesthetised with CO₂ inhalation and then decapitated. The upper thoracic spinal cord (T1-T2) was isolated and approximately 10 mg of tissue were put in RNAlater stabilization reagent (QIAGEN, Valencia, CA, USA). Total RNA was extracted from tissue according to the manufacturer's instructions. First-strand cDNA synthesized from 400 ng total RNA with random hexamer primers was used as the template for each reaction with the QuantiTect Rev Transcription Kit (QIAGEN). SYBR Green-based real-time quantitative PCR using Mx3000 p device for signal detection (Stratagene, La Jolla, CA, USA) was performed as described [22]. PCR was performed in SYBR Green Master mix (QIAGEN) with 300 nM of each primer. For standardization and quantification, rat 18S was amplified simultaneously. The primer pairs were designed by Vector NTI software (Table 1). PCR conditions were as follows: 95°C for 15 min, followed by 46 cycles at 94°C for 15 s, 60°C for 30 s and 72°C for 30 s. The cycle threshold (Ct) value represents the cycle number at which a fluorescent signal rises statistically above background. The relative quantification of gene expression was analyzed by the 2^{-ΔΔCt} method [38].

Table 1: PCR primer pairs used in this study

		Sequences		Position	Gen Bank
18S forward	5'	TCA ACT TTC GAT GGT AGT CGC CGT	3'	363 - 386	X01117
18S reverse	5'	TCC TTG GAT GTG GTA GCC GTT TCT	3'	470 - 447	
B ₁ receptor forward	5'	GCA GCG CTT AAC CAT AGC GGA AAT	3'	367 - 391	NM_030851
B ₁ receptor reverse	5'	CCA GTT GAA ACG GTT CCC GAT GTT	3'	478 - 454	
IL-1β forward	5'	TGT CAC TCA TTG TGG CTG TGG AGA	3'	247 - 270	NM_031512
IL-1β reverse	5'	TGG GAA CAT CAC ACA CTA GCA GGT	3'	411 - 388	
TNF-α forward	5'	ATG ATC CGA GAT GTG GAA CTG GCA	3'	160 - 183	NM_012675
TNF-α reverse	5'	AAT GAG AAG AGG CTG AGG CAC AGA	3'	257 - 234	
TRPV1 forward	5'	GCA CAA TGG GCA GAA TGA CAC CAT	3'	575 - 598	NM_031982
TRPV1 reverse	5'	GGC ATT GAC AAA CTG CTT CAG GCT	3'	656 - 633	

Drugs

The kinin B₁R was blocked with the orally active, non-peptide B₁R antagonist, SSR240612, which crosses readily the blood-brain barrier [39]. It was kindly provided by Sanofi-Aventis R&D (Montpellier, France). R-715 was also used as B₁R antagonist as it does not cross the blood-brain barrier due to its peptide nature [8]. It was generously obtained from Dr Fernand Gobeil Jr. (Pharmacology, Sherbrooke University, Sherbrooke, Que, Canada). SSR240612 (10 mg/kg) was administered by gavage (volume of 1 ml by 100 g of rat body weight) while R-715 (10 mg/kg) was given intraperitoneally. Both antagonists at this dose blocked allodynia in a rat model of type 2 diabetes [20,21]. SSR240612 and R-715 were also administered intrathecally at a single dose of 10 µg to better dissociate the spinal and peripheral contribution of B₁R in the functional tests. Microglial cells were blocked with fluorocitrate (1 nmol, i.t.), a selective inhibitor of the Krebs cycle enzyme aconitase [40,41] and with minocycline (10 mg/kg, i.p.), an antibiotic preventing the translocation of microglia NF-κB to its nuclear promoter [31]. The B₁R agonist, des-Arg⁹-BK (9.6 nmol, i.t.) caused hyperalgesia in the tail-flick test in STZ rats [7] while the NK-1 receptor agonist, substance P (SP) (6.6 nmol, i.t.) caused hyperalgesia in the tail-flick test in control rats [42]. Both agonists were purchased from Bachem Bioscience Inc. (King of Prussia, PA, USA). For intraperitoneal injections, minocycline and R-715 were dissolved in 0.9% sterile saline. For intrathecal injections, des-Arg⁹-BK, SP, R-715 and fluorocitrate were dissolved in aCSF. For all treatments, SSR240612 was dissolved in dimethylsulphoxide (0.5%), and then ethanol (5%) and Tween-80 (5%) were added in this sequence [20]. The solution was completed in distilled water. Fluorocitrate, minocycline and all other reagents were purchased from Sigma-Aldrich Canada, Ltd (Oakville, ON, Canada).

Statistical analysis

All data were expressed as the means ± S.E.M. obtained from *n* rats. In the tail-flick test, data were calculated as a percentage of the maximum possible effect (% MPE) according to the following formula: % MPE = 100 × (drug latency minus baseline latency) ÷ (cut-off time minus baseline latency) [7]. The baseline latency corresponds to the average of the first three measurements. Statistical significance was determined with Student's *t*-test for paired samples or one-way analysis of variance (ANOVA) followed by post-hoc Bonferroni test for multiple comparisons. Data for allodynia were analysed with the non-parametric Kruskal-Wallis post-test. Only probability (*P*) values less than 0.05 were considered to be statistically significant.

Results

Influence of microglia inhibitors and B₁R antagonists on STZ-induced hyperglycemia

As depicted in Figure 1, rats which received STZ (65 mg/kg, i.p.) 4 days earlier displayed a significant increase of blood glucose concentration compared with vehicle-matched control rats. Blood glucose levels in control and STZ-treated rats were not affected by fluorocitrate (1 nmol, i.t.) or minocycline (10 mg/kg, i.p.) injected 3 h earlier (Figure 1). SSR240612 (10 mg/kg, p.o.) reduced significantly hyperglycemia in STZ-treated rats at 3 h post-gavage; the inhibitory effect of the B₁R antagonist was not significant at 6 h and was completely resolved at 24 h. A similar pattern of anti-hyperglycemia was seen with R-715 (10 mg/kg, i.p.), yet the inhibitory effect did not reach statistical significance (Figure 2-A). Either antagonist did not affect glycemia in control rats. Intrathecally administered R-715 and SSR240612 (10 µg) failed to alter blood glucose levels in both control and STZ-diabetic rats (Figure 2-B).

Effect of microglia inhibitors on Iba-1 microglial immunoreactivity

A quantitative immunolabelling with a specific immunomarker of microglia Iba-1 was employed to validate the use of minocycline and fluorocitrate as inhibitors of microglia activity. As shown in Figure 3-A, immunoreactivity to Iba-1 was much more striking in the spinal dorsal horn of STZ-diabetic rats than in matched control spinal dorsal horn. Immunoreactive microglial cells in STZ spi-

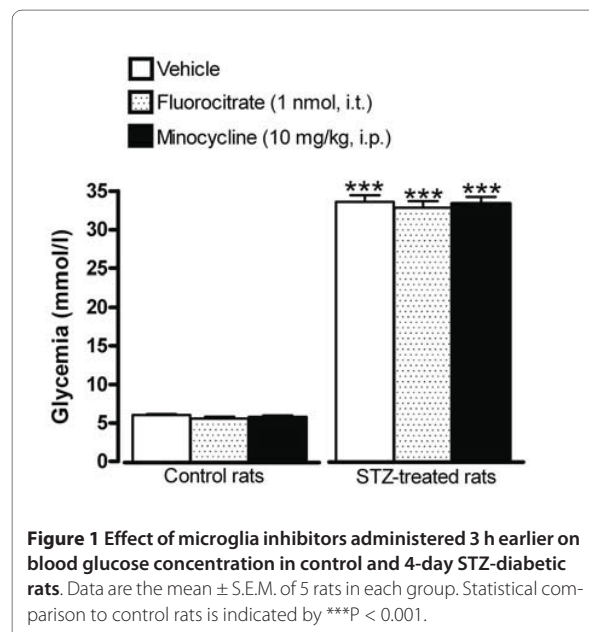
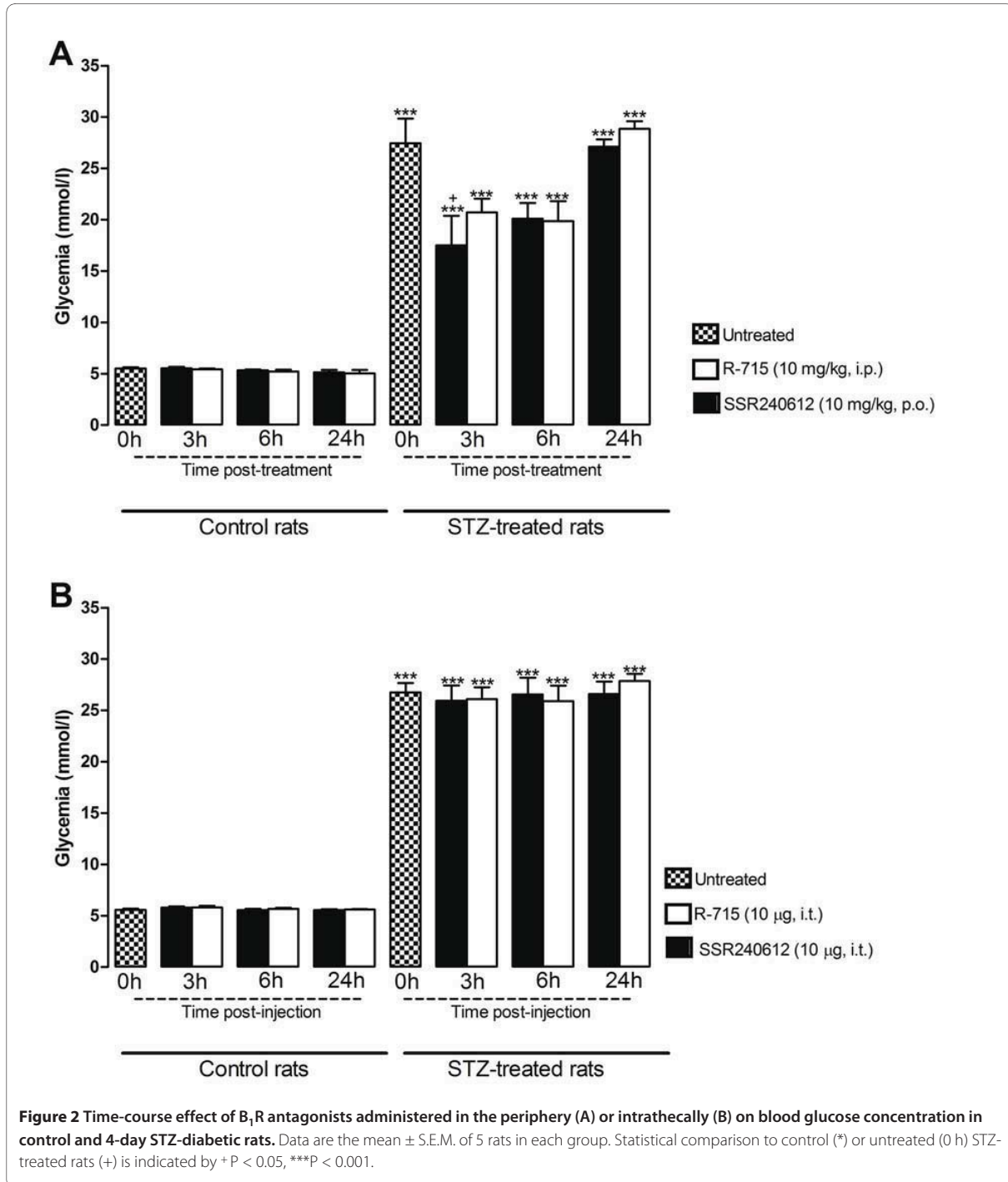


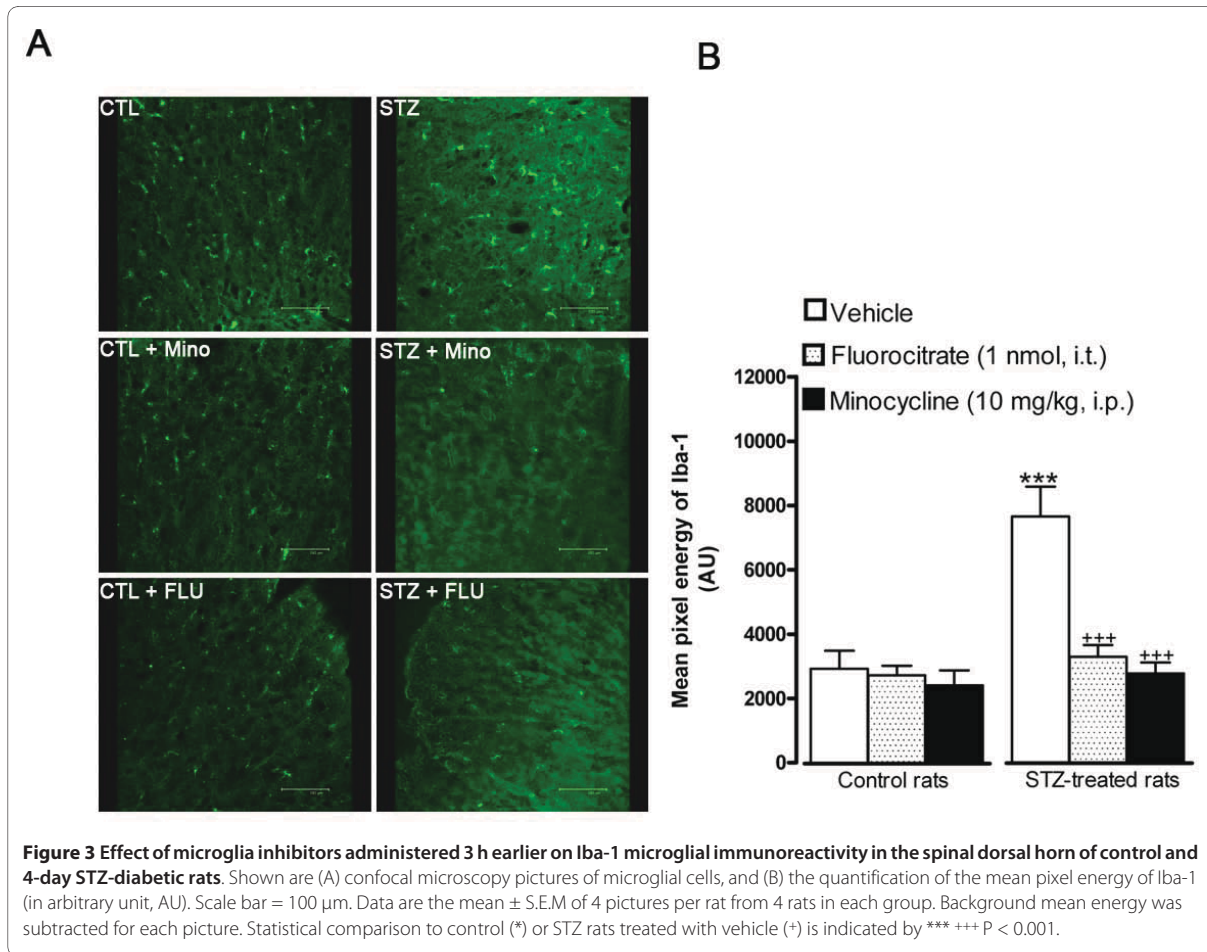
Figure 1 Effect of microglia inhibitors administered 3 h earlier on blood glucose concentration in control and 4-day STZ-diabetic rats. Data are the mean ± S.E.M. of 5 rats in each group. Statistical comparison to control rats is indicated by ****P* < 0.001.



nal cord were more numerous, thicker and displayed higher mean pixel energy than microglia of control spinal dorsal horn. Importantly, treatment with fluorocitrate or minocycline reversed and normalized the enhanced Iba-1 immunoreactivity in STZ spinal cord microglia (Figure 3-B). The same treatment with fluorocitrate or minocycline had no effect on the mean pixel energy of Iba-1 in control spinal dorsal horn.

Effect of microglia inhibitors on mRNA levels of B_1R , TRPV1, IL-1 β and TNF- α in STZ thoracic spinal cord

Since pro-inflammatory cytokines are involved in the induction of B_1R and that TRPV1 is associated with pain neuropathy, this series of experiments was carried out to measure their expression in STZ-diabetic rats. As illustrated in Table 2, mRNA levels of these markers were



markedly increased (IL-1 β > B₁R > TNF- α > TRPV1) in the spinal cord of STZ-diabetic rats. Treatment with fluorocitrate (1 nmol, i.t.) or minocycline (10 mg/kg, i.p.), 3 h earlier, markedly reduced the enhanced mRNA to values not significantly different from control levels.

Effect of fluorocitrate on B₁R specific binding sites in STZ thoracic spinal cord

A low density of specific kinin B₁R binding sites was detected in the spinal cord dorsal horn (laminae I-III) of control rats (0.637 fmol/mg protein). This value was increased by 4-fold in spinal cord of STZ-treated rats (2.474 fmol/mg protein). Fluorocitrate (1 nmol, i.t.) administered in STZ-diabetic rats, 3 h prior sacrifice, reduced (-38%) the increased density of specific B₁R binding sites induced by diabetes to values (1.532 fmol/mg protein) not significantly different from control density (Figure 4).

Effect of microglia inhibitors on thermal hyperalgesia mediated by des-Arg⁹-BK

As shown in Figure 5, control rats treated with SP (6.6 nmol, i.t.) showed a significant decrease in reaction time

to thermal stimulation at 1 min post-injection (-35%) in comparison with aCSE. This response was not significantly increased (-40%) in STZ-diabetic rats. Whereas des-Arg⁹-BK (9.6 nmol, i.t.) had no significant effect in control rats, a significant decrease in reaction time (-30%) occurred at 1 min post-injection in STZ-diabetic rats. A 3 h pre-treatment with fluorocitrate (1 nmol, i.t.) or minocycline (10 mg/kg, i.p.) abolished the hyperalgesic response to des-Arg⁹-BK (-5% and + 2%, respectively). Both fluorocitrate and minocycline reduced significantly SP-induced hyperalgesia in STZ-diabetic rats. This result indicates that microglia inhibition may partly contribute to SP-induced hyperalgesia in STZ-diabetic rats. Baseline values of the thermal nociceptive threshold in control rats (9.04 \pm 0.79; n = 5) were not affected (P > 0.05) at this early stage of STZ-induced diabetes (9.16 \pm 0.45; n = 5) neither by fluorocitrate (9.07 \pm 0.93; n = 5) nor minocycline (9.12 \pm 0.73; n = 5) treatment.

Effect of microglia inhibitors and B₁R antagonists on allodynia induced by STZ

STZ-diabetic rats presented significant tactile (Figures 6, 7) and cold allodynia (Figures 8,9) in comparison with

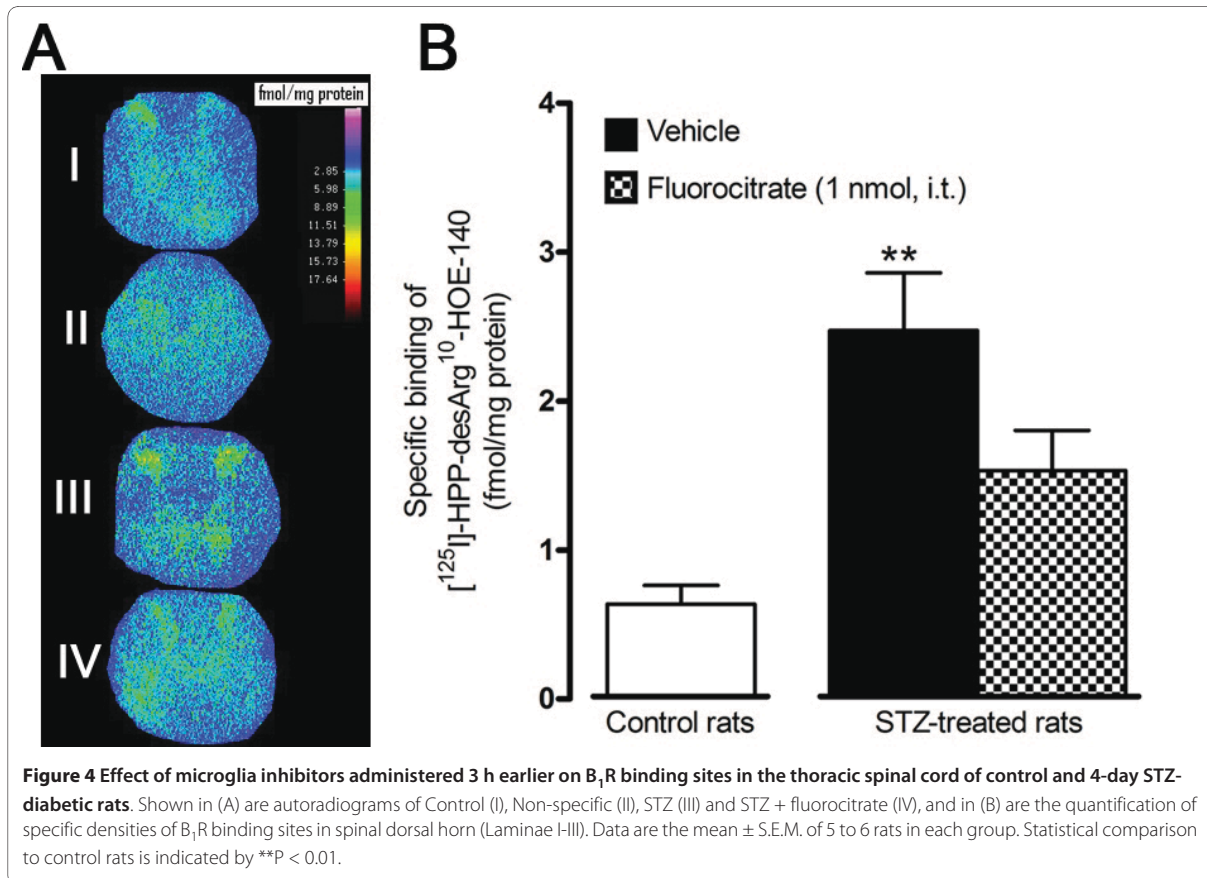
Table 2: Gene expression of various markers in thoracic spinal cord of STZ-diabetic rats

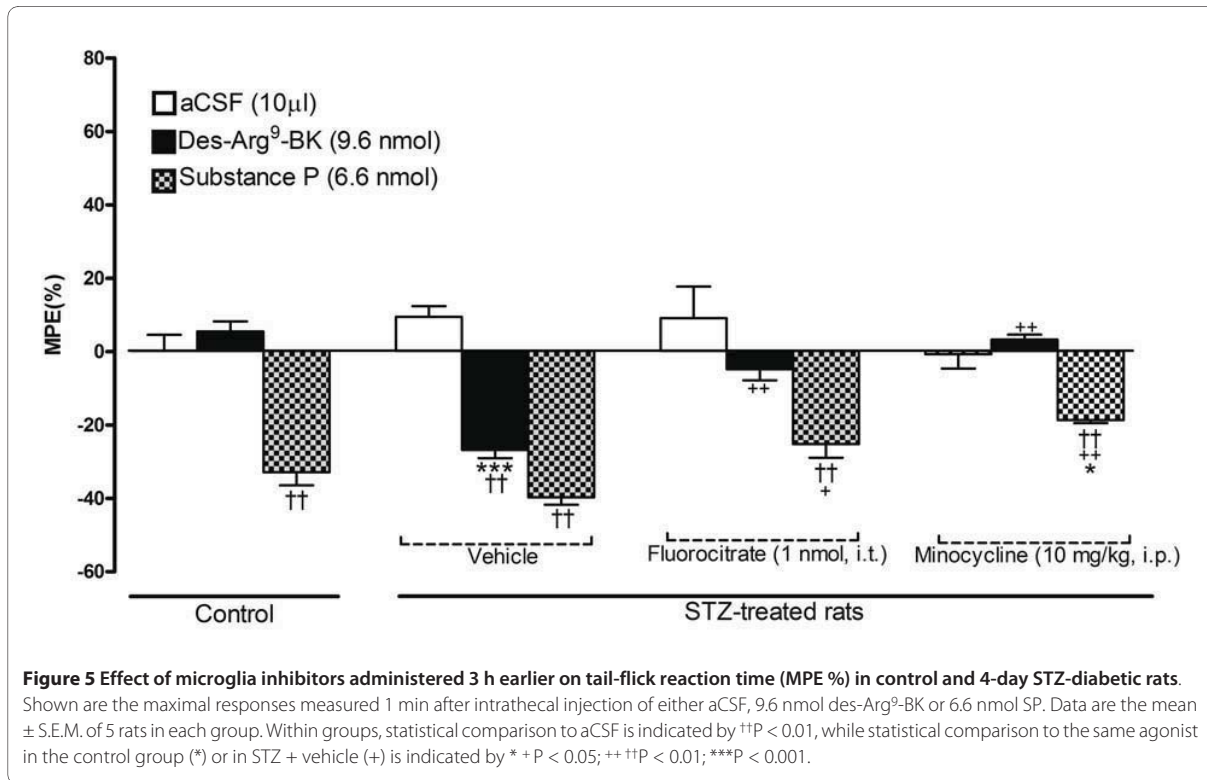
	B ₁ R	gene mRNA/18S mRNA (fold change)		
		TRPV1	IL-1β	TNF-α
Control	1.0 ± 0.4	1.0 ± 0.1	1.0 ± 0.6	1.0 ± 0.6
STZ	27.3 ± 8.7 *	3.1 ± 0.4 *	77.9 ± 19.6 *	6.0 ± 2.1 **
STZ + Fluorocitrate	2.7 ± 1.1	2.3 ± 0.3 +	10.1 ± 7.9	0.9 ± 0.4 +
STZ + Minocycline	3.0 ± 1.3	2.6 ± 0.2 +	8.9 ± 4.2	2.1 ± 0.7 +

Effect of a 3 h pre-treatment with fluorocitrate (1 nmol, i.t.) or minocycline (10 mg/kg, i.p.) on gene expression of inflammatory markers in thoracic spinal cord of STZ-diabetic rats. Data represent the mean ± S.E.M. of 5-6 rats in each group. Statistical comparison to control (*) and STZ-diabetic rats without microglia inhibitors (+) is indicated by * + P < 0.05; **P < 0.01.

vehicle-matched control rats. These responses were stable when the tests were performed over a period of 24 h. The B₁R antagonists, SSR240612 and R-715, administered systemically blocked in a transient and reversible manner cold and tactile allodynia between 3 and 6 h post-treatment in STZ-diabetic rats. Intrathecal treatments

with B₁R antagonists provided more rapid and shorter inhibition of allodynia (1-3 h) than systemic treatments (3-6 h). Fluorocitrate and minocycline caused a similar pattern of inhibition on tactile allodynia at 1 and 3 h post-treatment while the inhibition of cold allodynia with microglia inhibitors lasted at least up to 6 h post-treat-





ment. The same treatments with B₁R antagonists or microglia inhibitors had no consequence on baseline values in control rats.

Effect of microglia inhibitors on enhanced tactile allodynia induced by des-Arg⁹-BK in STZ-treated rats

As observed in Table 3, STZ-diabetic rats displayed significant tactile allodynia in comparison with control rats. In diabetic rats, the intrathecal stimulation of B₁R with its native agonist (des-Arg⁹-BK, 9.6 nmol) induced a significant and transient enhancement of tactile allodynia at 10 min post-injection. This response was prevented by the inhibition of B₁R (SSR240612, 10 µg, i.t.) and of microglia with fluorocitrate (1 nmol, i.t.) or minocycline (10 mg/kg, i.p.) injected 3 h earlier. Those treatments administered to control animals were without effect while they reversed tactile allodynia in STZ-diabetic rats.

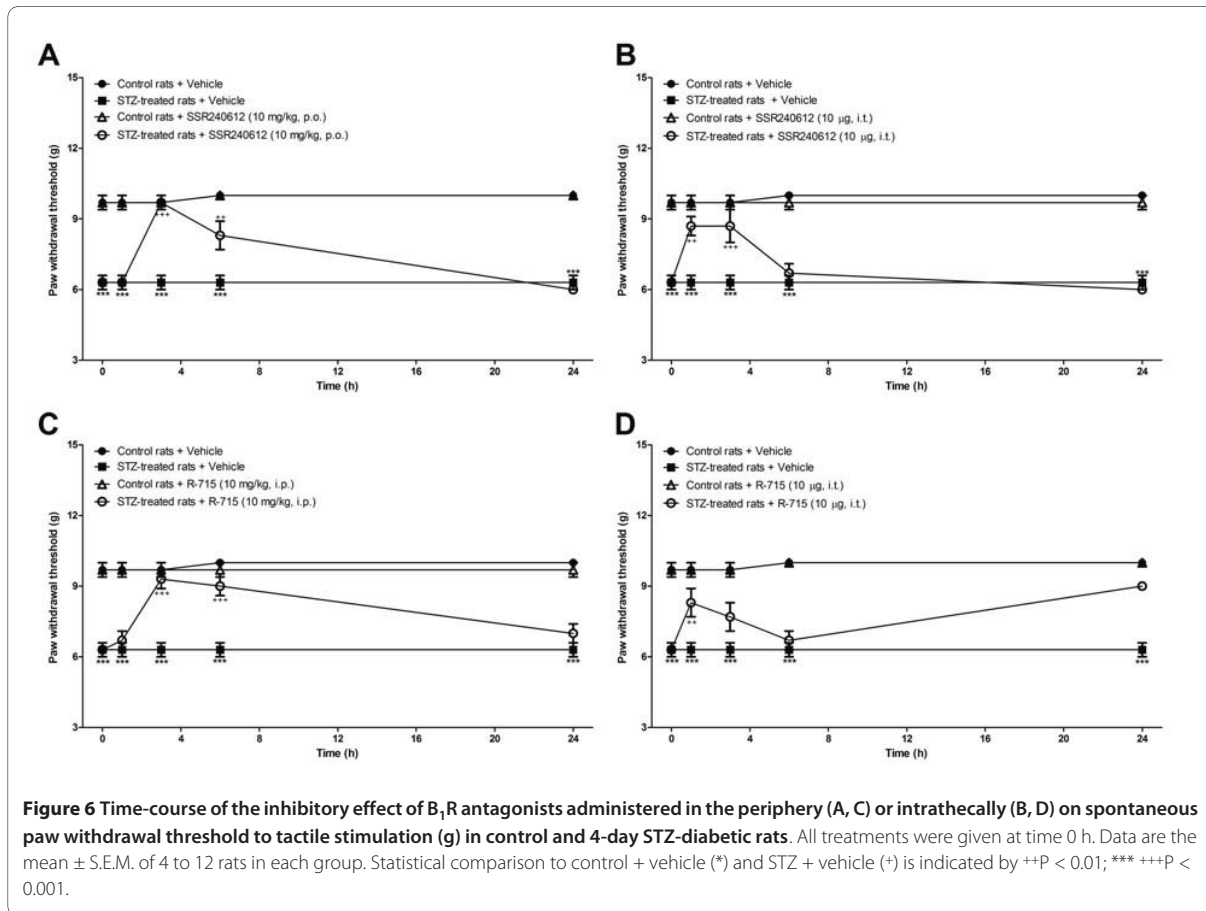
Discussion

The present findings support a primary role for spinal microglial kinin B₁R in early pain neuropathy in a rat model of type 1 diabetes. Our study provides the first direct evidence that the B₁R is involved in allodynia and hyperalgesia in STZ-diabetic rats through a mechanism involving the microglia. This is supported by 1- the similar pattern of inhibition of allodynia by microglia inhibi-

tors and B₁R antagonists, and 2- the blockade of the transient allodynic and hyperalgesic responses induced by the stimulation of spinal B₁R (des-Arg⁹-BK) by microglia inhibitors. Because spontaneous cold and tactile allodynia in STZ-diabetic rats were reversed by intrathecal B₁R antagonists and by peripheral administration of R-715, which does not cross the blood brain barrier, it is concluded that both spinal and peripheral B₁R are involved in diabetic allodynia. This is consistent with the presence of B₁R on spinal dorsal horn microglia in STZ-diabetic rats [22]. An additional argument supporting an interaction between B₁R and microglia is the finding that fluorocitrate and minocycline reversed simultaneously the upregulation of B₁R and pro-inflammatory cytokines (IL-1β and TNF-α) in the spinal cord. Hence, the results highlight a key role for microglia and pro-inflammatory cytokines in the induction and overexpression of B₁R in the spinal cord.

Validation of microglia inhibitors

Immunolabelling of Iba-1 in STZ-diabetic rats treated with minocycline and fluorocitrate confirmed the inhibition of microglia. The Iba-1 immunolabelling in the spinal dorsal horn of 4-days STZ-diabetic rats showed the characteristics of activated microglia with larger cell body, shorter and stouter processes [43,44]. In contrast,



resting-state microglia with small size cytoplasm and long processes are observed in control spinal cord [43,44]. As expected, microglia inhibitors caused a marked diminution of Iba-1 immunoreactivity and cell body volume. This result is in accordance with the literature showing that minocycline caused a marked reduction of Iba-1 immunoreactivity in diabetes [28]. To the best of our knowledge, this is however the first report showing a decrease of Iba-1 immunoreactivity after fluorocitrate treatment.

B₁R induction mechanism

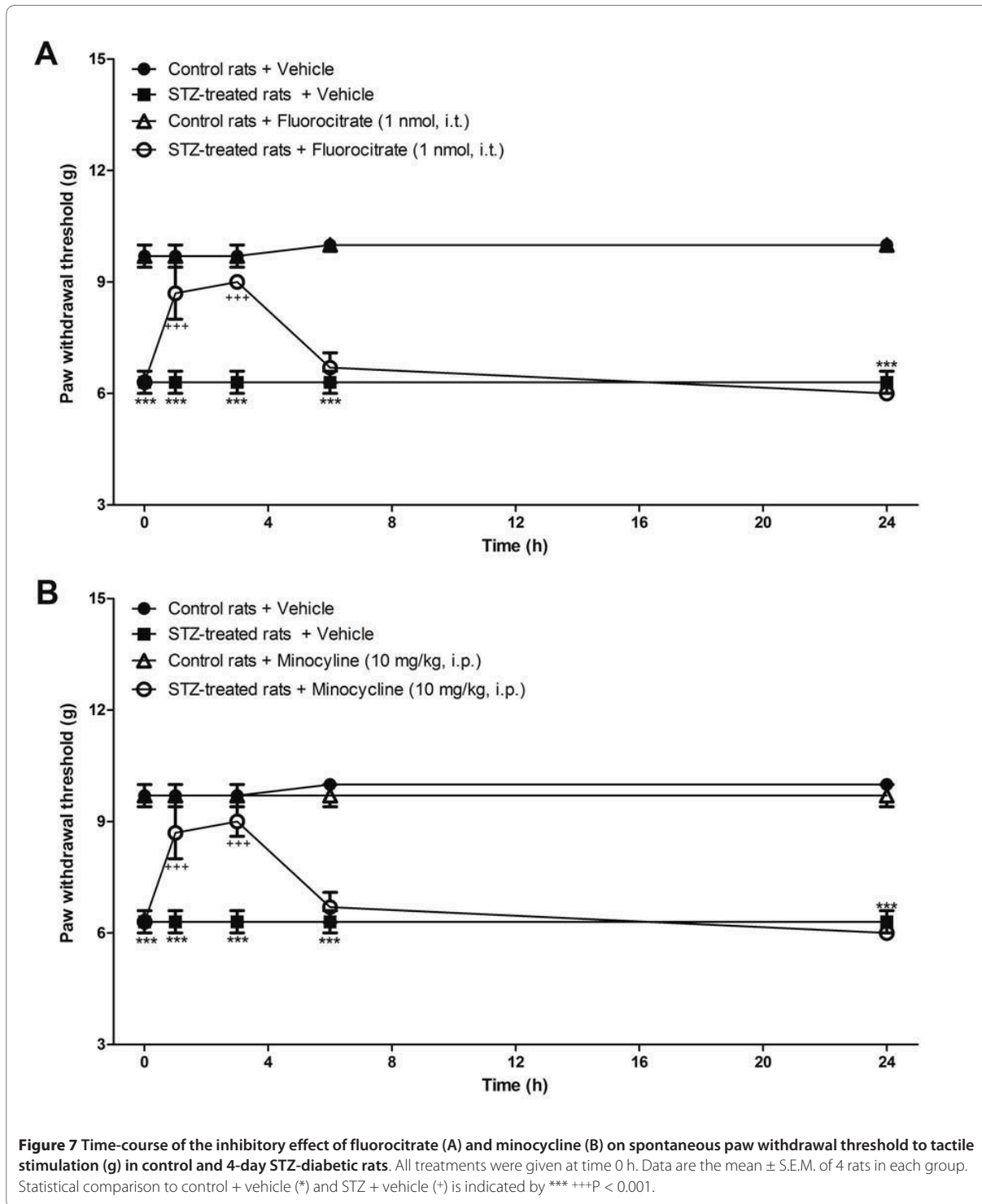
We observed an upregulation of both B₁R binding sites and mRNA in the spinal cord of STZ-diabetic rats in comparison with its low level of expression in controls. Those results are in accordance with previous studies [22,23]. Hyperglycemia associated with type 1 diabetes can activate NF-κB [45], which is known to induce B₁R [9,10]. Moreover, oxidative stress associated with diabetes was reported to be involved in the induction of B₁R [19,46].

We demonstrated that microglia inhibition prevented STZ-induced upregulation of B₁R, TNF-α and IL-1β

mRNA. The microglia can release pro-inflammatory mediators such as IL-1β [47], TNF-α [48] and reactive oxygen species (ROS) [49] all known to induce B₁R through the nuclear translocation of NF-κB and the activation of its promoter [7,9,10]. Therefore, the suppression of B₁R expression by fluorocitrate and minocycline is most likely linked to the inhibition of pro-inflammatory cytokines and ROS released from microglia. Since TRPV1 activation can also contribute to B₁R induction [50], one cannot exclude that the inhibitory effect of microglia inhibitors on B₁R is partly mediated by the inhibition of TRPV1 overexpression observed in STZ. However, the increased mRNA level of TRPV1 in STZ was much less striking (3-fold) than that of B₁R (27-fold), IL-1β (78-fold) and TNF-α (6-fold). The inhibitory effect of fluorocitrate and minocycline on STZ-induced increase of TRPV1 mRNA was also quite modest.

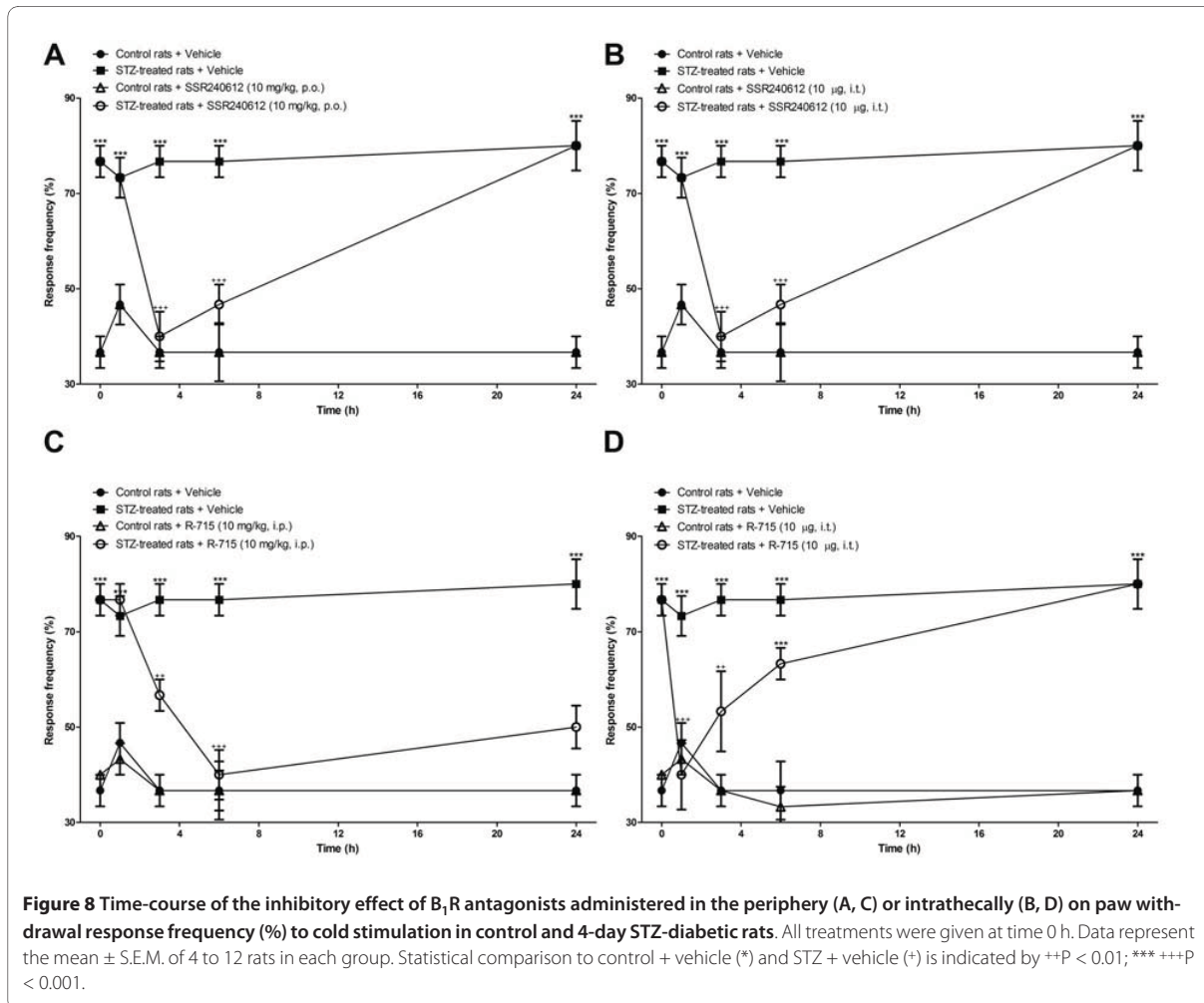
B₁R spinal cord localization

A 3 h treatment with fluorocitrate normalized B₁R mRNA level, yet specific dorsal horn B₁R binding sites were reduced by only 38% in the spinal cord of STZ rats.



This may suggest that the majority of induced and up-regulated B_1R mRNA is associated with microglial cells. The discrepancy between mRNA and binding sites suggests that about 62% of specific B_1R binding sites origi-

nate from outside the spinal cord such as dorsal root ganglion cells projecting to the dorsal horn. This would be consistent with the presence of B_1R on sensory C-fibers identified with CGRP and TRPV1 specific antibod-



ies [22]. B₁R binding sites may also represent receptors located on bulbospinal projecting fibers and/or astrocytes. Based on this reasoning, data with fluorocitrate suggest that microglial cells bear approximately 38% of all B₁R measured in the spinal cord of STZ-diabetic rats by autoradiography. The present study does not exclude a role for B₁R present on sensory C-fibers and astrocytes in allodynia and thermal hyperalgesia as these spinal cord elements may interact with microglia to contribute to neuropathic pain.

Allodynia

As early as 4 days after STZ-treatment, rats exerted significant spontaneous cold and tactile allodynia compared with control rats as already reported [28]. For the first time, we demonstrated that acute blockade of spinal cord B₁R with SSR240612 or R-715 can reverse both types of allodynia in STZ-diabetic rats. Our results also showed that systemic blockade of B₁R with the peptide B₁R antag-

onist R-715 reversed STZ-induced allodynia, supporting the idea that peripherally expressed B₁R may also contribute to neuropathic pain. This is in keeping with our recent results showing that tactile and cold allodynia, observed in a rat model of insulin resistance [20,21], can be prevented with either peripherally or centrally acting B₁R antagonists.

Although it was extensively studied, the exact mechanism underlying sensory abnormalities in STZ-treated rats remained unclear [51]. Recent literature suggests that spinal dorsal horn microglia is a crucial component of STZ-induced tactile allodynia which is partly mediated by the extracellular signal-regulated protein kinase signaling [28]. Moreover, studies have implicated the activation of stress-activated mitogen-activated protein kinase (MAPK) p38 in spinal microglial cells in the rat model of plantar incision-induced mechanical allodynia [52]. Inhibition of microglia activation with Gabapentin [25] or fluorocitrate and minocycline (present study) reversed

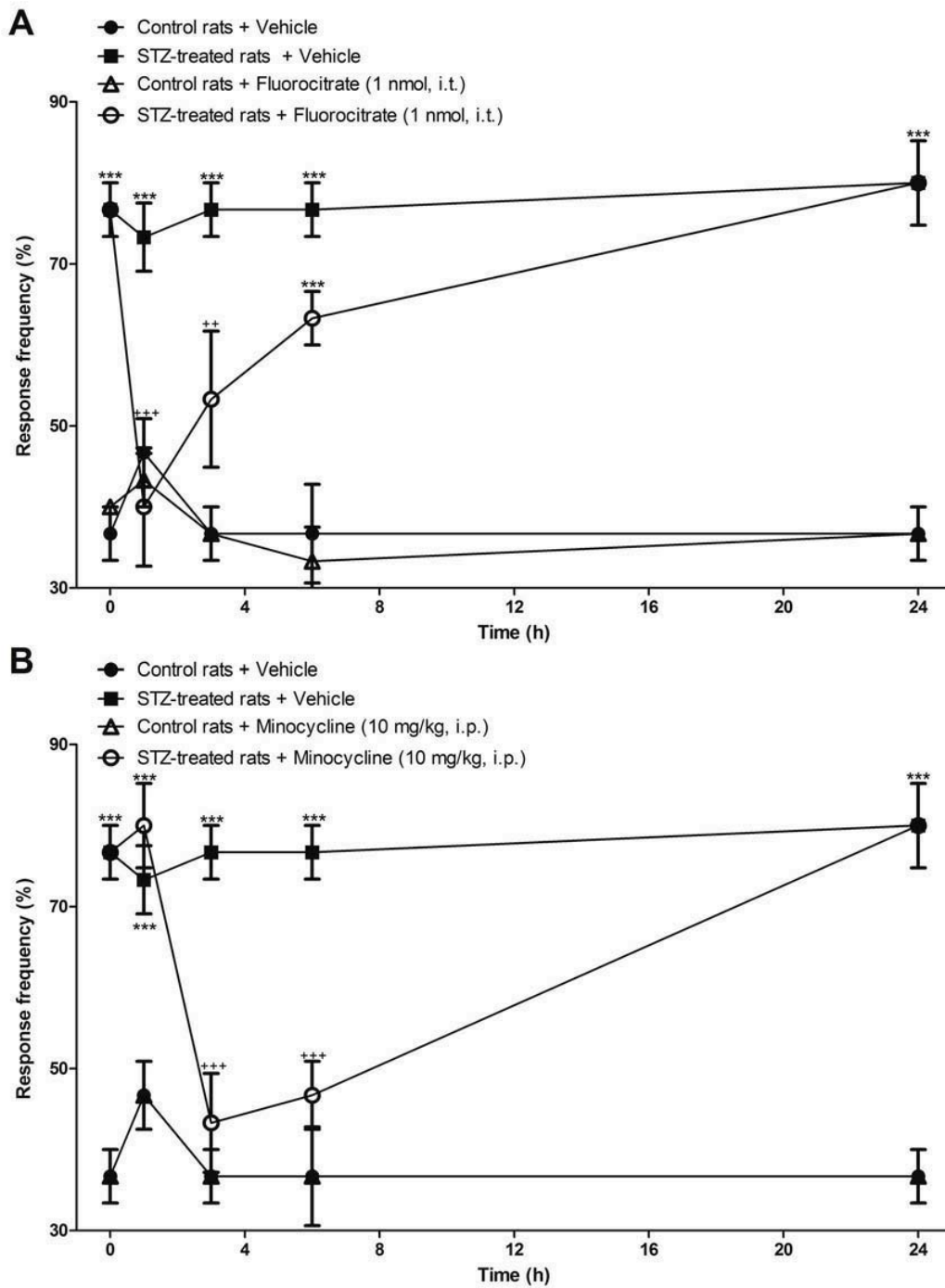


Figure 9 Time-course of the inhibitory effect of fluorocitrate (A) and minocycline (B) on paw withdrawal response frequency (%) to cold stimulation in control and 4-day STZ-diabetic rats. All treatments were given at time 0 h. Data are the mean \pm S.E.M. of 4 rats in each group. Statistical comparison to control + vehicle (*) and STZ + vehicle (*) is indicated by $^{*}P < 0.01$; $^{***}P < 0.001$.

Table 3: Effect of spinal cord B₁R stimulation on tactile allodynia in STZ-diabetic rats

Tactile allodynia (g)						
	0 min	5 min	10 min	15 min	30 min	60 min
Control rats						
Vehicle	9.7 ± 0.3	9.7 ± 0.3	9.3 ± 0.7	9.7 ± 0.3	9.7 ± 0.3	9.7 ± 0.3
DABK (9.6 nmol, i.t.)	9.7 ± 0.3	9.7 ± 0.3	9.3 ± 0.7	9.7 ± 0.3	9.7 ± 0.3	9.7 ± 0.3
SSR240612 (10 µg, i.t.) + DABK	10.7 ± 0.3	9.7 ± 0.3	9.3 ± 0.7	9.7 ± 0.3	9.7 ± 0.3	9.7 ± 1.3
FLU (1 nmol, i.t.) + DABK	9.7 ± 0.3	9.7 ± 0.3	9.3 ± 0.7	9.7 ± 0.3	9.7 ± 0.3	9.7 ± 0.3
Mino (10 mg/kg, i.p.) + DABK	9.7 ± 0.3	9.7 ± 0.3	9.3 ± 0.7	9.7 ± 0.3	9.7 ± 0.3	9.7 ± 0.3
Tactile allodynia (g)						
	0 min	5 min	10 min	15 min	30 min	60 min
STZ-treated rats						
Vehicle	6.3 ± 0.3***	6.0 ± 0.5***	6.3 ± 0.3***	6.3 ± 0.3***	6.3 ± 0.3***	6.0 ± 0.5***
DABK (9.6 nmol, i.t.)	6.0 ± 0.5***	5.3 ± 0.4***	4.3 ± 0.3++ ***	5.3 ± 0.4***	6.0 ± 0.0***	5.7 ± 0.3***
SSR240612 (10 µg, i.t.) + DABK	9.3 ± 0.3+++	9.3 ± 0.0+++	9.3 ± 0.0+++	9.3 ± 0.3+++	9.7 ± 0.3+++	9.3 ± 0.0+++
FLU (1 nmol, i.t.) + DABK	9.7 ± 0.3+++	9.7 ± 0.3+++	9.7 ± 0.3+++	9.7 ± 0.3+++	9.3 ± 0.4+++	9.3 ± 0.4+++
Mino (10 mg/kg, i.p.) + DABK	9.7 ± 0.3+++	9.0 ± 0.4+++	9.3 ± 0.4+++	9.3 ± 0.4+++	8.7 ± 0.4+++	9.3 ± 0.4+++

Time-course effect of a single intrathecal (i.t.) injection of the B₁R agonist, des-Arg⁹-BK (DABK, 9.6 nmol), on the paw withdrawal threshold to tactile stimulation (g) in control and 4-day STZ-diabetic rats pre-treated, 3 h earlier, with either B₁R antagonist (SSR240612), microglia inhibitors (minocycline, fluorocitrate) or vehicle. Data represent the mean ± S.E.M. of 4 to 12 rats in each group. Statistical comparison to vehicle in control (*) and STZ-treated rats (*) is indicated by ++P < 0.01; *** +++P < 0.001

allodynia in STZ-treated rats. This is the first report showing the anti-neuropathic potential of minocycline in diabetic rats. The anti-allodynic effect of minocycline in rats was reported in the formalin test [53] and in neuropathic pain models of sciatic or spinal nerve injury [54-56]. Likewise, fluorocitrate could reverse allodynia in various models of polyneuropathy, including that induced by sciatic nerve injury [41], intrathecal ATP [40] and intrathecal HIV-1 envelope glycoprotein gp120 [57]. Thus, this is also the first demonstration that fluorocitrate can reverse diabetic allodynia.

Allodynia induced by spinal cord B₁R stimulation

Importantly, this study presented the first evidence that spinal cord activation of B₁R with its native agonist enhanced tactile allodynia in STZ-diabetic rats. This effect was prevented by a pre-treatment with an antagonist of B₁R or by microglia inhibition, providing a strong argument that the allodynic response does involve microglial B₁R. This is in accordance with the pro-nociceptive role of many other G-protein coupled-receptors expressed on microglia, including TLR2-4, P2Y₁₂R, CCR2, CX₃CR1 [58].

Hyperalgesia mediated by the B₁R

The activation of spinal cord tachykinin NK-1 receptor with SP caused a hyperalgesic response in the tail-flick test, which was associated with the release of glutamate and NO in control rats [42,59,60]. Whereas intrathecal administration of des-Arg⁹-BK, the selective B₁R agonist, had no effect on the nociceptive threshold in control rats, it evoked a transient hyperalgesia in STZ-diabetic rat, which was likely mediated by the release of pro-inflammatory mediators (NO, SP and glutamate) based on pharmacological blockade of NOS, NK-1R and NMDAR [7]. The present study extended this observation by demonstrating that thermal hyperalgesia elicited by the B₁R agonist in STZ-diabetic rats requires intact microglia. This is consistent with the effects of pro-nociceptive mediators such as NO [61], ROS [49], SP [62] and glutamate [63], which can be released by microglia.

The therapeutic effects of B₁R antagonists and microglia inhibitors on allodynia and hyperalgesia are unlikely due to changes in blood glucose concentrations since microglia inhibitors and intrathecal B₁R antagonist reversed pain neuropathy without affecting hyperglycemia in STZ-diabetic rats. Although SSR240612 reduced

significantly hyperglycemia at 3 h post-gavage, rats remained diabetics (glycemia > 18 mmol/L). The mechanism of the transient anti-hyperglycemic effect of SSR240612 could be attributed to the inhibition of islet inflammation (insulinitis) as suggested earlier in studies using [Leu⁸]des-Arg⁹-BK as B₁R antagonist in STZ-diabetic mice [64,65].

Conclusion

This study provides the first pharmacological evidence that spinal dorsal horn microglial B₁R contributes to early pain neuropathy in a rat model of type 1 diabetes. Microglial B₁R induction could be related to the production and release of spinal pro-inflammatory cytokines such as IL-1 β and TNF- α . Hence, microglial B₁R may represent a promising therapeutic target for the treatment of diabetic pain neuropathy.

List of abbreviations

anti-Iba-1: Anti-Ionized calcium binding adapter molecule 1; aCSF: artificial cerebrospinal fluid; BK: bradykinin; BSA: bovine serum albumin; CGRP: calcitonin-gene related peptide; des-Arg⁹-BK: des-Arg⁹-bradykinin; IL-1 β : interleukin-1 beta; B₁R: kinin B₁ receptor; Lys-BK: Lys-bradykinin; MAPK: mitogen-activated protein kinase; NO: nitric oxide; NOS: nitric oxide synthase; PBS: phosphate buffered saline; qRT-PCR: quantitative real-time PCR; ROS: reactive oxygen species; STZ: streptozotocin; SP: substance P; NF-kappa B: transcriptional nuclear factor kappa B; TRPV1: transient receptor potential vanilloid 1; TNF-alpha: tumor necrosis factor alpha

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Authors' contributions

ST designed the study, performed the experiments, analyzed the data, drafted and interpreted critically the manuscript. EC helped in allodynia and tail-flick test experiments. JPD performed the intrathecal implantations. RC conceived and wrote the final version with important intellectual contribution. All authors read and approved the final manuscript.

Acknowledgements

This work was supported by Grant-in-aids from the Canadian Diabetes Association (OG-3-07-2428-RC) and Canadian Institutes of Health Research (CIHR) (MOP-79471). ST and JPD hold Studentship Awards from CIHR (Frederick Banting and Charles Best Canada Graduate Scholarships-Doctoral Award). Authors are most thankful to Michel Lauzon, Jacques Sénécal and Yessica-Haydee Gomez Sandoval for their expert assistance in confocal microscopy, quantitative autoradiography and Adobe Photoshop, respectively.

Author Details

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

Received: 14 July 2009 Accepted: 29 June 2010

Published: 29 June 2010

References

1. Hornick T, Aron DC: Preventing and managing diabetic complications in elderly patients. *Cleve Clin J Med* 2008, **75**:153-158.

2. Vinik AI, Suwanwalaikorn S, Stansberry KB, Holland MT, McNitt PM, Colen LE: Quantitative measurement of cutaneous perception in diabetic neuropathy. *Muscle Nerve* 1995, **18**:574-584.
3. Calcutt NA: Experimental models of painful diabetic neuropathy. *J Neurol Sci* 2004, **220**:137-139.
4. Daousi C, MacFarlane IA, Woodward A, Nurmikko TJ, Bundred PE, Benbow SJ: Chronic painful peripheral neuropathy in an urban community: a controlled comparison of people with and without diabetes. *Diabet Med* 2004, **21**:976-982.
5. Sharma SS, Kumar A, Kaundal RK: Protective effects of 4-amino-1,8-naphthalimide, a poly (ADP-ribose) polymerase inhibitor in experimental diabetic neuropathy. *Life Sci* 2008, **82**:570-576.
6. Calixto JB, Cabrini DA, Ferreira J, Campos MM: Kinins in pain and inflammation. *Pain* 2000, **87**:1-5.
7. Couture R, Harrison M, Vianna RM, Cloutier F: Kinin receptors in pain and inflammation. *Eur J Pharmacol* 2001, **429**:161-176.
8. Regoli D, Nsa Allogho S, Rizzi A, Gobeil F: Bradykinin receptors and their antagonists. *Eur J Pharmacol* 1998, **348**:1-10.
9. Leeb-Lundberg LM, Marceau F, Muller-Esterl W, Pettibone DJ, Zuraw BL: International union of pharmacology. XLV. Classification of the kinin receptor family: from molecular mechanisms to pathophysiological consequences. *Pharmacol Rev* 2005, **57**:27-77.
10. Marceau F, Regoli D: Bradykinin receptor ligands: therapeutic perspectives. *Nat Rev Drug Discov* 2004, **3**:845-852.
11. Marceau F, Hess JF, Bachvarov DR: The B1 receptors for kinins. *Pharmacol Rev* 1998, **50**:357-386.
12. deBlois D, Horlick RA: Endotoxin sensitization to kinin B(1) receptor agonist in a non-human primate model: haemodynamic and pro-inflammatory effects. *Br J Pharmacol* 2001, **132**:327-335.
13. Couture R, Girolami JP: Putative roles of kinin receptors in the therapeutic effects of angiotensin 1-converting enzyme inhibitors in diabetes mellitus. *Eur J Pharmacol* 2004, **500**:467-485.
14. Pesquero JB, Araujo RC, Heppenstall PA, Stucky CL, Silva JA Jr, Walther T, Oliveira SM, Pesquero JL, Paiva AC, Calixto JB, et al: Hypoalgesia and altered inflammatory responses in mice lacking kinin B1 receptors. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000, **97**:8140-8145.
15. Gabra BH, Merino VF, Bader M, Pesquero JB, Sirois P: Absence of diabetic hyperalgesia in bradykinin B1 receptor-knockout mice. *Regul Pept* 2005, **127**:245-248.
16. Davis AJ, Perkins MN: The involvement of bradykinin B1 and B2 receptor mechanisms in cytokine-induced mechanical hyperalgesia in the rat. *Br J Pharmacol* 1994, **113**:63-68.
17. Correa CR, Calixto JB: Evidence for participation of B1 and B2 kinin receptors in formalin-induced nociceptive response in the mouse. *Br J Pharmacol* 1993, **110**:193-198.
18. Petcu M, Dias JP, Ongali B, Thibault G, Neugebauer W, Couture R: Role of kinin B1 and B2 receptors in a rat model of neuropathic pain. *Int Immunopharmacol* 2008, **8**:188-196.
19. Ismael MA, Talbot S, Carbonneau CL, Beausejour CM, Couture R: Blockade of sensory abnormalities and kinin B(1) receptor expression by N-acetyl-L-cysteine and ramipril in a rat model of insulin resistance. *Eur J Pharmacol* 2008, **589**:66-72.
20. Dias JP, Ismael MA, Pilon M, de Champlain J, Ferrari B, Carayon P, Couture R: The kinin B1 receptor antagonist SSR240612 reverses tactile and cold allodynia in an experimental rat model of insulin resistance. *Br J Pharmacol* 2007, **152**:280-287.
21. Lungu C, Dias JP, Franca CE, Ongali B, Regoli D, Moldovan F, Couture R: Involvement of kinin B1 receptor and oxidative stress in sensory abnormalities and arterial hypertension in an experimental rat model of insulin resistance. *Neuropeptides* 2007, **41**:375-387.
22. Talbot S, Theberge-Turmel P, Liazoghli D, Senecal J, Gaudreau P, Couture R: Cellular localization of kinin B1 receptor in the spinal cord of streptozotocin-diabetic rats with a fluorescent [Nalpha-Bodipy]-des-Arg⁹-bradykinin. *J Neuroinflammation* 2009, **6**:11.
23. Ongali B, Campos MM, Petcu M, Rodi D, Cloutier F, Chabot JG, Thibault G, Couture R: Expression of kinin B1 receptors in the spinal cord of streptozotocin-diabetic rat. *Neuroreport* 2004, **15**:2463-2466.
24. Streit WJ, Graeber MB, Kreutzberg GW: Functional plasticity of microglia: a review. *Glia* 1988, **1**:301-307.
25. Wodarski R, Clark AK, Grist J, Marchand F, Malcangio M: Gabapentin reverses microglial activation in the spinal cord of streptozotocin-induced diabetic rats. *Eur J Pain* 2009, **13**:807-811.

26. Watkins LR, Maier SF: **Glia: a novel drug discovery target for clinical pain.** *Nat Rev Drug Discov* 2003, **2**:973-985.
27. Scholz J, Woolf CJ: **The neuropathic pain triad: neurons, immune cells and glia.** *Nat Neurosci* 2007, **10**:1361-1368.
28. Tsuda M, Ueno H, Kataoka A, Tozaki-Saitoh H, Inoue K: **Activation of dorsal horn microglia contributes to diabetes-induced tactile allodynia via extracellular signal-regulated protein kinase signaling.** *Glia* 2008, **56**:378-386.
29. Daulhac L, Mallet C, Courteix C, Etienne M, Duroux E, Privat AM, Eschaliar A, Fialip J: **Diabetes-induced mechanical hyperalgesia involves spinal mitogen-activated protein kinase activation in neurons and microglia via N-methyl-D-aspartate-dependent mechanisms.** *Mol Pharmacol* 2006, **70**:1246-1254.
30. Sun S, Cao H, Han M, Li TT, Zhao ZQ, Zhang YQ: **Evidence for suppression of electroacupuncture on spinal glial activation and behavioral hypersensitivity in a rat model of monoarthritis.** *Brain Res Bull* 2008, **75**:83-93.
31. Maier K, Merkler D, Gerber J, Taheri N, Kuhnert AV, Williams SK, Neusch C, Bahr M, Diem R: **Multiple neuroprotective mechanisms of minocycline in autoimmune CNS inflammation.** *Neurobiol Dis* 2007, **25**:514-525.
32. Chaplan SR, Bach FW, Pogrel JW, Chung JM, Yaksh TL: **Quantitative assessment of tactile allodynia in the rat paw.** *J Neurosci Methods* 1994, **53**:55-63.
33. Choi Y, Yoon YW, Na HS, Kim SH, Chung JM: **Behavioral signs of ongoing pain and cold allodynia in a rat model of neuropathic pain.** *Pain* 1994, **59**:369-376.
34. Yashpal K, Henry JL: **Endorphins mediate overshoot of substance P-induced facilitation of a spinal nociceptive reflex.** *Can J Physiol Pharmacol* 1983, **61**:303-307.
35. Lacoste B, Riad M, Ratte MO, Boye SM, Levesque D, Descarries L: **Trafficking of neurokinin-1 receptors in serotonin neurons is controlled by substance P within the rat dorsal raphe nucleus.** *Eur J Neurosci* 2009, **29**:2303-2314.
36. Hunter WM, Greenwood FC: **Preparation of iodine-131 labelled human growth hormone of high specific activity.** *Nature* 1962, **194**:495-496.
37. Nazarali AJ, Gutkind JS, Saavedra JM: **Calibration of 125I-polymer standards with 125I-brain paste standards for use in quantitative receptor autoradiography.** *J Neurosci Methods* 1989, **30**:247-253.
38. Livak KJ, Schmittgen TD: **Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method.** *Methods* 2001, **25**:402-408.
39. Gougat J, Ferrari B, Sarran L, Planchenault C, Poncelet M, Maruani J, Alonso R, Cudennec A, Croci T, Guagnini F, et al.: **SSR240612 [(2R)-2-[(3R)-3-(1,3-benzodioxol-5-yl)-3-[[6-methoxy-2-naphthyl)sulfonyl]amino]propanoyl]amino]-3-(4-[[2R,6S)-2,6-dimethylpiperidinyl]methyl]phenyl)-N-isopropyl-N-methylpropanamide hydrochloride], a new nonpeptide antagonist of the bradykinin B1 receptor: biochemical and pharmacological characterization.** *J Pharmacol Exp Ther* 2004, **309**:661-669.
40. Nakagawa T, Wakamatsu K, Zhang N, Maeda S, Minami M, Satoh M, Kaneko S: **Intrathecal administration of ATP produces long-lasting allodynia in rats: differential mechanisms in the phase of the induction and maintenance.** *Neuroscience* 2007, **147**:445-455.
41. Milligan ED, Twining C, Chacur M, Biedenkapp J, O'Connor K, Poole S, Tracey K, Martin D, Maier SF, Watkins LR: **Spinal glia and proinflammatory cytokines mediate mirror-image neuropathic pain in rats.** *J Neurosci* 2003, **23**:1026-1040.
42. Yashpal K, Radhakrishnan V, Henry JL: **NMDA receptor antagonist blocks the facilitation of the tail flick reflex in the rat induced by intrathecal administration of substance P and by noxious cutaneous stimulation.** *Neurosci Lett* 1991, **128**:269-272.
43. Chung DW, Yoo KY, Hwang IK, Kim DW, Chung JY, Lee CH, Choi JH, Choi SY, Youn HY, Lee IS, Won MH: **Systemic Administration of Lipopolysaccharide Induces Cyclooxygenase-2 Immunoreactivity in Endothelium and Increases Microglia in the Mouse Hippocampus.** *Cell Mol Neurobiol* 2010, **30**(4):531-41.
44. Dheen ST, Kaur C, Ling EA: **Microglial activation and its implications in the brain diseases.** *Curr Med Chem* 2007, **14**:1189-1197.
45. Yerneni KK, Bai W, Khan BV, Medford RM, Natarajan R: **Hyperglycemia-induced activation of nuclear transcription factor kappaB in vascular smooth muscle cells.** *Diabetes* 1999, **48**:855-864.
46. El Midaoui A, Ongali B, Petcu M, Rodi D, de Champlain J, Neugebauer W, Couture R: **Increases of spinal kinin receptor binding sites in two rat models of insulin resistance.** *Peptides* 2005, **26**:1323-1330.
47. Yao J, Keri JE, Taffs RE, Colton CA: **Characterization of interleukin-1 production by microglia in culture.** *Brain Res* 1992, **591**:88-93.
48. Magnus T, Chan A, Savill J, Toyka KV, Gold R: **Phagocytotic removal of apoptotic, inflammatory lymphocytes in the central nervous system by microglia and its functional implications.** *J Neuroimmunol* 2002, **130**:1-9.
49. Block ML: **NADPH oxidase as a therapeutic target in Alzheimer's disease.** *BMC Neurosci* 2008, **9**(Suppl 2):S8.
50. Talbot S, Dias JP, Couture R: **Induction of Kinin B1 receptor by stimulation of TRPV1: Molecular and Pharmacological Evidence.** . 38th Annual Meeting of the Society for Neuroscience. Poster 468; 14-18 November 2008, Washington DC, USA
51. Morrow TJ: **Animal models of painful diabetic neuropathy: the STZ rat model.** *Curr Protoc Neurosci* 2004, **Chapter 9**:Unit 9 18
52. Wen YR, Suter MR, Ji RR, Yeh GC, Wu YS, Wang KC, Kohno T, Sun WZ, Wang CC: **Activation of p38 mitogen-activated protein kinase in spinal microglia contributes to incision-induced mechanical allodynia.** *Anesthesiology* 2009, **110**:155-165.
53. Hua XY, Svensson CI, Matsui T, Fitzsimmons B, Yaksh TL, Webb M: **Intrathecal minocycline attenuates peripheral inflammation-induced hyperalgesia by inhibiting p38 MAPK in spinal microglia.** *Eur J Neurosci* 2005, **22**:2431-2440.
54. Ledebouer A, Sloane EM, Milligan ED, Frank MG, Mahony JH, Maier SF, Watkins LR: **Minocycline attenuates mechanical allodynia and proinflammatory cytokine expression in rat models of pain facilitation.** *Pain* 2005, **115**:71-83.
55. Lin CS, Tsaur ML, Chen CC, Wang TY, Lin CF, Lai YL, Hsu TC, Pan YY, Yang CH, Cheng JK: **Chronic intrathecal infusion of minocycline prevents the development of spinal-nerve ligation-induced pain in rats.** *Reg Anesth Pain Med* 2007, **32**:209-216.
56. Mika J, Osikowicz M, Makuch W, Przewlocka B: **Minocycline and pentoxifylline attenuate allodynia and hyperalgesia and potentiate the effects of morphine in rat and mouse models of neuropathic pain.** *Eur J Pharmacol* 2007, **560**:142-149.
57. Milligan ED, O'Connor KA, Nguyen KT, Armstrong CB, Twining C, Gaykema RP, Holguin A, Martin D, Maier SF, Watkins LR: **Intrathecal HIV-1 envelope glycoprotein gp120 induces enhanced pain states mediated by spinal cord proinflammatory cytokines.** *J Neurosci* 2001, **21**:2808-2819.
58. Inoue K, Tsuda M: **Microglia and neuropathic pain.** *Glia* 2009, **57**:1469-1479.
59. Sun XC, Li WB, Li SQ, Li QJ, Chen XL, Ai J: **[Intrathecal injection of Sar9, Met(O2)11-substance P, neurokinin-1 receptor agonist, increases nitric oxide synthase expression and nitric oxide production in the rat spinal cord].** *Sheng Li Xue Bao* 2003, **55**:677-683.
60. Radhakrishnan V, Yashpal K, Hui-Chan CW, Henry JL: **Implication of a nitric oxide synthase mechanism in the action of substance P: L-NAME blocks thermal hyperalgesia induced by endogenous and exogenous substance P in the rat.** *Eur J Neurosci* 1995, **7**:1920-1925.
61. Racz I, Nadal X, Alferink J, Banos JE, Rehnelt J, Martin M, Pintado B, Gutierrez-Adan A, Sanguino E, Bellora N, et al.: **Interferon-gamma is a critical modulator of CB(2) cannabinoid receptor signaling during neuropathic pain.** *J Neurosci* 2008, **28**:12136-12145.
62. Marriott I: **The role of tachykinins in central nervous system inflammatory responses.** *Front Biosci* 2004, **9**:2153-2165.
63. Takeuchi H, Jin S, Suzuki H, Doi Y, Liang J, Kawanokuchi J, Mizuno T, Sawada M, Suzumura A: **Blockade of microglial glutamate release protects against ischemic brain injury.** *Exp Neurol* 2008, **214**:144-146.
64. Zuccollo A, Navarro M, Catanzaro O: **Effects of B1 and B2 kinin receptor antagonists in diabetic mice.** *Can J Physiol Pharmacol* 1996, **74**:586-589.
65. Zuccollo A, Navarro M, Frontera M, Cueva F, Carattino M, Catanzaro OL: **The involvement of kallikrein-kinin system in diabetes type I (insulinitis).** *Immunopharmacology* 1999, **45**:69-74.

doi: 10.1186/1742-2094-7-36

Cite this article as: Talbot et al., Key role for spinal dorsal horn microglial kinin B1 receptor in early diabetic pain neuropathy *Journal of Neuroinflammation* 2010, **7**:36

Accord journal

Dear Mr. Talbot,

Copyrights to articles published in Journal of Neuroinflammation are held by the authors, not by the journal or the publisher. For more information, please see <http://www.biomedcentral.com/about/license>.

Robert Mrak

Editor-in-Chief

Dear,

I would need your permission (copyright) to include in my doctoral thesis the following paper that we published in your journal:

Talbot Sébastien, Chahmi E, Pena Dias J and Couture R. Key role for spinal dorsal horn microglial kinin B1 receptor in early diabetic pain neuropathy. *J Neuroinflammation*. 2010. Jun 29;7(1):36. PMID: 20587056.

All the best,

Sébastien Talbot

Université de Montréal

10.0. ARTICLE 3

10.1. Problématique

Les deux premiers articles joints à cette thèse présentent le rôle clé des cellules de la microglie dans l'activité pro-nociceptive du B1R chez le rat diabétique de type 1.

10.2. Objectif

Revoir et synthétiser la littérature concernant le rôle émergent de la microglie et du récepteur B1 dans l'induction des neuropathies diabétiques.

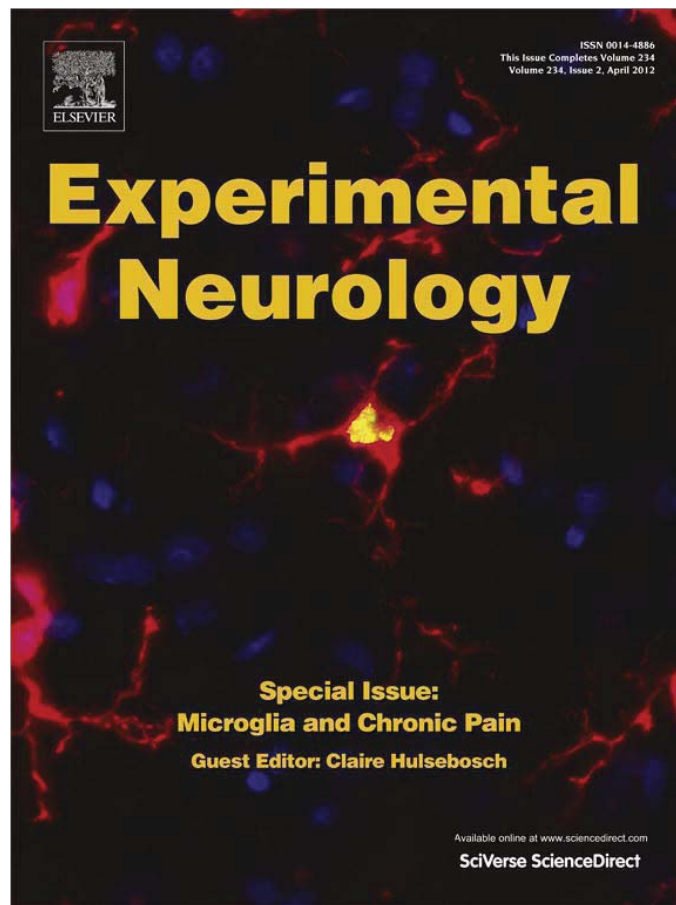
10.3. Contribution

ST a réalisé la revue de la littérature et a écrit la première version du manuscrit. RC a écrit la version finale du manuscrit.

10.4. Référence

Talbot Sébastien and Couture R. Emerging role of microglial kinin B1 receptor in diabetic pain neuropathy. *Exp Neurology*. **2012**. Apr;234(2):373-81. PMID: 22154922.

Provided for non-commercial research and education use.
Not for reproduction, distribution or commercial use.



This article appeared in a journal published by Elsevier. The attached copy is furnished to the author for internal non-commercial research and education use, including for instruction at the authors institution and sharing with colleagues.

Other uses, including reproduction and distribution, or selling or licensing copies, or posting to personal, institutional or third party websites are prohibited.

In most cases authors are permitted to post their version of the article (e.g. in Word or Tex form) to their personal website or institutional repository. Authors requiring further information regarding Elsevier's archiving and manuscript policies are encouraged to visit:

<http://www.elsevier.com/copyright>



Emerging role of microglial kinin B1 receptor in diabetic pain neuropathy

Sébastien Talbot, Réjean Couture

ARTICLE INFO

Article history:

Received 29 June 2011

Revised 1 November 2011

Accepted 22 November 2011

Available online 6 December 2011

ABSTRACT

Nowadays diabetes mellitus has reached epidemic level and is considered as the primary cause of foot amputation and pain neuropathy. The classical theories explaining the development of diabetic pain neuropathy include the imbalance of neuronal biochemical pathways (Polyol pathway, Na^+/K^+ ATPase pump, AGE, ROS) and microangiopathy which promote nerve fibers depolarization, sensitization, ectopic discharges, demyelination and ultimately neuronal death. However, the current pharmacotherapy targeting those pathways brings variable, not always satisfactory and temporal relief in patients experiencing diabetic pain neuropathy. Interestingly, recent research in animal models yielded compelling evidence that glial cells, mainly microglia, play a critical role in the mediation of diabetic pain facilitation mechanisms. Preventing microglia activation could therefore be considered as a potential therapeutic target. The lack of specific agents inhibiting microglia activity remains, however, a major obstacle for further treatment in diabetic patients. An alternative and new strategy would be the targeting of key mediators involved in microglia activation, migration and the subsequent release of pro-inflammatory substances contributing to neuronal hyperexcitability. The present review summarizes recent evidence that the kinin B1 receptor (B1R) may represent such a target of potential value for new medicines in the treatment of chronic pain. A few selective B1R antagonists have been fully characterized in animal models although small molecules orally active are urgently needed for targeting human B1R on CNS microglia. Thus far, the pharmacological blockade of kinin B1R in various animal paradigms or its genetic deletion in B1R knock-out mice failed to cause unwanted side effects, making this approach feasible. This is consistent with the highly inducible feature of this atypical G-protein coupled receptor whose expression can be seen as the alarming signature of immune and inflammatory diseases, notably diabetes mellitus.

© 2011 Elsevier Inc. All rights reserved.

Abbreviations: AGE, Advanced glycation end product; AMPA-R, α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid receptor; ATP, Adenosine-5'-triphosphate; B1R, Kinin B1 receptor; B2R, Kinin B2 receptor; BDNF, Brain derived neurotrophic factor; BK, Bradykinin; CCL2, Chemokine (C-C motif) ligand 2; CCL3, Chemokine (C-C motif) ligand 3; CCL5, Chemokine (C-C motif) ligand 5; CCL21, Chemokine (C-C motif) ligand 21; CD4, Cluster differentiation 4; CD14, Cluster differentiation 14; CFA, Complete Freund's adjuvant; CNS, Central nervous system; CR3, Complement receptor 3; CX3CL1, Chemokine (C-X3-C motif) ligand 1; CX3CR1, Chemokine (C-X3-C motif) receptor 1; CXCL12, Chemokine (C-X3-C motif) ligand 12; Des-Arg⁹-BK, des-Arginine⁹-bradykinin; DPN, Diabetic pain neuropathy; EAA, Excitatory amino acid; ERK, Extracellular signal-regulated kinases; GABA, Gamma-aminobutyric acid; IL-1 β , Interleukin-1 beta; IL-6, Interleukin-6; iNOS, Inducible nitric oxide; IP₃, Inositol-3-phosphate; IP-10, Interferon gamma-induced protein 10; LPS, Bacterial lipopolysaccharide; Lys-des-Arg⁹-BK, Lysine-des-Arginine⁹-bradykinin; MAPK, Mitogen-activated protein kinase; MHC2, Major histocompatibility complex 2; MMP2, Metalloproteinase 2; MMP9, Metalloproteinase 9; Na^+/K^+ ATPase, Sodium/potassium ATPase pump; NADPH oxidase, Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase; NF- κ B, Nuclear factor κ B; NGF, Nerve growth factor; NMDA, N-Methyl-D-aspartic acid; NO, Nitric oxide; PKC, Protein kinase C; PG, Prostaglandin; PGE₂, Prostaglandin E₂; ROS, Reactive oxygen species; SDF-1, Stromal cell-derived factor 1; SP, Substance P; STZ, Streptozotocin; TLR2, Toll-like receptor 2; TLR4, Toll-like receptor 4; TRPV1, Transient receptor potential vanilloid 1; TNF- α , Tumor necrosis factor-alpha.

Introduction

Painful sensation is conveyed from peripheral nociceptors to the spinal dorsal horn by primary sensory afferents, notably small myelinated A-delta fibers (fast pain transmission) and unmyelinated C-fibers (slow pain transmission) (Tesfaye and Kempler, 2005). Acute pain refers to a basic physiological defensive mechanism which intends to warn individual from excessive tissue damage and is consequently essential for healing and survival (Scholz and Woolf, 2002). However, pain can also be present in a chronic, debilitating form (Scholz and Woolf, 2002). Chronic pain serves no defensive physiological needs, and is characterized by its persistence even following the disappearance of the causal-stimulus or is generated by normally innocuous stimuli (allodynia). Chronic pain is present following aberrant functioning or pathologically altered nervous system (Woolf and Salter, 2000). The most incapacitating type of chronic pain is neuropathic pain, which is particular in regards of the constancy and the severity of the symptoms and its resistance to existing pharmacological treatments (Woolf, 2004; Zimmermann, 2001). Neuropathic pain occurs generally following injury to peripheral nerves or CNS neuronal pathways following trauma, surgery, cancer, infection or diabetes (Scholz and Woolf, 2002; Tsuda et al., 2005;

Woolf, 2004). Diabetes mellitus is the leading cause of pain neuropathy worldwide. For the past two decades, attention has been focusing on investigating neuronal mechanisms of neuropathic pain. Therefore, drugs were designed to block abnormal neurotransmission in pain pathways, which brings variable and temporal relief (Ji and Suter, 2007). One possible explanation is that neuropathy is characterized by persistent inflammation as evidenced by the substantial amount of pro-oxidative substances and pro-inflammatory cytokines (IL-1 β , IL-6, TNF- α) (Pabreja et al., 2011) released in concert with other inflammatory mediators (BK, ATP, NGF, SP, NO, PGE₂) (Tsuda et al., 2005) which sensitize nociceptors and the signaling of P2X₄ (Tsuda et al., 2003), TRPV1 (Suri and Szallasi, 2008) and kinin B1 (Talbot et al., 2009) receptors expressed on primary sensory afferents and/or spinal dorsal horn microglia. Importantly and unlike classical neurotransmitters, these inflammatory molecules are largely produced by non-neuronal cells such as Schwann cells, keratinocytes, immune cells, and glial cells in the spinal cord (Marchand et al., 2005; Tsuda et al., 2005). Hence, it is becoming imperative to better identify the mechanisms underlying neuronal-glia interaction for the development of more effective therapeutic agents in the management and treatment of chronic neuropathic pain.

In this review, we analyze the emerging role of kinin B1 receptor (B1R) and other pro-inflammatory mediators, which modulate the activity of microglia and thereby neuronal excitability in chronic pain with particular emphasis on diabetic pain neuropathy (DPN).

Kinin receptors as key players in inflammation and pain

Kinin receptors are denoted as bradykinin B1 (B1R) and bradykinin B2 receptors (B2R) (Regoli et al., 1990). The preferential B2R agonists are bradykinin (BK) and Lys-BK while their metabolites, des-Arg⁹-BK and Lys-des-Arg⁹-BK, are the preferential agonists of B1R (Marceau and Regoli, 2004). Both kinin receptors are preferentially G α q/11 and G α i G-protein-coupled receptors (Calixto et al., 2004). The B2R is widely and constitutively expressed while the B1R displays a low level of expression in healthy tissues (Marceau and Regoli, 2004); it is upregulated after exposure to pro-inflammatory cytokines (IL-1 β , TNF- α) and by the oxidative stress in diabetes mellitus (Couture and Girolami, 2004; deBlois and Horlick, 2001; Dias et al., 2010; Ismael et al., 2008; Lungu et al., 2007; Marceau and Bachvarov, 1998). The induction of the B1R is mostly triggered by mitogen-activated protein kinase (MAPK) pathway and by the transcriptional nuclear factor kappa B (NF- κ B) (Campos et al., 1999; Ni et al., 1998; Schanstra et al., 1998; Zhou et al., 1998). Thus, the induction of B1R in diabetes mellitus can also be triggered by hyperglycemia which promotes NF- κ B nuclear transcription (Chen et al., 2003).

The amino acid sequence of the human B1R (353 amino acids) is only 36% identical to that of the human B2R (364 amino acids) (Menke et al., 1994), while the homology is only 30% between these two receptors in mice (366 amino acids for B2R and 334 amino acids for B1R) (Menke et al., 1994; Pesquero et al., 1996). Also the existence of interspecies kinin B1R and B2R subtypes has been proposed, based on discriminating agonists and antagonists in bioassays. B2R in rat and guinea-pig tissues belong to a similar pharmacological entity, a receptor which is different from that mediating the responses of rabbit and human tissues (Regoli et al., 1994). Also, the human, rabbit and pig B1R subtype is pharmacologically different from the rat, mouse and hamster B1R subtype (Regoli et al., 1994; Regoli et al., 2001). Affinities of agonists and antagonists in some species (human, rabbit, pig) are significantly increased (at least 10-fold) by the presence of a Lys at their N-terminus (Regoli et al., 2001; Hess et al., 2001). These interspecies differences for B1R and B2R must be taken into account in the design of new compounds and their assessment in biological systems or cultured cell models.

The kinin B2R mediates the acute phase of inflammation and pain (Tonussi and Ferreira, 1997; Walker et al., 1996), through the

liberation of pro-nociceptive and inflammatory substances (Calixto et al., 2000). This is consistent with the rapid internalization and desensitization of B2R after agonist stimulation (Bachvarov et al., 2001; Leeb-Lundberg et al., 2005). Contrarily, the B1R is thought to mediate the chronic phase of pain and inflammation (Couture et al., 2001), as this inducible receptor is characterized by its insensitivity to receptor internalization and desensitization (Zhou et al., 2000). Moreover, B2R (Phagoo et al., 1999) or B1R (Phagoo et al., 2001) stimulation promotes B1R mRNA increases, translation and receptor membrane stabilization (Enquist et al., 2007). Of interest, kinin B1R knock-out mice (Pesquero et al., 2000) experience an absence or reduced pain hypersensitivity in models of nerve injury-induced neuropathic pain (Ferreira, et al., 2005), formalin (Ferreira, et al., 2002), complete Freund's adjuvant (Ferreira, et al., 2001) and in the model of diabetes induced by streptozotocin (Gabra, et al., 2005). Moreover, pharmacological studies support a role for B1R in mechanical and/or thermal hyperalgesia induced by chemical or exogenous inflammatory mediators such as cytokines (Cunha et al., 2007), formalin (Campos et al., 1995; Chichorro et al., 2004; Correa and Calixto, 1993), zymosan (Belichard et al., 2000), complete Freund's adjuvant (Fox et al., 2003; Perkins et al., 1993), PKC activation with phorbol myristate acetate (Ferreira et al., 2008) and lipopolysaccharide (Cunha et al., 2007). B1R is involved in pain sensitization after skin exposure to UV-B irradiation in human (Eisenbarth et al., 2004) and rat (Perkins et al., 1993). B1R blockade also reverses cancer-induced neuropathies in vincristine-treated rats (Bujalska and Makulska-Nowak, 2009), in murine pain models of skin cancer melanoma (Fujita et al., 2010) and of bone cancer (Sevcik et al., 2005). Beneficial effects of B1R antagonists are also shown in classical rodent models of neuropathic pain, including spinal nerve ligation (Werner et al., 2007), spinal cord contusion (Rajpal et al., 2007), peripheral nerve injury (Ferreira et al., 2005; Petcu et al., 2008; Rashid et al., 2004), brachial plexus avulsion (Quintao et al., 2008) and infraorbital nerve constriction injury (Luiz et al., 2010).

Diabetes as the leading cause of pain neuropathy

The definition used to describe diabetic neuropathy is: «the presence of symptoms and/or signs of peripheral nerve dysfunction in people with diabetes after exclusion of other causes» (Crofford, 1995). Diabetic neuropathy is considered as a major cause of mortality and morbidity in the diabetic population and the most common cause of pain neuropathy (Boulton et al., 2004; Obrosova, 2009; Tesfaye and Kempler, 2005; Ziegler, 2008). Diabetes is also the first cause of foot ulcer and amputation due to gangrene resulting from microangiopathy and nerve fiber loss (Molines et al., 2010). The prevalence of diabetic neuropathy is proportional to the duration of diabetes and is enhanced with improper control of blood glycemia (Kumar, et al., 2005). Therefore, 10% of the diabetic population diagnosed for less than one year suffers of neuropathy while this number increases to up to 50% of the diabetic population diagnosed for more than 25 years. It is generally accepted that 30% of the diabetic population suffers from diabetic neuropathy (Guastella and Mick, 2009). Under classical treatments, 77% of the patients reported persistent pain over 5 years (Daousi et al., 2006; Ziegler, 2009). Most often symptoms include paresthesia, numbness and burning (Schemmel et al., 2010). Diabetic neuropathy can also affect the autonomic nervous system and therefore affects most systems and organs (Kumar, et al., 2005). Afferent (sensory) and efferent (autonomic) nerves are not uniformly affected, partly explaining the wide range of symptoms associated with diabetic neuropathy (Levy et al., 1992). Some patients affected with diabetic neuropathy are asymptomatic but most of them report pain and/or loss of sensory function from distal regions such as toes, feet, fingers, hands or arms (Ziegler, 2008). Clinical diagnosis of diabetic neuropathy is based on a medical exam using electrophysiology and electromyography to assess the level of nerve conduction and

muscle response to electric stimulation (Guastella and Mick, 2009; Kumar et al., 2005). Moreover, blood glycemia, arterial blood pressure, heart rate, muscle forces, reflex quality and sensibility to spatio-temporal changes can be used to indirectly help physicians in their diagnosis of diabetic neuropathy (Guastella and Mick, 2009).

The exact factors and mechanisms involved in the onset of DPN remain to be identified. DPN has been, however, associated with poor glycemic control, diabetes duration and severity, hypertension, age, smoking, hypoinsulinemia and dyslipidemia (Ziegler et al., 2008). It is generally accepted that the development of DPN has multifactorial origins related to biochemical pathway imbalance promoting impairment of autonomic and sensory nerve conduction velocity and structural changes in peripheral nerves including endoneurial microangiopathy, axonal degeneration, Schwann cell pathology-induced demyelization (Said, 2007) and loss of myelinated and unmyelinated fibers (Fernyhough and Calcutt, 2010). When fibers undergo active degeneration or impaired regeneration, they become susceptible to generating ectopic discharges which induce pain-‘positive’ symptoms, by opposition to fiber loss which promotes ‘negative’ symptoms associated with sensory loss and ultimately to the diabetic-foot syndrome (Yagihashi et al., 2007). Principal theories (Brownlee, 2001; Brownlee, 2005) for the development of the symmetric form of DPN include imbalance of polyol pathway (Oates, 2002), imbalance of Na⁺/K⁺ ATPase activity (Gerbi et al., 1998; Raccach, 1998; Vague et al., 1997), AGE formation (Brownlee, 2005; Sugimoto et al., 2008), oxidative stress generation (Nishikawa et al., 2000; Pop-Busui et al., 2006), nitric oxide formation (Zochodne and Levy, 2005), microangiopathy (Yasuda et al., 2003) and central sensitization (Fischer and Waxman, 2010).

Animal models of diabetic pain neuropathy and the link with kinin B1R

Inhibition of kinin B1R and/or microgliosis may provide a novel strategic approach in the treatment of diabetic pain neuropathy (Daulhac et al., 2006; Daulhac et al., 2011; Talbot et al., 2010). Although no human studies have yet been reported to confirm this hypothesis, recent pre-clinical studies on animal models (mice and rats) deserve to be summarized hereafter.

Models of type 1 diabetes

Mice and rats treated with streptozotocin (STZ) have been the most commonly used model for studying diabetic pain neuropathy (402 papers) and its relation with microgliosis and kinin B1R (Daulhac et al., 2006; Daulhac et al., 2011; Pabreja et al., 2011; Talbot et al., 2010; Toth, et al., 2010; Tsuda et al., 2008; Wodarski et al., 2009). STZ is a glucosamine–nitrosourea compound which is toxic to the insulin-producing β cells of the pancreas in mammals and its administration is known to trigger type 1 diabetes onset within a few days. Because of its structural similarity to glucose, STZ is selectively transported into β cells by the glucose transporter GLUT2 (Wang and Gleichmann, 1998). STZ-diabetic mice display significant mechanical allodynia and thermal hyperalgesia from 9 to 20–25 weeks post-treatment and thereafter, they display, to some extent, mechanical and thermal hypoalgesia due to sensory fiber loss resulting from microangiopathy, calcium cytotoxicity and sustained increased oxidative stress (Toth et al., 2010). Sensory nerve conduction velocity decreases over-time to become highly significant after 2 months, reaching lowest velocity value at 8 months post-STZ (Toth et al., 2010). Over 20 papers, using kinin B1R knockout mice and antagonists undoubtedly demonstrated that B1R blockade or its genetic deletion reverses STZ-induced neuropathic pain (Gabra and Sirois, 2002; Gabra et al., 2005). Systemic injection of B1R agonist, des-Arg⁹-bradykinin (200–600 μ g/kg, i.p.) enhances STZ-induced thermal hyperalgesia, an effect prevented by acute administration of

two selective peptide B1R antagonists, R-715 (1.6–2.4 mg/kg, i.p.) and R-954 (0.8–1.6 mg/kg, i.p.). Also acute treatments with these antagonists reverse STZ-induced thermal hyperalgesia in mice (Gabra and Sirois, 2002; Gabra and Sirois, 2003). The enhancing effect of intrathecally injected B1R agonist on thermal hyperalgesia involves the release of NO, prostaglandins (COX-2) and SP in the spinal cord of STZ-diabetic rats (Couture et al., 2001). Finally, tactile and cold allodynia are transiently reversed from 3 to 6 h post-treatment with the non-peptide B1R antagonist SSR240612 (10 mg/kg, p.o.) and R-715 (10 mg/kg, i.p.) in STZ-diabetic rats. Either antagonist provide more rapid and shorter inhibition of allodynia (1–3 h) when administrated intrathecally (Talbot et al., 2010).

The non-obese diabetic (NOD) mouse is a genetic model that closely resembles the human type 1 diabetes, involving CD4⁺ and CD8⁺ T cell-dependent autoimmune destruction of pancreatic β cells (Serreze and Leiter, 1994). NOD mice develop inflammation of pancreatic islets (insulinitis) at 3 weeks of age, but do not develop diabetes before 10 weeks (Delovitch and Singh, 1997). Interestingly, diabetes occurs earlier and more often in female (70% of incidence) than in male (20% of incidence) (Fitzpatrick et al., 1991). Only 1 paper studied the presence of DPN in NOD. The authors (Gabra and Sirois, 2005) showed that NOD mice display thermal hyperalgesia from 8 weeks, being maximal over 16 to 20 weeks, an effect maintained up to 32 weeks (the last end point tested). Importantly, thermal hyperalgesia is reversed by acute and chronic administration of B1R antagonists, R-715 (400 μ g/kg, i.p.) and R-954 (200 μ g/kg, i.p.). The presence of allodynia and microgliosis has not been investigated in NOD mice.

Models of type 2 diabetes

The Zucker fatty rat represents a genetic model of type 2 diabetes induced by the recessive mutation of leptin receptor (fa/fa) promoting the onset of obesity and insulin resistance. Obese Zucker rats display high blood levels of lipids and cholesterol, resistance to insulin (10 weeks), hyperglycemia (beginning at 9–10 weeks and reaching plasma glucose concentration of 28.4 mmol/L at 20 weeks) (Piercy et al., 1999) and weight gain translating an increase in both the size and number of fat cells. This model of diabetes has been poorly used for studying diabetic pain neuropathy (only 17 papers). Roane and Porter (Roane and Porter, 1986) were the first to report a lower threshold in tail-flick responses to pinching and heat in Zucker fatty rats. Piercy et al., (1999) found thermal hyperalgesia in Zucker fatty rats at 3 weeks but no mechanical hyperalgesia (up to 10 weeks). Romanovsky et al., (2008) showed significantly lower pressure pain threshold in hind limb, beginning at 9 weeks. In conclusion, Zucker fatty rats display thermal hyperalgesia but the presence of mechanical hyperalgesia is still conflicting. Thus far, no study has yet documented the role of microgliosis or kinin B1R in this model.

Db/db mice is a genetic model of type 2 diabetes. These mice are homozygous for the diabetes spontaneous mutation (Lepr^{db}) and they become obese at approximately 3 weeks. Elevations of plasma insulin begin at 10 to 14 days and elevations of blood sugar at 4 to 8 weeks. Homozygous mutant mice are polyphagic, polydipsic, and polyuric. Uncontrolled blood sugar and severe depletion of pancreatic insulin-producing β cells trigger their death at 10 months. These mice are known to display peripheral neuropathy (35 papers), but no study has been reported on DPN mechanism in relation to kinin B1R expression. Db/db mice show mechanical allodynia from 6 to 16 weeks, while at 21 weeks they begin to display hypoalgesia (Cheng et al., 2009). Interestingly, db/db-induced tactile allodynia is prevented by intrathecally administrated 1- α -aminoadipate (astrocyte specific inhibitor) whereas minocycline (microglial specific inhibitor) does not affect mechanical allodynia, indicating that spinal astrocyte activation contributes to allodynia in db/db mice (Liao

et al., 2011). No study reported on the presence of thermal hyperalgesia in db/db mice.

Mice homozygous for the obese spontaneous mutation (*Lep^{ob}* commonly referred as *ob/ob*) exhibit obesity, hyperphagia, hyperglycemia, glucose intolerance, elevated plasma insulin, lower fertility, impaired wound healing and increase production of pituitary and adrenal gland hormones. They are also hypometabolic and hypothermic. Their obesity is characterized by an increase in both the number and the size of adipocytes. As with mice carrying the diabetes mutation (*Lepr^{db}*), manifestation of the diabetic syndrome is strikingly dependent on genetic background. Hyperglycemia is only transient (subsiding at around 14 to 16 weeks) in the C57BL/6 background while the same mutation in the C57BLKS background yields severe diabetes with regression of islets and early death. Three studies have assessed diabetic sensory neuropathies in *ob/ob* mice: at the age of 8 weeks, they display thermal hypoalgesia in hot plate test and tactile allodynia as assessed by Von Frey filaments (Vareniuk et al., 2007). However, Latham (Latham et al., 2009) found that, in comparison to lean mice, *ob/ob* mice display mechanical allodynia and thermal hyperalgesia from 6 to 20 weeks. Maeda et al. (2009) found similar results. The presence or not of thermal hyperalgesia/hypoalgesia is still conflicting and the possible contribution of microgliosis and kinin B1R to diabetic pain neuropathy has not been investigated in this model.

An experimental model of insulin resistance was developed in rats chronically fed with glucose (El Midaoui and de Champlain, 2002). High glucose intake (10% of D-glucose in drinking water) for periods of 4, 16 and 20 weeks causes mild hyperglycemia, hyperinsulinemia and insulin resistance which is associated with increased vascular levels of ROS, hypertension and both tactile and cold allodynia (Dias et al., 2007; Dias et al., 2010; Lungu et al., 2007). This nutritional model of insulin resistance, however, does not exhibit thermal hyperalgesia (Lungu et al., 2007). Acute B1R inhibition with brain penetrant non-peptide B1R antagonists (SSR240612, LF22-0542) or with the peripherally acting peptide B1R antagonist (R-715) reverses dose-dependently cold and tactile allodynia in glucose-fed rats (Dias et al., 2007; Lungu et al., 2007). Chronic blockade of B1R with SSR240612 (10 mg/kg/day for 7 days, p.o.) causes a persistent inhibition of tactile and cold allodynia together with the suppression of B1R expression and vascular oxidative stress in this model (Dias et al., 2010). The inhibition of oxidative stress with antioxidant diets also prevents the occurrence of allodynia and B1R upregulation in glucose-fed rats (Ismael et al., 2008; Lungu et al., 2007). Reciprocally, B1R activation both *in vivo* and *in vitro* with an agonist enhances the production of superoxide anion through NADPH oxidase, suggesting that B1R can amplify and perpetuate the oxidative stress via a positive feed-back loop (Dias et al., 2010). Collectively, these data strongly suggest that the beneficial effect of B1R antagonism in pain neuropathy associated to insulin resistance is due to inhibition of oxidative stress. Indeed, oxidative stress has been implicated in nerve degeneration and diabetic pain neuropathy (Nishikawa et al., 2000; Pop-Busui et al., 2006) and it is known to enhance the production of pro-inflammatory and pro-nociceptive mediators through the NF- κ B pathway (Romagnoli et al., 2010). Conversely, tactile allodynia as a symptom of peripheral neuropathy is not present in the model of insulin resistance induced by chronic fructose feeding (Patel et al., 2009).

To summarize this section, STZ-diabetic rats and mice have been the most characterized model for studying DPN. It is the only model presenting clear sensory abnormalities that mimic human neuropathy onset, such as tactile and cold allodynia, early phase of thermal hyperalgesia and late phase of hypoalgesia. Moreover, the contribution of kinin B1R and microgliosis in onset/maintenance of DPN is clearly demonstrated (further discussed in later sections). One limitation with this model, however, is that it represents probably only 10% of the diabetic population (type 1) and is highly associated with inflammation and severe hyperglycemia contrarily to type 2 diabetes

(representing 90% of the diabetic population). Thus, the glucose-fed rat may represent a relevant model for studying the contribution of microglia and kinin B1R in neuropathic pain more closely associated with type 2 diabetes.

Microglia classification and functions

Recent multidisciplinary studies provide compelling evidence that considering only neuronal activity impairment as the main contributor of chronic neuropathic pain is highly reductionist and therefore further emphasis on the excitatory role of glial cells is mandatory (Scholz and Woolf, 2007; Tsuda et al., 2005). Indeed, glial cells greatly outnumber neurons in the CNS and their activation seems to mediate pathological pain in various paradigms (e.g. diabetic neuropathy, chemotherapy-induced neuropathy, neuropathy induced by peripheral nerve trauma or spinal cord injury) (Milligan and Watkins, 2009; Watkins et al., 2006). Microglia represent 5–10% of CNS glial cells that are acting as resident macrophage-related cells in the CNS and as a first line of defense against pathogen invasion by generating innate immune responses through recognizing, sequestering and processing antigens (Gosselin et al., 2010). These glial cells are classified in two major populations, namely resident and perivascular microglial cells (Hickey and Kimura, 1988). Resident microglia are bone marrow-derived hematopoietic cells which invade the CNS during embryonic development (Milligan and Watkins, 2009) and are never replaced, but they show rapid proliferation following their activation (Romero-Sandoval et al., 2008). Conversely, perivascular microglia are continuously replenished by bone marrow-derived hematopoietic precursors (Hickey and Kimura, 1988), particularly during CNS inflammation (Lassmann et al., 1993). The exact role of each subpopulation of microglia in the healthy and injured CNS remains unsettled. Perivascular microglia can alter blood–brain barrier and exert an anti-inflammatory effect while resident microglia are known to exert both inflammatory and anti-inflammatory effects (Romero-Sandoval et al., 2008). Both types of microglia express most of the pro-inflammatory neurotransmitter receptors (Pocock and Kettenmann, 2007). Furthermore, microglia are present in two forms, namely resting and activated (Tsuda et al., 2005). Resting microglial cells possess small soma with thin and ramified processes; they express receptors of pro-inflammatory mediators (Gosselin et al., 2010) and play an immune role to keep CNS homeostasis (Tsuda et al., 2005). Upon activation, either by trauma, inflammation or infection, microglial cells undergo several stereotypic changes in morphology, gene expression, function and number (Tsuda et al., 2005). Briefly, microglia soma increases in size while long and thin ramifications withdraw until they adopt an amoeboid shape with few ramifications (Tsuda et al., 2005). Inflammation signals microglia to migrate, proliferate and to synthesis/release pro-inflammatory mediators which can activate nearby astrocytes, microglia and neurons. They also upregulate the complement receptor 3 (CR3) (Eriksson et al., 1993), major histocompatibility complex 2 (MHC2) (Sweitzer et al., 2002), toll-like receptor 4 (TLR4) (Tanga et al., 2004), cluster differentiation 14 (CD14) (Tanga et al., 2004) and cluster differentiation 4 (CD4) (Sweitzer et al., 2002). Among other modifications, these new characteristics implicate microglia in onset of diseases chronically, including pain facilitation (Chang et al., 2010; Marchand et al., 2005; Tsuda et al., 2005; Watkins et al., 2001a, 2001b). Supporting this, intrathecal injection of *in vitro* activated microglia triggers thermal hyperalgesia and tactile allodynia (Narita et al., 2006; Tsuda et al., 2003), while injection of resting microglia or activated astrocytes is without effect (Narita et al., 2006).

Mediators promoting microglia activation

Glial cells are activated following exposure to substance P (Zhou et al., 2010), CCL-2 (Thacker et al., 2009; Zhang and De Koninck,

2006), MMP9 (Kawasaki et al., 2008), BDNF (Tender et al., 2010), inflammatory endogenous signals (IL-1 β , TNF- α , IL-6 and NO), opioids (Hutchinson et al., 2008) and heat shock protein (Costigan et al., 1998) or following the activation of kinin B1R (Noda et al., 2007), p38 MAPK (Chang et al., 2010; Ji et al., 2009; Jin et al., 2003; Tsuda et al., 2004), P2X₄ receptor (Inoue, 2006, 2008), CX3CR-1 (Abbadie et al., 2009; Gao and Ji, 2010; Milligan et al., 2008), TLR2 (Kim et al., 2007) and TLR4 (Tanga et al., 2005). Note that selective blockade of p38 MAPK (Jin et al., 2003; Tsuda et al., 2004), CX3CR-1 (Milligan et al., 2004; Sun et al., 2007; Verge et al., 2004) or ATP P2X₄ receptor (Tsuda et al., 2003) shows a beneficial effect in chronic pain. Other chemokines such as RANTES, IP-10 and SDF1 are also implicated in microglia migration, infiltration, phagocytosis and therefore are contributors of microglia-induced neuropathic pain (White et al., 2007).

Activated microglia adopt a pro-inflammatory and pro-nociceptive genotype

Following activation and phenotype changes, microglia also adopt genotypic changes (Tsuda et al., 2005). ATP-stimulated microglial-P2X₄ receptor enhances intracellular Ca²⁺ levels leading to activation of NF- κ B, p38 and ERK MAPK (Tsuda et al., 2005) and the synthesis of classical pro-inflammatory cytokines (IL-1 β , TNF- α and IL-6) (Marchand et al., 2005; Watkins et al., 2001) or neuroexcitatory amino acids (Petrenko et al., 2003). These mediators can increase neuronal excitability (Beattie et al., 2002) and synaptic transmission (Stellwagen and Malenka, 2006) by increasing the conductivity and expression level of neuronal AMPA and NMDA receptors. IL-1 β enhances NMDA receptor NR-1 subunit phosphorylation (Zhang et al., 2008) and NMDA receptor-mediated intracellular calcium increase through activation of the Src family of kinases (Viviani et al., 2003). Because microglia express selective receptors of pain mediators (PGE₂, SP, EAA and ATP), which are also released from microglia, the existence of autocrine positive feed-back loops can further enhance glial activation (McMahon et al., 2005). ATP-stimulated microglial-P2X₄ receptor enhances BDNF and ATP release, disrupting interneuron GABAergic inhibitory signals in spinal cord (Torsney and MacDermott, 2005). Also, TNF- α and MMP trigger p38 MAPK activation in microglia of the spinal cord dorsal horn during peripheral neuropathic pain (Svensson et al., 2005). Interestingly, MMP9-induced pro-IL-1 β cleavage leads to p38 MAPK activation in microglia during the onset and early stages of neuropathic pain, whereas MMP2-induced pro-IL-1 β cleavage leads to astrocyte activation during the later stage of neuropathic pain (Kawasaki et al., 2008). Microglial-CX3CR1 activation, by exogenous fractalkine, triggers pain through IL-1 β and IL-6-release (Milligan et al., 2004; Milligan et al., 2005). Microglial NO (a diffusible transmitter) and PGE₂ can also increase excitability of pain-projection neurons (Besson, 1999).

This enhancing neuronal-glial interaction (Gao and Ji, 2010) leads to chronic neuron stimulation and sensitization (Scholz and Woolf, 2007) by either increasing glutamatergic stimulation or by reducing GABAergic inhibitory signals (Biggs et al., 2010; Tsuda et al., 2005). Thus, this new genetic expression profile of microglial cells is tightly implicated in the initiation and maintenance of neuropathic pain (Pocock and Kettenmann, 2007).

Activated microglia can contribute to diabetes pain neuropathy

Hyperglycemia activates microglia and stimulates IL-8 secretion via the generation of reactive oxygen species (ROS), PKC and NF- κ B pathways (Quan et al., 2007). Microglia are the major source of free radicals in spinal cord of DPN animals (Candelario-Jalil et al., 2007). In DPN, overactivation of iNOS occurs in specific cell types such as keratinocyte, macrophage, leukocyte and microglia (Zochodne et al., 2000). Excess NO production by iNOS can react with superoxide anion to generate peroxynitrite, a highly harmful oxidative molecule,

particularly for oligodendrocytes (Li et al., 2005). Furthermore, activated microglia have the ability to phagocytose myelin (Mosley and Cuzner, 1996), which can be a potent mechanism for inducing/promoting neuropathy. Of relevance, microglia express AGE receptor (Thornalley, 1998) making them susceptible to stimulation by enhanced AGE production during hyperglycemia. Indeed, microglia AGE receptor stimulation promotes subsequent activation of intra- and inter-cellular signaling pathways and chemokines release (CCL3, CCL5 and CxCL12) which further promote activation and migration of microglia (Bianchi et al., 2011). Hence, stimulation of microglia can promote the release of numerous inflammatory mediators contributing to nerve hyperexcitability.

The first evidence relating microgliosis to the development of DPN was provided by Daulhac (Daulhac et al., 2006). This study showed that diabetes-induced mechanical hyperalgesia is correlated with an early increase in extracellular signal-regulated protein kinase (ERK), p38, and c-Jun N-terminal kinase (JNK) phosphorylation in STZ-diabetic rat dorsal root ganglion and spinal cord dorsal horn superficial laminae. Increased MAPK is found in neurons (NeuN stained cells) and microglia (OX-42 stained cells) but not in astrocytes (GFAP stained cells). A 7-day intrathecal administration of MAPK kinase, p38 and JNK inhibitors suppress STZ-induced mechanical hyperalgesia, while NMDA-R blockade reverses MAPK activation and DPN. Chronic intrathecal blockade of MEK (U0126) (an upstream kinase of ERK canonical pathway) or NMDA receptor (MK801) also reverses STZ-induced mechanical hyperalgesia and phosphorylation of the NMDA receptor NR1 subunit in neurons and microglia of spinal cord dorsal horn (Laminae I–VI) (Daulhac et al., 2011).

Tsuda et al. (2008) showed increased number of microglia (OX-42 and Iba-1 stained cells) and the presence of activated microglia (amoeboid shape) in the spinal cord lumbar dorsal horn of STZ-diabetic rats. Phosphorylation levels of ERK and an upstream kinase, Src-family kinase (SFK), are increased in microglia of STZ-treated rats and chronic blockade of ERK (U0126, 10 nmol, i.t., 7 days) reverses STZ-induced tactile allodynia. Another study showed tactile allodynia, increase microglia activation (increase Iba-1 staining), and decrease number of astrocytes (GFAP stained cells) in 4-week STZ-diabetic rats (Wodarski et al., 2009). In the latter study, Gabapentin (50 mg/kg), a blocker of the $\alpha_2\delta_1$ subunit of voltage-gated calcium channels, delivered orally twice a day for 5 days reverses STZ-induced tactile allodynia and Iba-1 increased levels without affecting GFAP staining, indicating that the anti-allodynic effect of Gabapentin is mediated by a reduction of spinal microglial activation. Similarly, tactile allodynia and thermal hyperalgesia are associated with microglial density increases and elevation of phosphorylated p38 MAPK, a marker of microglial activation, in dorsal spinal cord and in thalamic nuclei of STZ-diabetic mice. In this model, inhibition of spinal microglial activation with cannabinoid CB1 and CB2 agonists limited development of DPN (Toth et al., 2010).

Involvement of B1R-induced activation of microglia in diabetes pain neuropathy

The activation of B1R in cultured microglia promotes microglia motility and chemotaxis, implicating PKC, phosphoinositide 3-kinase and the reverse mode Na⁺/Ca²⁺ exchanger and Ca²⁺-dependent K⁺ currents (Ifuku et al., 2007). B1R could contribute to migration and accumulation of microglia around CNS lesion sites (Ifuku et al., 2007) and to LPS-enhanced microglial activation in the mouse hippocampus (Viana et al., 2010). B1R agonist was found to enhance by 10-fold the mRNA expression level of the microglial chemotactic factor CX3CL1 in rat lung slices exposed to an inflammatory stimulus (Talbot and Couture, unpublished data) using an established model of lung inflammation (Lin et al., 2010). In STZ-diabetic rat, the expression of B1R is enhanced in activated microglia of the spinal cord dorsal horn (Talbot et al., 2009). Inhibition of STZ-induced microglial

activation with selective inhibitors administered systemically (minocycline) or intrathecally (fluorocitrate) provided the first evidence suggesting a key role for microglial B1R in DPN (Talbot et al., 2010). In addition to inhibiting STZ-induced DPN and B1R agonist (des-Arg⁹-BK, i.t.)-induced thermal hyperalgesia and enhanced tactile allodynia, microglial inhibitors normalize the expression levels of B1R and pro-inflammatory cytokines (IL-1 β and TNF- α) in the spinal cord. Likewise, intrathecal and systemic treatments with B1R antagonists (R-715 and SSR240612) reverse DPN. Hence, the upregulation of kinin B1R in spinal dorsal horn microglia by pro-inflammatory cytokines is proposed as a crucial mechanism in early pain neuropathy in STZ-diabetic rats. A recent study has confirmed the inhibitory effect of minocycline on STZ-induced cold allodynia and thermal hyperalgesia in parallel with the inhibition of the overproduction of IL-1 β , TNF- α , lipid peroxidation and nitrosative stress in the spinal cord (Pabreja, et al., 2011). These data suggest that minocycline reverses DPN by inhibition of neuroimmune activation of microglia and partly by reducing the inflammation induced by pro-inflammatory cytokines and by decreasing the oxidative stress in the spinal cord of diabetic rats.

Collectively, these findings highlight the impact of B1R stimulation on the activation and migration of microglia and also on microglia-mediated diabetic pain neuropathic states. Further studies are needed to evaluate the effect of B1R activation and inhibition on microglia proliferation level. Moreover, the putative role of B1R in the expression of CX3CL1 and other chemokines with respect to microglial migration and activation has to be confirmed in a classical model of diabetic pain neuropathy.

Conclusion

Compelling evidence in animal models suggests that glial cells, mainly microglia, play a critical role in the mediation of diabetic pain neuropathy. The key mediators involved in microglia activation, migration and subsequent release of pro-inflammatory substances contributing to neuronal hyperexcitability could therefore be considered as potential therapeutic targets. The kinin B1R may represent such a target of potential value for new medicines as exemplified in the model of STZ-induced diabetic pain neuropathy. A few selective and potent B1R antagonists have been fully characterized (Campos et al., 2006; Fincham et al., 2009; Marceau and Regoli, 2004), including the orally active non-peptide SSR240612 (Gougat et al., 2004), the water soluble non-peptide LF22-0542 (Porreca et al., 2006) and the pseudo-peptide R-954 which does not pass the blood–brain barrier (Neugebauer et al., 2002). However, small molecules orally active and devoid of liver toxicity (the primary side effect of SSR240612) still remain to be developed for targeting the human B1R on CNS microglia. The fact that the B1R is normally absent in physiological condition and induced in immune and inflammatory diseases, makes this receptor an attractive target.

Acknowledgments

This work was supported by Grant-in-aids from the Canadian Diabetes Association (OG-3-07-2428-RC) and Canadian Institutes of Health Research (CIHR) (MOP-79471). ST holds a Studentship Award from CIHR (Frederick Banting and Charles Best Canada Graduate Scholarships-Doctoral Award).

References

Abbadie, C., Bhangoo, S., De Koninck, Y., Malcangio, M., Melik-Parsadaniant, S., White, F.A., 2009. Chemokines and pain mechanisms. *Brain Res. Rev.* 60, 125–134.

Bachvarov, D.R., Houle, S., Bachvarova, M., Bouthillier, J., Adam, A., Marceau, F., 2001. Bradykinin B(2) receptor endocytosis, recycling, and down-regulation assessed using green fluorescent protein conjugates. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 297, 19–26.

Beattie, E.C., Stellwagen, D., Morishita, W., Bresnahan, J.C., Ha, B.K., Von Zastrow, M., Beattie, M.S., Malenka, R.C., 2002. Control of synaptic strength by glial TNF α . *Science* 295, 2282–2285.

Belichard, P., Landry, M., Faye, P., Bachvarov, D.R., Bouthillier, J., Pruneau, D., Marceau, F., 2000. Inflammatory hyperalgesia induced by zymosan in the plantar tissue of the rat: effect of kinin receptor antagonists. *Immunopharmacology* 46, 139–147.

Besson, J.M., 1999. The neurobiology of pain. *Lancet* 353, 1610–1615.

Bianchi, R., Kastrianaki, E., Giambanco, I., Donato, R., 2011. S100B protein stimulates microglia migration via RAGE-dependent up-regulation of chemokine expression and release. *J. Biol. Chem.* 286, 7214–7226.

Biggs, J.E., Lu, V.B., Stebbing, M.J., Balasubramanyan, S., Smith, P.A., 2010. Is BDNF sufficient for information transfer between microglia and dorsal horn neurons during the onset of central sensitization? *Mol. Pain* 6, 44.

Boulton, A.J., Kirsner, R.S., Vileikyte, L., 2004. Clinical practice. Neuropathic diabetic foot ulcers. *N. Engl. J. Med.* 351, 48–55.

Brownlee, M., 2001. Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. *Nature* 414, 813–820.

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

Bujalska, M., Makulska-Nowak, H., 2009. Bradykinin receptor antagonists and cyclooxygenase inhibitors in vincristine- and streptozotocin-induced hyperalgesia. *Pharmacol. Rep.* 61, 631–640.

Calixto, J.B., Cabrini, D.A., Ferreira, J., Campos, M.M., 2000. Kinins in pain and inflammation. *Pain* 87, 1–5.

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

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

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

Campos, M.M., Leal, P.C., Yunes, R.A., Calixto, J.B., 2006. Non-peptide antagonists for kinin B1 receptors: new insights into their therapeutic potential for the management of inflammation and pain. *Trends Pharmacol. Sci.* 27, 646–651.

Candelario-Jalil, E., de Oliveira, A.C., Graf, S., Bhatia, H.S., Hull, M., Munoz, E., Fiebich, B.L., 2007. Resveratrol potentially reduces prostaglandin E2 production and free radical formation in lipopolysaccharide-activated primary rat microglia. *J. Neuroinflammation* 4, 25.

Chang, Y.W., Tan, A., Saab, C., Waxman, S., 2010. Unilateral focal burn injury is followed by long-lasting bilateral allodynia and neuronal hyperexcitability in spinal cord dorsal horn. *J. Pain* 11, 119–130.

Chen, S., Khan, Z.A., Cukiernik, M., Chakrabarti, S., 2003. Differential activation of NF-kappa B and AP-1 in increased fibronectin synthesis in target organs of diabetic complications. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 284, E1089–E1097.

Cheng, H.T., Dauch, J.R., Hayes, J.M., Hong, Y., Feldman, E.L., 2009. Nerve growth factor mediates mechanical allodynia in a mouse model of type 2 diabetes. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 68, 1229–1243.

Chichorro, J.G., Lorenzetti, B.B., Zampronio, A.R., 2004. Involvement of bradykinin, cytokines, sympathetic amines and prostaglandins in formalin-induced orofacial nociception in rats. *Br. J. Pharmacol.* 141, 1175–1184.

Correa, C.R., Calixto, J.B., 1993. Evidence for participation of B1 and B2 kinin receptors in formalin-induced nociceptive response in the mouse. *Br. J. Pharmacol.* 110, 193–198.

Costigan, M., Mannion, R.J., Kendall, G., Lewis, S.E., Campagna, J.A., Coggeshall, R.E., Meridith-Middleton, J., Tate, S., Woolf, C.J., 1998. Heat shock protein 27: developmental regulation and expression after peripheral nerve injury. *J. Neurosci.* 18, 5891–5900.

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

Couture, R., Harrison, M., Vianna, R.M., Cloutier, F., 2001. Kinin receptors in pain and inflammation. *Eur. J. Pharmacol.* 429, 161–176.

Crofford, O.B., 1995. Diabetes control and complications. *Annu. Rev. Med.* 46, 267–279.

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

Daoussi, C., Benbow, S.J., Woodward, A., MacFarlane, I.A., 2006. The natural history of chronic painful peripheral neuropathy in a community diabetes population. *Diabet. Med.* 23, 1021–1024.

Daulhac, L., Mallet, C., Courteix, C., Etienne, M., Duroux, E., Privat, A.M., Eschalier, A., Fialip, J., 2006. Diabetes-induced mechanical hyperalgesia involves spinal mitogen-activated protein kinase activation in neurons and microglia via N-methyl-D-aspartate-dependent mechanisms. *Mol. Pharmacol.* 70, 1246–1254.

Daulhac, L., Maffre, V., Mallet, C., Etienne, M., Privat, A.M., Kowalski-Chauvel, A., Seva, C., Fialip, J., Eschalier, A., 2011. Phosphorylation of spinal N-methyl-d-aspartate receptor NR1 subunits by extracellular signal-regulated kinase in dorsal horn neurons and microglia contributes to diabetes-induced painful neuropathy. *Eur. J. Pain* 15, 169 e161–169 e112.

deBlois, D., Horlick, R.A., 2001. Endotoxin sensitization to kinin B(1) receptor agonist in a non-human primate model: haemodynamic and pro-inflammatory effects. *Br. J. Pharmacol.* 132, 327–335.

Delovitch, T.L., Singh, B., 1997. The nonobese diabetic mouse as a model of autoimmune diabetes: immune dysregulation gets the NOD. *Immunity* 7, 727–738.

Dias, J.P., Ismael, M.A., Pilon, M., de Champlain, J., Ferrari, B., Carayon, P., Couture, R., 2007. The kinin B1 receptor antagonist SSR240612 reverses tactile and cold

- allodynia in an experimental rat model of insulin resistance. *Br. J. Pharmacol.* 152, 280–287.
- Dias, J.P., Talbot, S., Senecal, J., Carayon, P., Couture, R., 2010. Kinin B1 receptor enhances the oxidative stress in a rat model of insulin resistance: outcome in hypertension and metabolic complications. *PLoS One* 5, e12622.
- Eisenbarth, H., Rukwied, R., Petersen, M., Schmelz, M., 2004. Sensitization to bradykinin B1 and B2 receptor activation in UV-B irradiated human skin. *Pain* 110, 197–204.
- El Midaoui, A., de Champlain, J., 2002. Prevention of hypertension, insulin resistance, and oxidative stress by alpha-lipoic acid. *Hypertension* 39, 303–307.
- Enquist, J., Skroder, C., Whistler, J.L., Leeb-Lundberg, L.M., 2007. Kinins promote B2 receptor endocytosis and delay constitutive B1 receptor endocytosis. *Mol. Pharmacol.* 71, 494–507.
- Eriksson, N.P., Persson, J.K., Svensson, M., Arvidsson, J., Molander, C., Aldskogius, H., 1993. A quantitative analysis of the microglial cell reaction in central primary sensory projection territories following peripheral nerve injury in the adult rat. *Exp. Brain Res.* 96, 19–27.
- Fernyhough, P., Calcutt, N.A., 2010. Abnormal calcium homeostasis in peripheral neuropathies. *Cell Calcium* 47, 130–139.
- Ferreira, J., Campos, M.M., Pesquero, J.B., Araujo, R.C., Bader, M., Calixto, J.B., 2001. Evidence for the participation of kinins in Freund's adjuvant-induced inflammatory and nociceptive responses in kinin B1 and B2 receptor knockout mice. *Neuropharmacology* 41, 1006–1012.
- Ferreira, J., Campos, M.M., Araujo, R., Bader, M., Pesquero, J.B., Calixto, J.B., 2002. The use of kinin B1 and B2 receptor knockout mice and selective antagonists to characterize the nociceptive responses caused by kinins at the spinal level. *Neuropharmacology* 43, 1188–1197.
- Ferreira, J., Beirith, A., Mori, M.A., Araujo, R.C., Bader, M., Pesquero, J.B., Calixto, J.B., 2005. Reduced nerve injury-induced neuropathic pain in kinin B1 receptor knock-out mice. *J. Neurosci.* 25, 2405–2412.
- Ferreira, J., Triches, K.M., Medeiros, R., Cabrini, D.A., Mori, M.A., Pesquero, J.B., Bader, M., Calixto, J.B., 2008. The role of kinin B1 receptors in the nociception produced by peripheral protein kinase C activation in mice. *Neuropharmacology* 54, 597–604.
- Fincham, C.I., Bressan, A., Paris, M., Rossi, C., Fattori, D., 2009. Bradykinin receptor antagonists—a review of the patent literature 2005–2008. *Expert Opin. Ther. Pat.* 19, 919–941.
- Fischer, T.Z., Waxman, S.G., 2010. Neuropathic pain in diabetes—evidence for a central mechanism. *Nat. Rev. Neurol.* 6, 462–466.
- Fitzpatrick, F., Lepault, F., Homo-Delarche, F., Bach, J.F., Dardenne, M., 1991. Influence of castration, alone or combined with thymectomy, on the development of diabetes in the nonobese diabetic mouse. *Endocrinology* 129, 1382–1390.
- Fox, A., Wotherspoon, G., McNair, K., Hudson, L., Patel, S., Gentry, C., Winter, J., 2003. Regulation and function of spinal and peripheral neuronal B1 bradykinin receptors in inflammatory mechanical hyperalgesia. *Pain* 104, 683–691.
- Fujita, M., Andoh, T., Ohashi, K., Akira, A., Saiki, I., Kuraishi, Y., 2010. Roles of kinin B1 and B2 receptors in skin cancer pain produced by orthotopic melanoma inoculation in mice. *Eur. J. Pain* 14, 588–594.
- Gabra, B.H., Sirois, P., 2002. Role of bradykinin B(1) receptors in diabetes-induced hyperalgesia in streptozotocin-treated mice. *Eur. J. Pharmacol.* 457, 115–124.
- Gabra, B.H., Sirois, P., 2003. Kinin B1 receptor antagonists inhibit diabetes-induced hyperalgesia in mice. *Neuropeptides* 37, 36–44.
- Gabra, B.H., Sirois, P., 2005. Hyperalgesia in non-obese diabetic (NOD) mice: a role for the inducible bradykinin B1 receptor. *Eur. J. Pharmacol.* 514, 61–67.
- Gabra, B.H., Merino, V.F., Bader, M., Pesquero, J.B., Sirois, P., 2005. Absence of diabetic hyperalgesia in bradykinin B1 receptor-knockout mice. *Regul. Pept.* 127, 245–248.
- Gao, Y.J., Ji, R.R., 2010. Chemokines, neuronal-glial interactions, and central processing of neuropathic pain. *Pharmacol. Ther.* 126, 56–68.
- Gerbi, A., Maixent, J.M., Barbey, O., Jamme, I., Pierlovisi, M., Coste, T., Pieroni, G., Nouvelot, A., Vague, P., Raccach, D., 1998. Alterations of Na, K-ATPase isoenzymes in the rat diabetic neuropathy: protective effect of dietary supplementation with n-3 fatty acids. *J. Neurochem.* 71, 732–740.
- Gosselin, R.D., Suter, M.R., Ji, R.R., Decosterd, I., 2010. Glial cells and chronic pain. *Neuroscientist* 16, 519–531.
- Gougat, J., Ferrari, B., Sarran, L., Planchenault, C., Poncelet, M., Maruani, J., Alonso, R., Cudennec, A., Croci, T., Guagnini, F., Urban-Szabo, K., Martinolle, J.P., Soubrie, P., Finance, O., Le Fur, G., 2004. SSR240612 [(2R)-2-(((3R)-3-(1,3-benzodioxol-5-yl)-3-[[[6-methoxy-2-naphthyl]sulfonyl]amino]propanoyl)amino]-3-(4-[[[2R,6S]-2,6-dimethylpiperidinyl]methyl]phenyl)-N-isopropyl-N-methylpropanamide hydrochloride)], a new nonpeptide antagonist of the bradykinin B1 receptor: biochemical and pharmacological characterization. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 309, 661–669.
- Guastella, V., Mick, G., 2009. Strategies for the diagnosis and treatment of neuropathic pain secondary to diabetic peripheral sensory polyneuropathy. *Diabetes Metab.* 35, 12–19.
- Hess, J.F., Hey, P.J., Chen, T.B., O'Brien, J., O'Malley, S.S., Pettibone, D.J., Chang, R.S., 2001. Molecular cloning and pharmacological characterization of the canine B1 and B2 bradykinin receptors. *Biol. Chem.* 382, 123–129.
- Hickey, W.F., Kimura, H., 1988. Perivascular microglial cells of the CNS are bone marrow-derived and present antigen in vivo. *Science* 239, 290–292.
- Hutchinson, M.R., Zhang, Y., Brown, K., Coats, B.D., Shridhar, M., Sholar, P.W., Patel, S.J., Crysdale, N.Y., Harrison, J.A., Maier, S.F., Rice, K.C., Watkins, L.R., 2008. Non-stereoselective reversal of neuropathic pain by naloxone and naltrexone: involvement of toll-like receptor 4 (TLR4). *Eur. J. Neurosci.* 28, 20–29.
- Ifuku, M., Farber, K., Okuno, Y., Yamakawa, Y., Miyamoto, T., Nolte, C., Merrino, V.F., Kita, S., Iwamoto, T., Komuro, I., Wang, B., Cheung, G., Ishikawa, E., Ooboshi, H., Bader, M., Wada, K., Kettenmann, H., Noda, M., 2007. Bradykinin-induced microglial migration mediated by B1-bradykinin receptors depends on Ca2+ influx via reverse-mode activity of the Na+/Ca2+ exchanger. *J. Neurosci.* 27, 13065–13073.
- Inoue, K., 2006. The function of microglia through purinergic receptors: neuropathic pain and cytokine release. *Pharmacol. Ther.* 109, 210–226.
- Inoue, K., 2008. Purinergic systems in microglia. *Cell. Mol. Life Sci.* 65, 3074–3080.
- Ismael, M.A., Talbot, S., Carbonneau, C.L., Beausjour, C.M., Couture, R., 2008. Blockade of sensory abnormalities and kinin B(1) receptor expression by N-acetyl-L-cysteine and ramipril in a rat model of insulin resistance. *Eur. J. Pharmacol.* 589, 66–72.
- Ji, R.R., Suter, M.R., 2007. p38 MAPK, microglial signaling, and neuropathic pain. *Mol. Pain* 3, 33.
- Ji, R.R., Gereau, R.W.t., Malcangio, M., Strichartz, G.R., 2009. MAP kinase and pain. *Brain Res. Rev.* 60, 135–148.
- Jin, S.X., Zhuang, Z.Y., Woolf, C.J., Ji, R.R., 2003. p38 mitogen-activated protein kinase is activated after a spinal nerve ligation in spinal cord microglia and dorsal root ganglion neurons and contributes to the generation of neuropathic pain. *J. Neurosci.* 23, 4017–4022.
- Kawasaki, Y., Xu, Z.Z., Wang, X., Park, J.Y., Zhuang, Z.Y., Tan, P.H., Gao, Y.J., Roy, K., Corfas, G., Lo, E.H., Ji, R.R., 2008. Distinct roles of matrix metalloproteases in the early- and late-phase development of neuropathic pain. *Nat. Med.* 14, 331–336.
- Kim, D., Kim, M.A., Cho, I.H., Kim, M.S., Lee, S., Jo, E.K., Choi, S.Y., Park, K., Kim, J.S., Akira, S., Na, H.S., Oh, S.B., Lee, S.J., 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.
- Kumar, V., Abbas, A.K., Fausto, N., Robbins, S.L., Cotran, R.S., 2005. Robbins and Cotran Pathologic Basis of Disease. Elsevier Saunders, Philadelphia.
- Lassmann, H., Schmied, M., Vass, K., Hickey, W.F., 1993. Bone marrow derived elements and resident microglia in brain inflammation. *Glia* 7, 19–24.
- Latham, J.R., Pathirathna, S., Jagodic, M.M., Choe, W.J., Levin, M.E., Nelson, M.T., Lee, W.Y., Krishnan, K., Covey, D.F., Todorovic, S.M., Jevtic-Todorovic, V., 2009. Selective T-type calcium channel blockade alleviates hyperalgesia in ob/ob mice. *Diabetes* 58, 2656–2665.
- Leeb-Lundberg, L.M., Marceau, F., Muller-Esterl, W., Pettibone, D.J., Zuraw, B.L., 2005. International union of pharmacology. XLV. Classification of the kinin receptor family: from molecular mechanisms to pathophysiological consequences. *Pharmacol. Rev.* 57, 27–77.
- Levy, D.M., Terenghi, G., Gu, X.H., Abraham, R.R., Springall, D.R., Polak, J.M., 1992. Immunohistochemical measurements of nerves and neuropeptides in diabetic skin: relationship to tests of neurological function. *Diabetologia* 35, 889–897.
- Li, J., Baud, O., Vartanian, T., Volpe, J.J., Rosenberg, P.A., 2005. Peroxynitrite generated by inducible nitric oxide synthase and NADPH oxidase mediates microglial toxicity to oligodendrocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 102, 9936–9941.
- Liao, Y.H., Zhang, G.H., Jia, D., Wang, P., Qian, N.S., He, J., Zeng, X.T., He, Y., Yang, Y.L., Cao, D.Y., Zhang, Y., Wang, D.S., Tao, K.S., Gao, C.J., Dou, K.F., 2011. Spinal astrocytic activation contributes to mechanical allodynia in a mouse model of type 2 diabetes. *Brain Res.* 1368, 324–335.
- Lin, J.C., Talbot, S., Lahjouji, K., Roy, J.P., Senecal, J., Couture, R., Morin, A., 2010. Mechanism of cigarette smoke-induced kinin B(1) receptor expression in rat airways. *Peptides* 31, 1940–1945.
- Luiz, A.P., Schroeder, S.D., Chichorro, J.G., Calixto, J.B., Zampronio, A.R., Rae, G.A., 2010. Kinin B(1) and B(2) receptors contribute to orofacial heat hyperalgesia induced by infraorbital nerve constriction injury in mice and rats. *Neuropeptides* 44, 87–92.
- Lungu, C., Dias, J.P., Franca, C.E., Ongali, B., Regoli, D., Moldovan, F., Couture, R., 2007. Involvement of kinin B1 receptor and oxidative stress in sensory abnormalities and arterial hypertension in an experimental rat model of insulin resistance. *Neuropeptides* 41, 375–387.
- Maeda, T., Kiguchi, N., Kobayashi, Y., Ikuta, T., Ozaki, M., Kishioka, S., 2009. Leptin derived from adipocytes in injured peripheral nerves facilitates development of neuropathic pain via macrophage stimulation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 106, 13076–13081.
- Marceau, F., Bachvarov, D.R., 1998. Kinin receptors. *Clin. Rev. Allergy Immunol.* 16, 385–401.
- Marceau, F., Regoli, D., 2004. Bradykinin receptor ligands: therapeutic perspectives. *Nat. Rev. Drug Discov.* 3, 845–852.
- Marchand, F., Perretti, M., McMahon, S.B., 2005. Role of the immune system in chronic pain. *Nat. Rev. Neurosci.* 6, 521–532.
- McMahon, S.B., Cafferty, W.B., Marchand, F., 2005. Immune and glial cell factors as pain mediators and modulators. *Exp. Neurol.* 192, 444–462.
- Menke, J.G., Borkowski, J.A., Bierilo, K.K., MacNeil, T., Derrick, A.W., Schneck, K.A., Ransom, R.W., Strader, C.D., Linemeyer, D.L., Hess, J.F., 1994. Expression cloning of a human B1 bradykinin receptor. *J. Biol. Chem.* 269, 21583–21586.
- Milligan, E.D., Watkins, L.R., 2009. Pathological and protective roles of glia in chronic pain. *Nat. Rev. Neurosci.* 10, 23–36.
- Milligan, E.D., Zapata, V., Chacur, M., Schoeniger, D., Biedenkapp, J., O'Connor, K.A., Verge, G.M., Chapman, G., Green, P., Foster, A.C., Naeve, G.S., Maier, S.F., Watkins, L.R., 2004. Evidence that exogenous and endogenous fractalkine can induce spinal nociceptive facilitation in rats. *Eur. J. Neurosci.* 20, 2294–2302.
- Milligan, E., Zapata, V., Schoeniger, D., Chacur, M., Green, P., Poole, S., Martin, D., Maier, S.F., Watkins, L.R., 2005. An initial investigation of spinal mechanisms underlying pain enhancement induced by fractalkine, a neuronally released chemokine. *Eur. J. Neurosci.* 22, 2775–2782.
- Milligan, E.D., Sloane, E.M., Watkins, L.R., 2008. Glia in pathological pain: a role for fractalkine. *J. Neuroimmunol.* 198, 113–120.
- Molines, L., Darmon, P., Raccach, D., 2010. Charcot's foot: newest findings on its pathophysiology, diagnosis and treatment. *Diabetes Metab.* 36, 251–255.
- Mosley, K., Cuzner, M.L., 1996. Receptor-mediated phagocytosis of myelin by macrophages and microglia: effect of opsonization and receptor blocking agents. *Neurochem. Res.* 21, 481–487.

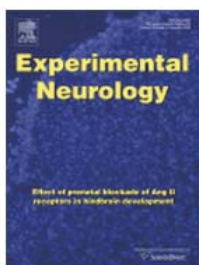
- Narita, M., Yoshida, T., Nakajima, M., Miyatake, M., Takagi, T., Yajima, Y., Suzuki, T., 2006. Direct evidence for spinal cord microglia in the development of a neuropathic pain-like state in mice. *J. Neurochem.* 97, 1337–1348.
- Neugebauer, W., Blais, P.A., Halle, S., Filteau, C., Regoli, D., Gobeil Jr., F., 2002. Kinin B1 receptor antagonists with multi-enzymatic resistance properties. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 80, 287–292.
- Ni, A., Chao, L., Chao, J., 1998. Transcription factor nuclear factor kappaB regulates the inducible expression of the human B1 receptor gene in inflammation. *J. Biol. Chem.* 273, 2784–2791.
- Nishikawa, T., Edelstein, D., Du, X.L., Yamagishi, S., Matsumura, T., Kaneda, Y., Yorek, M.A., Beebe, D., Oates, P.J., Hammes, H.P., Giardino, I., Brownlee, M., 2000. Normalizing mitochondrial superoxide production blocks three pathways of hyperglycaemic damage. *Nature* 404, 787–790.
- Noda, M., Kariura, Y., Pannasch, U., Nishikawa, K., Wang, L., Seike, T., Ifuku, M., Kosai, Y., Wang, B., Nolte, C., Aoki, S., Kettenmann, H., Wada, K., 2007. Neuroprotective role of bradykinin because of the attenuation of pro-inflammatory cytokine release from activated microglia. *J. Neurochem.* 101, 397–410.
- Oates, P.J., 2002. Polyol pathway and diabetic peripheral neuropathy. *Int. Rev. Neurobiol.* 50, 325–392.
- Obrosova, I.G., 2009. Diabetic painful and insensate neuropathy: pathogenesis and potential treatments. *Neurotherapeutics* 6, 638–647.
- Pabreja, K., Dua, K., Sharma, S., Padi, S.S., Kulkarni, S.K., 2011. Minocycline attenuates the development of diabetic neuropathic pain: possible anti-inflammatory and anti-oxidant mechanisms. *Eur. J. Pharmacol.* 661, 15–21.
- Patel, J., Iyer, A., Brown, L., 2009. Evaluation of the chronic complications of diabetes in a high fructose diet in rats. *Indian J. Biochem. Biophys.* 46, 66–72.
- Perkins, M.N., Campbell, E., Dray, A., 1993. Antinociceptive activity of the bradykinin B1 and B2 receptor antagonists, des-Arg⁹[Leu⁸]-BK and HOE 140, in two models of persistent hyperalgesia in the rat. *Pain* 53, 191–197.
- Pesquero, J.B., Pesquero, J.L., Oliveira, S.M., Roscher, A.A., Metzger, R., Ganten, D., Bader, M., 1996. Molecular cloning and functional characterization of a mouse bradykinin B1 receptor gene. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 220, 219–225.
- Pesquero, J.B., Araujo, R.C., Heppenstall, P.A., Stucky, C.L., Silva Jr., J.A., Walther, T., Oliveira, S.M., Pesquero, J.L., Paiva, A.C., Calixto, J.B., Lewin, G.R., Bader, M., 2000. Hypoalgesia and altered inflammatory responses in mice lacking kinin B1 receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 97, 8140–8145.
- Petcu, M., Dias, J.P., Ongali, B., Thibault, G., Neugebauer, W., Couture, R., 2008. Role of kinin B1 and B2 receptors in a rat model of neuropathic pain. *Int. Immunopharmacol.* 8, 188–196.
- Petrenko, A.B., Yamakura, T., Baba, H., Shimoji, K., 2003. The role of N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptors in pain: a review. *Anesth. Analg.* 97, 1108–1116.
- Phagoo, S.B., Poole, S., Leeb-Lundberg, L.M., 1999. Autoregulation of bradykinin receptors: agonists in the presence of interleukin-1beta shift the repertoire of receptor subtypes from B2 to B1 in human lung fibroblasts. *Mol. Pharmacol.* 56, 325–333.
- Phagoo, S.B., Reddi, K., Anderson, K.D., Leeb-Lundberg, L.M., Warburton, D., 2001. Bradykinin B1 receptor up-regulation by interleukin-1beta and B1 agonist occurs through independent and synergistic intracellular signaling mechanisms in human lung fibroblasts. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 298, 77–85.
- Piercy, V., Banner, S.E., Bhattacharya, A., Parsons, A.A., Sanger, G.J., Smith, S.A., Bingham, S., 1999. Thermal, but not mechanical, nociceptive behavior is altered in the Zucker Diabetic Fatty rat and is independent of glycemic status. *J. Diabetes Complications* 13, 163–169.
- Pocock, J.M., Kettenmann, H., 2007. Neurotransmitter receptors on microglia. *Trends Neurosci.* 30, 527–535.
- Pop-Busui, R., Sima, A., Stevens, M., 2006. Diabetic neuropathy and oxidative stress. *Diabetes Metab. Res. Rev.* 22, 257–273.
- Porreca, F., Vanderah, T.W., Guo, W., Barth, M., Dodey, P., Peyrou, V., Luccarini, J.M., Junien, J.L., Pruneau, D., 2006. Antinociceptive pharmacology of N-[[4-(4,5-dihydro-1H-imidazol-2-yl)phenyl]methyl]-2-[[[4-methoxy-2,6-dimethylphenyl]sulfonyl]methylamino]ethoxy]-N-methylacetamide, fumarate (LF22-0542), a novel non-peptidic bradykinin B1 receptor antagonist. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 318, 195–205.
- Quan, Y., Du, J., Wang, X., 2007. High glucose stimulates GRO secretion from rat microglia via ROS, PKC, and NF-kappaB pathways. *J. Neurosci. Res.* 85, 3150–3159.
- Quintao, N.L., Passos, G.F., Medeiros, R., Paszcuk, A.F., Motta, F.L., Pesquero, J.B., Campos, M.M., Calixto, J.B., 2008. Neuropathic pain-like behavior after brachial plexus avulsion in mice: the relevance of kinin B1 and B2 receptors. *J. Neurosci.* 28, 2856–2863.
- Racchah, D., 1998. Physiopathology of diabetic neuropathies. Functional exploration of peripheral involvement. *Diabetes Metab.* 24 (Suppl. 3), 73–78.
- Rajpal, S., Gerovac, T.A., Turner, N.A., Tilghman, J.I., Allcock, B.K., McChesney, S.L., Miranpuri, G.S., Park, S.W., Resnick, D.K., 2007. Antihyperalgesic effects of vanilloid-1 and bradykinin-1 receptor antagonists following spinal cord injury in rats. *J. Neurosurg. Spine* 6, 420–424.
- Rashid, M.H., Inoue, M., Matsumoto, M., Ueda, H., 2004. Switching of bradykinin-mediated nociception following partial sciatic nerve injury in mice. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 308, 1158–1164.
- Regoli, D., Rhaleb, N.E., Drapeau, G., Dion, S., 1990. Kinin receptor subtypes. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 15 (Suppl. 6), S30–S38.
- Regoli, D., Gobeil, F., Nguyen, Q.T., Jukic, D., Seoane, P.R., Salvino, J.M., Sawutz, D.G., 1994. Bradykinin receptor types and B2 subtypes. *Life Sci.* 55, 735–749.
- Regoli, D., Rizzi, A., Perron, S.I., Gobeil Jr., F., 2001. Classification of kinin receptors. *Biol. Chem.* 382, 31–35.
- Roane, D.S., Porter, J.R., 1986. Nociception and opioid-induced analgesia in lean (Fa/–) and obese (fa/fa) Zucker rats. *Physiol. Behav.* 38, 215–218.
- Romagnoli, M., Gomez-Cabrera, M.C., Perrelli, M.G., Biasi, F., Pallardo, F.V., Sastre, J., Poli, G., Vina, J., 2010. Xanthine oxidase-induced oxidative stress causes activation of NF-kappaB and inflammation in the liver of type I diabetic rats. *Free Radic. Biol. Med.* 49, 171–177.
- Romanovsky, D., Walker, J.C., Dobretsov, M., 2008. Pressure pain precedes development of type 2 disease in Zucker rat model of diabetes. *Neurosci. Lett.* 445, 220–223.
- Romero-Sandoval, E.A., Horvath, R.J., DeLeo, J.A., 2008. Neuroimmune interactions and pain: focus on glial-modulating targets. *Curr. Opin. Investig. Drugs* 9, 726–734.
- Said, G., 2007. Diabetic neuropathy—a review. *Nat. Clin. Pract. Neurol.* 3, 331–340.
- Schanstra, J.P., Bataille, E., Marin Castano, M.E., Barascud, Y., Hirtz, C., Pesquero, J.B., Pecher, C., Gauthier, F., Girolami, J.P., Bascands, J.L., 1998. The B1-agonist [des-Arg¹⁰]-kallidin activates transcription factor NF-kappaB and induces homologous upregulation of the bradykinin B1-receptor in cultured human lung fibroblasts. *J. Clin. Invest.* 101, 2080–2091.
- Schemmel, K.E., Padiyara, R.S., D'Souza, J.J., 2010. Aldose reductase inhibitors in the treatment of diabetic peripheral neuropathy: a review. *J. Diabetes Complications* 24, 354–360.
- Scholz, J., Woolf, C.J., 2002. Can we conquer pain? *Nat. Neurosci.* 5, 1062–1067 Suppl.
- Scholz, J., Woolf, C.J., 2007. The neuropathic pain triad: neurons, immune cells and glia. *Nat. Neurosci.* 10, 1361–1368.
- Serreze, D.V., Leiter, E.H., 1994. Genetic and pathogenic basis of autoimmune diabetes in NOD mice. *Curr. Opin. Immunol.* 6, 900–906.
- Sevcik, M.A., Ghilardi, J.R., Halvorson, K.G., Lindsay, T.H., Kubota, K., Mantyh, P.W., 2005. Analgesic efficacy of bradykinin B1 antagonists in a murine bone cancer pain model. *J. Pain* 6, 771–775.
- Stellwagen, D., Malenka, R.C., 2006. Synaptic scaling mediated by glial TNF-alpha. *Nature* 440, 1054–1059.
- Sugimoto, K., Yasujima, M., Yagihashi, S., 2008. Role of advanced glycation end products in diabetic neuropathy. *Curr. Pharm. Des.* 14, 953–961.
- Sun, S., Cao, H., Han, M., Li, T.T., Pan, H.L., Zhao, Z.Q., Zhang, Y.Q., 2007. New evidence for the involvement of spinal fractalkine receptor in pain facilitation and spinal glial activation in rat model of monoarthritis. *Pain* 129, 64–75.
- Suri, A., Szallasi, A., 2008. The emerging role of TRPV1 in diabetes and obesity. *Trends Pharmacol. Sci.* 29, 29–36.
- Svensson, C.I., Fitzsimmons, B., Azizi, S., Powell, H.C., Hua, X.Y., Yaksh, T.L., 2005. Spinal p38beta isoform mediates tissue injury-induced hyperalgesia and spinal sensitization. *J. Neurochem.* 92, 1508–1520.
- Sweitzer, S.M., White, K.A., Dutta, C., DeLeo, J.A., 2002. The differential role of spinal MHC class II and cellular adhesion molecules in peripheral inflammatory versus neuropathic pain in rodents. *J. Neuroimmunol.* 125, 82–93.
- Talbot, S., Theberge-Turmel, P., Liaozoghi, D., Senecal, J., Gaudreau, P., Couture, R., 2009. Cellular localization of kinin B1 receptor in the spinal cord of streptozotocin-diabetic rats with a fluorescent [Nalpha-Bodipy]-des-Arg⁹-bradykinin. *J. Neuroinflammation* 6, 11.
- Talbot, S., Chahmi, E., Dias, J.P., Couture, R., 2010. Key role for spinal dorsal horn microglial kinin B1 receptor in early diabetic pain neuropathy. *J. Neuroinflammation* 7, 36.
- Tanga, F.Y., Raghavendra, V., DeLeo, J.A., 2004. Quantitative real-time RT-PCR assessment of spinal microglial and astrocytic activation markers in a rat model of neuropathic pain. *Neurochem. Int.* 45, 397–407.
- Tanga, F.Y., Nutille-McMenemy, N., DeLeo, J.A., 2005. The CNS role of Toll-like receptor 4 in innate neuroimmunity and painful neuropathy. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 102, 5856–5861.
- Tender, G.C., Li, Y.Y., Cui, J.G., 2010. Brain-derived neurotrophic factor redistribution in the dorsal root ganglia correlates with neuropathic pain inhibition after resiniferatoxin treatment. *Spine J.* 10, 715–720.
- Tesfaye, S., Kempler, P., 2005. Painful diabetic neuropathy. *Diabetologia* 48, 805–807.
- Thacker, M.A., Clark, A.K., Bishop, T., Grist, J., Yip, P.K., Moon, L.D., Thompson, S.W., Marchand, F., McMahon, S.B., 2009. CCL2 is a key mediator of microglia activation in neuropathic pain states. *Eur. J. Pain* 13, 263–272.
- Thornalley, P.J., 1998. Cell activation by glycated proteins. AGE receptors, receptor recognition factors and functional classification of AGEs. *Cell. Mol. Biol. (Noisy-le-grand)* 44, 1013–1023.
- Tonussi, C.R., Ferreira, S.H., 1997. Bradykinin-induced knee joint incapacitation involves bradykinin B2 receptor mediated hyperalgesia and bradykinin B1 receptor-mediated nociception. *Eur. J. Pharmacol.* 326, 61–65.
- Torsney, C., MacDermott, A.B., 2005. Neuroscience: a painful factor. *Nature* 438, 923–925.
- Toth, C.C., Jedrzejewski, N.M., Ellis, C.L., Frey II, W.H., 2010. Cannabinoid-mediated modulation of neuropathic pain and microglial accumulation in a model of murine type I diabetic peripheral neuropathic pain. *Mol. Pain* 6, 16.
- Tsuda, M., Shigemoto-Mogami, Y., Koizumi, S., Mizokoshi, A., Kohsaka, S., Salter, M.W., Inoue, K., 2003. P2X4 receptors induced in spinal microglia gate tactile allodynia after nerve injury. *Nature* 424, 778–783.
- Tsuda, M., Mizokoshi, A., Shigemoto-Mogami, Y., Koizumi, S., Inoue, K., 2004. Activation of p38 mitogen-activated protein kinase in spinal hyperactive microglia contributes to pain hypersensitivity following peripheral nerve injury. *Glia* 45, 89–95.
- Tsuda, M., Inoue, K., Salter, M.W., 2005. Neuropathic pain and spinal microglia: a big problem from molecules in “small” glia. *Trends Neurosci.* 28, 101–107.
- Tsuda, M., Ueno, H., Kataoka, A., Tozaki-Saitoh, H., Inoue, K., 2008. Activation of dorsal horn microglia contributes to diabetes-induced tactile allodynia via extracellular signal-regulated protein kinase signaling. *Glia* 56, 378–386.
- Vague, P., Dufayet, D., Lamotte, M.F., Mouchot, C., Racchah, D., 1997. Genetic factors, Na K ATPase activity and neuropathy in diabetics. *Bull. Acad. Natl. Med.* 181, 1811–1821 discussion 1821–1813.
- Vareniuk, I., Pavlov, I.A., Drel, V.R., Lyzogubov, V.V., Ilnytska, O., Bell, S.R., Tibrewala, J., Groves, J.T., Obrosova, I.G., 2007. Nitrosative stress and peripheral diabetic neuropathy in leptin-deficient (ob/ob) mice. *Exp. Neurol.* 205, 425–436.
- Verge, G.M., Milligan, E.D., Maier, S.F., Watkins, L.R., Naeve, G.S., Foster, A.C., 2004. Fractalkine (CX3CL1) and fractalkine receptor (CX3CR1) distribution in spinal cord and

- dorsal root ganglia under basal and neuropathic pain conditions. *Eur. J. Neurosci.* 20, 1150–1160.
- Viana, A.F., Maciel, I.S., Dornelles, F.N., Figueiredo, C.P., Siqueira, J.M., Campos, M.M., Calixto, J.B., 2010. Kinin B1 receptors mediate depression-like behavior response in stressed mice treated with systemic *E. coli* lipopolysaccharide. *J. Neuroinflammation* 7, 98.
- Viviani, B., Bartesaghi, S., Gardoni, F., Vezzani, A., Behrens, M.M., Bartfai, T., Binaglia, M., Corsini, E., Di Luca, M., Galli, C.L., Marinovich, M., 2003. Interleukin-1 β enhances NMDA receptor-mediated intracellular calcium increase through activation of the Src family of kinases. *J. Neurosci.* 23, 8692–8700.
- Walker, K., Dray, A., Perkins, M., 1996. Hyperalgesia in rats following intracerebroventricular administration of endotoxin: effect of bradykinin B1 and B2 receptor antagonist treatment. *Pain* 65, 211–219.
- Wang, Z., Gleichmann, H., 1998. GLUT2 in pancreatic islets: crucial target molecule in diabetes induced with multiple low doses of streptozotocin in mice. *Diabetes* 47, 50–56.
- Watkins, L.R., Milligan, E.D., Maier, S.F., 2001a. Glial activation: a driving force for pathological pain. *Trends Neurosci.* 24, 450–455.
- Watkins, L.R., Milligan, E.D., Maier, S.F., 2001b. Spinal cord glia: new players in pain. *Pain* 93, 201–205.
- Watkins, L.R., Wieseler-Frank, J., Milligan, E.D., Johnston, I., Maier, S.F., 2006. Chapter 22 Contribution of glia to pain processing in health and disease. *Handb. Clin. Neurol.* 81, 309–323.
- Werner, M.F., Kassuya, C.A., Ferreira, J., Zampronio, A.R., Calixto, J.B., Rae, G.A., 2007. Peripheral kinin B(1) and B(2) receptor-operated mechanisms are implicated in neuropathic nociception induced by spinal nerve ligation in rats. *Neuropharmacology* 53, 48–57.
- White, F.A., Jung, H., Miller, R.J., 2007. Chemokines and the pathophysiology of neuropathic pain. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 104, 20151–20158.
- Wodarski, R., Clark, A.K., Grist, J., Marchand, F., Malcangio, M., 2009. Gabapentin reverses microglial activation in the spinal cord of streptozotocin-induced diabetic rats. *Eur. J. Pain* 13, 807–811.
- Woolf, C.J., 2004. Dissecting out mechanisms responsible for peripheral neuropathic pain: implications for diagnosis and therapy. *Life Sci.* 74, 2605–2610.
- Woolf, C.J., Salter, M.W., 2000. Neuronal plasticity: increasing the gain in pain. *Science* 288, 1765–1769.
- Yagihashi, S., Yamagishi, S., Wada, R., 2007. Pathology and pathogenetic mechanisms of diabetic neuropathy: correlation with clinical signs and symptoms. *Diabetes Res. Clin. Pract.* 77 (Suppl. 1), S184–S189.
- Yasuda, H., Terada, M., Maeda, K., Kogawa, S., Sanada, M., Haneda, M., Kashiwagi, A., Kikkawa, R., 2003. Diabetic neuropathy and nerve regeneration. *Prog. Neurobiol.* 69, 229–285.
- Zhang, J., De Koninck, Y., 2006. Spatial and temporal relationship between monocyte chemoattractant protein-1 expression and spinal glial activation following peripheral nerve injury. *J. Neurochem.* 97, 772–783.
- Zhang, R.X., Li, A., Liu, B., Wang, L., Ren, K., Zhang, H., Berman, B.M., Lao, L., 2008. IL-1 α alleviates inflammatory hyperalgesia through preventing phosphorylation of NMDA receptor NR-1 subunit in rats. *Pain* 135, 232–239.
- Zhou, X., Polgar, P., Taylor, L., 1998. Roles for interleukin-1 β , phorbol ester and a post-transcriptional regulator in the control of bradykinin B1 receptor gene expression. *Biochem. J.* 330 (Pt 1), 361–366.
- Zhou, X., Prado, G.N., Taylor, L., Yang, X., Polgar, P., 2000. Regulation of inducible bradykinin B1 receptor gene expression through absence of internalization and resensitization. *J. Cell. Biochem.* 78, 351–362.
- Zhou, Z., Peng, X., Hagshenas, J., Insolera, R., Fink, D.J., Mata, M., 2010. A novel cell–cell signaling by microglial transmembrane TNF α with implications for neuropathic pain. *Pain* 151, 296–306.
- Ziegler, D., 2008. Painful diabetic neuropathy: treatment and future aspects. *Diabetes Metab. Res. Rev.* 24 (Suppl. 1), S52–S57.
- Ziegler, D., 2009. Painful diabetic neuropathy: advantage of novel drugs over old drugs? *Diabetes Care* 32 (Suppl. 2), S414–S419.
- Ziegler, D., Rathmann, W., Dickhaus, T., Meisinger, C., Mielck, A., 2008. Prevalence of polyneuropathy in pre-diabetes and diabetes is associated with abdominal obesity and macroangiopathy: the MONICA/KORA Augsburg Surveys S2 and S3. *Diabetes Care* 31, 464–469.
- Zimmermann, M., 2001. Pathobiology of neuropathic pain. *Eur. J. Pharmacol.* 429, 23–37.
- Zochodne, D.W., Levy, D., 2005. Nitric oxide in damage, disease and repair of the peripheral nervous system. *Cell. Mol. Biol. (Noisy-le-grand)* 51, 255–267.
- Zochodne, D.W., Verge, V.M., Cheng, C., Hoke, A., Jolley, C., Thomsen, K., Rubin, I., Lauritzen, M., 2000. Nitric oxide synthase activity and expression in experimental diabetic neuropathy. *J. Neurobiol. Exp. Neurol.* 59, 798–807.

Accord journal



RightsLink®

[Home](#)
[Account Info](#)
[Help](#)


Title: Emerging role of microglial kinin B1 receptor in diabetic pain neuropathy

Author: Sébastien Talbot, Réjean Couture

Publication: Experimental Neurology

Publisher: Elsevier

Date: April 2012

Copyright © 2012, Elsevier

Logged in as:
Rejean Couture
Account #:
3000439041

[LOGOUT](#)

Order Completed

Thank you very much for your order.

This is a License Agreement between Rejean Couture ("You") and Elsevier ("Elsevier"). The license consists of your order details, the terms and conditions provided by Elsevier, and the [payment terms and conditions](#).

[Get the printable license.](#)

License Number	2886501486096
License date	Apr 12, 2012
Licensed content publisher	Elsevier
Licensed content publication	Experimental Neurology
Licensed content title	Emerging role of microglial kinin B1 receptor in diabetic pain neuropathy
Licensed content author	Sébastien Talbot, Réjean Couture
Licensed content date	April 2012
Licensed content volume number	234
Licensed content issue	2
Number of pages	9
Type of Use	reuse in a thesis/dissertation
Portion	full article
Format	both print and electronic
Are you the author of this Elsevier article?	Yes
Will you be translating?	No
Order reference number	
Title of your thesis/dissertation	Localisation, mécanisme d'induction et rôle physiopathologique du récepteur B1 des kinines dans des modèles expérimentaux de douleur chez le rat
Expected completion date	Apr 2012
Estimated size (number of pages)	250
Elsevier VAT number	GB 494 6272 12
Permissions price	0.00 USD
VAT/Local Sales Tax	0.0 USD / 0.0 GBP
Total	0.00 USD

11.0. ARTICLE 4

11.1. Problématique

Le canal ionique TRPV1 joue un rôle clé dans l'induction des neuropathies. D'ailleurs, des souris TRPV1^{-/-} sont insensibles au développement l'hypersensibilité thermique dans plusieurs paradigmes expérimentaux. Il a été suggéré que l'activation du TRPV1 avec un agoniste exogène augmente l'activité de la NADPH oxydase et les niveaux intracellulaires de ROS. Le rôle de ceux-ci est d'ailleurs bien décrit dans l'activation de la translocation nucléaire du NF- κ B et dans l'expression du B1R.

11.2. Objectif

Vérifier l'impact de l'activation systémique du TRPV1 sur l'expression du B1R.

11.3. Méthode expérimentale

Différents groupes de rats Sprague-Dawley mâles ont reçu des doses croissantes de capsaïcine (agoniste exogène du TRPV1) au niveau systémique. L'impact de ce traitement a été évalué 24h post-injection sur les niveaux d'expression du B1R (ARNm, protéine et sites de liaison spécifiques), de certaines cytokines pro-inflammatoires (IL-1 β , TNF- α), du stress oxydatif ainsi que sur le niveau de phosphorylation de la sous-unité p65 du NF- κ B dans la moelle épinière. De plus, la fonctionnalité du B1R, soit sa capacité à induire une hyperalgésie thermique, a été évaluée suivant l'administration intraspinale d'un agoniste du B1R (des-Arg⁹-BK) chez des rats pré-traités à la capsaïcine. Finalement, le type cellulaire exprimant le B1R a été identifié dans la moelle épinière lombaire de rats traités à la capsaïcine par microscopie confocale.

11.4. Contribution

ST a réalisé les expériences, a analysé les résultats et a écrit la première version du manuscrit. JPD a implanté les canules intrathécales. KL a fait l'immunobuvardage de type Western. MRB a fourni l'appareil de PCR quantitatif. MMC a participé à l'élaboration du design expérimental et à l'analyse des données. PG a synthétisé l'agoniste fluorescent. RC a participé à l'interprétation des résultats et à l'élaboration du design expérimental et a écrit la version finale du manuscrit.

11.5. Référence

Talbot Sébastien, Dias JP, Lahjouji K, Bogo MR, Campos MM, Gaudreau P and Couture R. Activation of TRPV1 by capsaicin induces functional Kinin B1 receptor in rat spinal cord microglia. *J Neuroinflammation* **2012**. Jan 20;9:16. PMID: 22264228.

RESEARCH

Open Access

Activation of TRPV1 by capsaicin induces functional Kinin B₁ receptor in rat spinal cord microglia

Sébastien Talbot, Jenny Pena Dias, Karim Lahjouji, Maurício Reis Bogó, Maria Martha Campos, Pierrette Gaudreau and Réjean Couture

Abstract

Background: The kinin B₁ receptor (B₁R) is upregulated by pro-inflammatory cytokines and oxidative stress, which are enhanced by transient receptor potential vanilloid subtype 1 (TRPV1) activation. To examine the link between TRPV1 and B₁R in inflammatory pain, this study aimed to determine the ability of TRPV1 to regulate microglial B₁R expression in the spinal cord dorsal horn, and the underlying mechanism.

Methods: B₁R expression (mRNA, protein and binding sites) was measured in cervical, thoracic and lumbar spinal cord in response to TRPV1 activation by systemic capsaicin (1-50 mg/kg, s.c) in rats pre-treated with TRPV1 antagonists (capsazepine or SB-366791), the antioxidant N-acetyl-L-cysteine (NAC), or vehicle. B₁R function was assessed using a tail-flick test after intrathecal (i.t.) injection of a selective B₁R agonist (des-Arg⁹-BK), and its microglial localization was investigated by confocal microscopy with the selective fluorescent B₁R agonist, [N^α-bodipy]-des-Arg⁹-BK. The effect of i.t. capsaicin (1 μg/site) was also investigated.

Results: Capsaicin (10 to 50 mg/kg, s.c.) enhanced time-dependently (0-24h) B₁R mRNA levels in the lumbar spinal cord; this effect was prevented by capsazepine (10 mg/kg, i.p.; 10 μg/site, i.t.) and SB-366791 (1 mg/kg, i.p.; 30 μg/site, i.t.). Increases of B₁R mRNA were correlated with IL-1β mRNA levels, and they were significantly less in cervical and thoracic spinal cord. Intrathecal capsaicin (1 μg/site) also enhanced B₁R mRNA in lumbar spinal cord. NAC (1 g/kg/d × 7 days) prevented B₁R up-regulation, superoxide anion production and NF-κB activation induced by capsaicin (15 mg/kg). Des-Arg⁹-BK (9.6 nmol/site, i.t.) decreased by 25-30% the nociceptive threshold at 1 min post-injection in capsaicin-treated rats (10-50 mg/kg) while it was without effect in control rats. Des-Arg⁹-BK-induced thermal hyperalgesia was blocked by capsazepine, SB-366791 and by antagonists/inhibitors of B₁R (SSR240612, 10 mg/kg, p.o.), glutamate NMDA receptor (DL-AP5, 10 μg/site, i.t.), substance P NK-1 receptor (RP-67580, 10 μg/site, i.t.) and nitric oxide synthase (L-NNA, 10 μg/site, i.t.). The B₁R fluorescent agonist was co-localized with an immunomarker of microglia (Iba-1) in spinal cord dorsal horn of capsaicin-treated rats.

Conclusion: This study highlights a new mechanism for B₁R induction via TRPV1 activation and establishes a link between these two pro-nociceptive receptors in inflammatory pain.

Keywords: Bradykinin, B₁ receptors, TRPV1, capsaicin, oxidative stress, thermal hyperalgesia

Background

Kinins are neuroactive peptides involved in pain and inflammation [1-4]. They act through the activation of two G-protein-coupled receptors (GPCR) denoted as B₁ (B₁R) and B₂ (B₂R) [5,6]. The B₂R, activated by bradykinin (BK) and Lys-BK, is widely and constitutively expressed in central and peripheral tissues. The BK metabolites, des-Arg⁹-BK and Lys-des-Arg¹⁰-BK, are the preferential agonists of B₁R. Whereas the B₁R is virtually absent in healthy conditions, it is upregulated after exposure to pro-inflammatory cytokines, bacterial endotoxins and hyperglycaemia-induced oxidative stress [7-10]. The induction of B₁R involves the transcriptional nuclear factor NF- κ B and MAP-kinase/P38 pathways [6,11]. We have reported that spinal injection of B₁R agonist causes transient thermal hyperalgesia in type 1 diabetic rats due to release of sensory pro-inflammatory mediators, notably substance P (SP), prostaglandins and nitric oxide [1]. Furthermore, B₁R antagonists reverse thermal hyperalgesia and allodynia in various models of type 1 and type 2 diabetes [4,12-15].

The transient receptor potential vanilloid subtype 1 (TRPV1) is known as a non-selective cationic channel expressed in primary sensory C-fibers [16] and microglia [17]. Its activation increases both calcium and sodium influx [16]. TRPV1 knockout mice do not display thermal hyperalgesia [18-20]. TRPV1 can be sensitized through the phosphorylation of its C-terminal end by protein kinases A and/or C [21,22]. It is activated by a variety of stimuli such as heat > 43°C [16], acidification [23], BK [24], nerve growth factor [24] and oxidative stress [25]. It was recently shown that TRPV1 activation by capsaicin increases reactive oxygen species (ROS) production in mouse dorsal root ganglion (DRG) neurons [26]. TRPV1-induced ROS production is thought to involve increased cytosolic calcium influx and activation of NADPH oxidase [27]. Moreover, it has been suggested that selective TRPV1 inhibition reduces the pro-oxidant capacity of microglial NADPH oxidase [28].

This study was undertaken to determine whether TRPV1 activation by capsaicin could enhance expression of the pro-nociceptive B₁R since both receptors are involved in thermal hyperalgesia. Moreover, microglial TRPV1 activation enhances pro-inflammatory cytokines and oxidative stress, both known to trigger B₁R induction through the NF- κ B pathway. Thus, microglia can be considered to be a strategic target for B₁R expression as evidenced in a diabetic model of pain neuropathy [29,30]. Our main objectives were to determine: 1- the role of oxidative stress and pro-inflammatory cytokines in capsaicin-induced B₁R upregulation; 2- whether newly induced B₁R is functional and could induce thermal hyperalgesia through release of spinal cord

mediators; and 3- the presence of B₁R on microglia in the spinal dorsal horn of capsaicin-treated rats by confocal microscopy.

Methods

Experimental animals and care

All research procedures and the care of the animals were in compliance with the guidelines of the Committee for Research and Ethical Issues of IASP and were approved by the Animal Care Committees of Université de Montréal and Pontificia Universidade Católica do Rio Grande do Sul. Male Sprague-Dawley rats (200-225 g; Charles River, St-Constant, Qc, Canada and CEMIB, UNICAMP, Brasil) were housed two per cage, under controlled conditions of temperature (23°C) and humidity (50%), on a 12 h light-dark cycle (until surgery) and allowed free access to normal chow diet (Charles River Rodent) and tap water.

Intrathecal implantation of catheter and capsaicin treatment

Four days after arrival, rats were anaesthetized with isoflurane and chronically implanted with an indwelling intrathecal (i.t.) polyethylene catheter (PE-10; Intramedic, Clay Adams, NJ, USA) at the vertebral lumbar level (L3 to L6) through an incision made in the dura at the atlanto-occipital junction [31]. The canula was secured to the skull through two small parallel segments of PE-60 glued with cyano-acrylate. Rats with apparent abnormal behaviour or motor deficits were euthanized with CO₂ inhalation. Rats were housed permanently in the testing laboratory under continuous light to prevent the release of endogenous opioids which could alter nociceptive threshold [32]. One week after surgery, six groups of 7-8 rats received a single dose of capsaicin (1, 5, 10, 15, 25 and 50 mg/kg), injected subcutaneously at the lumbar back skin level under mild anaesthesia with pentobarbital (45 mg/kg, i.p.). The highest dose of 50 mg/kg was injected in two doses of 25 mg/kg at 12 h intervals. Rats were used 24 h after capsaicin injection, except for rats used for time-course experiments (treated for: 0, 8, 24 or 48 h). To evaluate directly the capacity of spinally expressed TRPV1 to induce B₁R expression, one group of rats received 1 μ g of capsaicin intrathecally at the lumbar region of the spinal cord. Control rats received vehicle only (10% ethanol, 10% Tween-80 and 80% saline 0.9%). Responses to des-Arg⁹-BK were measured using a tail-flick test prior to and 24 h after capsaicin injection.

Tail-flick test protocol

Experiments were always started in the morning at around 10:00 H AM. Awake rats were placed in a plastic

restraining box. The nociceptive threshold was taken as the reaction-time to remove the tail from a source of noxious heat stimulus using either a tungsten lamp or a hot water bath ($50 \pm 1^\circ\text{C}$) [33]. The average tail-flick reaction times of control rats were 9.4 ± 0.2 s and 5.8 ± 0.3 s, when assessed with the tungsten lamp and the hot water bath as heat stimuli, respectively. A 25 s cut-off time was used to prevent tissue damage [31]. All rats were tested for a maximum of four consecutive days. During the first two days, rats received 10 μl of artificial cerebrospinal fluid (aCSF) as training experiments and to ensure that the intrathecal catheter was patent. On the subsequent days, each testing trial lasted 45 min and consisted of 9 measurements of tail-flick latency, spaced by 5 min intervals. The initial three measurements were used to determine baseline latency [31]. One minute prior to the 4th reading ($t = 15$ min), the vehicle (aCSF) or an inhibitor was i.t. injected. Twelve min later, the tested agonist (des-Arg⁹-BK) or substance P (SP) (as positive control) was administered through the same route ($t = 26$ min), and its effect on the tail-flick latency was measured 1 min later ($t = 27$ min). Three subsequent readings were made to assess the effect of the agonist on the nociceptive threshold. The study design for time and agonist doses (des-Arg⁹-BK, 9.6 nmol; SP, 6.6 nmol) was based on previous studies showing that SP and des-Arg⁹-BK evoke a transient 5-10 min thermal hyperalgesia that peaks 1 min post-injection [1,31,34]. Drugs and tested agonists were intrathecally injected using a 50 μl Hamilton syringe with a total volume of 10 μl . The catheter, with a void volume of 10 μl , was immediately flushed after drug injection by the administration of 15 μl aCSF.

Pharmacological treatments

The hyperalgesic response induced by SP and des-Arg⁹-BK in the tail-flick test was characterized by determining the effects of the following selective antagonists/inhibitors (10 $\mu\text{g}/\text{site}$) administered intrathecally 15 min prior to the agonist: nitric oxide synthase (NOS): L-N^G-Nitroarginine (L-NNA) [35], neurokinin-1 (NK-1) receptor: [Miro-1 (methoxy-2 phenyl)-2ethyl]-2 diphenyl-7.7 perhydroisoindolone-4-(3aR, 7aR) (RP-67580) [36], and N-methyl-D-aspartic acid (NMDA) receptor: D, L-2-amino-5-phosphonovaleric acid (DL-AP5) [37]. SSR240612 was used in this study as a selective and orally active B₁R antagonist. Dosage of SSR240612 (10 mg/kg, 3 h pre-treatment) was based on previous studies showing that: i) des-Arg⁹-BK-induced paw oedema in mice is inhibited by 1 h pre-treatment with 3 and 10 mg/kg, p.o. of SSR240612 [38], and ii) allodynia and high systolic blood pressure induced by insulin resistance are prevented by a 3 h pre-treatment with SSR240612 (IC₅₀ of 5.5-7.1 mg/kg) [4,39]. Finally, we

used two generations of TRPV1 antagonists (capsazepine and SB-366791) [16] to unequivocally demonstrate that capsaicin effects are attributable to TRPV1 stimulation. Capsazepine was administered intraperitoneally 1 h before capsaicin challenge at a dose of 10 mg/kg [40] or intrathecally at a dose of 10 $\mu\text{g}/\text{site}$ [41]. SB-366791 [N-(3-methoxyphenyl)-4-chlorocinnamide] is known as a more selective and more potent TRPV1 antagonist than capsazepine [42]. SB-366791 was administered intraperitoneally 1 h before capsaicin challenge at a dose of 1 mg/kg [43] or intrathecally at a dose of 30 $\mu\text{g}/\text{site}$ [44].

Antioxidant treatment

Rats without intrathecal catheter received every day for a period of 1-week the potent antioxidant N-acetyl-L-cysteine (NAC) (1 g/kg/d) or the vehicle (sterile water) by gavage [8]. On the 6th day of treatment with NAC, rats received a single injection of capsaicin (15 mg/kg, s.c.) or its vehicle. Rats were sacrificed 24 h later under inhalation with CO₂.

Tissue preparation for autoradiography and microscopy

Twenty-four hours after capsaicin treatment, rats were anaesthetised with CO₂ inhalation and then decapitated. Lower-lumbar (L3-L6) spinal cord was removed and frozen in 2-methylbutane (cooled at $-55 \pm 5^\circ\text{C}$ with liquid nitrogen) and stored at -80°C . Spinal cords were mounted in a gelatin block and serially cut into 20- μm thick coronal sections with a cryostat. The sections were thaw-mounted on 0.2% gelatin-0.033% chromium potassium sulfate-coated slides and kept at -80°C for 1 month to allow sections adhesion to the coverslip glasses.

Quantitative autoradiography

The density of kinin B₁R binding sites was measured with the radioligand [¹²⁵I]-HPP-desArg¹⁰-Hoe140 (3-(4-hydroxyphenyl) propionyl-desArg⁹-D-Arg⁰[Hyp³, Thi⁵, D-Tic⁷, Oic⁸]bradykinin) used at a concentration of 200 pM (specific activity: 2000 cpm/fmol) as described previously [3,8,15,29]. Non-specific binding was determined for each capsaicin doses in the presence (1 μM) of the selective B₁R antagonist R-715 (AcLys[D- β Nal⁷, Ile⁸]des-Arg⁹-BK) [45]. Scientific Imaging Films BIOMAX™ MR® (Amersham Pharmacia Biotech Canada) were juxtaposed onto the slides in the presence of [¹²⁵I]-microscales and exposed at room temperature for 7 days. Autoradiograms were quantified by densitometry using an MCID™ image analysis system (Imaging Research, St. Catharines, ON, Canada). Briefly, twenty measurements were made throughout the spinal cord dorsal horn in 3 to 8 rats per group. A standard curve from [¹²⁵I]-microscales was used to convert density levels into femtomoles per milligram of protein [46]. Specific

binding was determined by subtracting values of non-specific binding from that of total binding.

Confocal microscopy

The exhaustive protocol and specificity of the fluorescent B₁R agonist have been described elsewhere [29]. Sections were dissected out under a binocular microscope to specifically isolate the spinal cord dorsal horn. Briefly, unfixed 20- μ m sections were exposed for 90 min to 50 μ M [N ^{α} -bodipy]-des-Arg⁹-BK (N ^{α} -4,4,-difluoro-5,7-dimethyl-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacene-3-propionic acid succinimidyl ester-des(Arg⁹)-bradykinin) to label the B₁R. Slices were then incubated with a blocking buffer (25 mM PIPES buffer supplemented with 3% bovine serum albumin (BSA) and 3% donkey serum) to prevent non-specific labeling. Antibody was diluted in blocking buffer. Rabbit anti-ionized calcium binding adapter molecule 1 (anti-Iba-1, Wako, Richmond, VA, Cat No: #019-19741) at a concentration of 2 μ g/ml was used to label microglia [30]. The secondary antibody was rhodamine anti-rabbit 1:500 (Chemicon, Hornby, ON, Cat No: # R-6394).

Measurement of superoxide anion

In situ levels of O₂ in the spinal cord were evaluated with the oxidative fluorescent dye dihydroethidium (DHE) as described earlier [47]. Cells are permeable to DHE which specifically react with O₂ to produce ethidium bromide (EtBr) which is trapped by intercalation with DNA. EtBr is excited at 518 nm with an emission spectrum of 605 nm. Twenty-four hours post-capsaicin, rats were anaesthetized with CO₂ inhalation and then decapitated. The lumbar spinal cord (L3-L6) was isolated and serially cut into 20- μ m thick sections and placed on glass slides. On the day of experiment, slides were exposed for 30 min in a light-protected humidified chamber at 37°C to DHE (2 μ M) for superoxide anion labeling and to TO-PRO-3 1:5000 (Molecular Probes, Eugene, OR, USA) for DNA staining. Sections were then washed 3 times in sterile phosphate buffered saline (PBS, pH7.4), coverslipped and observed using a confocal microscope (Leica Microsystem Co., Germany). Slides from the four groups (control, control + NAC, capsaicin-treated, capsaicin-treated + NAC) were processed and imaged in parallel. Laser settings were identical for acquisition of images from all sections. Computer based analysis was performed with Image J software and calculated using the following equation: $I = \frac{\sum I}{A/N}$, where I is the fluorescence intensity, $\sum I$ is the summation of all nuclei intensity, A is the total area of the nuclei, and N is the number of nuclei used [47]. Data are expressed as an average of total nuclei fluorescence quantified on at least 4 nuclei/section on 4 sections/rat from 4 different rats. Positive pixels regarding the co-

localisation of B₁R and Iba-1 were determined following the subtraction of mean pixel background level intensity from total pixels.

SYBR green-based quantitative real-time PCR

Twenty-four hours after capsaicin injection, rats were anaesthetized with CO₂ inhalation and then decapitated. Cervical (C2-C4), thoracic (T3-T5) and lumbar spinal cord (L3-L6) segments were isolated and approximately 10 mg of tissue were put in RNAlater stabilization reagent (QIAGEN, Valencia, CA, USA). The protocol for mRNA extraction, cDNA generation, SYBR green-based quantitative RT-PCR and quantification has been described elsewhere [29]. The PCR conditions were as follows: 95°C for 15 min, followed by 46 cycles at 94°C for 15 s, 60°C for 30 s and 72°C for 30 s. Real-time PCR primer pairs were designed using Vector NTI and are presented in Table 1.

Western blot

The extensive procedure has been described elsewhere [48]. Briefly, 24 h after capsaicin treatment, rats were anaesthetized with CO₂ inhalation and then decapitated. The lumbar spinal cord (L3-L6) was isolated and approximately 50 mg of tissue were put in PBS containing a cocktail of proteases inhibitors (Sigma-Aldrich, Canada). Antibodies against B₁R, p65NF- κ B and dynein (internal control) are presented in Table 2.

Drugs and solutions

Des-Arg⁹-BK and SP were purchased from Bachem Bioscience Inc. (King of Prussia, PA, USA). RP-67580 and SB-366791 were purchased from Tocris Cookson Inc (Ellisville, MO, USA). The B₁R antagonist, SSR240612 [(2R)-2-[[[(3R)-3-(1,3-benzodioxol-5-yl)-3-[[[(6-methoxy-2-naphthyl)sulfonyl]amino]propanoyl]amino]-3-(4-[[[2R,6S]-2,6-dimethylpiperidinyl]methyl]phenyl)-N-isopropyl-N-methylpropanamide,fumarate], was kindly provided by Sanofi-Aventis (Montpellier, France). HPP-des-Arg¹⁰-Hoe140 was synthesized at the Research Institute of Biotechnology, National Research Council of Canada (Montreal, Qc, Canada). R-715 was kindly provided by Dr Fernand Gobeil (Pharmacology, University of Sherbrooke, Sherbrooke, Qc, Canada). [N ^{α} -bodipy]-des-Arg⁹-BK was synthesized by Dr. Pierrrette Gaudreau (Research Center CHUM, Université de Montréal, Montréal, Qc, Canada) [29]. Dihydroethidium was obtained from Molecular Probes (Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA, USA) and suspended in DMSO at a concentration of 10⁻³ M, and stored at -20°C until use. Capsaicin, capsazepine, NAC, DL-AP5 and L-NNA were purchased from Sigma-Aldrich Canada, Ltd (Oakville, ON, Canada). For i.t. injections, SP, des-Arg⁹-BK, DL-AP5, L-NNA, RP-67580, SB-366791 and capsazepine

Table 1 Real-time PCR primer pairs.

		Sequences		Position			Gen Bank
18 S forward	5'	TCA ACT TTC GAT GGT AGT CGC CGT	3'	363	-	386	X01117
18 S reverse	5'	TCC TTG GAT GTG GTA GCC GTT TCT	3'	470	-	447	
B ₁ receptor forward	5'	GCA GCG CTT AAC CAT AGC GGA AAT	3'	367	-	391	NM_030851
B ₁ receptor reverse	5'	CCA GTT GAA ACG GTT CCC GAT GTT	3'	478	-	454	
IL-1 β forward	5'	TGT CAC TCA TTG TGG CTG TGG AGA	3'	247	-	270	NM_031512
IL-1 β reverse	5'	TGG GAA CAT CAC ACA CTA GCA GGT	3'	411	-	388	
TNF- α forward	5'	ATG ATC CGA GAT GTG GAA CTG GCA	3'	160	-	183	NM_012675
TNF- α reverse	5'	AAT GAG AAG AGG CTG AGG CAC AGA	3'	257	-	234	

were dissolved in aCSF while SB-366791 and capsazepine were dissolved in sterile saline for i.p. injections. SSR240612 was dissolved in dimethyl sulfoxide (DMSO, 0.5% v/v), ethanol (5% v/v) and Tween-80 (5% v/v). The solution was completed in distilled water. The drug was administered orally by gavage in a volume of 1 ml per 100 g of body weight [39]. Capsaicin was solubilized in a mixture of 10% ethanol, 10% Tween-80 and 80% saline 0.9%.

Statistical analysis

Data were expressed as means \pm S.E.M. of values obtained from *n* rats. Only one treatment was given to a rat. For the tail-flick test, data were calculated as a percentage of the maximum possible effect (% MPE) according to the following formula: % MPE = 100 \times (drug latency minus baseline latency/cut-off time minus baseline latency) [1]. Statistical significance was determined with Student's *t*-test for paired samples or with one-way analysis of variance (ANOVA) followed by the Bonferroni post-test for multiple comparisons. Data for DHE labelling intensity were analysed with the non-parametric Kruskal-Wallis post-test. Probability (P) values less than 0.05 were considered to be statistically significant.

Results

Increased B₁R expression by capsaicin-induced TRPV1 activation

A 24-h-capsaicin treatment (10-50 mg/kg, s.c.) increased significantly B₁R mRNA levels in rat lumbar spinal cord when compared with vehicle-treated rats. A dose of 15

mg/kg caused the highest increase of gene expression (500-fold) at 24 h and the effect was almost gone at 48 h (Figure 1). In comparison, a dose of 50- mg/kg capsaicin caused a smaller enhancing effect on B₁R mRNA, which peaked at 8 h and declined thereafter (Figure 1B). The increasing effect of 15 mg/kg capsaicin on B₁R mRNA was significantly less at the thoracic (T4) and cervical (C2) spinal cord levels (Figure 2). Intrathecal capsaicin (1 μ g/site) reproduced to some extent the effects of systemic capsaicin, as it significantly increased B₁R mRNA in the lumbar spinal cord in comparison with vehicle-treated rats 24 h post-treatment (Figure 3).

Capsaicin-induced B₁R up-regulation is likely associated with TRPV1 activation as the increased B₁R mRNA expression evoked by 15 mg/kg capsaicin was prevented by capsazepine (10 mg/kg, i.p. or 10 μ g/site, i. t.) and SB-366791 (1 mg/kg, i.p. or 30 μ g/site, i.t.), when injected 1 h beforehand (Figure 4).

Contrarily to B₁R mRNA levels, the density of B₁R binding sites was dose-dependently increased at 15 and 50 mg/kg capsaicin (Figure 5). As depicted on autoradiograms, B₁R binding sites were displayed throughout the grey matter of spinal cord in capsaicin-treated rats and poorly in white matter. Such a distribution is in accordance with B₁R expression on spinal cord projecting C-fibres, astrocytes and microglia [29].

Effect of des-Arg⁹-BK on tail-flick latency in capsaicin-treated rats

The functionality of the B₁R which is up-regulated by capsaicin in the spinal cord was assessed on thermal nociception. Intrathecal injection of des-Arg⁹-BK (9.6 nmol/site)

Table 2 Western Blot primary and secondary antibodies.

Primary antibodies	Molecular weight	Dilution	Source
rabbit polyclonal anti-rat B ₁ R	37 kDa	1:1000	Réjean Couture's Laboratory [48]
rabbit polyclonal anti-rat p65NF- κ B	65 kDa	1:1000	SantaCruz Biotechnology (Cat number Sc-8008)
mouse monoclonal anti-rat dynein	70 kDa	1:20000	SantaCruz Biotechnology (Cat number Sc-13524)
Secondary antibodies	Protein detected	Dilution	Source
HRP-linked goat anti-rabbit	B ₁ R, p65NF- κ B	1:5000	SantaCruz Biotechnology (Cat number Sc-2077)
HRP-linked goat anti-mouse	dynein	1:5000	SantaCruz Biotechnology (Cat number Sc-2005)

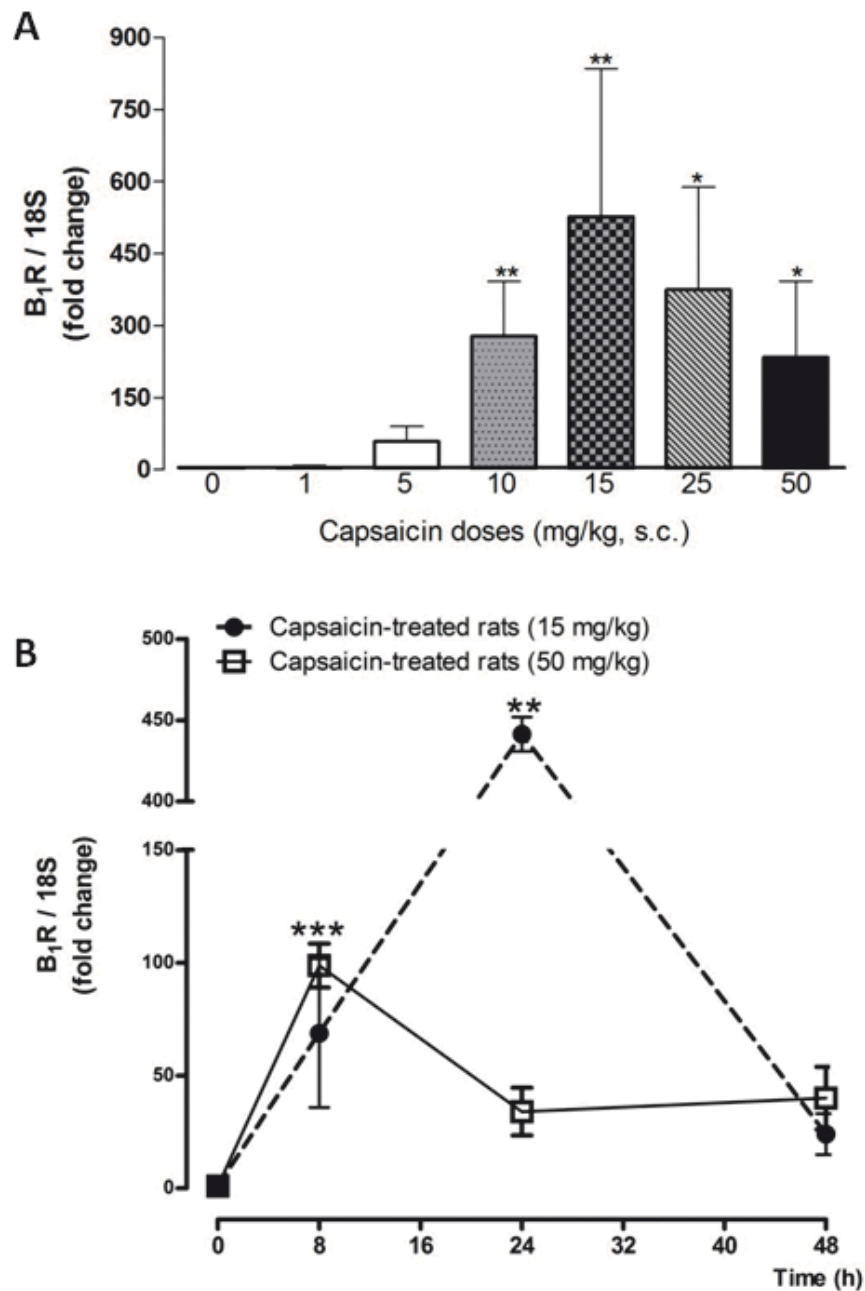


Figure 1 (A) Changes of B₁R mRNA levels in the lumbar spinal cord of capsaicin-treated rats (0-50 mg/kg, s.c.). Data represent the means ± S.E.M. of 4 to 7 rats per group (a single dose of capsaicin per group, 24 h earlier). Comparison with the 0 mg/kg group is indicated by * P < 0.05; ** P < 0.01. **(B)** Time-course effect (0 - 48 h) of 15 mg/kg (●) and 50 mg/kg (□) capsaicin on lumbar spinal cord B₁R mRNA expression levels. Data represent the means ± S.E.M. of 4 rats per group. Comparison with the 0 h group (*) is indicated by ** P < 0.01; *** P < 0.001. Shown are the responses in rats housed under constant light (A) or a 12 h-12 h light-dark cycle (B).

failed to alter nociceptive threshold in control (vehicle) rats or in rats treated with capsaicin at doses of 1 and 5 mg/kg, 24 h earlier (Figure 6A). However, the B₁R agonist dose-dependently decreased the tail-flick latency in rats

treated with doses from 10 to 50 mg/kg capsaicin. The hyperalgesic response to the B₁R agonist peaked 1 min post-injection (-30%) and lasted about 5-10 min in rats pre-treated with 15 mg/kg capsaicin (Figure 7). The

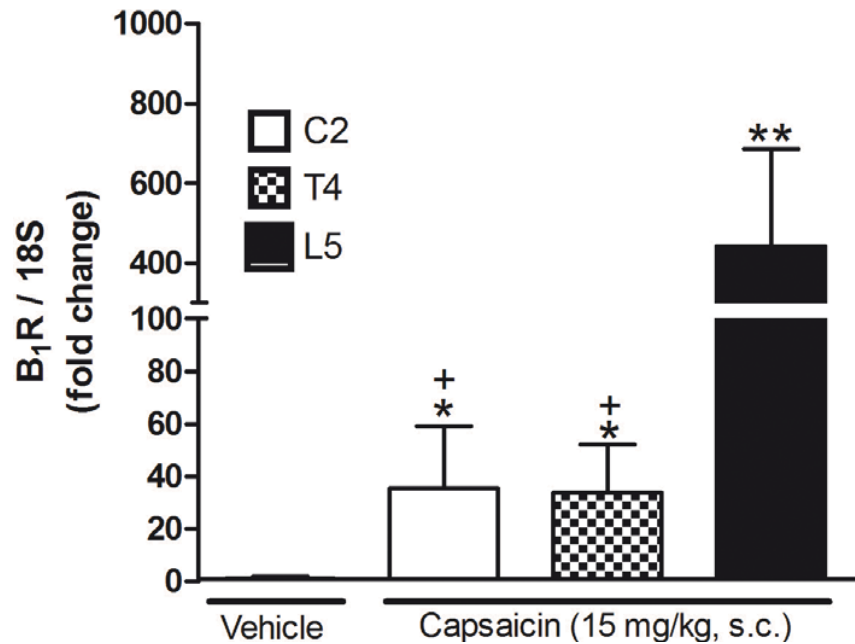


Figure 2 Effect of 24 h capsaicin (15 mg/kg, s.c.) or its vehicle on B₁R mRNA expression levels in cervical (C2), thoracic (T4) and lumbar (L5) segments of rat spinal cord. Data represent the means \pm S.E.M. of 4 rats per group. Comparison with vehicle (*) or lumbar segment (+) is indicated by +, * P < 0.05; ** P < 0.01.

hyperalgesic response to des-Arg⁹-BK was similar in intensity, onset and duration than that evoked by substance P (6.6 nmol/site, i.t.) [1,31,34]. Des-Arg⁹-BK-induced thermal hyperalgesia in capsaicin-treated rats was completely

prevented by the selective B₁R antagonist SSR240612 (10 mg/kg, p.o.) (Figure 6B) and by both TRPV1-selective antagonists: capsazepine (10 mg/kg, i.p. or 10 μ g/site, i.t.) and SB-366791 (1 mg/kg, i.p. or 30 μ g/site, i.t.) when

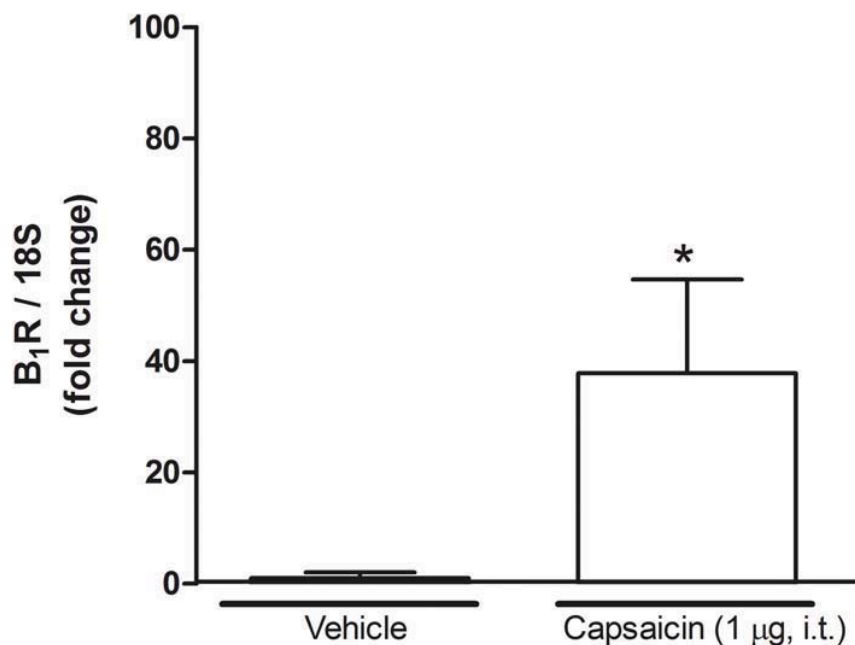
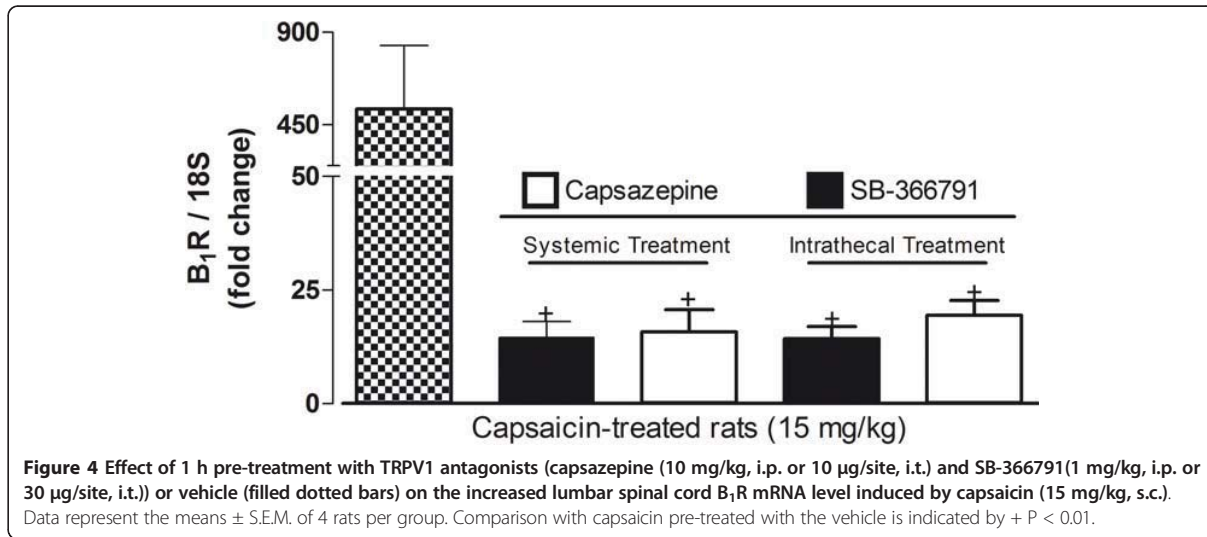
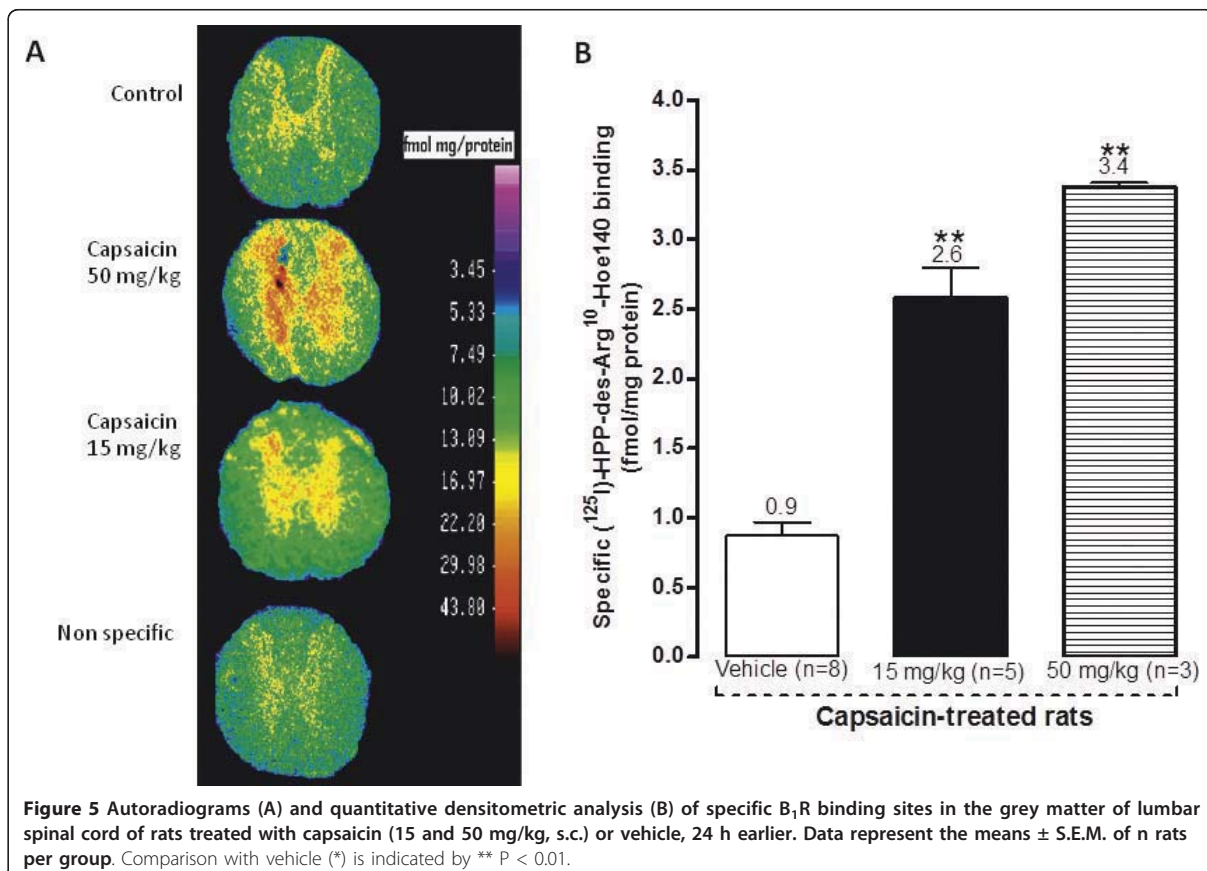


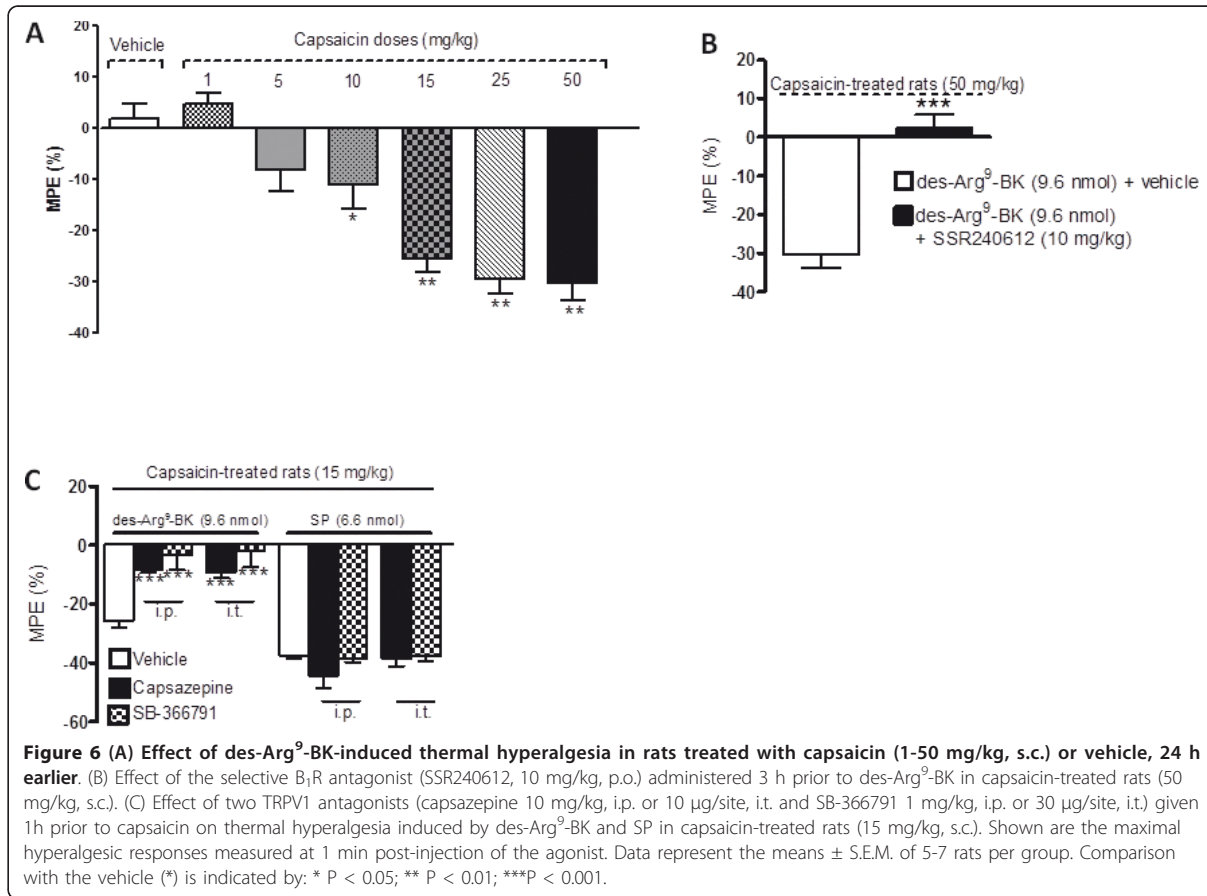
Figure 3 Effect of intrathecally injected capsaicin (1 μ g/site, 24 h) or its vehicle on B₁R mRNA expression level in lumbar spinal cord. Data represent the means \pm S.E.M. of 4 rats per group. Comparison with vehicle (*) is indicated by * P < 0.05.



injected 1 h prior to capsaicin (Figure 6C). In contrast, similar treatments with TRPV1 antagonists did not affect the hyperalgesic response induced by substance P (6.6 nmol/site, i.t.), showing the specificity of the inhibition

(Figure 6C). The TRPV1 antagonists (capsazepine (10 mg/kg, i.p. or 10 µg/site, i.t.) and SB-366791 (1 mg/kg, i.p. or 30 µg/site, i.t.)) had no direct effect on baseline tail-flick reaction time in control rats (Figure 8).

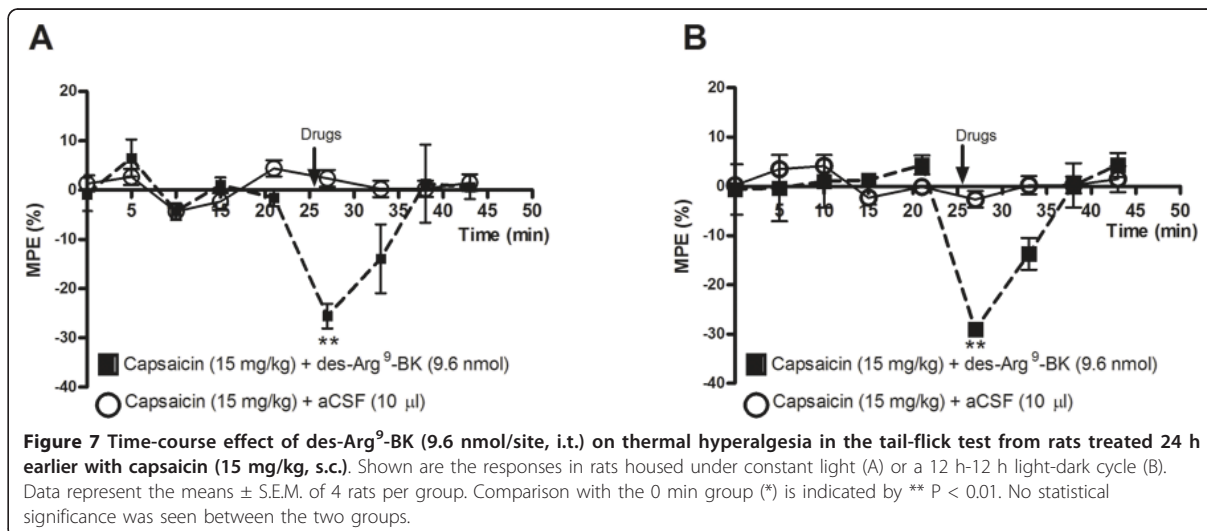


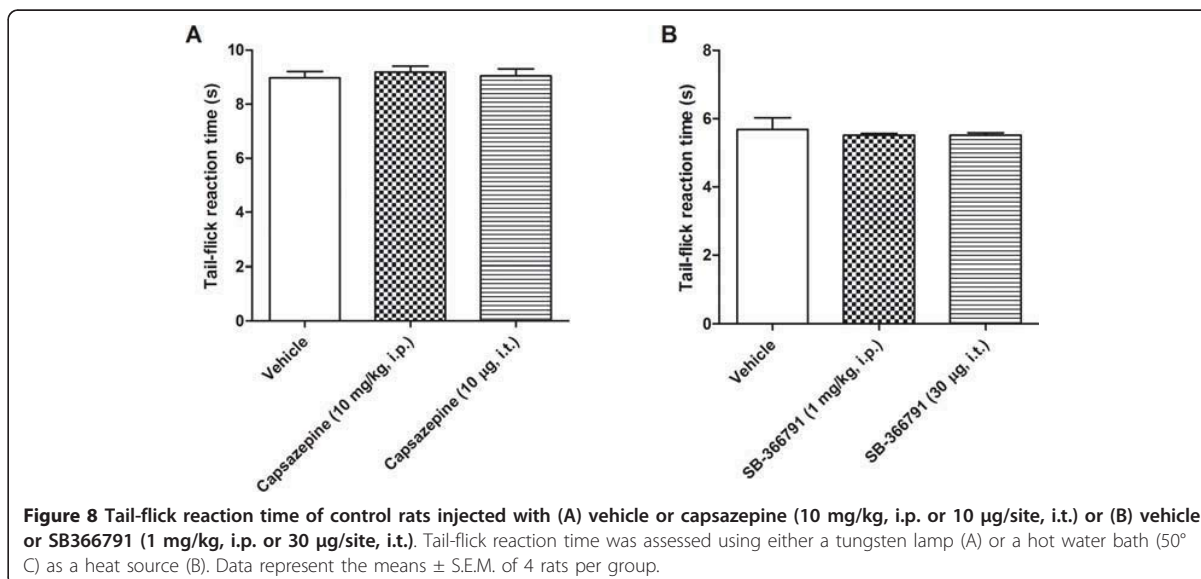


Housing conditions

Most of the current data were obtained in rats housed under constant light with the intent to prevent the release of endogenous opioid peptides [32] which could

interfere with the hyperalgesic response to substance P in the rat tail-flick test [31,34]. To confirm that the interruption of the circadian cycle by constant light did not corrupt our findings, we run a series of experiments





with a 12 h-12 h light-dark cycle. These data showed that the time-course pattern of B₁R agonist-induced thermal hyperalgesia in 15 mg/kg capsaicin-treated rats is similar in rats housed under constant light or under a standard 12 h-12 h light-dark cycle (Figure 7). Moreover, increased B₁R mRNA levels in the lumbar spinal cord of rats treated with capsaicin (15 and 50 mg/kg, 24 h) under continuous light (Figure 1A) were not significantly different from those measured in rats under the 12 h-12 h light dark-cycle (Figure 1B). Thus, these data confirm that constant light exposure does not interfere with our findings.

Mechanism underlying des-Arg⁹-BK-induced hyperalgesia

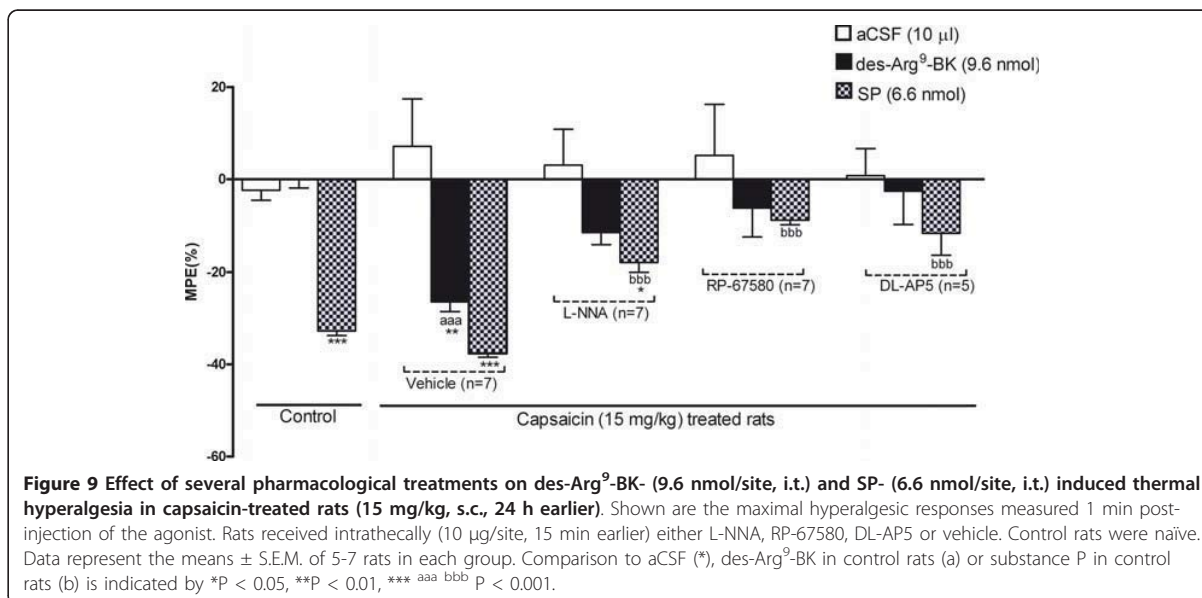
Whereas control rats treated with SP (6.6 nmol/site, i.t.) showed a significant decrease in tail-flick latency (-34%) when compared with aCSF (-2%), des-Arg⁹-BK (9.6 nmol/site, i.t.) had no effect (0%) (Figure 9). Significant decreases in tail-flick latency were, however, achieved with both des-Arg⁹-BK (-29%) and SP (-41%) in rats treated 24 h earlier with capsaicin (15 mg/kg, s.c.) in comparison with aCSF. A 15-min pre-treatment with either L-NNA (NOS inhibitor; 10 µg/site, i.t.), RP-67580 (NK-1R antagonist; 10 µg/site, i.t.) or DL-AP5 (NMDA-R antagonist; 10 µg/site, i.t.) inhibited significantly the response to both des-Arg⁹-BK and SP. Whereas these inhibitors had no direct effect in control rats (data not shown), they caused antinociceptive effects in capsaicin-treated rats (+51% for L-NNA; +29% for RP-67580 and +9% for DL-AP5). Note that MPE was calculated from baseline values obtained after inhibitor/antagonists administration.

Microglial localisation of B₁R in the spinal dorsal horn of capsaicin-treated rats

As shown in Figure 10, immunofluorescence to the specific marker of microglia Iba-1 (red, A) and fluorescent labeling with the specific B₁R agonist [N^α-bodipy]-des-Arg⁹-BK (green, B) were co-localized (yellow, C) in spinal cord dorsal horn of capsaicin-treated rats (15 mg/kg, s.c., 24 h earlier). Note that 87 ± 4% of B₁R-positive pixels co-localized with Iba-1-positive pixels, suggesting that B₁R induced by capsaicin is mostly expressed by lumbar spinal cord microglia.

Increased superoxide anion production and NF-κB activation in the spinal cord of capsaicin-treated rats

This series of experiments aimed to determine the contribution of oxidative stress to the induction of B₁R following TRPV1 activation. DHE staining (red staining, Figure 11C) was significantly increased in nuclei (labelled with TO-PRO-3 in blue) in the spinal dorsal horn of rats treated with capsaicin (15 mg/kg, s.c., 24 h earlier) when compared with control spinal cord (Figure 11A). This increase was abolished by a 1-week pre-treatment with NAC (1 g/kg/d) (from 1.46 ± 0.21 to 0.74 ± 0.12 a.u.) (Figure 11D). In contrast, NAC treatment had no significant effect on DHE staining in control spinal cord (Figure 11B). This is in relation with the increased protein expression of B₁R in the spinal cord of capsaicin-treated rats, which was also prevented by pre-treatment with NAC (Figure 12). These data thus suggest that oxidative stress is involved in the induction of B₁R by TRPV1 stimulation. To determine the contribution of NF-κB in this process, expression of p65NF-κB was



determined. Capsaicin-treatment caused a non-significant increase of p65NF- κ B when compared with control spinal cords. However, NAC treatment (1 g/kg/d \times 7 days) reduced significantly p65NF- κ B expression in the spinal cord of capsaicin-treated rats. NAC had no effect in control spinal cord p65NF- κ B expression (Figure 12).

Changes of IL-1 β and TNF- α mRNA levels in the spinal cord of capsaicin-treated rats

To further determine the mechanism of B₁R induction by capsaicin, spinal cord mRNA levels of pro-inflammatory cytokines (IL-1 β and TNF- α) known to induce B₁R were assessed using real-time PCR (Figure 13). These data show a significant increase in IL-1 β mRNA expression (40-fold) in the spinal cord of capsaicin-treated rats (15 mg/kg, s.c.) when compared with control. This induction was prevented by the selective TRPV1 antagonist capsazepine (10 mg/kg, i.p.) administered 1 h prior to capsaicin. In contrast, TNF- α mRNA levels were unaffected by the three doses of capsaicin. Spinal cord B₁R and IL-1 β mRNA levels following capsaicin challenge were highly correlated ($R^2 = 0.996$) while mRNA levels of B₁R and TNF- α ($R^2 = 0.562$) were not correlated.

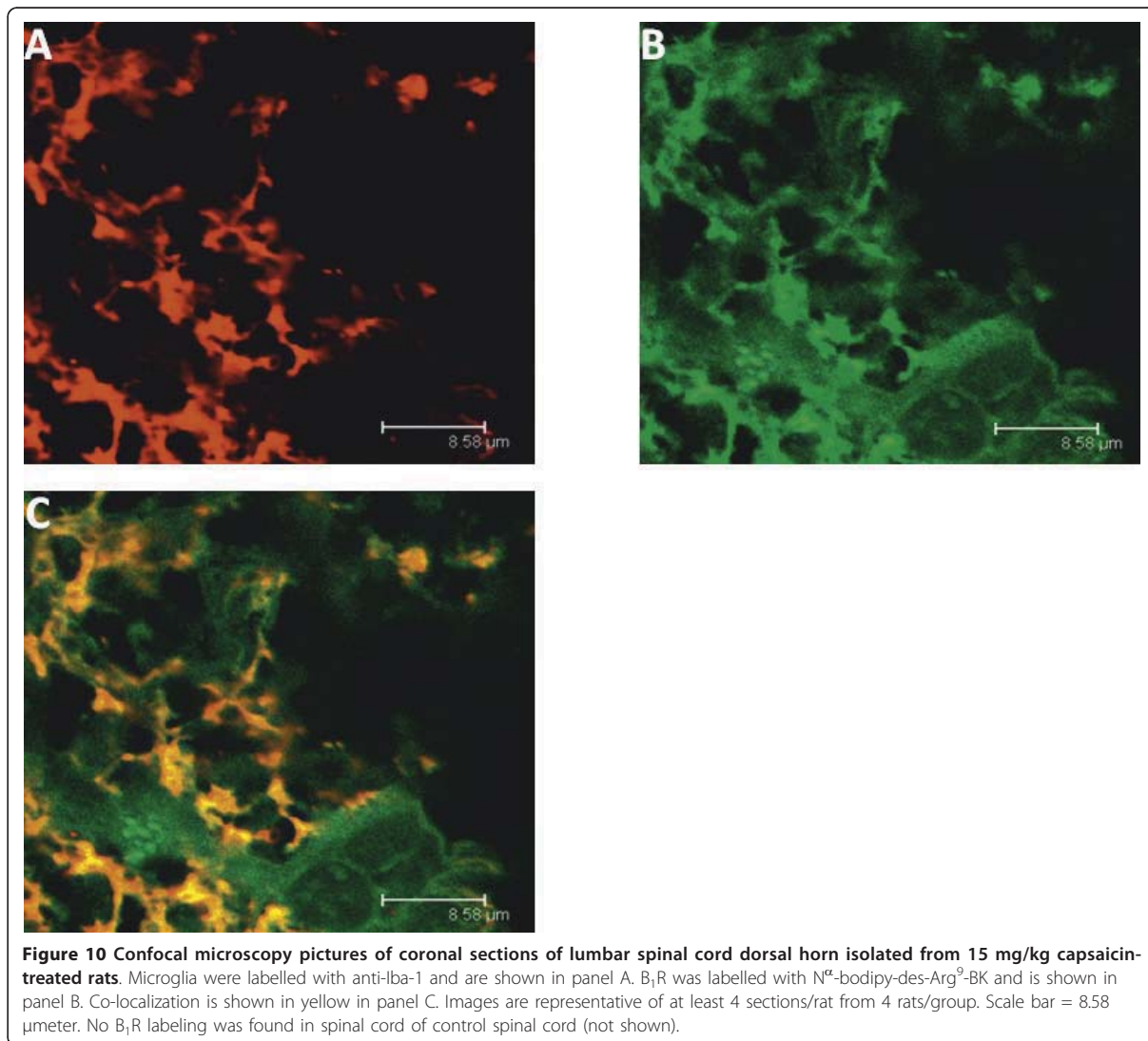
Discussion

The present study provides the first pharmacological evidence that the B₁R (mRNA and protein levels) can be induced and up-regulated in rat spinal cord after systemic or spinal activation of TRPV1 by capsaicin. The B₁R induction mechanism involves oxidative stress, pro-inflammatory cytokines and the NF- κ B pathway.

Activation of TRPV1 on primary sensory afferents and microglial cells can enhance superoxide anion production [26,28], which is known to induce B₁R expression in various tissues [4,8,15]. Hence, the involvement of oxidative stress in the induction of B₁R by TRPV1 is consistent with these latter studies, as shown with N-acetyl-L-cysteine treatment that prevented the increased expression of B₁R and superoxide anion levels in the spinal cord of capsaicin-treated rats. Functionality of the B₁R was demonstrated in thermonociception. The hyperalgesic response to intrathecally injected B₁R agonist was ascribed to the intraspinal release of NO and activation of NK-1R and NMDA-R, as previously reported following spinal activation of B₁R in streptozotocin-diabetic rats [1]. The presence of B₁R in spinal cord microglia is consistent with the emerging role of microglial B₁R in pain neuropathy [29,30,49].

TRPV1 activation and inhibition

In this study, TRPV1 was activated with increasing doses of the lipophilic molecule capsaicin, the active pungent ingredient of hot chilli peppers [50]. Capsaicin's actions are classified into TRPV1-mediated actions (including some side effects) and TRPV1-independent effects. TRPV1-mediated side effects include desensitisation (depletion of SP and CGRP) of C and A δ neurons following sub-chronic capsaicin treatment, and neuronal apoptosis (calcium neurotoxicity) after chronic treatment with high capsaicin doses [50]. As reviewed by the latter authors, capsaicin TRPV1-independent effects include: alteration of membrane fluidity [51], inhibition of platelet aggregation [52], and toxicity to non-TRPV1

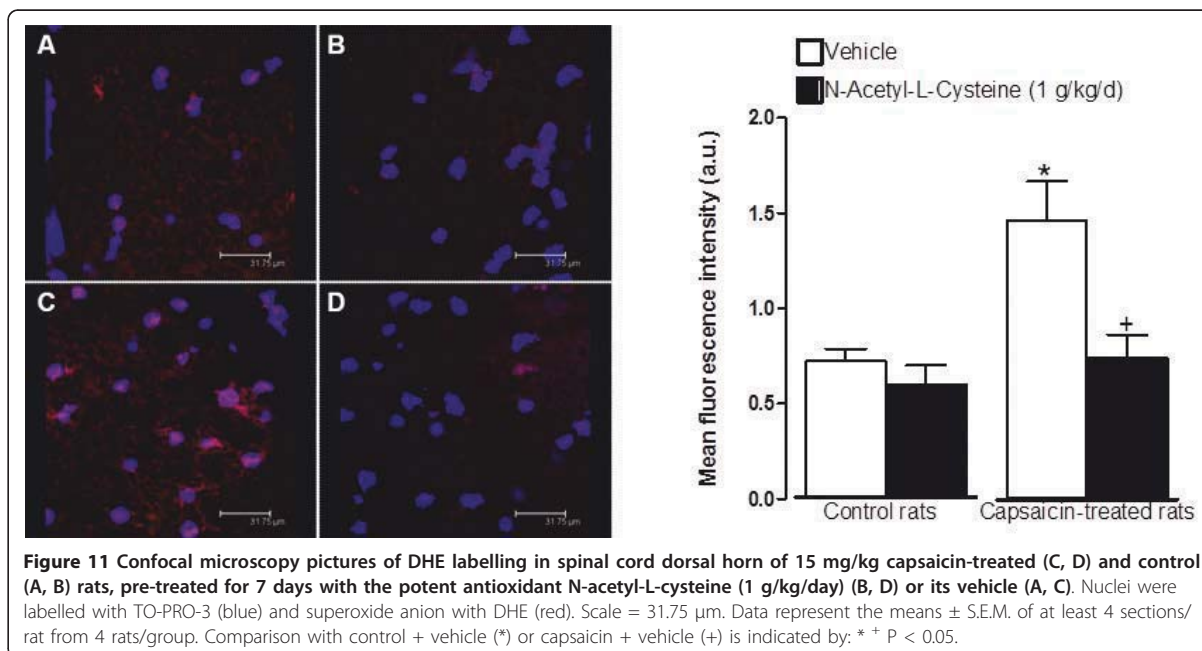


neurons [53]. Hence, to ascertain that the enhancing effect of capsaicin on B₁R expression is truly mediated by TRPV1 activation, two classes of TRPV1 antagonists (capsazepine and SB-366791) were used [16]. Although high doses of capsazepine can block neuronal voltage-gated calcium channels [54], it has also been shown that capsazepine is 10-100 times more potent for TRPV1 than for its off-target [54]. Secondly, we selected SB-366791 which is known as a more selective and more potent TRPV1 antagonist than capsazepine [42]. Recently, it has been broadly employed as a selective TRPV1 antagonist in pain research [55]. In addition to blocking B₁R up-regulation induced by capsaicin, capsazepine and SB-366791 reversed selectively des-Arg⁹-BK-induced hyperalgesia without affecting SP-induced hyperalgesia. As additional evidence of specificity,

systemic and intrathecal treatments with TRPV1 antagonists (capsazepine and SB-366791) had no direct effect on baseline latency in the tail-flick test. Collectively, these findings strongly suggest that the induction of B₁R by capsaicin is attributable to TRPV1 stimulation.

Localisation of B₁R and site of action for capsaicin

Using a fluorescent B₁R ligand, B₁R was mostly found (87% of positive cells) in microglial cells in the lumbar spinal cord dorsal horn of capsaicin-treated rats. Such a cellular localisation on migratory cells can explain the widespread distribution of B₁R binding sites in all spinal cord laminae. The significant increase of B₁R mRNA in the spinal cord of capsaicin-treated rats also supports a spinal site rather than a peripheral site (DRG) for B₁R synthesis.



The induction of B_1R was largely restricted to lumbar spinal cord segments innervated by peripheral nociceptors in the stimulated region, suggesting a contribution of peripheral TRPV1 to the induction of B_1R in the spinal cord. The enhanced expression of B_1R on rostral segments (T4 and C2) of the spinal cord could be due to the expression of B_1R on migratory microglial cells after stimulation of sensory fibers by capsaicin.

Our data also suggest that induction of B_1R by capsaicin is mediated by a central mechanism since TRPV1 antagonists administered intrathecally prevented B_1R mRNA expression and B_1R -stimulated thermal hyperalgesia. Capsaicin and capsaizepine are lipophilic molecules and SB-366791 is likely to pass the blood-brain barrier as well [56]. Therefore, systemically administered capsaicin is thought to enter the spinal cord to stimulate TRPV1 located on central sensory terminals, astrocytes [56] and microglia [56]. Supporting the latter assumption, we showed that 1 μ g of capsaicin directly injected into lumbar spinal cord caused a significant increase in B_1R mRNA, showing that centrally expressed TRPV1 cells can trigger B_1R expression.

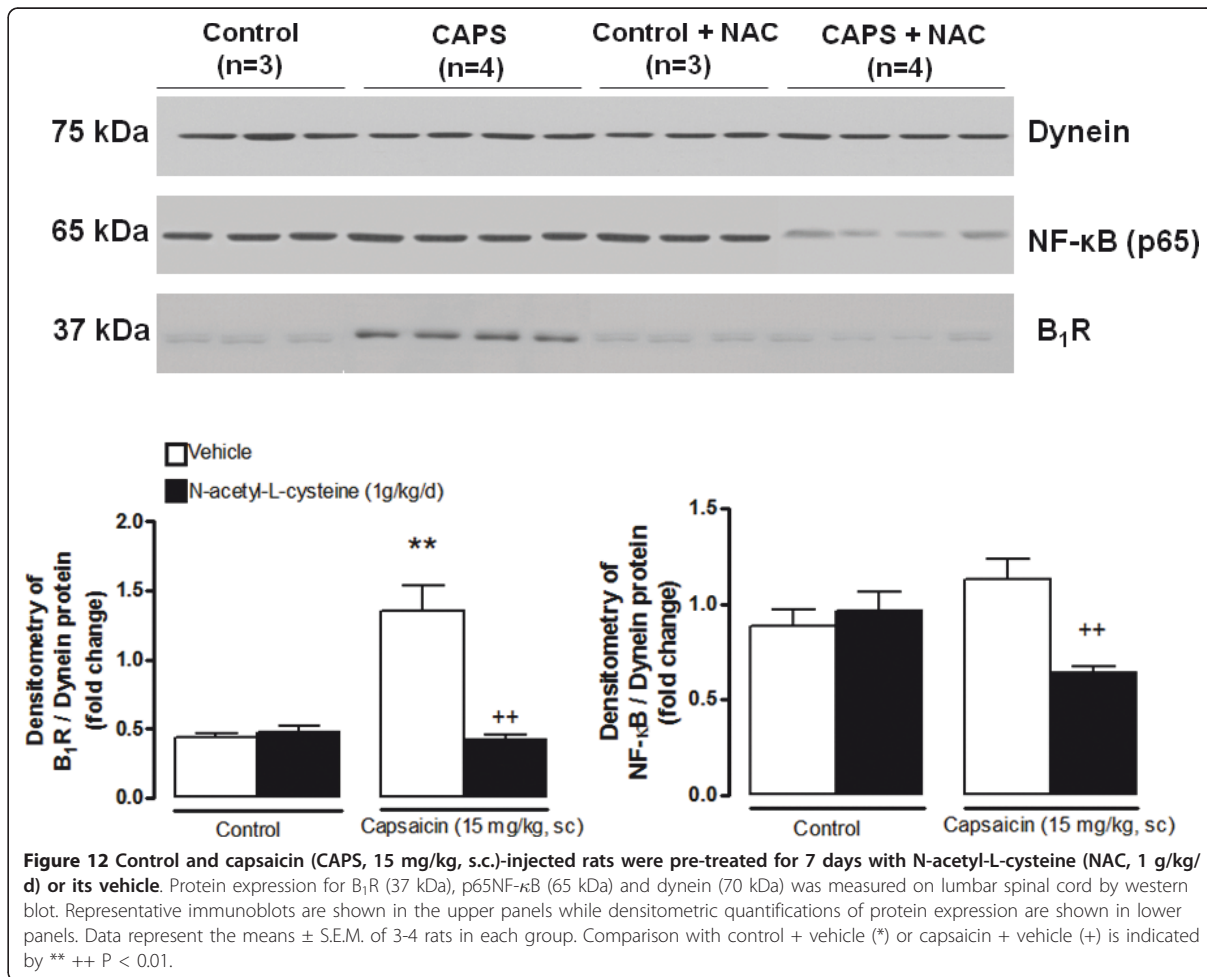
B_1R mRNA expression patterns

Contrarily to B_1R mRNA expression, B_1R specific binding sites were shown to be maximally increased by 50 mg/kg capsaicin. This is congruent with the faster kinetics of B_1R mRNA expression after a dose of 50 mg/kg capsaicin in comparison with 15 mg/kg. As B_1R is hardly internalised or desensitised [6], its presence on

the cellular membrane can easily outlast the transient increase of mRNA in response to acute stimulation of TRPV1. Thus, B_1R mRNA changes do not reflect the expression of B_1R on the cellular membrane. The actual bell-shaped pattern of B_1R mRNA expression is not unique and has been observed in other models of acute inflammation induced by exposure to increasing concentrations of tobacco-smoke condensate [48,57].

Mechanism underlying B_1R induction

TRPV1-induced oxidative stress is suggested as the primary mechanism by which capsaicin induces B_1R . This is supported by the suppression of capsaicin-induced increase B_1R protein expression and NF- κ B activation by the 1-week treatment with the antioxidant N-acetyl-L-cysteine. This is in line with the findings of Ma et al. [26], which suggest that TRPV1 activation by capsaicin increases reactive oxygen species production in mouse dorsal root ganglion neurons. This can occur through increased cytosolic calcium influx and activation of NADPH oxidase [27]. N-acetyl-L-cysteine also prevented the increased superoxide anion production in the spinal cord of capsaicin-treated rats. It is noteworthy that N-acetyl-L-cysteine or a prolonged treatment with another antioxidant (alpha-lipoic acid) has been shown to prevent rat spinal cord B_1R induction in models of diabetes [8,15] and hypertension [58]. In a model of rat knee joint-induced arthritis, peripheral TRPV1 and centrally increased oxidative stress can enhance pro-inflammatory cytokines production [59], suggesting that these

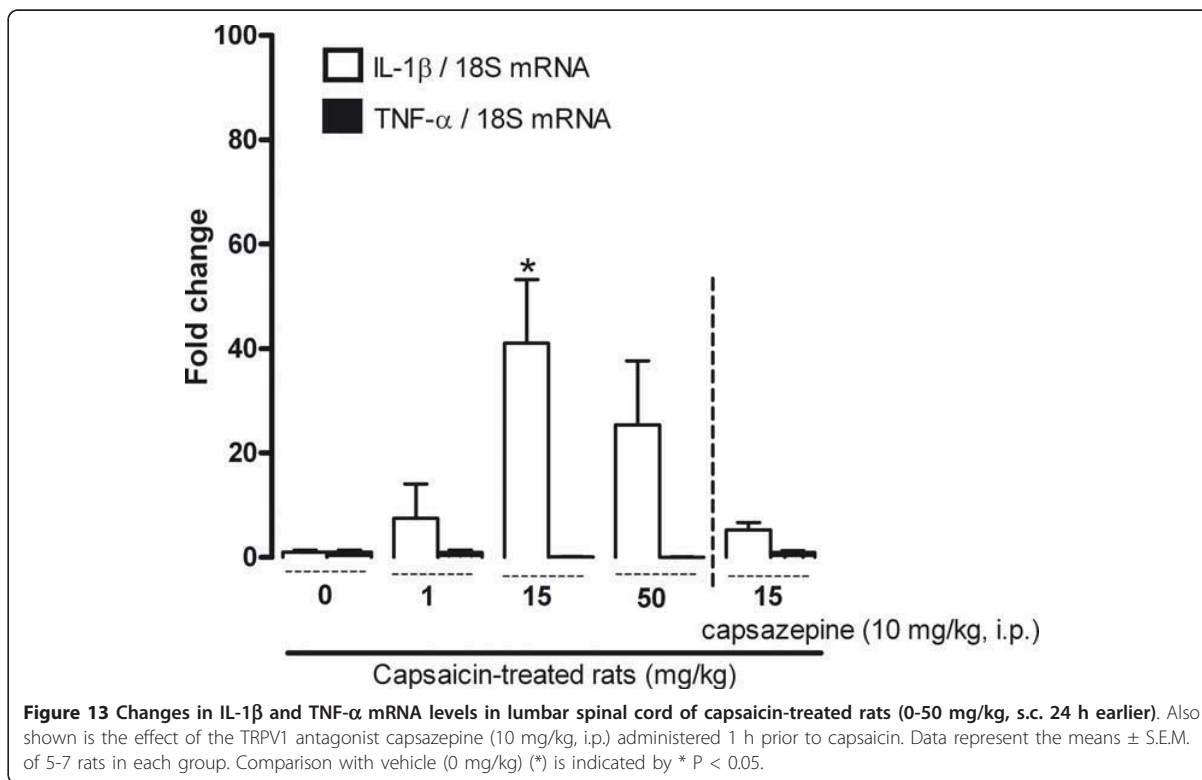


inflammatory molecules can also contribute to the effect of capsaicin on B₁R expression. Indeed, stimulation of TRPV1 causes the release of various pro-inflammatory cytokines, including interleukin-6 (IL-6) and IL-8 from human bronchial epithelial cells [60], IL-1β and transforming growth factor-β₂ from human ORS keratinocytes [61], IL-2, IL-4 and interferon-gamma from cultured murine Peyer's patch cells [62], or IL-6 release and NF-κB activation in dorsal horn TRPV1-expressing microglia [63]. Those pro-inflammatory cytokines could activate NF-κB translocation to the nucleus, thereby increasing B₁R expression [1,64,65]. One can suggest that cytokines may represent key mediators in the induction of B₁R following TRPV1 activation. As indirect evidence, we found that IL-1β mRNA levels are enhanced and highly correlated with B₁R mRNA levels following TRPV1 stimulation. In contrast, TNF-α is unlikely to be involved in B₁R expression as its mRNA level was unaffected by capsaicin administration. This is in agreement with data showing no correlation between

B₁R induction and TNF-α expression in tobacco smoke-induced lung inflammation [48].

B₁R activation led to thermal hyperalgesia

TRPV1 activation by capsaicin induced functional B₁R in the rat spinal cord. This is highlighted by the hyperalgesia induced by intrathecal administration of B₁R selective agonist (des-Arg⁹-BK) in capsaicin-treated rats. This response was inhibited by SSR240612, a highly selective and orally active B₁R antagonist [38]. In contrast, des-Arg⁹-BK had no effect on the nociceptive threshold in control rats which is congruent with its weak constitutive expression. The spinal cord activation of tachykinin NK-1 receptor with SP causes a hyperalgesic response in the tail-flick test which is associated with glutamate release and NO production. Indeed, blockade of NOS or NMDA receptor prevents thermal hyperalgesia induced by endogenous release of SP following noxious cutaneous stimulation or by intrathecal administration of SP [66-68]. The hyperalgesic response induced by SP has



the same time-course and amplitude as that induced by des-Arg⁹-BK. Also, our pharmacological analysis shows that the hyperalgesic response to B₁R agonist is likely mediated by endogenous release of NO and activation of NK-1R and NMDA-R. These spinal pro-nociceptive mediators appear to be tonically active in capsaicin-treated rats as their inhibition increased the nociceptive threshold. Hypoalgesia has also been reported with inhibition of NOS with L-NNA in streptozotocin-diabetic rats [1] or with NMDA receptor blockade [69]. Since the hyperalgesic response to SP in capsaicin-treated rats was not significantly altered, the hyperalgesic response to des-Arg⁹-BK is unlikely to be due to an upregulation of NK-1 receptors or increased SP response in the spinal cord of capsaicin-treated rats. The TRPV1 antagonists capsazepine and SB-366791 prevented the hyperalgesia induced by des-Arg⁹-BK but not that evoked by SP, suggesting that this inhibition is highly specific.

Conclusion

This study provides the first evidence that B₁R can be induced and up-regulated in microglia of spinal cord dorsal horn following activation of TRPV1 by capsaicin. This up-regulation is correlated with increased expression of IL-1β and involves ROS generation and the redox-regulated NF-κB pathway. The newly synthesized

B₁R is functional as its activation with an agonist caused thermal hyperalgesia which we attribute to the intraspinal release of NO and activation of NK-1R and NMDA-R. These findings support the possibility that microglial B₁R contributes to the effect of TRPV1 in inflammatory pain.

List of abbreviations

ANOVA: Analysis of variance; anti-Iba-1: anti-ionized calcium binding adapter molecule 1; aCSF: artificial cerebrospinal fluid; a.u.: arbitrary unit; BK: bradykinin; BSA: bovine serum albumin; DL-AP5: D,L-2-amino-5-phosphonopentanoic acid; DNA: Deoxyribonucleic acid; des-Arg⁹-BK: des-Arg⁹-bradykinin; DHE: dihydroethidium; DMSO: dimethyl sulfoxide; DRG: dorsal root ganglion; EtBr: ethidium bromide; GPCR: G-protein-coupled receptor; HPP-desArg¹⁰-Hoe140: 3-(4-hydroxyphenyl) propionyl-desArg⁹-D-Arg⁰[Hyp³, Thi⁵, D-Tic⁷, Oic⁸]bradykinin; IASP: International Association for the Study of Pain; IL-1β: interleukin-1 beta; i.t.: intrathecal; B₁R: kinin B₁ receptor; B₂R: kinin B₂ receptor; L-NNA: L-NG-Nitroarginine; MPE: maximum possible effect; mRNA: messenger RNA; NAC: N^α-L-acetylcysteine; NADPH: nicotinamide adenine dinucleotide phosphate-oxidase; NO: nitric oxide; NOS: nitric oxide synthase; NK-1: neurokinin-1; NMDA: N-Methyl-D-aspartic Acid; PCR: polymerase chain reaction; PBS: phosphate buffered saline; qRT-PCR: quantitative real-time PCR; R-715: AcLys[D-β-Nal⁷,Ile⁸]des-Arg⁹-BK; ROS: reactive oxygen species; SB-366791: N-(3-methoxyphenyl)-4-chlorocinnamide; RP-67580: Imiro-1 (methoxy-2-phenyl)-2-ethyl-2-diphenyl-7.7-perhydroisindolone-4-(3aR, 7aR); SSR240612: [(2R)-2-[[[(3R)-3-(1,3-benzodioxol-5-yl)-3-[[[6-methoxy-2-naphthyl]sulfonyl]amino]propanoyl]amino]-3-(4-[[[2R,6S]-2,6-dimethylpiperidiny]methyl]phenyl]-N-isopropyl-N-methylpropanamide,fumarate)]; SP: substance P; NF-κB: transcriptional nuclear factor kappa B; TRPV1: transient receptor potential vanilloid 1; TNF-α: tumor necrosis factor alpha.

Acknowledgements

This work was supported by a Grant-in-aid from the Canadian Institutes of Health Research (MOP-79471 to RC). ST and JPD are recipients of Studentship Awards from the CIHR (Frederick Banting and Charles Best Canada Graduate Scholarships-Doctoral Award). The authors acknowledge the technical assistance of Talita Carneiro Brandão Pereira and Carolina de Moura Gubert and the expertise of Jacques Sénécal in autoradiography.

Author details

¹Department of Physiology, Faculty of Medicine, Université de Montréal, C.P. 6128, Succursale Centre-ville, Montréal, H3C 3J7, Québec, Canada.

²Department of Molecular Biology, Faculty of Biosciences, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 90619-900, Rio Grande do Sul, Brasil. ³National Institute for Translational Medicine (INCT-TM), Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil. ⁴Institute of Toxicology and Pharmacology, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 90619-900, Rio Grande do Sul, Brasil. ⁵Faculty of Dentistry, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 90619-900, Rio Grande do Sul, Brasil. ⁶Laboratory of Neuroendocrinology of Aging, Université de Montréal, CHUM Research Center, Angus Technopole, Montréal, H1W 4A4, Québec, Canada.

Authors' contributions

ST and JPD performed the experiments. ST designed the study, analyzed the data and wrote the manuscript. KL carried out western blot analysis. MRB gave us access to his real-time PCR apparatus. MMC helped in study design and data analysis. PG conceived and synthesized the B₁R fluorescent agonist. RC conceived experiments, supervised the work and wrote the final version of the manuscript. All authors have read and approved the final version of the manuscript.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Received: 15 August 2011 Accepted: 20 January 2012

Published: 20 January 2012

References

- Couture R, Harrison M, Vianna RM, Cloutier F: **Kinin receptors in pain and inflammation.** *Eur J Pharmacol* 2001, **429**:161-176.
- Calixto JB, Medeiros R, Fernandes ES, Ferreira J, Cabrini DA, Campos MM: **Kinin B1 receptors: key G-protein-coupled receptors and their role in inflammatory and painful processes.** *Br J Pharmacol* 2004, **143**:803-818.
- Petcu M, Dias JP, Ongali B, Thibault G, Neugebauer W, Couture R: **Role of kinin B1 and B2 receptors in a rat model of neuropathic pain.** *Int Immunopharmacol* 2008, **8**:188-196.
- Dias JP, Talbot S, Senecal J, Carayon P, Couture R: **Kinin B1 receptor enhances the oxidative stress in a rat model of insulin resistance: outcome in hypertension, allodynia and metabolic complications.** *PLoS One* 2010, **5**:e12622.
- Regoli D, Barabe J: **Pharmacology of bradykinin and related kinins.** *Pharmacol Rev* 1980, **32**:1-46.
- Leeb-Lundberg LM, Marceau F, Muller-Esterl W, Pettibone DJ, Zuraw BL: **International union of pharmacology. XLV. Classification of the kinin receptor family: from molecular mechanisms to pathophysiological consequences.** *Pharmacol Rev* 2005, **57**:27-77.
- Marceau F, Bachvarov DR: **Kinin receptors.** *Clin Rev Allergy Immunol* 1998, **16**:385-401.
- Ismael MA, Talbot S, Carbonneau CL, Beausejour CM, Couture R: **Blockade of sensory abnormalities and kinin B(1) receptor expression by N-acetyl-L-cysteine and ramipril in a rat model of insulin resistance.** *Eur J Pharmacol* 2008, **589**:66-72.
- Couture R, Girolami JP: **Putative roles of kinin receptors in the therapeutic effects of angiotensin 1-converting enzyme inhibitors in diabetes mellitus.** *Eur J Pharmacol* 2004, **500**:467-485.
- deBlois D, Horlick RA: **Endotoxin sensitization to kinin B(1) receptor agonist in a non-human primate model: haemodynamic and pro-inflammatory effects.** *Br J Pharmacol* 2001, **132**:327-335.
- Bachvarov DR, Hess JF, Menke JG, Larrivee JF, Marceau F: **Structure and genomic organization of the human B1 receptor gene for kinins (BDKRB1).** *Genomics* 1996, **33**:374-381.
- Gabra BH, Sirois P: **Hyperalgesia in non-obese diabetic (NOD) mice: a role for the inducible bradykinin B1 receptor.** *Eur J Pharmacol* 2005, **514**:61-67.
- Gabra BH, Merino VF, Bader M, Pesquero JB, Sirois P: **Absence of diabetic hyperalgesia in bradykinin B1 receptor-knockout mice.** *Regul Pept* 2005, **127**:245-248.
- Gabra BH, Sirois P: **Pathways for the bradykinin B1 receptor-mediated diabetic hyperalgesia in mice.** *Inflamm Res* 2004, **53**:653-657.
- Lungu C, Dias JP, Franca CE, Ongali B, Regoli D, Moldovan F, Couture R: **Involvement of kinin B1 receptor and oxidative stress in sensory abnormalities and arterial hypertension in an experimental rat model of insulin resistance.** *Neuropeptides* 2007, **41**:375-387.
- Szallasi A, Cortright DN, Blum CA, Eid SR: **The vanilloid receptor TRPV1: 10 years from channel cloning to antagonist proof-of-concept.** *Nat Rev Drug Discov* 2007, **6**:357-372.
- Kim SR, Kim SU, Oh U, Jin BK: **Transient receptor potential vanilloid subtype 1 mediates microglial cell death in vivo and in vitro via Ca²⁺-mediated mitochondrial damage and cytochrome c release.** *J Immunol* 2006, **177**:4322-4329.
- Caterina MJ, Leffler A, Malmberg AB, Martin WJ, Trafton J, Petersen-Zeit KR, Koltzenburg M, Basbaum AI, Julius D: **Impaired nociception and pain sensation in mice lacking the capsaicin receptor.** *Science* 2000, **288**:306-313.
- Moriyama T, Iida T, Kobayashi K, Higashi T, Fukuoka T, Tsumura H, Leon C, Suzuki N, Inoue K, Gachet C, et al: **Possible involvement of P2Y₂ metabotropic receptors in ATP-induced transient receptor potential vanilloid receptor 1-mediated thermal hypersensitivity.** *J Neurosci* 2003, **23**:6058-6062.
- Szabo A, Helyes Z, Sandor K, Bite A, Pinter E, Nemeth J, Banvolgyi A, Bolcskei K, Elekes K, Szolcsanyi J: **Role of transient receptor potential vanilloid 1 receptors in adjuvant-induced chronic arthritis: in vivo study using gene-deficient mice.** *J Pharmacol Exp Ther* 2005, **314**:111-119.
- Premkumar LS, Ahern GP: **Induction of vanilloid receptor channel activity by protein kinase C.** *Nature* 2000, **408**:985-990.
- Numazaki M, Tominaga T, Toyooka H, Tominaga M: **Direct phosphorylation of capsaicin receptor VR1 by protein kinase Cepsilon and identification of two target serine residues.** *J Biol Chem* 2002, **277**:13375-13378.
- Jordt SE, Tominaga M, Julius D: **Acid potentiation of the capsaicin receptor determined by a key extracellular site.** *Proc Natl Acad Sci USA* 2000, **97**:8134-8139.
- Chuang HH, Prescott ED, Kong H, Shields S, Jordt SE, Basbaum AI, Chao MV, Julius D: **Bradykinin and nerve growth factor release the capsaicin receptor from PtdIns(4,5)P₂-mediated inhibition.** *Nature* 2001, **411**:957-962.
- Chuang HH, Lin S: **Oxidative challenges sensitize the capsaicin receptor by covalent cysteine modification.** *Proc Natl Acad Sci USA* 2009, **106**:20097-20102.
- Ma F, Zhang L, Westlund KN: **Reactive oxygen species mediate TNFR1 increase after TRPV1 activation in mouse DRG neurons.** *Mol Pain* 2009, **5**:31.
- Hu F, Sun WW, Zhao XT, Cui ZJ, Yang WX: **TRPV1 mediates cell death in rat synovial fibroblasts through calcium entry-dependent ROS production and mitochondrial depolarization.** *Biochem Biophys Res Commun* 2008, **369**:989-993.
- Schilling T, Eder C: **Importance of the non-selective cation channel TRPV1 for microglial reactive oxygen species generation.** *J Neuroimmunol* 2009, **216**:118-121.
- Talbot S, Theberge-Turmel P, Liazoghli D, Senecal J, Gaudreau P, Couture R: **Cellular localization of kinin B1 receptor in the spinal cord of streptozotocin-diabetic rats with a fluorescent [Nalpha-Bodipy]-des-Arg9-bradykinin.** *J Neuroinflammation* 2009, **6**:11.
- Talbot S, Chahmi E, Dias JP, Couture R: **Key role for spinal dorsal horn microglial kinin B1 receptor in early diabetic pain neuropathy.** *J Neuroinflammation* 2010, **7**:36.
- Couture R, Escher E, Regoli D: **Effects of substance P analogues in the rat tail-flick test.** *Eur J Pharmacol* 1987, **134**:355-359.
- Oliverio A, Castellano C, Puglisi-Allegra S: **Opiate analgesia: evidence for circadian rhythms in mice.** *Brain Res* 1982, **249**:265-270.
- Ferreira J, Campos MM, Araujo R, Bader M, Pesquero JB, Calixto JB: **The use of kinin B1 and B2 receptor knockout mice and selective antagonists to characterize the nociceptive responses caused by kinins at the spinal level.** *Neuropharmacology* 2002, **43**:1188-1197.

34. Yashpal K, Henry JL: Endorphins mediate overshoot of substance P-induced facilitation of a spinal nociceptive reflex. *Can J Physiol Pharmacol* 1983, **61**:303-307.
35. Furfine ES, Harmon MF, Paith JE, Garvey EP: Selective inhibition of constitutive nitric oxide synthase by L-NG-nitroarginine. *Biochemistry* 1993, **32**:8512-8517.
36. Garret C, Carruette A, Fardin V, Moussaoui S, Peyronel JF, Blanchard JC, Laduron PM: Pharmacological properties of a potent and selective nonpeptide substance P antagonist. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991, **88**:10208-10212.
37. Kent S, Kernahan SD, Levine S: Effects of excitatory amino acids on the hypothalamic-pituitary-adrenal axis of the neonatal rat. *Brain Res Dev Brain Res* 1996, **94**:1-13.
38. Gougat J, Ferrari B, Sarran L, Planchenault C, Poncelet M, Maruani J, Alonso R, Cudennec A, Croci T, Guagnini F, et al: SSR240612 [(2R)-2-[(3R)-3-(1,3-benzodioxol-5-yl)-3-[[[6-methoxy-2-naphthyl)sulfonyl]amino]propanoyl]amino]-3-(4-[[[2R,6S]-2,6-dimethylpiperidinyl]methyl]phenyl)-N-isopropyl-N-methylpropanamide hydrochloride], a new nonpeptide antagonist of the bradykinin B1 receptor: biochemical and pharmacological characterization. *J Pharmacol Exp Ther* 2004, **309**:661-669.
39. Dias JP, Ismael MA, Pilon M, de Champlain J, Ferrari B, Carayon P, Couture R: The kinin B1 receptor antagonist SSR240612 reverses tactile and cold allodynia in an experimental rat model of insulin resistance. *Br J Pharmacol* 2007, **152**:280-287.
40. Gauchan P, Andoh T, Kato A, Kuraishi Y: Involvement of increased expression of transient receptor potential melastatin 8 in oxaliplatin-induced cold allodynia in mice. *Neurosci Lett* 2009, **458**:93-95.
41. Horvath G, Kekesi G, Nagy E, Benedek G: The role of TRPV1 receptors in the antinociceptive effect of anandamide at spinal level. *Pain* 2008, **134**:277-284.
42. Varga A, Nemeth J, Szabo A, McDougall JJ, Zhang C, Elekes K, Pinter E, Szolcsanyi J, Helyes Z: Effects of the novel TRPV1 receptor antagonist SB366791 in vitro and in vivo in the rat. *Neurosci Lett* 2005, **385**:137-142.
43. Niiyama Y, Kawamata T, Yamamoto J, Furuse S, Namiki A: SB366791, a TRPV1 antagonist, potentiates analgesic effects of systemic morphine in a murine model of bone cancer pain. *Br J Anaesth* 2009, **102**:251-258.
44. Chen Y, Geis C, Sommer C: Activation of TRPV1 contributes to morphine tolerance: involvement of the mitogen-activated protein kinase signaling pathway. *J Neurosci* 2008, **28**:5836-5845.
45. Regoli D, Nsa Allogho S, Rizzi A, Gobeil FJ: Bradykinin receptors and their antagonists. *Eur J Pharmacol* 1998, **348**:1-10.
46. Nazarali AJ, Gutkind JS, Saavedra JM: Calibration of 125I-polymer standards with 125I-brain paste standards for use in quantitative receptor autoradiography. *J Neurosci Methods* 1989, **30**:247-253.
47. Gendron ME, Theoret JF, Mamarbachi AM, Drouin A, Nguyen A, Bolduc V, Thorin-Trescases N, Merhi Y, Thorin E: Late chronic catechin antioxidant treatment is deleterious to the endothelial function in aging mice with established atherosclerosis. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2010, **298**:H2062-2070.
48. Lin JC, Talbot S, Lahjouji K, Roy JP, Senecal J, Couture R, Morin A: Mechanism of cigarette smoke-induced kinin B(1) receptor expression in rat airways. *Peptides* 2010, **31**:1940-1945.
49. Talbot S, Couture R: Emerging role of microglial kinin B1 receptor in diabetic pain neuropathy. *Experimental Neurology* 2011.
50. Papoiu AD, Yosipovitch G: Topical capsaicin. The fire of a 'hot' medicine is reignited. *Expert Opin Pharmacother* 2010, **11**:1359-1371.
51. Meddings JB, Hogaboam CM, Tran K, Reynolds JD, Wallace JL: Capsaicin effects on non-neuronal plasma membranes. *Biochim Biophys Acta* 1991, **1070**:43-50.
52. Hogaboam CM, Wallace JL: Inhibition of platelet aggregation by capsaicin. An effect unrelated to actions on sensory afferent neurons. *Eur J Pharmacol* 1991, **202**:129-131.
53. Ritter S, Dinh TT: Capsaicin-induced neuronal degeneration in the brain and retina of preweanling rats. *J Comp Neurol* 1990, **296**:447-461.
54. Docherty RJ, Yeats JC, Piper AS: Capsazepine block of voltage-activated calcium channels in adult rat dorsal root ganglion neurones in culture. *Br J Pharmacol* 1997, **121**:1461-1467.
55. Andrade EL, Luiz AP, Ferreira J, Calixto JB: Pronociceptive response elicited by TRPA1 receptor activation in mice. *Neuroscience* 2008, **152**:511-520.
56. Wu C, Gava NR, Brennan TJ: Effect of AMG0347, a transient receptor potential type V1 receptor antagonist, and morphine on pain behavior after plantar incision. *Anesthesiology* 2008, **108**:1100-1108.
57. Talbot S, Lin JC, Lahjouji K, Roy JP, Senecal J, Morin A, Couture R: Cigarette smoke-induced kinin B1 receptor promotes NADPH oxidase activity in cultured human alveolar epithelial cells. *Peptides* 2011, **32**:1447-56.
58. Petcu M, Ongali B, El Midaoui A, de Champlain J, Couture R: Effects of alpha-lipoic acid on kinin B1 and B2 receptor binding sites in the spinal cord of chronically angiotensin-treated rats. *Peptides* 2005, **26**:1331-1338.
59. Westlund KN, Kochukov MY, Lu Y, McNearney TA: Impact of central and peripheral TRPV1 and ROS levels on proinflammatory mediators and nociceptive behavior. *Mol Pain* 2010, **6**:46.
60. Reilly CA, Johansen ME, Lanza DL, Lee J, Lim JO, Yost GS: Calcium-dependent and independent mechanisms of capsaicin receptor (TRPV1)-mediated cytokine production and cell death in human bronchial epithelial cells. *J Biochem Mol Toxicol* 2005, **19**:266-275.
61. Bodo E, Biro T, Telek A, Czifra G, Griger Z, Toth BI, Mescalchin A, Ito T, Bettermann A, Kovacs L, Paus R: A hot new twist to hair biology: involvement of vanilloid receptor-1 (VR1/TRPV1) signaling in human hair growth control. *Am J Pathol* 2005, **166**:985-998.
62. Takano F, Yamaguchi M, Takada S, Shoda S, Yahagi N, Takahashi T, Ohta T: Capsaicin ethanol extracts and capsaicin enhance interleukin-2 and interferon-gamma production in cultured murine Peyer's patch cells ex vivo. *Life Sci* 2007, **80**:1553-1563.
63. Sappington RM, Calkins DJ: Contribution of TRPV1 to microglia-derived IL-6 and NFkappaB translocation with elevated hydrostatic pressure. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2008, **49**:3004-3017.
64. Ni A, Chai KX, Chao L, Chao J: Molecular cloning and expression of rat bradykinin B1 receptor. *Biochim Biophys Acta* 1998, **1442**:177-185.
65. Campos MM, Souza GE, Calixto JB: In vivo B1 kinin-receptor upregulation. Evidence for involvement of protein kinases and nuclear factor kappaB pathways. *Br J Pharmacol* 1999, **127**:1851-1859.
66. Radhakrishnan V, Yashpal K, Hui-Chan CW, Henry JL: Implication of a nitric oxide synthase mechanism in the action of substance P: L-NAME blocks thermal hyperalgesia induced by endogenous and exogenous substance P in the rat. *Eur J Neurosci* 1995, **7**:1920-1925.
67. Radhakrishnan V, Henry JL: L-NAME blocks responses to NMDA, substance P and noxious cutaneous stimuli in cat dorsal horn. *Neuroreport* 1993, **4**:323-326.
68. Yashpal K, Radhakrishnan V, Henry JL: NMDA receptor antagonist blocks the facilitation of the tail flick reflex in the rat induced by intrathecal administration of substance P and by noxious cutaneous stimulation. *Neurosci Lett* 1991, **128**:269-272.
69. Raigorodsky G, Urca G: Intrathecal N-methyl-D-aspartate (NMDA) activates both nociceptive and antinociceptive systems. *Brain Res* 1987, **422**:158-162.

doi:10.1186/1742-2094-9-16

Cite this article as: Talbot et al.: Activation of TRPV1 by capsaicin induces functional Kinin B₁ receptor in rat spinal cord microglia. *Journal of Neuroinflammation* 2012 **9**:16.

Submit your next manuscript to BioMed Central and take full advantage of:

- Convenient online submission
- Thorough peer review
- No space constraints or color figure charges
- Immediate publication on acceptance
- Inclusion in PubMed, CAS, Scopus and Google Scholar
- Research which is freely available for redistribution

Submit your manuscript at
www.biomedcentral.com/submit



Accord journal

Dear Mr. Talbot,

Copyrights to articles published in *Journal of Neuroinflammation* are held by the authors, not by the journal or the publisher. For more information, please see <http://www.biomedcentral.com/about/license>.

Robert Mrak

Editor-in-Chief

Dear,

I would need your permission (copyright) to include in my doctoral thesis the following paper that we published in your journal:

Talbot Sébastien, Dias JP, Lahjouji K, Bogo MR, Campos MM, Gaudreau P and Couture R. Activation of TRPV1 by capsaicin induces functional Kinin B1 receptor in rat spinal cord microglia. *J Neuroinflammation* 2012. Jan 20;9:16. PMID: 22264228.

All the best,

Sébastien Talbot

Université de Montréal

CHAPITRE III

DISCUSSION ET PERSPECTIVES

12.0. Discussion et perspectives

Bien que la recherche sur les kinines et leurs récepteurs ait débuté il y a plus d'une trentaine d'années, plusieurs avenues demeurent à être explorées, tant au niveau de la régulation de l'expression génique qu'au niveau du rôle pathophysiologique du B1R. Ainsi, cette thèse a permis d'apporter un nouvel éclairage sur plusieurs aspects de la régulation des kinines. Nos données ont permis de raffiner les connaissances sur la localisation cellulaire du B1R, les mécanismes d'induction et le rôle physiopathologique de ce récepteur dans des modèles expérimentaux de douleur chez le rat. Plus précisément, nous avons démontré pour la première fois que 1) le B1R est localisé sur les astrocytes, les fibres sensorielles de type C et les cellules de la microglie de la moelle épinière de rats diabétiques de type 1, 2) l'activation des cellules de la microglie est essentielle à l'activité pro-nociceptive du B1R et 3) la stimulation du récepteur pro-nociceptif TRPV1 par son agoniste exogène, la capsaïcine, augmente l'expression du B1R au niveau spinal.

12.1. Localisation

Les deux dernières décennies en recherche biomédicale ont été dédiées à la génomique, puis à la protéomique. Une part importante de ces efforts comprenait l'identification cellulaire et le mode d'expression de GPCR. Étant donné que cette approche est cruciale dans la compréhension du rôle physiologique d'un récepteur, nous l'avons adoptée pour le B1R. Notez que nos travaux reposent sur des données déjà obtenus par PCR (expression de l'ARNm), l'hybridation *in situ* (localisation de l'ARNm), et par autoradiographie quantitative (localisation des sites de liaison). L'autoradiographie permet la visualisation des récepteurs dans le tissu, mais ne possède pas la résolution suffisante pour identifier le type cellulaire porteur du B1R.

Les premières mesures d'expression du B1R sont celles de Marin-Castano et collaborateurs (Marin-Castano *et al.*, 1998) qui ont démontré une induction significative de l'ARNm du B1R dans différents segments du néphron de rat après traitement au lipopolysaccharide bactérien (18h), par opposition à l'absence d'ARNm chez les rats témoins. Le premier rapport portant sur l'expression du B1R dans les tissus nerveux est celui de Mahabeer (Mahabeer *et al.*, 2000) qui démontra, par hybridation *in situ*, une expression basale du B1R dans certaines régions de l'hypothalamus, du thalamus, du plexus choroïde, ainsi que dans la moelle épinière chez l'humain. Notez qu'aucune analyse pathologique des sujets n'est fournie. En 2004, les premières données en hybridation *in situ* et en autoradiographie quantitative ont démontré que l'ARNm et les sites de liaison spécifiques du B1R sont surexprimés

dans la moelle épinière de rats STZ comparativement aux animaux témoins (Ongali *et al.*, 2004). Les premières données utilisant un anticorps dirigé contre la forme humaine du B1R (Raidoo *et al.*, 1997) montrèrent que le B1R est présent sur les cellules endothéliales, ainsi que sur les cellules musculaires lisses vasculaires des larges artères élastiques de patients présentant des plaques athérosclérotiques (Raidoo *et al.*, 1997). Le B1R fut également localisé sur les macrophages spumeux formant la plaque athérosclérotique de ces patients (Raidoo *et al.*, 1997). Finalement, les premières données d'immunolocalisation du B1R dans les tissus nerveux de rats suggèrent une expression basale du B1R dans les ganglions de la racine dorsale (DRG) d'animaux témoins (Ma *et al.*, 2000). Ces données demeurent cependant controversées. En effet, certaines équipes ne parviennent pas à mesurer l'ARNm du B1R chez les animaux témoins (Marin-Castano *et al.*, 1998). De plus, l'administration intraspinale d'un agoniste sélectif du B1R chez ces animaux n'a aucun effet physiologique (Cloutier *et al.*, 2000).

L'absence d'un anticorps commercial spécifique dirigé contre le B1R a grandement limité l'avancée des travaux d'immunolocalisation. Pour pallier ce manque, nous avons développé une méthode novatrice permettant la localisation cellulaire du B1R (Talbot *et al.*, 2009). Celle-ci élimine les principaux problèmes associés aux techniques disponibles puisqu'elle possède une haute résolution (vs autoradiographie) et une haute spécificité (vs anticorps commerciaux). En effet, le couplage d'une molécule fluorescente, le N^α-Bodipy, à l'agoniste sélectif du B1R, la des-Arg⁹-BK,

nous a permis de générer un puissant outil permettant de révéler le ou les types cellulaires exprimant le B1R et ce, dans le tissu et la pathologie à l'étude.

Cet outil a confirmé que le B1R est absent dans la moelle épinière de rats témoins (Talbot *et al.*, 2009), apportant un nouvel argument contrastant avec les données de Ma (Ma *et al.*, 2000). Aussi, nous avons révélé que le B1R est localisé sur les fibres sensorielles de type C, les astrocytes et les cellules de la microglie des rats pré-traités à la STZ (Talbot *et al.*, 2009). D'ailleurs, nous avons pu confirmer ces données en démontrant que le B1R est présent sur les cellules de la microglie dans deux autres modèles de douleur chronique, soit le rat ayant subi une ligature partielle du nerf sciatique (données non publiées) et le rat traité à la capsaïcine (Talbot *et al.*, 2012). L'importance de cette découverte a été d'ailleurs soulignée dans les articles 2 et 3 de cette thèse où nous avons pu démontrer que la microglie activée est essentielle à l'activité pro-nociceptive du B1R.

La présence du B1R sur les cellules de la microglie reste d'ailleurs à confirmer dans un modèle non-inflammatoire de diabète de type 1 (voir critique modèle STZ), ainsi que dans le diabète de type 2. Aussi, la présence du B1R sur les cellules de la microglie pourrait être investiguée dans d'autres pathologies présentant une surexpression du B1R au niveau cérébral. Entre autres, on peut penser au rat épileptique (modèle "kindled") dont l'induction du B1R fut démontrée par autoradiographie quantitative dans l'hippocampe (CA1, CA2, CA3) et dans le cortex cérébral (Ongali *et al.*, 2003). Notez que la durée et l'intensité des crises épileptiques

induites par l'administration de pilocarpine sont réduites chez les rats B1R^{-/-} (Silva *et al.*, 2008). De plus, il semble que le blocage de l'activation de la microglie par la minocycline permet de contrecarrer l'effet épiléptogénique des premières convulsions (Abraham *et al.*, 2012). Ainsi, il est permis de croire que l'effet pro-épileptigène du B1R puisse être relayé par l'entremise des cellules de la microglie, d'où l'intérêt d'investiguer le ou les types cellulaires exprimant le B1R dans différents modèles d'épilepsie chez le rat.

Notez que le Dr Karim Lahjouji (laboratoire du Dr Réjean Couture) a développé en 2009 deux anticorps dirigés contre le B1R du rat et de l'homme. Nous avons d'ailleurs caractérisé ceux-ci dans deux récentes publications (Lin *et al.*, 2010; Talbot *et al.*, 2011a). Ainsi, ces deux anticorps remplissent les critères de spécificité et de résolution nécessaires à leur utilisation en immunohistochimie. Leur utilisation en immunobuvardage de type Western révèle un marquage spécifique, soit une seule bande, en présence d'extraits protéiques de poumons de rats traités avec un condensat de fumée de cigarette (connu pour déclencher l'induction du B1R) (Lin *et al.*, 2010). De plus, aucune bande n'est détectée lorsque ces tissus sont exposés au sérum pré-immun du B1R. Cette bande est aussi absente lorsque l'anticorps est co-exposé avec l'anti-peptide (Lin *et al.*, 2010) ou encore en présence d'extraits protéiques de rats témoins ou de souris B1R^{-/-} (données non publiées). Fait intéressant, nous avons comparé les marquages obtenus au moyen du peptide fluorescent et de l'anticorps spécifique sur des tranches de poumons de rats exposés à des condensats de fumée de cigarette. Les deux approches ont montré que le B1R est localisé sur les cellules

épithéliales alvéolaires de types 1 et 2 ainsi que sur les neutrophiles infiltrant (données non publiées).

En terminant, le nouvel anticorps spécifique présente certains avantages techniques sur le peptide fluorescent. En effet, l'utilisation de ce dernier est limité aux coupes de tissus non-fixées. Cela a pour effet de réduire la qualité des images (résolution) prises en microscopie confocale. En effet, l'intégrité du tissu est affectée par la procédure de congélation, la coupe ainsi que par les premières étapes du protocole d'immunolocalisation. D'ailleurs, cela nous a empêché d'utiliser l'agoniste fluorescent pour procéder à l'immunolocalisation du B1R dans la rétine de rats diabétiques (STZ) ainsi que dans l'aorte d'animaux diabétiques et hypertendus (SHR ou infusés à l'angiotensine II). Ainsi, ce nouvel anticorps spécifique pourrait permettre de revisiter ces questions. En outre, il permet de faire de l'immunohistochimie sur des tissus déjà fixés et archivés dans les banques de tissus humains (ex. : banques de cerveaux ou de rétines de patients diabétiques).

12.2. Modèle de diabète de type 1 induit par la STZ

Le modèle expérimental de diabète de type 1 que nous avons choisi est celui induit par l'administration de STZ. Tel que discuté dans l'article 3 de cette thèse, la STZ est le modèle de choix pour l'étude du diabète de type 1. En effet, les rats traités par la STZ développent la plupart des symptômes retrouvés chez les patients diabétiques

(hyperglycémie, hypoinsulinémie, hyperalgésie (phase initiale), hypoalgésie (phase tardive), allodynie) et ce quatre jours suivant l'administration de la drogue. Le taux d'induction du diabète dans ce modèle varie entre 80 à 90 % en fonction de l'expérimentateur.

Le modèle STZ possède cependant certains défauts, tel que l'induction d'une inflammation aiguë (Herold *et al.*, 1996). En effet, la STZ induit une augmentation de la libération de cytokines, chémokines et autres médiateurs pro-inflammatoires (Herold *et al.*, 1996; Sandberg *et al.*, 1994). Ceux-ci peuvent affecter les résultats de nos études. Ainsi, nous considérons généralement que les effets observés chez les rats STZ (induction du B1R et développement des DPN) sont attribuables à l'hyperglycémie chronique secondaire au développement du diabète de type 1 et non aux effets secondaires pro-inflammatoires de la STZ. La STZ possède aussi des effets non-spécifiques sur les reins, le foie et les neurones (Brambilla *et al.*, 1987; Johnston *et al.*, 2007; Petzold *et al.*, 1978; Schnedl *et al.*, 1994). Il s'avère en effet qu'elle pourrait directement agir sur les neurones (effet pro-oxydant) (Turk *et al.*, 1993a) et donc participer directement à l'induction des DPN (Bishnoi *et al.*, 2011; Pabbidi *et al.*, 2008a; Pabbidi *et al.*, 2008b). D'ailleurs, certains travaux suggèrent que les rats traités à la STZ ne présentant pas d'hyperglycémie chronique peuvent tout de même souffrir de DPN, un effet associé à une augmentation de l'expression neuronale du TRPV1 (Bishnoi *et al.*, 2011; Pabbidi *et al.*, 2008a; Pabbidi *et al.*, 2008b). Ainsi, nos données auraient avantage à être confirmées dans un modèle génétique de diabète de type 1, tel que chez les souris diabétiques non-obèses (NOD) (Talbot *et al.*, 2012a). Ces dernières sont d'ailleurs connues pour présenter une hyperalgésie thermique, laquelle est

prévenue par des antagonistes peptidiques du B1R (R-715 et R954) (Gabra *et al.*, 2005c). Finalement, le développement du diabète de type 1 par la STZ ne représente que 10% de la population diabétique totale chez l'homme. Ainsi, il serait intéressant de confirmer ces données dans un modèle de diabète de type 2, tel que les rats traités chroniquement au glucose (Dias *et al.*, 2007; El Midaoui *et al.*, 2005). Notez que les rats traités au glucose sont connus pour présenter une augmentation des sites de liaison et de l'ARNm du B1R dans la moelle épinière (Dias *et al.*, 2010). De plus, l'utilisation d'antagonistes non peptidiques du B1R (SSR240612) (Dias *et al.*, 2007; Dias *et al.*, 2010) ou LF22-0542 (Lungu *et al.*, 2007)) prévient les neuropathies diabétiques (allodynie tactile et au froid) présentes chez ces animaux. Ainsi, il serait pertinent de vérifier la présence ou non du B1R sur les cellules de la microglie et sa contribution à l'induction des DPN dans ce modèle de diabète de type 2. En terminant, nos études ont été réalisées 4 jours post-STZ, ce qui équivaut à un diabète aigu. Ainsi, il serait également à propos de confirmer nos données chez des rats STZ, 8 semaines post-traitement (diabète et hyperglycémie chroniques), une condition mimant davantage la pathologie humaine. D'ailleurs, il serait pertinent de corréler les niveaux d'expression et d'activation du B1R microglial avec le développement de l'hyper- et l'hypo- algésie thermique chez ces rats.

12.3. Stimulation du TRPV1 par la capsaïcine

L'utilisation de la capsaïcine comme agoniste exogène du TRPV1 peut soulever certaines questions sur la validité des données obtenues. Tel que revu par Papoiu

(Papoiu *et al.*, 2010), la capsaïcine est une molécule lipophile pouvant diffuser à travers les membranes cellulaires (Szolcsanyi, 2004). Ainsi, la capsaïcine possède des effets relayés ou non à l'activation du TRPV1 (Papoiu *et al.*, 2010). Les effets secondaires relayés par l'activation du TRPV1 incluent la désensibilisation (déplétion des neurotransmetteurs (SP, CGRP)) des fibres A δ et C, ainsi que l'apoptose neuronale induite par une neurotoxicité calcique (Szallasi *et al.*, 2007). Les effets de la capsaïcine indépendants de l'activation du TRPV1 incluent une altération de la fluidité membranaire (Meddings *et al.*, 1991), l'inhibition de l'agrégation plaquettaire (Hogaboam *et al.*, 1991) et l'apoptose neuronale (neurones TRPV1⁺) (Ritter *et al.*, 1990). En outre, l'administration de la capsaïcine semble pouvoir perturber le transport intra-axonal de NGF, ce qui influencerait négativement la capacité des neurones à synthétiser certains neurotransmetteurs (Gamse *et al.*, 1982). Aussi, la capsaïcine induirait le blocage des canaux ioniques K1 (Dubois, 1982), de la NADPH-oxydo-réductase et de certaines autres enzymes (Shimomura *et al.*, 1989) et agirait comme inhibiteur de la tyrosyl-tRNA synthétase (Cochereau *et al.*, 1996). Tout bien considéré, la capsaïcine possède plusieurs effets secondaires relayés ou non par le TRPV1. Cependant, nos données démontrent clairement que l'induction du B1R par la capsaïcine est relayée par le TRPV1 puisqu'elle est prévenue par deux antagonistes sélectifs du TRPV1 (capsazépine et SB-366791).

Toutefois, nos données voulant que le B1R soit induit suivant la stimulation du TRPV1 auraient avantage à être confirmées via l'utilisation d'autres agonistes. Brièvement, les molécules endogènes pouvant stimuler le TRPV1 incluent l'anandamide (Zygmunt *et al.*, 1999), le N-arachidonoyl-dopamine (Huang *et al.*,

2002) ainsi que les protons (acidification) (Jordt *et al.*, 2002). En plus de la capsaïcine, certaines molécules peuvent également agir à titre d'agonistes exogènes du TRPV1 tels que la *résinifératoxine* (RTX) (isolée du cactus *Euphorbia risinifera*) (Szallasi *et al.*, 2007) et la rutaecarpine (molécule extrait de Wu-Chu-Yu (plante d'origine chinoise) (Hu *et al.*, 2002). Ainsi, l'administration systémique ou intra-spinale de la rutaecarpine, un agoniste exogène du TRPV1, pourrait servir à confirmer l'induction du B1R via ce récepteur.

Fait intéressant, nos données suggèrent que la stimulation du TRPV1 par la capsaïcine augmente l'activité de la NADPH oxydase, augmentant ainsi la production d'anions superoxyde (Miller *et al.*, 2011a), l'activation du NF- κ B et l'induction du B1R (Talbot *et al.*, 2012b). Aussi, nous suggérons que certains effets pro-inflammatoires et pro-nociceptifs du TRPV1 pourraient être en fait relayés par le B1R (Talbot *et al.*, 2012b). D'ailleurs, le B1R est insensible à la désensibilisation et à l'internalisation (Leeb-Lundberg *et al.*, 2005). De plus, son activation est associée à la relâche de médiateurs (SP, CGRP, Glutamate, NO) (Couture *et al.*, 2001), cytokines (IL-1 β , TNF- α) et chémokines (Cx3CL1) pro-inflammatoires (Talbot *et al.*, 2012a). Nous avons également démontré que la stimulation du B1R augmente l'activation de la NADPH oxydase (Dias *et al.*, 2010; Talbot *et al.*, 2011b). L'augmentation des niveaux de ROS et de la libération de médiateurs pro-inflammatoires mène à la surexpression du B1R. Ainsi, le B1R participe à une boucle de rétro-expression positive, où le TRPV1 agit comme initiateur de la cascade. Par exemple, l'expression et le niveau de sensibilisation du TRPV1 sont augmentés dans certains modèles de douleur tels que le rat diabétique de type 1 (Hong *et al.*, 2008) et le rat ayant subi une ligature du nerf

sciatique (Ueda, 2006). Notez que l'expression du B1R est également augmentée dans ces pathologies et que son inhibition supprime les neuropathies (Petcu *et al.*, 2008; Talbot *et al.*, 2010). Ainsi, il serait intéressant de vérifier si l'inhibition du TRPV1 permet de prévenir l'induction du B1R dans ces modèles et si cet effet est corrélé avec le niveau de sévérité des douleurs neuropathiques.

Notez que l'extrémité N- et C-terminale du canal TRPV1 peut être phosphorylée par certaines kinases intracellulaires (PKC et/ou PKA) facilitant l'ouverture du canal ionique (Szallasi *et al.*, 2007). Entre autres médiateurs, la stimulation du B2R par la BK entraîne la phosphorylation du canal (Szallasi *et al.*, 2007). En effet, le B2R est un GPCR principalement couplé à la protéine $G\alpha_q$; son activation entraîne une augmentation de calcium intracellulaire et l'activation de la PKC via la voie de la PLC (Couture *et al.*, 2004). Notez par ailleurs que l'activation du B1R est également associée à cette voie de signalisation et à l'activation de la PKC (Couture *et al.*, 2001). Ainsi, il serait intéressant de vérifier si l'activation du B1R entraîne une augmentation des niveaux de phosphorylation des régions N- et C-terminale du TRPV1.

12.4. Le TRPV1 dans le diabète

Plusieurs études suggèrent que le TRPV1 joue un rôle important dans la régulation des niveaux de glucose sanguin via la relâche de l'insuline. En effet, une quantité importante de fibres sensorielles exprimant le TRPV1 innervent le pancréas (Ahren, 2000). D'ailleurs, l'insuline sécrétée par les cellules β pancréatiques pourrait agir sur

les récepteurs à l'insuline présents sur les afférences sensibles primaires TRPV-positives (Van Buren *et al.*, 2005). Celles-ci, via la libération de certains neuropeptides tels que le CGRP, réduiraient la relâche d'insuline par les cellules β pancréatiques (Khachatryan *et al.*, 1997), créant un réseau de communication entre le pancréas et les neurones. De plus, la présence de certains médiateurs inflammatoires durant le développement du diabète de type 1 pourrait activer et sensibiliser le TRPV1 des afférences sensibles primaires qui induirait alors une relâche importante de SP. Cette dernière participerait au développement de l'insulinitis (Hutter *et al.*, 2005). En outre, il semble que la sévérité du diabète induit par l'administration de STZ est réduite lorsque cette drogue est administrée chez des rats dont les fibres sensorielles de type C sont détruites (rats néonataux traités à la capsaïcine) (Guillot *et al.*, 1996). Des résultats similaires sont détenus chez les rats Zuckers (diabète de type 2) (Moesgaard *et al.*, 2005).

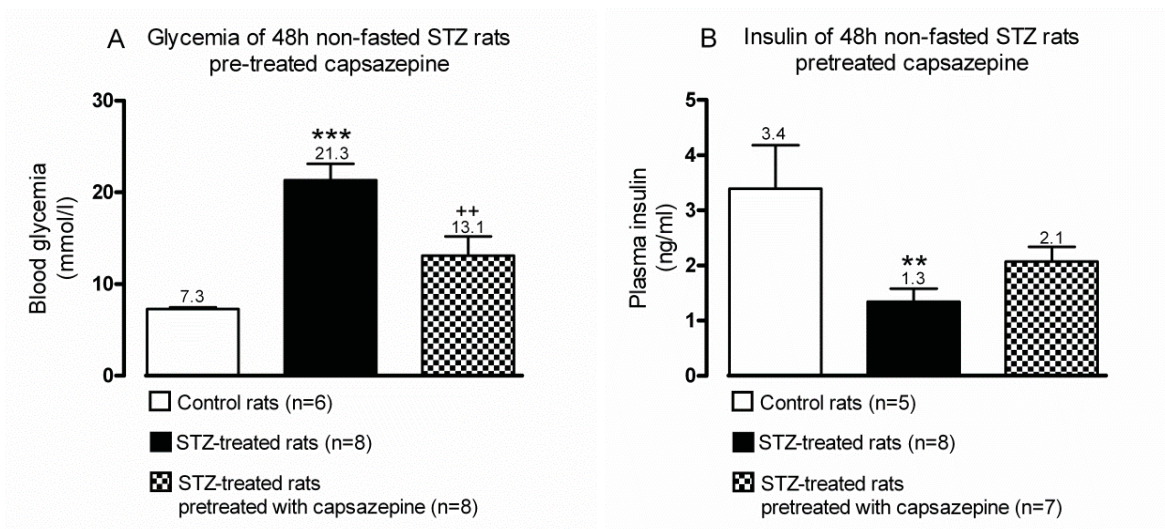
Tout compte fait, le TRPV1 semble jouer un rôle clé dans la régulation de la relâche de l'insuline et le développement du diabète de type 1 (Razavi *et al.*, 2006). Ainsi, puisque nous avons démontré le rôle clé du TRPV1 dans l'induction du B1R (Talbot *et al.*, 2012b), ainsi que le rôle du B1R dans la genèse et le maintien de la plupart des complications du diabète (hypertension, néphropathie, rétinopathie et neuropathie) (Couture *et al.*, 2004; Couture *et al.*, 2001), il apparaît intéressant de vérifier le rôle du TRPV1 dans l'induction du B1R chez les diabétiques.

Les patients diabétiques se retrouvent fréquemment en situation d'acidose métabolique et ce, pour une période prolongée (Greene, 1986). En effet, 85% des patients

diabétiques de type 1 ainsi que 25% des diabétiques de type 2 sont sujets à développer une insuffisance rénale durant l'évolution de leur pathologie (Berwert *et al.*, 2007). Ainsi, l'insuffisance rénale est caractérisée par l'incapacité du corps à éliminer certains déchets métaboliques par les reins provoquant, entre autres, une accumulation d'acides (H^+), de sulfates, de phosphates et d'urée contribuant à l'acidification du sang (Lim, 2007). L'acidose métabolique est en fait une diminution du pH sanguin qui pourrait contribuer directement à l'activation du canal TRPV1. En effet, celui-ci est reconnu comme pouvant être stimulé par les protons (Szallasi *et al.*, 2007). Ainsi, nous croyons que le TRPV1 pourrait jouer un rôle majeur dans l'induction du B1R chez les diabétiques. Conséquemment, le TRPV1 constituerait une cible thérapeutique idéale dans la prévention du développement des complications diabétiques.

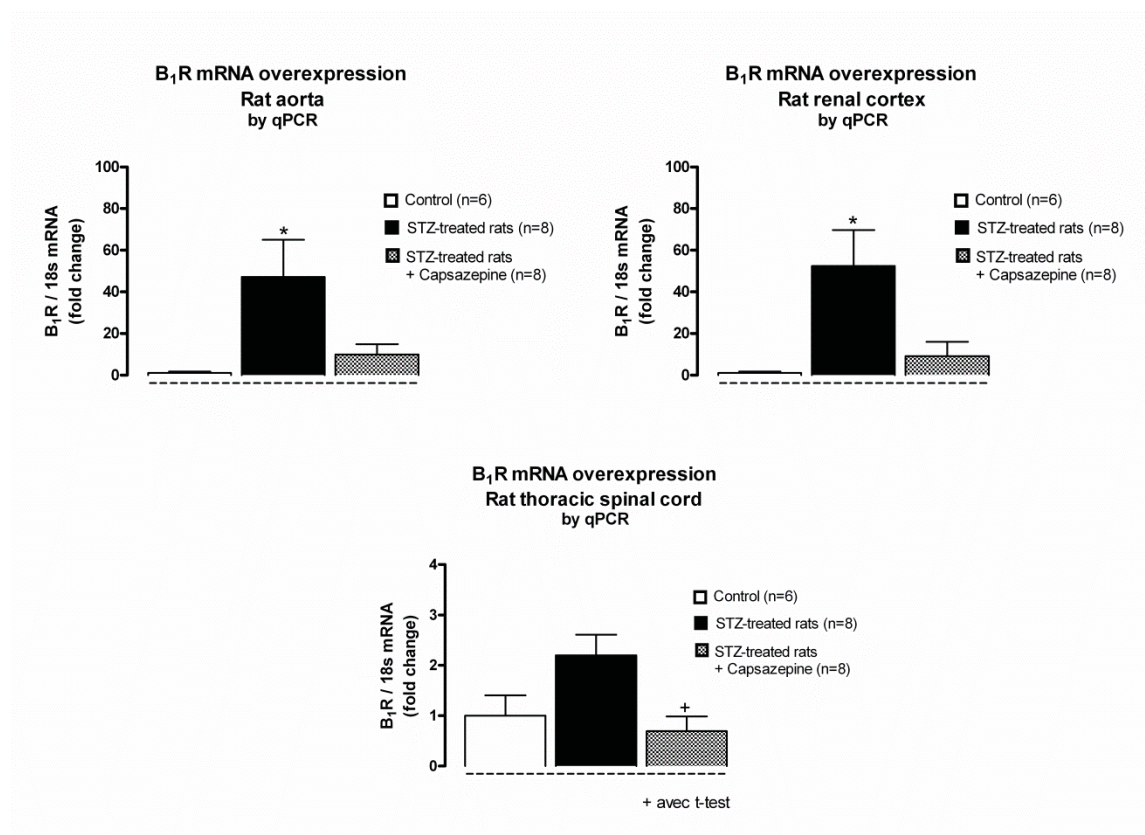
Cette dernière hypothèse est étayée par certaines données, demeurant à être confirmées, obtenues chez des rats diabétiques de type 1 (STZ; 65 mg/kg, i.p.) ayant reçu un antagoniste du TRPV1 (capsazépine). Ainsi, nous avons observé que le blocage prolongé du TRPV1 réduit certaines complications associées au développement du diabète de type 1 telles que l'hyperglycémie (figure 11A) et l'hypoinsulinémie (figure 11B), ainsi que l'augmentation de l'ARNm du B1R dans la moelle épinière, le rein et l'aorte de ces animaux (figure 12). De plus, les augmentations de l'expression protéique (figure 13) et des sites de liaison (figure 14) du B1R dans le cortex rénal des rats STZ sont normalisées par le blocage du TRPV1. En terminant, ces résultats restent à confirmer chez des rats TRPV1^{-/-} + STZ et sur la sévérité des DPN présents chez ces animaux.

Figure 11 : Glycémie et insulïnémie de rats STZ traités ou non avec un antagoniste du TRPV1.



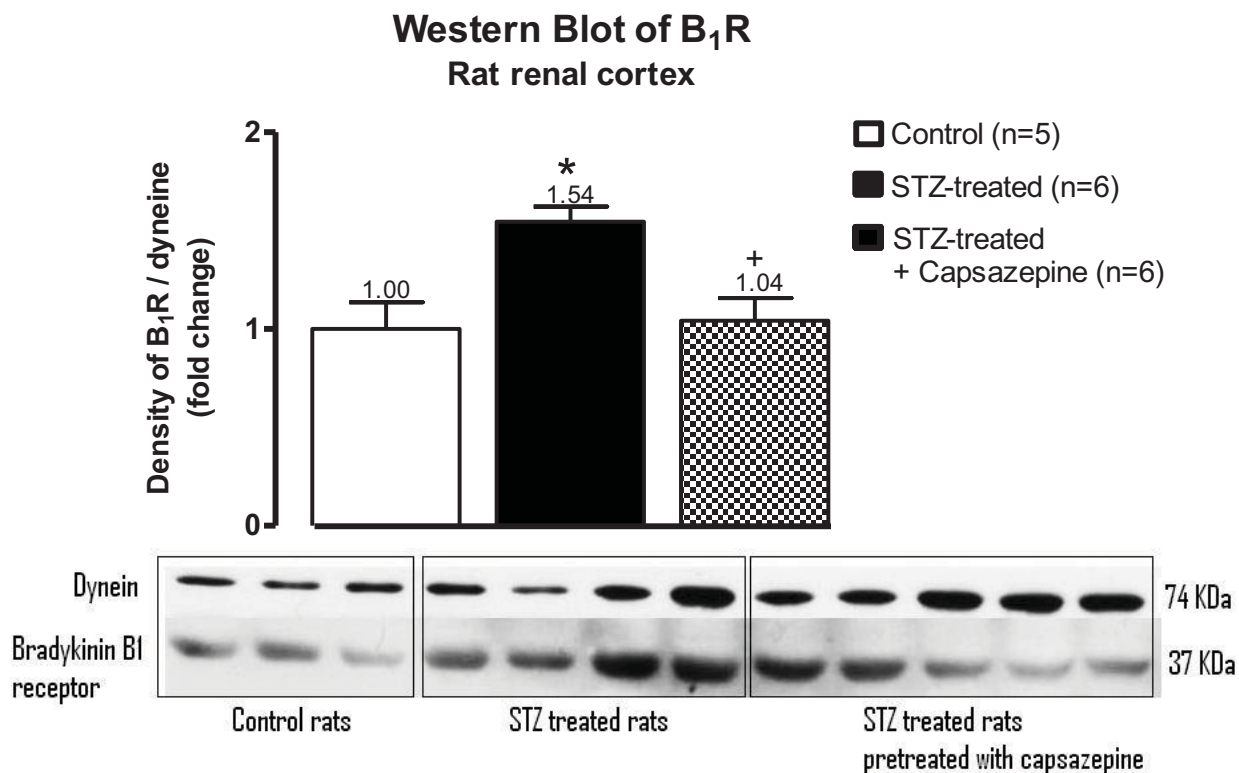
Mesure de la glycémie (A) et de l'insuline plasmatique (B) de rats témoins et traités à la STZ (65 mg/kg, i.p.) pour 2 jours. Les rats STZ ont reçu ou non un antagoniste du TRPV1 (capsazépine, 10 mg/kg, i.p., 2 doses/j pour 2 jours). Les données sont exprimées sous forme de moyenne \pm écart-type à la moyenne (SEM) de 6-8 rats. La comparaison statistique avec le groupe témoin (*) et le groupe STZ (+) est indiquée par : ++, ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$.

Figure 12 : Niveau d'expression de l'ARNm du B1R dans l'aorte, le cortex rénal et la moelle épinière de rats STZ traités ou non avec un antagoniste sélectif du TRPV1.



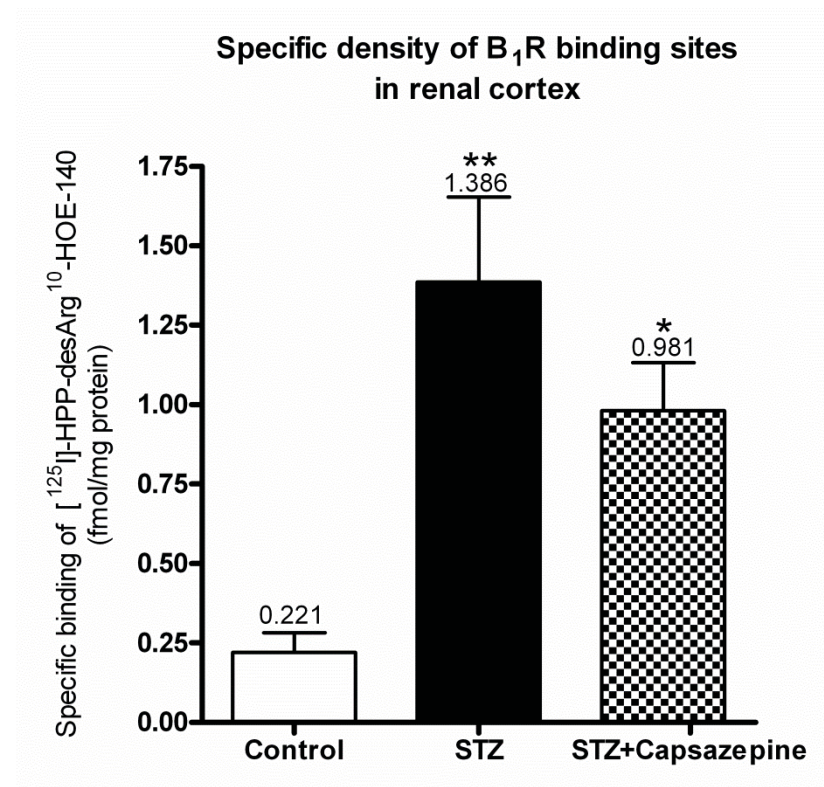
Mesure par PCR quantitatif en temps réel des taux d'ARNm du B1R dans l'aorte, le cortex rénal et la moelle épinière de rats témoins et traités à la STZ (65 mg/kg, i.p.) pour 1 semaine. Les rats STZ ont reçu ou non un antagoniste du TRPV1 pendant une semaine (capsazépine, 10 mg/kg, i.p., 2 doses/j). Les données sont exprimées sous forme de moyenne \pm SEM de 6-8 rats. La comparaison statistique avec le groupe témoin (*) et le groupe STZ (+) est indiquée par : +, * $P < 0.05$. La procédure pour le PCR quantitatif est décrite dans l'article 1 de cette thèse.

Figure 13 : Niveau d'expression protéique du B₁R dans le cortex rénal de rats STZ traités ou non avec un antagoniste sélectif du TRPV1.



Mesure par immunobuvardage de type Western de l'expression protéique du B₁R dans le cortex rénal de rats témoins et traités à la STZ (65 mg/kg, i.p.) pour 1 semaine. Les rats STZ ont reçu ou non un antagoniste du TRPV1 pendant une semaine (capsazépine, 10 mg/kg, i.p., 2 doses/j). Les données sont exprimées sous forme de moyenne ± SEM de 5-6 rats. La comparaison statistique avec le groupe témoin (*) et le groupe STZ (+) est indiquée par : +,* P < 0.05. La procédure pour l'immunobuvardage de type Western est décrite dans l'article 4 de cette thèse.

Figure 14 : Densité des sites de liaison spécifiques du B₁R dans le cortex rénal de rat STZ traités ou non avec un antagoniste sélectif du TRPV1.



Mesure par autoradiographie quantitative des sites de liaison du B₁R dans le cortex rénal de rats témoins et traités à la STZ (65 mg/kg, i.p.) pour 1 semaine. Les rats STZ ont reçu ou non un antagoniste du TRPV1 pendant une semaine (Capsazépine, 10 mg/kg, i.p., 2 doses/j). Les données sont exprimées sous forme de moyenne ± SEM de 5-6 rats. La comparaison statistique avec le groupe témoin (*) est indiquée par : * P < 0.05; ** P < 0.01. La procédure pour l'autoradiographie quantitative est décrite dans l'article 1 de cette thèse.

12.5. Le rôle du B1R central et périphérique dans la douleur

Nos données obtenues chez les rats diabétiques de type 1 (1 semaine post-STZ) suggèrent que l'inhibition intraspinale du B1R au moyen d'antagonistes sélectifs (SSR240612 ou R-715) permet de faire rétrocéder les neuropathies diabétiques (Talbot *et al.*, 2010). De plus, l'inhibition de l'activité microgliale (fluorocitrate, minocycline) permet de prévenir l'activité pro-nociceptive du B1R, ainsi que son expression centrale menant également à la suppression des neuropathies diabétiques (Talbot *et al.*, 2010). Tout considéré, nos données suggèrent que l'inhibition centrale du B1R est suffisante pour bloquer les DPN. D'autre part, le traitement systémique aigu (Dias *et al.*, 2007) ou chronique (Dias *et al.*, 2010) avec un antagoniste sélectif non peptidique du B1R (SSR240612, pénétrant la barrière hémato-encéphalique) supprime les neuropathies (allodynie) chez des rats diabétiques de type 2 (10% de glucose dans l'eau à boire pour 8 semaines). Cependant, ces dernières données ne nous renseignent pas sur le site d'action des antagonistes du B1R (central ou périphérique) et donc ne permettent pas d'infirmer ou de confirmer notre hypothèse. Utilisant le même modèle de rat traités au glucose, Lungu et collègues (Lungu *et al.*, 2007) ont montré que des antagonistes sélectifs du B1R, peptidique (R-715) ou non (LF22-0542), administrés par voie systémique suppriment les DPN (allodynie tactile et au froid), suggérant un site d'action périphérique. Également, Gabra a montré que l'administration systémique d'antagonistes peptidiques du B1R (R-715 et R-954) en périphérie bloque l'hyperalgésie thermique chez la souris (Gabra *et al.*, 2003b) et le rat (Gabra *et al.*, 2005a) diabétiques de type 1 (STZ).

L'ensemble de ces données suggèrent que l'inhibition périphérique ou centrale du B1R permet de faire rétrocéder les DPN chez les rats et les souris diabétiques de types 1 et 2. Pour ce qui est du mécanisme d'action du B1R central, nos recherches suggèrent que l'inhibition du B1R prévient l'activation des cellules de la microglie connues pour leur rôle pro-nociceptif dans de nombreux modèles expérimentaux de douleur neuropathique (Hulsebosch, 2012; Talbot *et al.*, 2012a). Cependant, les connaissances actuelles ne permettent pas d'expliquer le mécanisme par lequel le B1R périphérique induit la douleur neuropathique. Il apparaît probable que le B1R soit exprimé sur les dendrites des afférences sensitives primaires puisqu'il est retrouvé au niveau de leurs projections (fibres C) centrales dans la moelle épinière (Talbot *et al.*, 2009). Ainsi, il est possible que l'inhibition périphérique du B1R réduise le niveau de sensibilisation des nocicepteurs polymodaux, limitant ainsi la stimulation chronique des neurones de 2^e ordre et des cellules de la microglie dans la moelle épinière. En effet, il serait intéressant d'étudier l'expression du B1R au niveau périphérique (cellules immunes, dendrites des fibres afférentes) chez les rats STZ, précisément au niveau du derme des pattes postérieures (lieu d'acquisition des données sur l'allodynie et l'hyperalgésie). En conclusion, l'utilisation d'un antagoniste sélectif non peptidique du B1R (SSR240612, bio-disponible oralement) semble parfaitement indiquée dans le traitement des neuropathies diabétiques puisque ce dernier permet autant l'inhibition périphérique (fibres sensorielles) que centrale (microglie) du B1R, assurant un meilleur pronostic clinique.

12.6. Inhibiteurs de l'activité microgliale

L'inhibition de l'activité des microglies constitue une manière simple et directe d'évaluer le rôle de ces cellules dans les processus physiologiques et pathologiques. Cette dualité s'explique par l'existence d'un état basal (rôle immun) et activé (rôle pro-nociceptif et pro-inflammatoire) de la cellule (article 3 de cette thèse). Cependant, aucun inhibiteur sélectif de ces cellules n'est encore commercialement disponible. En outre, deux molécules, ci-nommées fluorocitrate (Clark et al., 2007) et minocycline (Chang et al., 2010), sont présentement utilisées pour mener ce type de travail. Brièvement, l'acide fluorocitrate est un acide carboxylique dérivé de l'acide fluoroacétique (commercialement utilisé comme pesticide). Ainsi, le fluorocitrate possède une structure apparentée à celle de l'acétate lui permettant d'être absorbé par les cellules au moyen de la pompe acétate perméase (Proudfoot et al., 2006), un transporteur membranaire H⁺/Na⁺-dépendant. Une fois que le fluorocitrate est entré dans la cellule, il se lie de manière covalente à l'aconitase, un métabolite clé du cycle de Krebs (Proudfoot et al., 2006). Cette action réduit grandement l'apport énergétique cellulaire et provoque éventuellement l'apoptose (Proudfoot et al., 2006). Il semble que cette drogue inhibe les formes activées des cellules gliales. Effectivement, elle est principalement utilisée pour inhiber l'astrogliose (67 références répertoriées dans Pubmed), mais pourrait également limiter la microgliose (25 références dans Pubmed). Il s'avère cependant que la nature de sa pseudo-sélectivité demeure inconnue, tout comme son niveau de sélectivité pour ces deux types cellulaires. Le dosage approprié du fluorocitrate semble prévenir l'occurrence de la mortalité cellulaire en plongeant la cellule dans un état de quiescence réversible (Proudfoot et al., 2006). En effet, des

études menées chez l'opposum ont révélé que des doses sub-léthales de fluorocitrate sont entièrement métabolisées et excrétées 4 jours post-administration (Eason et al., 1993).

En conclusion, il est difficile de distinguer l'activité et le niveau de sélectivité du fluorocitrate sur les astrocytes et les microglies. Ainsi, l'effet de différentes doses de fluorocitrate et de différents temps d'administration sur le niveau d'inhibition des microglies et des astrocytes pourrait être étudié. En outre, nos résultats expérimentaux (article 2) sur le rôle de la microglie dans l'activité pro-nociceptive du B1R ont été confirmés au moyen de la minocycline. Notez que celle-ci n'affecte pas l'activité des astrocytes (Matsukawa et al., 2009).

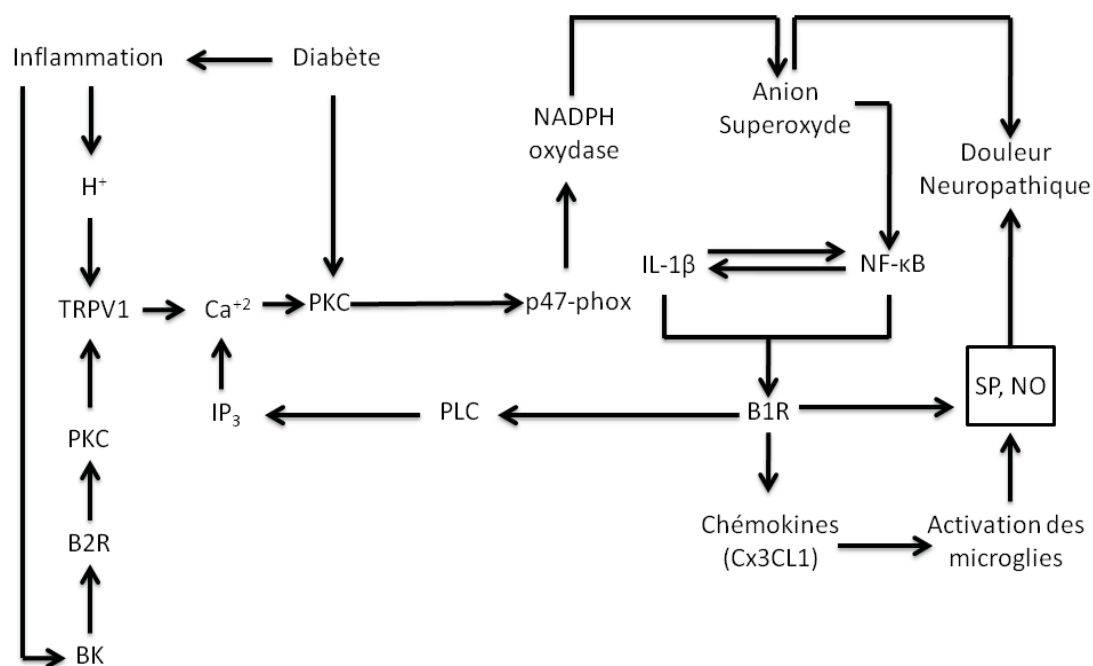
12.7. Chronicité de la douleur – mécanisme intégratif

Nos données ainsi que les connaissances actuellement disponibles dans la littérature nous permettent de proposer un mécanisme général (voir figure 15) pouvant expliquer le passage de la douleur aiguë vers sa chronicité. En effet, la perception initiale de la douleur pourrait, entre autres, impliquer le B2R. Celui-ci est ubiquitaire, exprimé de façon constitutive et participerait davantage à la phase aiguë de l'inflammation (Couture *et al.*, 2004). D'ailleurs, la BK est libérée de façon abondante lors d'un dommage tissulaire, ce qui mène à la stimulation du B2R entraînant l'activation de seconds messagers intracellulaires, tels que la PKC via la voie de la PLC (Couture *et al.*, 2004). Cependant, la stimulation du B2R est suivie de sa désensibilisation et de son internalisation (Leeb-Lundberg *et al.*, 2005). La PKC activée phosphoryle le

TRPV1, rendant ce canal davantage propice à l'ouverture. De plus, les autres médiateurs libérés lors du dommage initial, tels que les protons et les métabolites de l'acide arachidonique, peuvent directement stimuler le TRPV1 et entraîner une augmentation de la concentration intracellulaire de calcium menant à la dépolarisation neuronale. De façon concomitante, certaines kinases sont activées et entraînent à leur tour la stimulation de la NADPH oxydase et l'augmentation de la production d'anion superoxyde. Ces ROS déclenchent la translocation nucléaire du NF- κ B et mènent à l'expression du B1R sur les fibres sensorielles de type C, les astrocytes et les cellules de la microglie. La BK, libérée en condition inflammatoire, est convertie en des-Arg⁹-BK par les kininases I, permettant ainsi la stimulation du B1R (Leeb-Lundberg *et al.*, 2005). Ce dernier entraîne alors une augmentation plus importante de l'activité de la NADPH oxydase (Dias *et al.*, 2010; Talbot *et al.*, 2011b) et donc, de la production de ROS, de l'activation du NF- κ B, de la production de cytokines (IL-1 β , TNF α) et de l'expression de récepteurs pro-inflammatoires (B1R, IL-1R) (Talbot *et al.*, 2011b). De plus, la stimulation du B1R est associée à une augmentation de la libération de médiateurs pro-nociceptifs (SP, NO, Glutamate) (Couture *et al.*, 2001; Talbot *et al.*, 2012b) contribuant à la sensibilisation neuronale. Finalement, la stimulation du B1R entraîne la production de chémokines (Cx3CL1) contribuant à l'attraction des cellules gliales (Talbot *et al.*, 2012a) ainsi qu'à leur activation (augmentation intracellulaire de calcium). Les cellules gliales ainsi activées participent au maintien de la production de médiateurs inflammatoires contribuant au processus de sensibilisation neuronale et donc à la chronicité de la douleur.

En condition d'hyperglycémie chronique (diabète), les niveaux d'activation et de production de DAG (Rolo *et al.*, 2006) et de la PKC (Danis *et al.*, 2009; Das Evcimen *et al.*, 2007; Noh *et al.*, 2007) sont augmentés, ainsi que la production de ROS (Giacco *et al.*, 2010). Ces dernières peuvent alors sensibiliser le TRPV1 et conduire à l'expression du B1R.

Figure 15 : Lien entre les récepteurs des kinines et TRPV1 dans la douleur neuropathique.



Bradykinine (BK), Calcium (Ca^{+2}), Chaînes légères du facteur nucléaire kappa des cellules B activées (NF- κ B), Chémokine (C-X3-C motif) ligand 1 (Cx3CL1), Inositol 3-phosphate (IP_3), Interleukine-1 β (IL-1 β), Monoxyde d'azote (NO), Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate (NADPH), Phospholipase C (PLC), Protéine kinase C (PKC), Proton (H^+), Récepteur aux vanilloïdes (TRPV1), Récepteur B1 des kinines (B1R), Récepteur B2 des kinines (B2R), Substance P (SP).

13.0. Conclusion

En conclusion, nos résultats ont permis d'affiner nos connaissances portant sur la régulation, la localisation et le rôle pathophysiologique du B1R des kinines. Ils ont, entre autres, permis de mettre en étude une nouvelle voie d'induction du B1R, via la stimulation du TRPV1. De plus, nos données ont montré le rôle clé des cellules de la microglie dans l'activité pro-nociceptive du B1R. Conséquemment, le TRPV1 et la microglie doivent maintenant être considérés comme des cibles pharmacologiques de choix dans la prévention de l'activité ou de l'induction du B1R. De facto, ceux-ci présentent un potentiel thérapeutique intéressant dans le traitement de pathologies associées à l'inflammation, telles que les complications reliées au diabète.

Les faits saillants de cette thèse incluent :

- 1) La mise au point d'une sonde fluorescente spécifique, le N^α-Bodipy-des-Arg⁹-BK, permettant l'identification des types cellulaires exprimant le B1R au niveau spinal.

Au moyen de cet outil on a noté :

- a) Une absence d'expression du B1R dans la moelle épinière de rats témoins.
- b) Une colocalisation du B1R sur les afférences sensibles de type C, les astrocytes et les cellules de la microglie chez le rat traité à la STZ. Ceci est en accord avec une augmentation significative de l'expression (ARNm et sites de liaison) du B1R.

- 2) L'inhibition du B1R (spinal ou systémique) au moyen d'antagonistes sélectifs peptidiques (R-715) ou non (SSR240612) supprime les allodynies tactile et au froid présentes chez les rats diabétiques de type 1. Le blocage de la forme activée des cellules de la microglie (fluorocitrate et minocycline) prévient également ces allodynies.
- a) La stimulation intraspinale du B1R avec son agoniste sélectif, la des-Arg⁹-BK, cause une hyperalgésie thermique transitoire et augmente la sévérité des allodynies tactile chez les rats STZ.
 - b) En revanche, cette stimulation est sans effet chez les rats témoins. Le blocage du B1R (SSR240612, i.t.) ou de la forme activée des cellules de la microglie (fluorocitrate et minocycline) prévient l'effet pro-nociceptif induit par la stimulation intraspinale du B1R chez les rats STZ.
 - c) Le blocage de l'activation des cellules de la microglie (fluorocitrate et minocycline) diminue significativement l'expression de cytokines (IL-1 β et TNF α) et du B1R dans la moelle épinière de rats STZ.

- 3) L'administration systémique de doses subléthales de capsaïcine chez le rat induit une surexpression de l'ARNm, des sites de liaison et de la forme protéique du B1R dans la moelle épinière.
- a) Cette induction est associée à la stimulation du canal ionique TRPV1 puisque prévenue chez des animaux pré-traités avec des antagonistes sélectifs (Capsazépine, SB-366791).
 - b) L'activation du TRPV1 par la capsaïcine augmente la production spinale de ROS qui entraîne une augmentation de la phosphorylation du NF- κ B et ultimement l'expression du B1R.
 - c) Le B1R induit suivant l'administration de la capsaïcine est localisé à 87% sur la microglie.
 - d) Le B1R induit par l'activation du TRPV1 est fonctionnel. En effet, l'activation intraspinale du B1R produit une hyperalgésie thermique transitoire secondaire à la relâche de SP, glutamate et de NO.

14.0. RÉFÉRENCES

Abdouh M, Khanjari A, Abdelazziz N, Ongali B, Couture R, Hassessian HM (2003). Early upregulation of kinin B1 receptors in retinal microvessels of the streptozotocin-diabetic rat. *Br J Pharmacol* **140**(1): 33-40.

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

Abraham J, Fox PD, Condello C, Bartolini A, Koh S (2012). Minocycline attenuates microglia activation and blocks the long-term epileptogenic effects of early-life seizures. *Neurobiol Dis*.

Ahren B (2000). Autonomic regulation of islet hormone secretion--implications for health and disease. *Diabetologia* **43**(4): 393-410.

Aimar P, Pasti L, Carmignoto G, Merighi A (1998). Nitric oxide-producing islet cells modulate the release of sensory neuropeptides in the rat substantia gelatinosa. *J Neurosci* **18**(24): 10375-10388.

Alexander GM, Peterlin BL, Perreault MJ, Grothusen JR, Schwartzman RJ (2012). Changes in plasma cytokines and their soluble receptors in complex regional pain syndrome. *J Pain* **13**(1): 10-20.

Almeida TF, Roizenblatt S, Tufik S (2004). Afferent pain pathways: a neuroanatomical review. *Brain Res* **1000**(1-2): 40-56.

Ameyar M, Wisniewska M, Weitzman JB (2003). A role for AP-1 in apoptosis: the case for and against. *Biochimie* **85**(8): 747-752.

Andrade P, Visser-Vandewalle V, Hoffmann C, Steinbusch HW, Daemen MA, Hoogland G (2011). Role of TNF-alpha during central sensitization in preclinical studies. *Neurol Sci* **32**(5): 757-771.

Araque A, Parpura V, Sanzgiri RP, Haydon PG (1999). Tripartite synapses: glia, the unacknowledged partner. *Trends Neurosci* **22**(5): 208-215.

Attal N, Brasseur L, Chauvin M, Bouhassira D (1999). Effects of single and repeated applications of a eutectic mixture of local anaesthetics (EMLA) cream on spontaneous and evoked pain in post-herpetic neuralgia. *Pain* **81**(1-2): 203-209.

Auron PE, Webb AC, Rosenwasser LJ, Mucci SF, Rich A, Wolff SM, *et al.* (1984). Nucleotide sequence of human monocyte interleukin 1 precursor cDNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* **81**(24): 7907-7911.

Averill S, Robson LG, Jeromin A, Priestley JV (2004). Neuronal calcium sensor-1 is expressed by dorsal root ganglion cells, is axonally transported to central and peripheral terminals, and is concentrated at nodes. *Neuroscience* **123**(2): 419-427.

Bachvarov DR, Hess JF, Menke JG, Larrivee JF, Marceau F (1996). Structure and genomic organization of the human B1 receptor gene for kinins (BDKRB1). *Genomics* **33**(3): 374-381.

Bachvarov DR, Houle S, Bachvarova M, Bouthillier J, Adam A, Marceau F (2001). Bradykinin B(2) receptor endocytosis, recycling, and down-regulation assessed using green fluorescent protein conjugates. *J Pharmacol Exp Ther* **297**(1): 19-26.

Baker RG, Hayden MS, Ghosh S (2011). NF-kappaB, inflammation, and metabolic disease. *Cell Metab* **13**(1): 11-22.

Barres BA (2008). The mystery and magic of glia: a perspective on their roles in health and disease. *Neuron* **60**(3): 430-440.

Baynes JW, Thorpe SR (1999). Role of oxidative stress in diabetic complications: a new perspective on an old paradigm. *Diabetes* **48**(1): 1-9.

Beattie EC, Stellwagen D, Morishita W, Bresnahan JC, Ha BK, Von Zastrow M, *et al.* (2002). Control of synaptic strength by glial TNFalpha. *Science* **295**(5563): 2282-2285.

Beggs S, Salter MW (2008). Taking two cuts at pain. *Nat Med* **14**(3): 243-244.

Belarbi K, Jopson T, Tweedie D, Arellano C, Luo W, Greig NH, *et al.* (2012). TNF-alpha protein synthesis inhibitor restores neuronal function and reverses cognitive deficits induced by chronic neuroinflammation. *J Neuroinflammation* **9**(1): 23.

Belichard P, Landry M, Faye P, Bachvarov DR, Bouthillier J, Pruneau D, *et al.* (2000). Inflammatory hyperalgesia induced by zymosan in the plantar tissue of the rat: effect of kinin receptor antagonists. *Immunopharmacology* **46**(2): 139-147.

Bennett MV, Contreras JE, Bukauskas FF, Saez JC (2003). New roles for astrocytes: gap junction hemichannels have something to communicate. *Trends Neurosci* **26**(11): 610-617.

Bensi G, Raugei G, Palla E, Carinci V, Tornese Buonamassa D, Melli M (1987). Human interleukin-1 beta gene. *Gene* **52**(1): 95-101.

Berger NA (1985). Poly(ADP-ribose) in the cellular response to DNA damage. *Radiat Res* **101**(1): 4-15.

Berwert L, Teta D, Zanchi A (2007). [Chronic kidney disease and antidiabetic treatment]. *Rev Med Suisse* **3**(101): 598-604.

Bhave G, Zhu W, Wang H, Brasier DJ, Oxford GS, Gereau RWt (2002). cAMP-dependent protein kinase regulates desensitization of the capsaicin receptor (VR1) by direct phosphorylation. *Neuron* **35**(4): 721-731.

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

Bierhaus A, Humpert PM, Morcos M, Wendt T, Chavakis T, Arnold B, *et al.* (2005). Understanding RAGE, the receptor for advanced glycation end products. *J Mol Med (Berl)* **83**(11): 876-886.

Billings LK, Florez JC (2010). The genetics of type 2 diabetes: what have we learned from GWAS? *Ann N Y Acad Sci* **1212**: 59-77.

Bingel U, Tracey I (2008). Imaging CNS modulation of pain in humans. *Physiology (Bethesda)* **23**: 371-380.

Bishnoi M, Bosgraaf CA, Abooj M, Zhong L, Premkumar LS (2011). Streptozotocin-induced early thermal hyperalgesia is independent of glycemic state of rats: role of transient receptor potential vanilloid 1 (TRPV1) and inflammatory mediators. *Mol Pain* **7**: 52.

Blomqvist A, Berkley KJ (1992). A re-examination of the spino-reticulo-diencephalic pathway in the cat. *Brain Res* **579**(1): 17-31.

Bluestone JA, Herold K, Eisenbarth G (2010). Genetics, pathogenesis and clinical interventions in type 1 diabetes. *Nature* **464**(7293): 1293-1300.

Bouwmeester T, Bauch A, Ruffner H, Angrand PO, Bergamini G, Crougton K, *et al.* (2004). A physical and functional map of the human TNF-alpha/NF-kappa B signal transduction pathway. *Nat Cell Biol* **6**(2): 97-105.

Brambilla G, Carlo P, Finollo R, Sciaba L (1987). Dose-response curves for liver DNA fragmentation induced in rats by sixteen N-nitroso compounds as measured by viscometric and alkaline elution analyses. *Cancer Res* **47**(13): 3485-3491.

Bredt DS, Glatt CE, Hwang PM, Fotuhi M, Dawson TM, Snyder SH (1991). Nitric oxide synthase protein and mRNA are discretely localized in neuronal populations of the mammalian CNS together with NADPH diaphorase. *Neuron* **7**(4): 615-624.

Breivik H, Collett B, Ventafridda V, Cohen R, Gallacher D (2006). Survey of chronic pain in Europe: prevalence, impact on daily life, and treatment. *Eur J Pain* **10**(4): 287-333.

Brovkovych V, Zhang Y, Brovkovich S, Minshall RD, Skidgel RA (2011). A novel pathway for receptor-mediated post-translational activation of inducible nitric oxide synthase. *J Cell Mol Med* **15**(2): 258-69.

- Brownlee M (2001). Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. *Nature* **414**(6865): 813-820.
- Bujalska M, Makulska-Nowak H (2009a). Bradykinin receptor antagonists and cyclooxygenase inhibitors in vincristine- and streptozotocin-induced hyperalgesia. *Pharmacol Rep* **61**(4): 631-640.
- Bujalska M, Makulska-Nowak H (2009b). Bradykinin receptors antagonists and nitric oxide synthase inhibitors in vincristine and streptozotocin induced hyperalgesia in chemotherapy and diabetic neuropathy rat model. *Neuro Endocrinol Lett* **30**(1): 144-152.
- Buritova J, Besson JM, Bernard JF (1998). Involvement of the spinoparabrachial pathway in inflammatory nociceptive processes: a c-Fos protein study in the awake rat. *J Comp Neurol* **397**(1): 10-28.
- Burkart V, Wang ZQ, Radons J, Heller B, Herceg Z, Stingl L, *et al.* (1999). Mice lacking the poly(ADP-ribose) polymerase gene are resistant to pancreatic beta-cell destruction and diabetes development induced by streptozocin. *Nat Med* **5**(3): 314-319.
- Caldeira JC, Franci CR, Pela IR (1998). Bilateral lesion of hypothalamic paraventricular nucleus abolishes fever induced by endotoxin and bradykinin in rats. *Ann N Y Acad Sci* **856**: 294-297.
- Calixto JB, Cabrini DA, Ferreira J, Campos MM (2000). Kinins in pain and inflammation. *Pain* **87**(1): 1-5.
- Calixto JB, Medeiros R, Fernandes ES, Ferreira J, Cabrini DA, Campos MM (2004). Kinin B1 receptors: key G-protein-coupled receptors and their role in inflammatory and painful processes. *Br J Pharmacol* **143**(7): 803-818.
- Cameron NE, Cotter MA, Low PA (1991). Nerve blood flow in early experimental diabetes in rats: relation to conduction deficits. *The American journal of physiology* **261**(1 Pt 1): E1-8.

Campos MM, Cabrini DA, Cardozo AH, Rae GA, Toro JH, Calixto JB (2001). Changes in paw oedema triggered via bradykinin B(1) and B(2) receptors in streptozotocin-diabetic rats. *Eur J Pharmacol* **416**(1-2): 169-177.

Campos MM, Leal PC, Yunes RA, Calixto JB (2006). Non-peptide antagonists for kinin B1 receptors: new insights into their therapeutic potential for the management of inflammation and pain. *Trends Pharmacol Sci* **27**(12): 646-651.

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

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

Carter MS, Krause JE (1990). Structure, expression, and some regulatory mechanisms of the rat preprotachykinin gene encoding substance P, neurokinin A, neuropeptide K, and neuropeptide gamma. *J Neurosci* **10**(7): 2203-2214.

Caterina MJ, Leffler A, Malmberg AB, Martin WJ, Trafton J, Petersen-Zeitz KR, *et al.* (2000). Impaired nociception and pain sensation in mice lacking the capsaicin receptor. *Science* **288**(5464): 306-313.

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**(6653): 816-824.

Cervero F (2009). Spinal cord hyperexcitability and its role in pain and hyperalgesia. *Exp Brain Res* **196**(1): 129-137.

Chan CL, Facer P, Davis JB, Smith GD, Egerton J, Bountra C, *et al.* (2003). Sensory fibres expressing capsaicin receptor TRPV1 in patients with rectal hypersensitivity and faecal urgency. *Lancet* **361**(9355): 385-391.

- Chan L, Terashima T, Urabe H, Lin F, Kojima H (2011). Pathogenesis of diabetic neuropathy: bad to the bone. *Annals of the New York Academy of Sciences* **1240**: 70-76.
- Chang YW, Waxman SG (2010). Minocycline attenuates mechanical allodynia and central sensitization following peripheral second-degree burn injury. *J Pain* **11**(11):1146-54.
- Chatzidakis I, Mamalaki C (2010). T cells as sources and targets of TNF: implications for immunity and autoimmunity. *Curr Dir Autoimmun* **11**: 105-118.
- Chen G, Goeddel DV (2002). TNF-R1 signaling: a beautiful pathway. *Science* **296**(5573): 1634-1635.
- Chen J (2011). History of pain theories. *Neuroscience bulletin* **27**(5): 343-350.
- Chen S, Khan ZA, Cukiernik M, Chakrabarti S (2003). Differential activation of NF-kappa B and AP-1 in increased fibronectin synthesis in target organs of diabetic complications. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **284**(6): E1089-1097.
- Chichorro JG, Lorenzetti BB, Zampronio AR (2004). Involvement of bradykinin, cytokines, sympathetic amines and prostaglandins in formalin-induced orofacial nociception in rats. *Br J Pharmacol* **141**(7): 1175-1184.
- Clark AK, Gentry C, Bradbury EJ, McMahon SB, Malcangio M (2007). Role of spinal microglia in rat models of peripheral nerve injury and inflammation. *Eur J Pain* **11**(2):223-30.
- Cloutier F, Couture R (2000). Pharmacological characterization of the cardiovascular responses elicited by kinin B(1) and B(2) receptor agonists in the spinal cord of streptozotocin-diabetic rats. *Br J Pharmacol* **130**(2): 375-385.
- Cochereau C, Sanchez D, Bourhaoui A, Creppy EE (1996). Capsaicin, a structural analog of tyrosine, inhibits the aminoacylation of tRNA(Tyr). *Toxicol Appl Pharmacol* **141**(1): 133-137.
- Coelho MM, Oliveira CR, Pajolla GP, Calixto JB, Pela IR (1997). Central involvement of kinin B1 and B2 receptors in the febrile response induced by endotoxin in rats. *Br J Pharmacol* **121**(2): 296-302.

Correa CR, Calixto JB (1993). Evidence for participation of B1 and B2 kinin receptors in formalin-induced nociceptive response in the mouse. *Br J Pharmacol* **110**(1): 193-198.

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

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

Craig AD (1991). Spinal distribution of ascending lamina I axons anterogradely labeled with Phaseolus vulgaris leucoagglutinin (PHA-L) in the cat. *J Comp Neurol* **313**(2): 377-393.

Creange A, Boerio D, Lefaucheur JP (2006). [Inflammatory demyelinating neuropathies: classification, evolution and prognosis]. *J Soc Biol* **200**(4): 301-306.

Crofford OB (1995). Diabetes control and complications. *Annu Rev Med* **46**: 267-279.

Cui M, Honore P, Zhong C, Gauvin D, Mikusa J, Hernandez G, *et al.* (2006). TRPV1 receptors in the CNS play a key role in broad-spectrum analgesia of TRPV1 antagonists. *J Neurosci* **26**(37): 9385-9393.

Culotta E, Koshland DE, Jr. (1992). NO news is good news. *Science* **258**(5090): 1862-1865.

Cunha TM, Verri WA, Jr., Fukada SY, Guerrero AT, Santodomingo-Garzon T, Poole S, *et al.* (2007). TNF-alpha and IL-1beta mediate inflammatory hypernociception in mice triggered by B1 but not B2 kinin receptor. *Eur J Pharmacol* **573**(1-3): 221-229.

Curtiss LK (2009). Reversing atherosclerosis? *N Engl J Med* **360**(11): 1144-1146.

Czeschik JC, Hagenacker T, Schafers M, Busselberg D (2008). TNF-alpha differentially modulates ion channels of nociceptive neurons. *Neurosci Lett* **434**(3): 293-298.

Dal D, Salman MA, Salman AE, Iskit AB, Aypar U (2006). The involvement of nitric oxide on the analgesic effect of tramadol. *Eur J Anaesthesiol* **23**(2): 175-177.

Danis RP, Sheetz MJ (2009). Ruboxistaurin: PKC-beta inhibition for complications of diabetes. *Expert Opin Pharmacother* **10**(17): 2913-2925.

Das Evcimen N, King GL (2007). The role of protein kinase C activation and the vascular complications of diabetes. *Pharmacol Res* **55**(6): 498-510.

Datar P, Srivastava S, Coutinho E, Govil G (2004). Substance P: structure, function, and therapeutics. *Curr Top Med Chem* **4**(1): 75-103.

De Felipe C, Herrero JF, O'Brien JA, Palmer JA, Doyle CA, Smith AJ, *et al.* (1998). Altered nociception, analgesia and aggression in mice lacking the receptor for substance P. *Nature* **392**(6674): 394-397.

de Sousa Buck H, Ongali B, Thibault G, Lindsey CJ, Couture R (2002). Autoradiographic detection of kinin receptors in the human medulla of control, hypertensive, and diabetic donors. *Can J Physiol Pharmacol* **80**(4): 249-257.

deBlois D, Horlick RA (2001). Endotoxin sensitization to kinin B(1) receptor agonist in a non-human primate model: haemodynamic and pro-inflammatory effects. *Br J Pharmacol* **132**(1): 327-335.

Delaney CA, Dunger A, Di Matteo M, Cunningham JM, Green MH, Green IC (1995). Comparison of inhibition of glucose-stimulated insulin secretion in rat islets of Langerhans by streptozotocin and methyl and ethyl nitrosoureas and methanesulphonates. Lack of correlation with nitric oxide-releasing or O6-alkylating ability. *Biochem Pharmacol* **50**(12): 2015-2020.

Devor M (2009). Ectopic discharge in Abeta afferents as a source of neuropathic pain. *Exp Brain Res* **196**(1): 115-128.

Dhimolea E (2010). Canakinumab. *MAbs* **2**(1): 3-13.

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

Dias JP, Talbot S, Senecal J, Carayon P, Couture R (2010). Kinin B1 receptor enhances the oxidative stress in a rat model of insulin resistance: outcome in hypertension, allodynia and metabolic complications. *PLoS One* **5**(9): e12622.

Dinis P, Charrua A, Avelino A, Yaqoob M, Bevan S, Nagy I, *et al.* (2004). Anandamide-evoked activation of vanilloid receptor 1 contributes to the development of bladder hyperreflexia and nociceptive transmission to spinal dorsal horn neurons in cystitis. *J Neurosci* **24**(50): 11253-11263.

Djoughri L, Jankowska E (1998). Indications for coupling between feline spinocervical tract neurones and midlumbar interneurons. *Exp Brain Res* **119**(1): 39-46.

Djoughri L, Meng Z, Brown AG, Short AD (1997). Electrophysiological evidence that spinomesencephalic neurons in the cat may be excited via spinocervical tract collaterals. *Exp Brain Res* **116**(3): 477-484.

Donkin JJ, Nimmo AJ, Cernak I, Blumbergs PC, Vink R (2009). Substance P is associated with the development of brain edema and functional deficits after traumatic brain injury. *J Cereb Blood Flow Metab* **29**(8): 1388-1398.

Doolittle DJ, Rahn CA, Burger GT, Davis R, deBethizy JD, Howard G, *et al.* (1989). Human urine mutagenicity study comparing cigarettes which burn or only heat tobacco. *Mutat Res* **223**(2): 221-232.

Dray A (1997). Kinins and their receptors in hyperalgesia. *Can J Physiol Pharmacol* **75**(6): 704-712.

Dray A, Perkins M (1993). Bradykinin and inflammatory pain. *Trends Neurosci* **16**(3): 99-104.

Drory VE, Lev D, Groozman GB, Gutmann M, Klausner JM (1998). Neurotoxicity of isolated limb perfusion with tumor necrosis factor. *J Neurol Sci* **158**(1): 1-4.

Dubois JM (1982). Capsaicin blocks one class of K⁺ channels in the frog node of Ranvier. *Brain Res* **245**(2): 372-375.

Eason F, Henderson T, King C. (1993). Sodium monofluoroacetate and alternative toxins for possum control. *New Zealand Journal of Zoology* **20**:329-334.

El Midaoui A, de Champlain J (2005). Effects of glucose and insulin on the development of oxidative stress and hypertension in animal models of type 1 and type 2 diabetes. *J Hypertens* **23**(3): 581-588.

Empl M, Renaud S, Erne B, Fuhr P, Straube A, Schaeren-Wiemers N, *et al.* (2001). TNF-alpha expression in painful and nonpainful neuropathies. *Neurology* **56**(10): 1371-1377.

Emsley JG, Macklis JD (2006). Astroglial heterogeneity closely reflects the neuronal-defined anatomy of the adult murine CNS. *Neuron Glia Biol* **2**(3):175-186.

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

Fagerberg SE (1959). Diabetic neuropathy: a clinical and histological study on the significance of vascular affections. *Acta medica Scandinavica. Supplementum* **345**: 1-97.

Fehsel K, Kroncke KD, Kolb-Bachofen V (1995). The action of NO and its role in autoimmune diabetes mellitus. *Res Immunol* **146**(9): 711-715.

Fernandes ES, Passos GF, Campos MM, Araujo JG, Pesquero JL, Avelllar MC, *et al.* (2003). Mechanisms underlying the modulatory action of platelet activating factor (PAF) on the upregulation of kinin B1 receptors in the rat paw. *Br J Pharmacol* **139**(5): 973-981.

Fernyhough P, Calcutt NA (2010). Abnormal calcium homeostasis in peripheral neuropathies. *Cell Calcium* **47**(2): 130-139.

Ferreira J, Beirith A, Mori MA, Araujo RC, Bader M, Pesquero JB, *et al.* (2005). Reduced nerve injury-induced neuropathic pain in kinin B1 receptor knock-out mice. *J Neurosci* **25**(9): 2405-2412.

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

Ferreira J, Campos MM, Pesquero JB, Araujo RC, Bader M, Calixto JB (2001). Evidence for the participation of kinins in Freund's adjuvant-induced inflammatory and nociceptive responses in kinin B1 and B2 receptor knockout mice. *Neuropharmacology* **41**(8): 1006-1012.

Ferreira J, Triches KM, Medeiros R, Cabrini DA, Mori MA, Pesquero JB, *et al.* (2008). The role of kinin B1 receptors in the nociception produced by peripheral protein kinase C activation in mice. *Neuropharmacology* **54**(3): 597-604.

Fiacco TA, Agulhon C, McCarthy KD (2009). Sorting out astrocyte physiology from pharmacology. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **49**: 151-174.

Figuroa-Romero C, Sadidi M, Feldman EL (2008). Mechanisms of disease: the oxidative stress theory of diabetic neuropathy. *Rev Endocr Metab Disord* **9**(4): 301-314.

Finegold D, Lattimer SA, Nolle S, Bernstein M, Greene DA (1983). Polyol pathway activity and myo-inositol metabolism. A suggested relationship in the pathogenesis of diabetic neuropathy. *Diabetes* **32**(11): 988-992.

Förstermann U, Gath I, Schwarz P, Closs EI, Kleinert H (1995). Isoforms of nitric oxide synthase. Properties, cellular distribution and expressional control. *Biochem Pharmacol* **26**;50(9):1321-32.

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

Fujita M, Andoh T, Ohashi K, Akira A, Saiki I, Kuraishi Y (2010). Roles of kinin B1 and B2 receptors in skin cancer pain produced by orthotopic melanoma inoculation in mice. *Eur J Pain* **14**(6): 588-594.

Gabra BH, Benrezzak O, Pheng LH, Duta D, Daull P, Sirois P, *et al.* (2005a). Inhibition of type 1 diabetic hyperalgesia in streptozotocin-induced Wistar versus spontaneous gene-prone BB/Worchester rats: efficacy of a selective bradykinin B1 receptor antagonist. *J Neuropathol Exp Neurol* **64**(9): 782-789.

Gabra BH, Berthiaume N, Sirois P, Nantel F, Battistini B (2006). The kinin system mediates hyperalgesia through the inducible bradykinin B1 receptor subtype: evidence in various experimental animal models of type 1 and type 2 diabetic neuropathy. *Biol Chem* **387**(2): 127-143.

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

Gabra BH, Merino VF, Bader M, Pesquero JB, Sirois P (2005b). Absence of diabetic hyperalgesia in bradykinin B1 receptor-knockout mice. *Regul Pept* **127**(1-3): 245-248.

Gabra BH, Sirois P (2005c). Hyperalgesia in non-obese diabetic (NOD) mice: a role for the inducible bradykinin B1 receptor. *Eur J Pharmacol* **514**(1): 61-67.

Gabra BH, Sirois P (2003b). Kinin B1 receptor antagonists inhibit diabetes-induced hyperalgesia in mice. *Neuropeptides* **37**(1): 36-44.

Gabra BH, Sirois P (2002). Role of bradykinin B(1) receptors in diabetes-induced hyperalgesia in streptozotocin-treated mice. *Eur J Pharmacol* **457**(2-3): 115-124.

Gamse R, Petsche U, Lembeck F, Jancso G (1982). Capsaicin applied to peripheral nerve inhibits axoplasmic transport of substance P and somatostatin. *Brain Res* **239**(2): 447-462.

Gao YJ, Ji RR (2010). Targeting astrocyte signaling for chronic pain. *Neurotherapeutics* **7**(4): 482-493.

Garg A, Aggarwal BB (2002). Nuclear transcription factor-kappaB as a target for cancer drug development. *Leukemia* **16**(6): 1053-1068.

Ge YX, Xin WJ, Hu NW, Zhang T, Xu JT, Liu XG (2006). Clonidine depresses LTP of C-fiber evoked field potentials in spinal dorsal horn via NO-cGMP pathway. *Brain Res* **1118**(1): 58-65.

Geppetti P, Capone JG, Trevisani M, Nicoletti P, Zagli G, Tola MR (2005). CGRP and migraine: neurogenic inflammation revisited. *J Headache Pain* **6**(2): 61-70.

Geppetti P, Materazzi S, Nicoletti P (2006). The transient receptor potential vanilloid 1: role in airway inflammation and disease. *Eur J Pharmacol* **533**(1-3): 207-214.

Gerard NP, Garraway LA, Eddy RL, Jr., Shows TB, Iijima H, Paquet JL, *et al.* (1991). Human substance P receptor (NK-1): organization of the gene, chromosome localization, and functional expression of cDNA clones. *Biochemistry* **30**(44): 10640-10646.

Gery I, Gershon RK, Waksman BH (1972). Potentiation of the T-lymphocyte response to mitogens. I. The responding cell. *J Exp Med* **136**(1): 128-142.

Ghosh S, Hayden MS (2012). Celebrating 25 years of NF-kappaB research. *Immunol Rev* **246**(1): 5-13.

Giacco F, Brownlee M (2010). Oxidative stress and diabetic complications. *Circ Res* **107**(9): 1058-1070.

Gispen WH, Hamers FP (1994). Calcium and neuronal dysfunction in peripheral nervous system. *Ann N Y Acad Sci* **747**: 419-430.

Goodman LS, Gilman A, Brunton LL, Lazo JS, Parker KL (2006). *Goodman & Gilman's the pharmacological basis of therapeutics*. 11th edn. McGraw-Hill: New York.

Grady EF, Garland AM, Gamp PD, Lovett M, Payan DG, Bunnett NW (1995). Delineation of the endocytic pathway of substance P and its seven-transmembrane domain NK1 receptor. *Mol Biol Cell* **6**(5): 509-524.

Greene DA (1986). Acute and chronic complications of diabetes mellitus in older patients. *Am J Med* **80**(5A): 39-53.

Groop L, Lyssenko V (2008). Genes and type 2 diabetes mellitus. *Curr Diab Rep* **8**(3): 192-197.

Guan Y, Yaster M, Raja SN, Tao YX (2007). Genetic knockout and pharmacologic inhibition of neuronal nitric oxide synthase attenuate nerve injury-induced mechanical hypersensitivity in mice. *Mol Pain* **3**: 29.

Guastella V, Mick G (2009). Strategies for the diagnosis and treatment of neuropathic pain secondary to diabetic peripheral sensory polyneuropathy. *Diabetes Metab* **35**(1): 12-19.

Guhring H, Tegeder I, Lotsch J, Pahl A, Werner U, Reeh PW, *et al.* (2001). Role of nitric oxide in zymosan induced paw inflammation and thermal hyperalgesia. *Inflamm Res* **50**(2): 83-88.

Guillot E, Coste A, Angel I (1996). Involvement of capsaicin-sensitive nerves in the regulation of glucose tolerance in diabetic rats. *Life Sci* **59**(12): 969-977.

Hammes HP, Du X, Edelstein D, Taguchi T, Matsumura T, Ju Q, *et al.* (2003). Benfotiamine blocks three major pathways of hyperglycemic damage and prevents experimental diabetic retinopathy. *Nature medicine* **9**(3): 294-299.

Harrison R (2002). Structure and function of xanthine oxidoreductase: where are we now? *Free Radic Biol Med* **33**(6): 774-797.

Harrison S, Geppetti P (2001). Substance p. *Int J Biochem Cell Biol* **33**(6): 555-576.

Hautkappe M, Roizen MF, Toledano A, Roth S, Jeffries JA, Ostermeier AM (1998). Review of the effectiveness of capsaicin for painful cutaneous disorders and neural dysfunction. *Clin J Pain* **14**(2): 97-106.

Hayden MS, Ghosh S (2011). NF-kappaB in immunobiology. *Cell Res* **21**(2): 223-244.

Hayden MS, Ghosh S (2012). NF-kappaB, the first quarter-century: remarkable progress and outstanding questions. *Genes Dev* **26**(3): 203-234.

Heinricher MM, Tavares I, Leith JL, Lumb BM (2009). Descending control of nociception: Specificity, recruitment and plasticity. *Brain Res Rev* **60**(1): 214-225.

Herold KC, Vezys V, Sun Q, Viktora D, Seung E, Reiner S, *et al.* (1996). Regulation of cytokine production during development of autoimmune diabetes induced with multiple low doses of streptozotocin. *J Immunol* **156**(9): 3521-3527.

Hess J, Angel P, Schorpp-Kistner M (2004). AP-1 subunits: quarrel and harmony among siblings. *J Cell Sci* **117**(Pt 25): 5965-5973.

Hess JF, Hey PJ, Chen TB, O'Brien J, Omalley SS, Pettibone DJ, *et al.* (2001). Molecular cloning and pharmacological characterization of the canine B1 and B2 bradykinin receptors. *Biol Chem* **382**(1): 123-129.

Hofstetter CP, Holmstrom NA, Lilja JA, Schweinhardt P, Hao J, Spenger C, *et al.* (2005). Allodynia limits the usefulness of intraspinal neural stem cell grafts; directed differentiation improves outcome. *Nat Neurosci* **8**(3): 346-353.

Hogaboam CM, Wallace JL (1991). Inhibition of platelet aggregation by capsaicin. An effect unrelated to actions on sensory afferent neurons. *Eur J Pharmacol* **202**(1): 129-131.

Holthusen H, Arndt JO (1994). Nitric oxide evokes pain in humans on intracutaneous injection. *Neurosci Lett* **165**(1-2): 71-74.

Holzer P (1988). Local effector functions of capsaicin-sensitive sensory nerve endings: involvement of tachykinins, calcitonin gene-related peptide and other neuropeptides. *Neuroscience* **24**(3): 739-768.

Hong S, Agresta L, Guo C, Wiley JW (2008). The TRPV1 receptor is associated with preferential stress in large dorsal root ganglion neurons in early diabetic sensory neuropathy. *J Neurochem* **105**(4): 1212-1222.

Honore P, Wade CL, Zhong C, Harris RR, Wu C, Ghayur T, *et al.* (2006). Interleukin-1alpha gene-deficient mice show reduced nociceptive sensitivity in models of inflammatory and neuropathic pain but not post-operative pain. *Behav Brain Res* **167**(2): 355-364.

Houstis N, Rosen ED, Lander ES (2006). Reactive oxygen species have a causal role in multiple forms of insulin resistance. *Nature* **440**(7086): 944-948.

Hu CP, Xiao L, Deng HW, Li YJ (2002). The cardioprotection of rutaecarpine is mediated by endogenous calcitonin related-gene peptide through activation of vanilloid receptors in guinea-pig hearts. *Planta Med* **68**(8): 705-709.

Huang SM, Bisogno T, Trevisani M, Al-Hayani A, De Petrocellis L, Fezza F, *et al.* (2002). An endogenous capsaicin-like substance with high potency at recombinant and native vanilloid VR1 receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**(12): 8400-8405.

Hulsebosch CE (2012). Special Issue on microglia and chronic pain. *Exp Neurol* **234**(2): 253-254.

Hutter MM, Wick EC, Day AL, Maa J, Zerega EC, Richmond AC, *et al.* (2005). Transient receptor potential vanilloid (TRPV-1) promotes neurogenic inflammation in the pancreas via activation of the neurokinin-1 receptor (NK-1R). *Pancreas* **30**(3): 260-265.

Hynd MR, Scott HL, Dodd PR (2004). Glutamate-mediated excitotoxicity and neurodegeneration in Alzheimer's disease. *Neurochem Int* **45**(5): 583-595.

Inoguchi T, Li P, Umeda F, Yu HY, Kakimoto M, Imamura M, *et al.* (2000). High glucose level and free fatty acid stimulate reactive oxygen species production through protein kinase C--dependent activation of NAD(P)H oxidase in cultured vascular cells. *Diabetes* **49**(11): 1939-1945.

Ismael MA, Talbot S, Carbonneau CL, Beausejour CM, Couture R (2008). Blockade of sensory abnormalities and kinin B(1) receptor expression by N-acetyl-L-cysteine and ramipril in a rat model of insulin resistance. *Eur J Pharmacol* **589**(1-3): 66-72.

Jackson DL, Hargreaves KM (1999). Activation of excitatory amino acid receptors in bovine dental pulp evokes the release of iCGRP. *J Dent Res* **78**(1): 54-60.

Jain SK (2006). Superoxide dismutase overexpression and cellular oxidative damage in diabetes. A commentary on "Overexpression of mitochondrial superoxide dismutase in mice protects the retina from diabetes-induced oxidative stress". *Free radical biology & medicine* **41**(8): 1187-1190.

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

Jessen KR, Mirsky R (1980). Glial cells in the enteric nervous system contain glial fibrillary acidic protein. *Nature* **286**(5774): 736-737.

Ji RR, Kawasaki Y, Zhuang ZY, Wen YR, Decosterd I (2006). Possible role of spinal astrocytes in maintaining chronic pain sensitization: review of current evidence with focus on bFGF/JNK pathway. *Neuron Glia Biol* **2**(4): 259-269.

Jin X, Gereau RWt (2006). Acute p38-mediated modulation of tetrodotoxin-resistant sodium channels in mouse sensory neurons by tumor necrosis factor-alpha. *J Neurosci* **26**(1): 246-255.

Jin YH, Yamaki F, Takemura M, Koike Y, Furuyama A, Yonehara N (2009). Capsaicin-induced glutamate release is implicated in nociceptive processing through activation of ionotropic glutamate receptors and group I metabotropic glutamate receptor in primary afferent fibers. *J Pharmacol Sci* **109**(2): 233-241.

Johnston AP, Campbell JE, Found JG, Riddell MC, Hawke TJ (2007). Streptozotocin induces G2 arrest in skeletal muscle myoblasts and impairs muscle growth in vivo. *Am J Physiol Cell Physiol* **292**(3): C1033-1040.

Jordt SE, Julius D (2002). Molecular basis for species-specific sensitivity to "hot" chili peppers. *Cell* **108**(3): 421-430.

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

Kakoki M, Sullivan KA, Backus C, Hayes JM, Oh SS, Hua K, *et al.* (2010). Lack of both bradykinin B1 and B2 receptors enhances nephropathy, neuropathy, and bone mineral loss in Akita diabetic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**(22): 10190-10195.

Kaneki M, Shimizu N, Yamada D, Chang K (2007). Nitrosative stress and pathogenesis of insulin resistance. *Antioxidants & redox signaling* **9**(3): 319-329.

Katter JT, Burstein R, Giesler GJ, Jr. (1991). The cells of origin of the spinothalamic tract in cats. *J Comp Neurol* **303**(1): 101-112.

Kaul CL, Ramarao P (2001). The role of aldose reductase inhibitors in diabetic complications: recent trends. *Methods and findings in experimental and clinical pharmacology* **23**(8): 465-475.

Kaushik VV, Moots RJ (2005). CDP-870 (certolizumab) in rheumatoid arthritis. *Expert Opin Biol Ther* **5**(4): 601-606.

Kayser V, Elfassi IE, Aubel B, Melfort M, Julius D, Gingrich JA, *et al.* (2007). Mechanical, thermal and formalin-induced nociception is differentially altered in 5-HT1A^{-/-}, 5-HT1B^{-/-}, 5-HT2A^{-/-}, 5-HT3A^{-/-} and 5-HTT^{-/-} knock-out male mice. *Pain* **130**(3): 235-248.

Kempeni J (1999). Preliminary results of early clinical trials with the fully human anti-TNFalpha monoclonal antibody D2E7. *Ann Rheum Dis* **58 Suppl 1**: I70-72.

Kennedy JM, Zochodne DW (2002). Influence of experimental diabetes on the microcirculation of injured peripheral nerve: functional and morphological aspects. *Diabetes* **51**(7): 2233-2240.

Khachatryan A, Guerder S, Palluault F, Cote G, Solimena M, Valentijn K, *et al.* (1997). Targeted expression of the neuropeptide calcitonin gene-related peptide to beta cells prevents diabetes in NOD mice. *J Immunol* **158**(3): 1409-1416.

Khan GM, Chen SR, Pan HL (2002). Role of primary afferent nerves in allodynia caused by diabetic neuropathy in rats. *Neuroscience* **114**(2): 291-299.

King GL, Kunisaki M, Nishio Y, Inoguchi T, Shiba T, Xia P (1996). Biochemical and molecular mechanisms in the development of diabetic vascular complications. *Diabetes* **45 Suppl 3**: S105-108.

Klatt EC, Kumar V, Robbins SL, Cotran RS, Klatt EC (2010). *Robbins and Cotran review of pathology*. 3rd edn. Saunders/Elsevier: Philadelphia, Pa.

Klatt EC, Robbins SL, Kumar V (2000). *Robbins review of pathology*. edn. Saunders: Philadelphia.

Knip M, Siljander H (2008). Autoimmune mechanisms in type 1 diabetes. *Autoimmun Rev* **7**(7): 550-557.

Knowles RG, Moncada S (1994). Nitric oxide synthases in mammals. *Biochem J* **298 (Pt 2)**: 249-258.

Kolb WP, Granger GA (1968). Lymphocyte in vitro cytotoxicity: characterization of human lymphotoxin. *Proc Natl Acad Sci U S A* **61**(4): 1250-1255.

Kovacs KA, Steinmann M, Magistretti PJ, Halfon O, Cardinaux JR (2006). C/EBPbeta couples dopamine signalling to substance P precursor gene expression in striatal neurones. *J Neurochem* **98**(5): 1390-1399.

Krishnan AV, Lin CS, Kiernan MC (2008). Activity-dependent excitability changes suggest Na⁺/K⁺ pump dysfunction in diabetic neuropathy. *Brain* **131**(Pt 5):1209-16.

Kumar V, Abbas AK, Fausto N, Robbins SL, Cotran RS (2005). *Robbins and Cotran pathologic basis of disease*. 7th edn. Elsevier Saunders: Philadelphia.

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

Latremoliere A, Woolf CJ (2009). Central sensitization: a generator of pain hypersensitivity by central neural plasticity. *The journal of pain : official journal of the American Pain Society* **10**(9): 895-926.

Lauria G, Morbin M, Lombardi R, Capobianco R, Camozzi F, Pareyson D, *et al.* (2006). Expression of capsaicin receptor immunoreactivity in human peripheral nervous system and in painful neuropathies. *J Peripher Nerv Syst* **11**(3): 262-271.

Lawand NB, McNearney T, Westlund KN (2000). Amino acid release into the knee joint: key role in nociception and inflammation. *Pain* **86**(1-2): 69-74.

Lawson SR, Gabra BH, Nantel F, Battistini B, Sirois P (2005). Effects of a selective bradykinin B1 receptor antagonist on increased plasma extravasation in streptozotocin-induced diabetic rats: distinct vasculopathic profile of major key organs. *Eur J Pharmacol* **514**(1): 69-78.

LeDoux SP, Hall CR, Forbes PM, Patton NJ, Wilson GL (1988). Mechanisms of nicotinamide and thymidine protection from alloxan and streptozocin toxicity. *Diabetes* **37**(8): 1015-1019.

Lee HP (1989a). Patterns of smoking among Singaporeans. *Ann Acad Med Singapore* **18**(3): 286-288.

Lee PN (1989b). Passive smoking in New Zealand. *N Z Med J* **102**(877): 539.

Leeb-Lundberg LM, Marceau F, Muller-Esterl W, Pettibone DJ, Zuraw BL (2005). International union of pharmacology. XLV. Classification of the kinin receptor family: from molecular mechanisms to pathophysiological consequences. *Pharmacol Rev* **57**(1): 27-77.

Leininger GM, Backus C, Sastry AM, Yi YB, Wang CW, Feldman EL (2006). Mitochondria in DRG neurons undergo hyperglycemic mediated injury through Bim, Bax and the fission protein Drp1. *Neurobiol Dis* **23**(1): 11-22.

Leonard PA, Arunkumar R, Brennan TJ (2004). Bradykinin antagonists have no analgesic effect on incisional pain. *Anesth Analg* **99**(4): 1166-1172, table of contents.

Lester-Coll N, Rivera EJ, Soscia SJ, Doiron K, Wands JR, de la Monte SM (2006). Intracerebral streptozotocin model of type 3 diabetes: relevance to sporadic Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis* **9**(1):13-33.

Leung L, Cahill CM (2010). TNF-alpha and neuropathic pain--a review. *J Neuroinflammation* **7**: 27.

Levy D, Kubes P, Zochodne DW (2001). Delayed peripheral nerve degeneration, regeneration, and pain in mice lacking inducible nitric oxide synthase. *J Neuropathol Exp Neurol* **60**(5): 411-421.

Lim S (2007). Metabolic acidosis. *Acta Med Indones* **39**(3): 145-150.

Lin JC, Talbot S, Lahjouji K, Roy JP, Senecal J, Couture R, *et al.* (2010). Mechanism of cigarette smoke-induced kinin B(1) receptor expression in rat airways. *Peptides* **31**(10): 1940-1945.

Lin XH, Kashima Y, Khan M, Heller KB, Gu XZ, Sadun AA (1997). An immunohistochemical study of TNF-alpha in optic nerves from AIDS patients. *Curr Eye Res* **16**(10): 1064-1068.

Liu XJ, White TD, Sawynok J (2002). Intraplantar injection of glutamate evokes peripheral adenosine release in the rat hind paw: involvement of peripheral ionotropic glutamate receptors and capsaicin-sensitive sensory afferents. *J Neurochem* **80**(4): 562-570.

Lodge D (2009). The history of the pharmacology and cloning of ionotropic glutamate receptors and the development of idiosyncratic nomenclature. *Neuropharmacology* **56**(1): 6-21.

LoPinto C, Young WB, Ashkenazi A (2006). Comparison of dynamic (brush) and static (pressure) mechanical allodynia in migraine. *Cephalalgia* **26**(7): 852-856.

Lu GW (1989). Spinocervical tract-dorsal column postsynaptic neurons: a double-projection neuronal system. *Somatosens Mot Res* **6**(5-6): 445-454.

Luiz AP, Schroeder SD, Chichorro JG, Calixto JB, Zampronio AR, Rae GA (2010). Kinin B(1) and B(2) receptors contribute to orofacial heat hyperalgesia induced by infraorbital nerve constriction injury in mice and rats. *Neuropeptides* **44**(2): 87-92.

Lungu C, Dias JP, Franca CE, Ongali B, Regoli D, Moldovan F, *et al.* (2007). Involvement of kinin B1 receptor and oxidative stress in sensory abnormalities and arterial hypertension in an experimental rat model of insulin resistance. *Neuropeptides* **41**(6): 375-387.

Lyssenko V (2008). The transcription factor 7-like 2 gene and increased risk of type 2 diabetes: an update. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* **11**(4): 385-392.

Ma QP (2002). Expression of capsaicin receptor (VR1) by myelinated primary afferent neurons in rats. *Neurosci Lett* **319**(2): 87-90.

Ma QP, Hill R, Sirinathsinghi D (2000). Basal expression of bradykinin B1 receptor in peripheral sensory ganglia in the rat. *Neuroreport* **11**(18): 4003-4005.

MacMicking J, Xie QW, Nathan C (1997). Nitric oxide and macrophage function. *Annu Rev Immunol* **15**: 323-350.

Maggi CA (1995). The mammalian tachykinin receptors. *Gen Pharmacol* **26**(5): 911-944.

Mahabeer R, Naidoo S, Raidoo DM (2000). Detection of tissue kallikrein and kinin B1 and B2 receptor mRNAs in human brain by in situ RT-PCR. *Metab Brain Dis* **15**(4): 325-335.

Malmberg AB, Mizisin AP, Calcutt NA, von Stein T, Robbins WR, Bley KR (2004). Reduced heat sensitivity and epidermal nerve fiber immunostaining following single applications of a high-concentration capsaicin patch. *Pain* **111**(3): 360-367.

Marceau F, Bachvarov DR (1998a). Kinin receptors. *Clin Rev Allergy Immunol* **16**(4): 385-401.

Marceau F, Hess JF, Bachvarov DR (1998b). The B1 receptors for kinins. *Pharmacol Rev* **50**(3): 357-386.

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

March CJ, Mosley B, Larsen A, Cerretti DP, Braedt G, Price V, *et al.* (1985). Cloning, sequence and expression of two distinct human interleukin-1 complementary DNAs. *Nature* **315**(6021): 641-647.

Marin-Castano ME, Schanstra JP, Praddaude F, Pesquero JB, Ader JL, Girolami JP, *et al.* (1998). Differential induction of functional B1-bradykinin receptors along the rat nephron in endotoxin induced inflammation. *Kidney Int* **54**(6): 1888-1898.

Masson J, Darmon M, Conjard A, Chuhma N, Ropert N, Thoby-Brisson M, *et al.* (2006). Mice lacking brain/kidney phosphate-activated glutaminase have impaired glutamatergic synaptic transmission, altered breathing, disorganized goal-directed behavior and die shortly after birth. *J Neurosci* **26**(17): 4660-4671.

Mathieu C, Gysemans C, Giulietti A, Bouillon R (2005). Vitamin D and diabetes. *Diabetologia* **48**(7): 1247-1257.

Matsukawa N, Yasuhara T, Hara K, Xu L, Maki M, Yu G, Kaneko Y, Ojika K, Hess DC, Borlongan CV (2009). Therapeutic targets and limits of minocycline neuroprotection in experimental ischemic stroke. *BMC Neurosci* **6**;10:126.

Matyash V, Kettenmann H (2010). Heterogeneity in astrocyte morphology and physiology. *Brain Res Rev* **63**(1-2):2-10.

McCaffery M, Pasero C (1999). *Pain : clinical manual*. 2nd edn. Mosby: St. Louis.

McCoy MK, Tansey MG (2008). TNF signaling inhibition in the CNS: implications for normal brain function and neurodegenerative disease. *J Neuroinflammation* **5**: 45.

McEntee WJ, Crook TH (1993). Glutamate: its role in learning, memory, and the aging brain. *Psychopharmacology (Berl)* **111**(4): 391-401.

McNearney T, Baethge BA, Cao S, Alam R, Lisse JR, Westlund KN (2004). Excitatory amino acids, TNF-alpha, and chemokine levels in synovial fluids of patients with active arthropathies. *Clin Exp Immunol* **137**(3): 621-627.

McNearney T, Speegle D, Lawand N, Lisse J, Westlund KN (2000). Excitatory amino acid profiles of synovial fluid from patients with arthritis. *J Rheumatol* **27**(3): 739-745.

Meddings JB, Hogaboam CM, Tran K, Reynolds JD, Wallace JL (1991). Capsaicin effects on non-neuronal plasma membranes. *Biochim Biophys Acta* **1070**(1): 43-50.

Medeiros R, Cabrini DA, Ferreira J, Fernandes ES, Mori MA, Pesquero JB, *et al.* (2004). Bradykinin B1 receptor expression induced by tissue damage in the rat portal vein: a critical role for mitogen-activated protein kinase and nuclear factor-kappaB signaling pathways. *Circ Res* **94**(10): 1375-1382.

Medzhitov R (2001). Toll-like receptors and innate immunity. *Nat Rev Immunol* **1**(2): 135-145.

Medzhitov R, Preston-Hurlburt P, Kopp E, Stadlen A, Chen C, Ghosh S, *et al.* (1998). MyD88 is an adaptor protein in the hToll/IL-1 receptor family signaling pathways. *Mol Cell* **2**(2): 253-258.

Meller ST, Dykstra C, Gebhart GF (1992). Production of endogenous nitric oxide and activation of soluble guanylate cyclase are required for N-methyl-D-aspartate-produced facilitation of the nociceptive tail-flick reflex. *Eur J Pharmacol* **214**(1): 93-96.

Meller ST, Gebhart GF (1993). Nitric oxide (NO) and nociceptive processing in the spinal cord. *Pain* **52**(2): 127-136.

Menke JG, Borkowski JA, Bierilo KK, MacNeil T, Derrick AW, Schneck KA, *et al.* (1994). Expression cloning of a human B1 bradykinin receptor. *J Biol Chem* **269**(34): 21583-21586.

Merrill JE (1991). Effects of interleukin-1 and tumor necrosis factor-alpha on astrocytes, microglia, oligodendrocytes, and glial precursors in vitro. *Dev Neurosci* **13**(3): 130-137.

Mezey E, Toth ZE, Cortright DN, Arzubi MK, Krause JE, Elde R, *et al.* (2000). Distribution of mRNA for vanilloid receptor subtype 1 (VR1), and VR1-like immunoreactivity, in the central nervous system of the rat and human. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**(7): 3655-3660.

Micheau O, Tschopp J (2003). Induction of TNF receptor I-mediated apoptosis via two sequential signaling complexes. *Cell* **114**(2): 181-190.

Miclescu A, Gordh T (2009). Nitric oxide and pain: 'Something old, something new'. *Acta Anaesthesiol Scand* **53**(9): 1107-1120.

Millan MJ (2002). Descending control of pain. *Prog Neurobiol* **66**(6): 355-474.

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

Miller BA, Zhang W (2011a). TRP channels as mediators of oxidative stress. *Adv Exp Med Biol* **704**: 531-544.

Miller KE, Hoffman EM, Sutharshan M, Schechter R (2011b). Glutamate pharmacology and metabolism in peripheral primary afferents: physiological and pathophysiological mechanisms. *Pharmacol Ther* **130**(3): 283-309.

Milligan ED, Watkins LR (2009). Pathological and protective roles of glia in chronic pain. *Nat Rev Neurosci* **10**(1): 23-36.

Mixcoatl-Zecuatl T, Flores-Murrieta FJ, Granados-Soto V (2006). The nitric oxide-cyclic GMP-protein kinase G-K⁺ channel pathway participates in the antiallodynic effect of spinal gabapentin. *Eur J Pharmacol* **531**(1-3): 87-95.

Mizumura K (1997). Peripheral mechanism of hyperalgesia--sensitization of nociceptors. *Nagoya J Med Sci* **60**(3-4): 69-87.

Moesgaard SG, Brand CL, Sturis J, Ahren B, Wilken M, Fleckner J, *et al.* (2005). Sensory nerve inactivation by resiniferatoxin improves insulin sensitivity in male obese Zucker rats. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **288**(6): E1137-1145.

Mogi M, Harada M, Riederer P, Narabayashi H, Fujita K, Nagatsu T (1994). Tumor necrosis factor-alpha (TNF-alpha) increases both in the brain and in the cerebrospinal fluid from parkinsonian patients. *Neurosci Lett* **165**(1-2): 208-210.

Mohapatra DP, Nau C (2005). Regulation of Ca²⁺-dependent desensitization in the vanilloid receptor TRPV1 by calcineurin and cAMP-dependent protein kinase. *J Biol Chem* **280**(14): 13424-13432.

Moisset X, Bouhassira D (2007). Brain imaging of neuropathic pain. *Neuroimage* **37 Suppl 1**: S80-88.

Mollace V, Muscoli C, Masini E, Cuzzocrea S, Salvemini D (2005). Modulation of prostaglandin biosynthesis by nitric oxide and nitric oxide donors. *Pharmacol Rev* **57**(2): 217-252.

Moore PK, Oluyomi AO, Babbedge RC, Wallace P, Hart SL (1991). L-NG-nitro arginine methyl ester exhibits antinociceptive activity in the mouse. *Br J Pharmacol* **102**(1): 198-202.

Morand-Contant M, Anand-Srivastava MB, Couture R (2010). Kinin B1 receptor upregulation by angiotensin II and endothelin-1 in rat vascular smooth muscle cells: receptors and mechanisms. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **299**(5): H1625-1632.

Mori MA, Araujo RC, Pesquero JB (2008). Kinin B1 receptor stimulation modulates leptin homeostasis. Evidence for an insulin-dependent mechanism. *Int Immunopharmacol* **8**(2): 242-246.

Muller G, Morawietz H (2009). Nitric oxide, NAD(P)H oxidase, and atherosclerosis. *Antioxidants & redox signaling* **11**(7): 1711-1731.

Murphey LJ, Hachey DL, Oates JA, Morrow JD, Brown NJ (2000). Metabolism of bradykinin In vivo in humans: identification of BK1-5 as a stable plasma peptide metabolite. *J Pharmacol Exp Ther* **294**(1): 263-269.

Muzio M, Ni J, Feng P, Dixit VM (1997). IRAK (Pelle) family member IRAK-2 and MyD88 as proximal mediators of IL-1 signaling. *Science* **278**(5343): 1612-1615.

Ndengele MM, Cuzzocrea S, Esposito E, Mazzon E, Di Paola R, Matuschak GM, *et al.* (2008). Cyclooxygenases 1 and 2 contribute to peroxynitrite-mediated inflammatory pain hypersensitivity. *FASEB J* **22**(9): 3154-3164.

Ness TJ (2000). Evidence for ascending visceral nociceptive information in the dorsal midline and lateral spinal cord. *Pain* **87**(1): 83-88.

Newman EA (2001). Propagation of intercellular calcium waves in retinal astrocytes and Muller cells. *J Neurosci* **21**(7): 2215-2223.

Nguyen MD, Julien JP, Rivest S (2002). Innate immunity: the missing link in neuroprotection and neurodegeneration ? *Nat Rev Neurosci* **3**(3):216-27.

Ni A, Chai KX, Chao L, Chao J (1998a). Molecular cloning and expression of rat bradykinin B1 receptor. *Biochim Biophys Acta* **1442**(2-3): 177-185.

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

Nishikawa T, Edelstein D, Brownlee M (2000). The missing link: a single unifying mechanism for diabetic complications. *Kidney international. Supplement* **77**: S26-30.

Nishikawa T, Kukidome D, Sonoda K, Fujisawa K, Matsuhisa T, Motoshima H, *et al.* (2007). Impact of mitochondrial ROS production in the pathogenesis of insulin resistance. *Diabetes research and clinical practice* **77 Suppl 1**: S161-164.

Noguchi H (2009). Pancreatic islet transplantation. *World J Gastrointest Surg* **1**(1): 16-20.

Noguchi H (2010). Pancreatic stem/progenitor cells for the treatment of diabetes. *Rev Diabet Stud* **7**(2): 105-111.

Noh H, King GL (2007). The role of protein kinase C activation in diabetic nephropathy. *Kidney Int Suppl*(106): S49-53.

Nukatsuka M, Yoshimura Y, Nishida M, Kawada J (1990). Importance of the concentration of ATP in rat pancreatic beta cells in the mechanism of streptozotocin-induced cytotoxicity. *J Endocrinol* **127**(1): 161-165.

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

Oates PJ (2008). Aldose reductase, still a compelling target for diabetic neuropathy. *Curr Drug Targets* **9**(1): 14-36.

Oates PJ (2002). Polyol pathway and diabetic peripheral neuropathy. *Int Rev Neurobiol* **50**: 325-392.

Okamoto H, Greenbaum LM (1983). Isolation and structure of T-kinin. *Biochem Biophys Res Commun* **112**(2): 701-708.

Old LJ (1985). Tumor necrosis factor (TNF). *Science* **230**(4726): 630-632.

Ongali B, Campos MM, Bregola G, Rodi D, Regoli D, Thibault G, *et al.* (2003). Autoradiographic analysis of rat brain kinin B1 and B2 receptors: normal distribution and alterations induced by epilepsy. *J Comp Neurol* **461**(4): 506-519.

Ongali B, Campos MM, Petcu M, Rodi D, Cloutier F, Chabot JG, *et al.* (2004). Expression of kinin B1 receptors in the spinal cord of streptozotocin-diabetic rat. *Neuroreport* **15**(16): 2463-2466.

Pabbidi RM, Cao DS, Parihar A, Pauza ME, Premkumar LS (2008a). Direct role of streptozotocin in inducing thermal hyperalgesia by enhanced expression of transient receptor potential vanilloid 1 in sensory neurons. *Mol Pharmacol* **73**(3): 995-1004.

Pabbidi RM, Yu SQ, Peng S, Khardori R, Pauza ME, Premkumar LS (2008b). Influence of TRPV1 on diabetes-induced alterations in thermal pain sensitivity. *Mol Pain* **4**: 9.

Pacher P, Nivorozhkin A, Szabo C (2006). Therapeutic effects of xanthine oxidase inhibitors: renaissance half a century after the discovery of allopurinol. *Pharmacol Rev* **58**(1): 87-114.

Paganelli R, Di Iorio A, Patricelli L, Ripani F, Sparvieri E, Faricelli R, *et al.* (2002). Proinflammatory cytokines in sera of elderly patients with dementia: levels in vascular injury are higher than those of mild-moderate Alzheimer's disease patients. *Exp Gerontol* **37**(2-3): 257-263.

Palau F, Estela A, Pla-Martin D, Sanchez-Piris M (2009). The role of mitochondrial network dynamics in the pathogenesis of Charcot-Marie-Tooth disease. *Adv Exp Med Biol* **652**: 129-137.

Papoiu AD, Yosipovitch G (2010). Topical capsaicin. The fire of a 'hot' medicine is reignited. *Expert Opin Pharmacother* **11**(8): 1359-1371.

Park TJ, Comer C, Carol A, Lu Y, Hong HS, Rice FL (2003). Somatosensory organization and behavior in naked mole-rats: II. Peripheral structures, innervation, and selective lack of neuropeptides associated with thermoregulation and pain. *J Comp Neurol* **465**(1): 104-120.

Park YM, Febbraio M, Silverstein RL (2009). CD36 modulates migration of mouse and human macrophages in response to oxidized LDL and may contribute to macrophage trapping in the arterial intima. *J Clin Invest* **119**(1): 136-145.

Parpura V, Haydon PG (2000). Physiological astrocytic calcium levels stimulate glutamate release to modulate adjacent neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**(15): 8629-8634.

Pennica D, Nedwin GE, Hayflick JS, Seeburg PH, Derynck R, Palladino MA, *et al.* (1984). Human tumour necrosis factor: precursor structure, expression and homology to lymphotoxin. *Nature* **312**(5996): 724-729.

Peppel K, Crawford D, Beutler B (1991). A tumor necrosis factor (TNF) receptor-IgG heavy chain chimeric protein as a bivalent antagonist of TNF activity. *J Exp Med* **174**(6): 1483-1489.

Perkins MN, Campbell E, Dray A (1993). Antinociceptive activity of the bradykinin B1 and B2 receptor antagonists, des-Arg9, [Leu8]-BK and HOE 140, in two models of persistent hyperalgesia in the rat. *Pain* **53**(2): 191-197.

Pesquero JB, Araujo RC, Heppenstall PA, Stucky CL, Silva JA, Jr., Walther T, *et al.* (2000). Hypoalgesia and altered inflammatory responses in mice lacking kinin B1 receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**(14): 8140-8145.

Pesquero JB, Pesquero JL, Oliveira SM, Roscher AA, Metzger R, Ganten D, *et al.* (1996). Molecular cloning & functional characterization of a mouse bradykinin B1 receptor gene. *Biochem Biophys Res Commun* **224**(1): 281.

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

Petzold GL, Swenberg JA (1978). Detection of DNA damage induced in vivo following exposure of rats to carcinogens. *Cancer Res* **38**(6): 1589-1594.

Phagoo SB, Poole S, Leeb-Lundberg LM (1999). Autoregulation of bradykinin receptors: agonists in the presence of interleukin-1beta shift the repertoire of receptor subtypes from B2 to B1 in human lung fibroblasts. *Mol Pharmacol* **56**(2): 325-333.

Phagoo SB, Reddi K, Anderson KD, Leeb-Lundberg LM, Warburton D (2001). Bradykinin B1 receptor up-regulation by interleukin-1beta and B1 agonist occurs through independent and synergistic intracellular signaling mechanisms in human lung fibroblasts. *J Pharmacol Exp Ther* **298**(1): 77-85.

Pickering M, Cumiskey D, O'Connor JJ (2005). Actions of TNF-alpha on glutamatergic synaptic transmission in the central nervous system. *Exp Physiol* **90**(5): 663-670.

Pitcher GM, Henry JL (2000). Cellular mechanisms of hyperalgesia and spontaneous pain in a spinalized rat model of peripheral neuropathy: changes in myelinated afferent inputs implicated. *Eur J Neurosci* **12**(6): 2006-2020.

Pop-Busui R, Sima A, Stevens M (2006). Diabetic neuropathy and oxidative stress. *Diabetes Metab Res Rev* **22**(4): 257-273.

Premkumar LS, Ahern GP (2000). Induction of vanilloid receptor channel activity by protein kinase C. *Nature* **408**(6815): 985-990.

Proudfoot AT, Bradberry SM, Vale JA (2006). Sodium fluoroacetate poisoning. *Toxicol Rev* **25**(4):213-9.

Pruneau D, Belichard P, Sahel JA, Combal JP (2010). Targeting the kallikrein-kinin system as a new therapeutic approach to diabetic retinopathy. *Curr Opin Investig Drugs* **11**(5): 507-514.

Qadri F, Hauser W, Jöhren O, Dominiak P (2002). Kinin B1 and B2 receptor mRNA expression in the hypothalamus of spontaneously hypertensive rats. *Can J Physiol Pharmacol* **80**(4): 258-263.

Qi X, Lewin AS, Hauswirth WW, Guy J (2003). Optic neuropathy induced by reductions in mitochondrial superoxide dismutase. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **44**(3): 1088-1096.

Qian Y, Chao DS, Santillano DR, Cornwell TL, Nairn AC, Greengard P, *et al.* (1996). cGMP-dependent protein kinase in dorsal root ganglion: relationship with nitric oxide synthase and nociceptive neurons. *J Neurosci* **16**(10): 3130-3138.

Quintao NL, Passos GF, Medeiros R, Paszcuk AF, Motta FL, Pesquero JB, *et al.* (2008). Neuropathic pain-like behavior after brachial plexus avulsion in mice: the relevance of kinin B1 and B2 receptors. *J Neurosci* **28**(11): 2856-2863.

Raidoo DM, Ramsaroop R, Naidoo S, Muller-Esterl W, Bhoola KD (1997). Kinin receptors in human vascular tissue: their role in atheromatous disease. *Immunopharmacology* **36**(2-3): 153-160.

Rajpal S, Gerovac TA, Turner NA, Tilghman JI, Allcock BK, McChesney SL, *et al.* (2007). Antihyperalgesic effects of vanilloid-1 and bradykinin-1 receptor antagonists following spinal cord injury in rats. *J Neurosurg Spine* **6**(5): 420-424.

Ramasamy R, Yan SF, Schmidt AM (2011). Receptor for AGE (RAGE): signaling mechanisms in the pathogenesis of diabetes and its complications. *Annals of the New York Academy of Sciences* **1243**: 88-102.

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

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

Razavi R, Chan Y, Afifiyan FN, Liu XJ, Wan X, Yantha J, *et al.* (2006). TRPV1+ sensory neurons control beta cell stress and islet inflammation in autoimmune diabetes. *Cell* **127**(6): 1123-1135.

Regoli D, Gobeil F, Nguyen QT, Jukic D, Seoane PR, Salvino JM, *et al.* (1994). Bradykinin receptor types and B2 subtypes. *Life Sci* **55**(10): 735-749.

Regoli D, Rhaleb NE, Drapeau G, Dion S (1990). Kinin receptor subtypes. *J Cardiovasc Pharmacol* **15 Suppl 6**: S30-38.

Regoli D, Rizzi A, Perron SI, Gobeil F, Jr. (2001). Classification of kinin receptors. *Biol Chem* **382**(1): 31-35.

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

Riedel W, Neeck G (2001). Nociception, pain, and antinociception: current concepts. *Z Rheumatol* **60**(6): 404-415.

Ritter S, Dinh TT (1990). Capsaicin-induced neuronal degeneration in the brain and retina of preweanling rats. *J Comp Neurol* **296**(3): 447-461.

Robbins SL, Kumar V, Cotran RS (2010). *Robbins and Cotran pathologic basis of disease*. 8th edn. Saunders/Elsevier: Philadelphia, PA.

Roche AK, Cook M, Wilcox GL, Kajander KC (1996). A nitric oxide synthesis inhibitor (L-NAME) reduces licking behavior and Fos-labeling in the spinal cord of rats during formalin-induced inflammation. *Pain* **66**(2-3): 331-341.

Rodi D, Couture R, Ongali B, Simonato M (2005). Targeting kinin receptors for the treatment of neurological diseases. *Current pharmaceutical design* **11**(10): 1313-1326.

Rolo AP, Palmeira CM (2006). Diabetes and mitochondrial function: role of hyperglycemia and oxidative stress. *Toxicol Appl Pharmacol* **212**(2): 167-178.

Rother KI (2007). Diabetes treatment--bridging the divide. *N Engl J Med* **356**(15): 1499-1501.

Ruddle NH, Waksman BH (1968). Cytotoxicity mediated by soluble antigen and lymphocytes in delayed hypersensitivity. 3. Analysis of mechanism. *J Exp Med* **128**(6): 1267-1279.

Saito S (2001). Cytokine cross-talk between mother and the embryo/placenta. *J Reprod Immunol* **52**(1-2): 15-33.

Salerno L, Sorrenti V, Di Giacomo C, Romeo G, Siracusa MA (2002). Progress in the development of selective nitric oxide synthase (NOS) inhibitors. *Curr Pharm Des* **8**(3): 177-200.

Sandberg JO, Andersson A, Eizirik DL, Sandler S (1994). Interleukin-1 receptor antagonist prevents low dose streptozotocin induced diabetes in mice. *Biochem Biophys Res Commun* **202**(1): 543-548.

Sardi SP, Rey-Ares V, Pujol-Lereis VA, Serrano SA, Rothlin RP (2002). Further pharmacological evidence of nuclear factor-kappa B pathway involvement in bradykinin B1 receptor-sensitized responses in human umbilical vein. *J Pharmacol Exp Ther* **301**(3): 975-980.

Sato T, Iwaki M, Shimogaito N, Wu X, Yamagishi S, Takeuchi M (2006). TAGE (toxic AGEs) theory in diabetic complications. *Current molecular medicine* **6**(3): 351-358.

Schafers M, Geis C, Svensson CI, Luo ZD, Sommer C (2003a). Selective increase of tumour necrosis factor-alpha in injured and spared myelinated primary afferents after chronic constrictive injury of rat sciatic nerve. *Eur J Neurosci* **17**(4): 791-804.

Schafers M, Sorkin L (2008). Effect of cytokines on neuronal excitability. *Neurosci Lett* **437**(3): 188-193.

Schafers M, Svensson CI, Sommer C, Sorkin LS (2003b). Tumor necrosis factor-alpha induces mechanical allodynia after spinal nerve ligation by activation of p38 MAPK in primary sensory neurons. *J Neurosci* **23**(7): 2517-2521.

Schanstra JP, Alric C, Marin-Castano ME, Girolami JP, Bascands JL (1999). Renal bradykinin receptors: localisation, transduction pathways and molecular basis for a possible pathological role (review). *Int J Mol Med* **3**(2): 185-191.

Schanstra JP, Bataille E, Marin Castano ME, Barascud Y, Hirtz C, Pesquero JB, *et al.* (1998). The B1-agonist [des-Arg10]-kallidin activates transcription factor NF-kappaB and induces homologous upregulation of the bradykinin B1-receptor in cultured human lung fibroblasts. *J Clin Invest* **101**(10): 2080-2091.

Schmidt H, Werner M, Heppenstall PA, Henning M, More MI, Kuhbandner S, *et al.* (2002). cGMP-mediated signaling via cGKIalpha is required for the guidance and connectivity of sensory axons. *J Cell Biol* **159**(3): 489-498.

Schnedl WJ, Ferber S, Johnson JH, Newgard CB (1994). STZ transport and cytotoxicity. Specific enhancement in GLUT2-expressing cells. *Diabetes* **43**(11): 1326-1333.

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

Sen R, Baltimore D (1986). Inducibility of kappa immunoglobulin enhancer-binding protein Nf-kappa B by a posttranslational mechanism. *Cell* **47**(6): 921-928.

Sevcik MA, Ghilardi JR, Halvorson KG, Lindsay TH, Kubota K, Mantyh PW (2005). Analgesic efficacy of bradykinin B1 antagonists in a murine bone cancer pain model. *J Pain* **6**(11): 771-775.

Sherrington CS. The integrative action of the nervous system. New Haven, CT: Yale University Press; 1906.

Shimomura Y, Kawada T, Suzuki M (1989). Capsaicin and its analogs inhibit the activity of NADH-coenzyme Q oxidoreductase of the mitochondrial respiratory chain. *Arch Biochem Biophys* **270**(2): 573-577.

Shubayev VI, Myers RR (2002). Anterograde TNF alpha transport from rat dorsal root ganglion to spinal cord and injured sciatic nerve. *Neurosci Lett* **320**(1-2): 99-101.

Silva JA, Jr., Goto EM, Perosa SR, Arganaraz GA, Cavalheiro EA, Naffah-Mazzacoratti MG, *et al.* (2008). Kinin B1 receptors facilitate the development of temporal lobe epilepsy in mice. *Int Immunopharmacol* **8**(2): 197-199.

Simard B, Gabra BH, Sirois P (2002). Inhibitory effect of a novel bradykinin B1 receptor antagonist, R-954, on enhanced vascular permeability in type 1 diabetic mice. *Can J Physiol Pharmacol* **80**(12): 1203-1207.

Sofue M, Yoshimura Y, Nishida M, Kawada J (1991). Uptake of nicotinamide by rat pancreatic beta cells with regard to streptozotocin action. *J Endocrinol* **131**(1): 135-138.

Spector T (1988). Oxypurinol as an inhibitor of xanthine oxidase-catalyzed production of superoxide radical. *Biochem Pharmacol* **37**(2): 349-352.

Spillmann F, Altmann C, Scheeler M, Barbosa M, Westermann D, Schultheiss HP, *et al.* (2002). Regulation of cardiac bradykinin B1- and B2-receptor mRNA in experimental ischemic, diabetic, and pressure-overload-induced cardiomyopathy. *Int Immunopharmacol* **2**(13-14): 1823-1832.

Stadnicki A (2011). Intestinal tissue kallikrein-kinin system in inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis* **17**(2): 645-654.

Steenland HW, Ko SW, Wu LJ, Zhuo M (2006). Hot receptors in the brain. *Mol Pain* **2**: 34.

Stuehr DJ (1997). Structure-function aspects in the nitric oxide synthases. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **37**:339-59.

Sugimoto K, Yasujima M, Yagihashi S (2008). Role of advanced glycation end products in diabetic neuropathy. *Curr Pharm Des* **14**(10): 953-961.

Sung CS, Wen ZH, Chang WK, Ho ST, Tsai SK, Chang YC, *et al.* (2004). Intrathecal interleukin-1beta administration induces thermal hyperalgesia by activating inducible nitric oxide synthase expression in the rat spinal cord. *Brain Res* **1015**(1-2): 145-153.

Suzuki T, Hide I, Ido K, Kohsaka S, Inoue K, Nakata Y (2004). Production and release of neuroprotective tumor necrosis factor by P2X7 receptor-activated microglia. *J Neurosci* **24**(1): 1-7.

Szallasi A, Appendino G (2004). Vanilloid receptor TRPV1 antagonists as the next generation of painkillers. Are we putting the cart before the horse? *J Med Chem* **47**(11): 2717-2723.

Szallasi A, Blumberg PM (1999). Vanilloid (Capsaicin) receptors and mechanisms. *Pharmacol Rev* **51**(2): 159-212.

Szallasi A, Cortright DN, Blum CA, Eid SR (2007). The vanilloid receptor TRPV1: 10 years from channel cloning to antagonist proof-of-concept. *Nat Rev Drug Discov* **6**(5): 357-372.

Szolcsanyi J (2004). Forty years in capsaicin research for sensory pharmacology and physiology. *Neuropeptides* **38**(6): 377-384.

Takigawa T, Yasuda H, Terada M, Maeda K, Haneda M, Kashiwagi A, Kitasato H, Kikkawa R (2000). Increases in K⁺ conductance and Ca²⁺ influx under high glucose with suppressed Na⁺/K⁺-pump activity in rat myelinated nerve fibers. *Neuroreport* **3**;11(11):2547-51.

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

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

Talbot S, Dias JP, Lahjouji K, Bogo MR, Campos MM, Gaudreau P, *et al.* (2012b). Activation of TRPV1 by capsaicin induces functional Kinin B1 receptor in rat spinal cord microglia. *J Neuroinflammation* **9**: 16.

Talbot S, Lin JC, Lahjouji K, Roy JP, Senecal J, Morin A, *et al.* (2011a). Cigarette smoke-induced kinin B1 receptor promotes NADPH oxidase activity in cultured human alveolar epithelial cells. *Peptides*.

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

Tang SC, Leung JC, Lai KN (2011). The kallikrein-kinin system. *Contrib Nephrol* **170**: 145-155.

Tao F, Liaw WJ, Zhang B, Yaster M, Rothstein JD, Johns RA, *et al.* (2004). Evidence of neuronal excitatory amino acid carrier 1 expression in rat dorsal root ganglion neurons and their central terminals. *Neuroscience* **123**(4): 1045-1051.

Tao YX, Johns RA (2000). Activation of cGMP-dependent protein kinase Ialpha is required for N-methyl-D-aspartate- or nitric oxide-produced spinal thermal hyperalgesia. *Eur J Pharmacol* **392**(3): 141-145.

Tegeder I, Del Turco D, Schmidtko A, Sausbier M, Feil R, Hofmann F, *et al.* (2004). Reduced inflammatory hyperalgesia with preservation of acute thermal nociception in mice lacking cGMP-dependent protein kinase I. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**(9): 3253-3257.

Tergaonkar V (2006). NFkappaB pathway: a good signaling paradigm and therapeutic target. *Int J Biochem Cell Biol* **38**(10): 1647-1653.

Tew DG (1993). Inhibition of cytochrome P450 reductase by the diphenyliodonium cation. Kinetic analysis and covalent modifications. *Biochemistry* **32**(38): 10209-10215.

Tonussi CR, Ferreira SH (1997). Bradykinin-induced knee joint incapacitation involves bradykinin B2 receptor mediated hyperalgesia and bradykinin B1 receptor-mediated nociception. *Eur J Pharmacol* **326**(1): 61-65.

Torres A, Wang F, Xu Q, Fujita T, Dobrowolski R, Willecke K, *et al.* (2012). Extracellular Ca²⁺ acts as a mediator of communication from neurons to glia. *Sci Signal* **5**(208): ra8.

Tracey I, Mantyh PW (2007). The cerebral signature for pain perception and its modulation. *Neuron* **55**(3): 377-391.

Tschope C, Westermann D (2008). Development of diabetic cardiomyopathy and the kallikrein-kinin system--new insights from B1 and B2 receptor signaling. *Biol Chem* **389**(6): 707-711.

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

Turk DC, Okifuji A (2000). Pain in patients with fibromyalgia syndrome. *Curr Rheumatol Rep* **2**(2): 109-115.

Turk J, Corbett JA, Ramanadham S, Bohrer A, McDaniel ML (1993a). Biochemical evidence for nitric oxide formation from streptozotocin in isolated pancreatic islets. *Biochem Biophys Res Commun* **197**(3): 1458-1464.

Turk J, Gross RW, Ramanadham S (1993b). Amplification of insulin secretion by lipid messengers. *Diabetes* **42**(3): 367-374.

Twig G, Elorza A, Molina AJ, Mohamed H, Wikstrom JD, Walzer G, *et al.* (2008). Fission and selective fusion govern mitochondrial segregation and elimination by autophagy. *EMBO J* **27**(2): 433-446.

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

Uehara K, Yamagishi S, Otsuki S, Chin S, Yagihashi S (2004). Effects of polyol pathway hyperactivity on protein kinase C activity, nociceptive peptide expression, and neuronal structure in dorsal root ganglia in diabetic mice. *Diabetes* **53**(12): 3239-3247.

Urban MO, Gebhart GF (1999). Supraspinal contributions to hyperalgesia. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**(14): 7687-7692.

Van Buren JJ, Bhat S, Rotello R, Pauza ME, Premkumar LS (2005). Sensitization and translocation of TRPV1 by insulin and IGF-I. *Mol Pain* **1**: 17.

Van den Brande JM, Braat H, van den Brink GR, Versteeg HH, Bauer CA, Hoedemaeker I, *et al.* (2003). Infliximab but not etanercept induces apoptosis in lamina propria T-lymphocytes from patients with Crohn's disease. *Gastroenterology* **124**(7): 1774-1785.

Vanegas H, Schaible HG (2004). Descending control of persistent pain: inhibitory or facilitatory? *Brain Res Brain Res Rev* **46**(3): 295-309.

Ventura-Martinez R, Deciga-Campos M, Diaz-Reval MI, Gonzalez-Trujano ME, Lopez-Munoz FJ (2004). Peripheral involvement of the nitric oxide-cGMP pathway in the indomethacin-induced antinociception in rat. *Eur J Pharmacol* **503**(1-3): 43-48.

Vezzani A, Balosso S, Ravizza T (2008). The role of cytokines in the pathophysiology of epilepsy. *Brain Behav Immun* **22**(6): 797-803.

Vincent AM, Callaghan BC, Smith AL, Feldman EL (2011). Diabetic neuropathy: cellular mechanisms as therapeutic targets. *Nature reviews. Neurology* **7**(10): 573-583.

Virtanen SM, Saukkonen T, Savilahti E, Ylonen K, Rasanen L, Aro A, *et al.* (1994). Diet, cow's milk protein antibodies and the risk of IDDM in Finnish children. Childhood Diabetes in Finland Study Group. *Diabetologia* **37**(4): 381-387.

von Hehn CA, Baron R, Woolf CJ (2012). Deconstructing the neuropathic pain phenotype to reveal neural mechanisms. *Neuron* **73**(4): 638-652.

Vucenik I, Shamsuddin AM (2003). Cancer inhibition by inositol hexaphosphate (IP6) and inositol: from laboratory to clinic. *J Nutr* **133**(11 Suppl 1): 3778S-3784S.

Wada R, Yagihashi S (2005). Role of advanced glycation end products and their receptors in development of diabetic neuropathy. *Annals of the New York Academy of Sciences* **1043**: 598-604.

Wajant H, Pfizenmaier K, Scheurich P (2003). Tumor necrosis factor signaling. *Cell Death Differ* **10**(1): 45-65.

Walker K, Dray A, Perkins M (1996). Hyperalgesia in rats following intracerebroventricular administration of endotoxin: effect of bradykinin B1 and B2 receptor antagonist treatment. *Pain* **65**(2-3): 211-219.

Wall PD, Woolf CJ (1980). What we don't know about pain. *Nature* **287**(5779): 185-186.

Wanaka A, Shiotani Y, Kiyama H, Matsuyama T, Kamada T, Shiosaka S, *et al.* (1987). Glutamate-like immunoreactive structures in primary sensory neurons in the rat detected by a specific antiserum against glutamate. *Exp Brain Res* **65**(3): 691-694.

Wang H, Woolf CJ (2005). Pain TRPs. *Neuron* **46**(1): 9-12.

Wang ZQ, Porreca F, Cuzzocrea S, Galen K, Lightfoot R, Masini E, *et al.* (2004). A newly identified role for superoxide in inflammatory pain. *J Pharmacol Exp Ther* **309**(3): 869-878.

Watkins LR, Maier SF (2000). The pain of being sick: implications of immune-to-brain communication for understanding pain. *Annu Rev Psychol* **51**: 29-57.

Watkins LR, Maier SF, Goehler LE (1995). Immune activation: the role of pro-inflammatory cytokines in inflammation, illness responses and pathological pain states. *Pain* **63**(3): 289-302.

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

Wiencken AE, Casagrande VA (1999). Endothelial nitric oxide synthetase (eNOS) in astrocytes: another source of nitric oxide in neocortex. *Glia* **26**(4):280-90.

Wild S, Roglic G, Green A, Sicree R, King H (2004). Global prevalence of diabetes: estimates for the year 2000 and projections for 2030. *Diabetes Care* **27**(5): 1047-1053.

Wilkinson-Berka JL, Fletcher EL (2004). Angiotensin and bradykinin: targets for the treatment of vascular and neuro-glial pathology in diabetic retinopathy. *Curr Pharm Des* **10**(27): 3313-3330.

Willis WD, Westlund KN (1997). Neuroanatomy of the pain system and of the pathways that modulate pain. *J Clin Neurophysiol* **14**(1): 2-31.

Wolf G, Gabay E, Tal M, Yirmiya R, Shavit Y (2006). Genetic impairment of interleukin-1 signaling attenuates neuropathic pain, autotomy, and spontaneous ectopic neuronal activity, following nerve injury in mice. *Pain* **120**(3): 315-324.

Woolf CJ (2011). Central sensitization: implications for the diagnosis and treatment of pain. *Pain* **152**(3 Suppl): S2-15.

Woolf CJ (2007). Central sensitization: uncovering the relation between pain and plasticity. *Anesthesiology* **106**(4): 864-867.

Woolf CJ (2010a). Overcoming obstacles to developing new analgesics. *Nat Med* **16**(11): 1241-1247.

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

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

Woolf CJ, Salter MW (2000). Neuronal plasticity: increasing the gain in pain. *Science* **288**(5472): 1765-1769.

Woolf CJ, Shortland P, Coggeshall RE (1992). Peripheral nerve injury triggers central sprouting of myelinated afferents. *Nature* **355**(6355): 75-78.

Xia P, Inoguchi T, Kern TS, Engerman RL, Oates PJ, King GL (1994). Characterization of the mechanism for the chronic activation of diacylglycerol-protein kinase C pathway in diabetes and hypergalactosemia. *Diabetes* **43**(9): 1122-1129.

Xu L, Mabuchi T, Katano T, Matsumura S, Okuda-Ashitaka E, Sakimura K, *et al.* (2007). Nitric oxide (NO) serves as a retrograde messenger to activate neuronal NO synthase in the spinal cord via NMDA receptors. *Nitric Oxide* **17**(1): 18-24.

Yamagishi S, Matsui T (2011). Nitric oxide, a janus-faced therapeutic target for diabetic microangiopathy-Friend or foe? *Pharmacol Res* **64**(3): 187-194.

Yiangou Y, Facer P, Ford A, Brady C, Wiseman O, Fowler CJ, *et al.* (2001). Capsaicin receptor VR1 and ATP-gated ion channel P2X3 in human urinary bladder. *BJU Int* **87**(9): 774-779.

Yokota T, Ma RC, Park JY, Isshiki K, Sotiropoulos KB, Rauniyar RK, *et al.* (2003). Role of protein kinase C on the expression of platelet-derived growth factor and endothelin-1 in the retina of diabetic rats and cultured retinal capillary pericytes. *Diabetes* **52**(3): 838-845.

Zhang X, Honda CN, Giesler GJ, Jr. (2000). Position of spinothalamic tract axons in upper cervical spinal cord of monkeys. *J Neurophysiol* **84**(3): 1180-1185.

Zhang Y, Brovkovych V, Brovkovych S, Tan F, Lee BS, Sharma T, Skidgel RA (2007). Dynamic receptor-dependent activation of inducible nitric-oxide synthase by ERK-mediated phosphorylation of Ser745. *J Biol Chem* **282**(44):32453-61.

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

Zhou X, Prado GN, Taylor L, Yang X, Polgar P (2000). Regulation of inducible bradykinin B1 receptor gene expression through absence of internalization and resensitization. *J Cell Biochem* **78**(3): 351-362.

Zhuo M, Wu G, Wu LJ (2011). Neuronal and microglial mechanisms of neuropathic pain. *Mol Brain* **4**: 31.

Ziegler D (2008). Painful diabetic neuropathy: treatment and future aspects. *Diabetes Metab Res Rev* **24** Suppl 1: S52-57.

Zochodne DW, Levy D (2005). Nitric oxide in damage, disease and repair of the peripheral nervous system. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)* **51**(3): 255-267.

Zygmunt PM, Petersson J, Andersson DA, Chuang H, Sorgard M, Di Marzo V, *et al.* (1999). Vanilloid receptors on sensory nerves mediate the vasodilator action of anandamide. *Nature* **400**(6743): 452-457.

CHAPITRE IV

ANNEXES

15.0. Accord figures

15.1. Accord figure 3

I am writing to ask you the permission to include one figure previously published by your journal, in my doctoral thesis entitled: Localisation, mécanisme d'induction et rôle physiopathologique du récepteur B1 des kinines dans des modèles expérimentaux de douleur chez le rat.

Thus, the figure will be appropriately referenced.

Paper: The vanilloid receptor TRPV1: 10 years from channel cloning to antagonist proof-of-concept

Author: Arpad Szallasi, Daniel N. Cortright, Charles A. Blum & Samer R. Eid

Reference: Nature Reviews Drug Discovery 6, 357-372 (May 2007) |
doi:10.1038/nrd2280

Sébastien Talbot

Dear Sébastien,

Thank you for contacting Nature Publishing Group. We grant the right to use this manuscript and figures.

a) To reproduce the Contribution in whole or in part in any printed volume (book or thesis).

Sarah Brooks
Permissions Assistant
nature publishing group
The Macmillan Building
4 Crinan Street
London N1 9XW
e: permissions@nature.com
p: + 44 207 014 4129
f: + 44 207 843 4998

16.0. Curriculum Vitae

16.1. Articles Publiés

1. Pouliot M, **Talbot Sébastien**, Sénécal J, Dotigny F, Pruneau D, Vaucher E and Couture R. Ocular application of the kinin B1 receptor antagonist LF22-0542 inhibits retinal inflammation and oxidative stress in streptozotocin-diabetic rats. PLOS ONE. **2012**;7(3):e33864. PMID: 22470485.
2. Chi-Jen Lin J, Roy JP, Verreault J, **Talbot Sébastien**, Côté F, Couture R, Morin A. An ex vivo approach to the differential parenchymal responses induced by cigarette whole smoke and its vapor phase. TOXICOLOGY. **2012** Mar 11;293(1-3):125-31. PMID: 22266391.
3. **Talbot Sébastien**, Dias JP and Couture R. Activation of TRPV1 by capsaicin induces functional kinin B(1) receptor in rat spinal cord microglia. JOURNAL OF NEUROINFLAMMATION. **2012** Jan 20;9(1):16. PMID: 22264228.
4. **Talbot Sébastien** and Couture R. Emerging role of microglial kinin B1 receptor in diabetic pain neuropathy. EXPERIMENTAL NEUROLOGY. **2011** Dec 6. PMID: 22154922.
5. **Talbot Sébastien**, Lin JC, Lahjouji K, Roy JP, Senecal J, Morin A and Couture R. Cigarette smoke-induced kinin B1 receptor promotes NADPH oxidase activity in cultured human alveolar epithelial cells. PEPTIDES. **2011** Jul;32(7):1447-56. PMID: 21600945.
6. Lin JC, **Talbot Sébastien**, Lahjouji K, Roy JP, Sénécal J, Couture R and Morin A. Mechanism of cigarette smoke-induced kinin B(1) receptor expression in rat airways. PEPTIDES. **2010** Oct 31;(10):1940-5. PMID: 20637817.
7. Dias JP, **Talbot Sébastien**, Sénécal J, Carayon P and Couture R. Kinin B1 receptor enhances the oxidative stress in a rat model of insulin resistance:

outcome in hypertension, allodynia and metabolic complications. PLOS ONE. **2010** Sep 7;5(9):e12622. PMID: 20830306.

8. **Talbot Sébastien**, Chahmi E, Pena Dias J and Couture R. Key role for spinal dorsal horn microglial kinin B1 receptor in early diabetic pain neuropathy. JOURNAL OF NEUROINFLAMMATION. **2010** Jun 29;7(1):36. PMID: 20587056.
9. **Talbot Sébastien**, Theberge-Turmel P, Liazoghli D, Senecal J, Gaudreau P and Couture R. Cellular localization of kinin B1 receptor in the spinal cord of streptozotocin-diabetic rats with a fluorescent [Nalpha-Bodipy]-des-Arg⁹-bradykinin. JOURNAL OF NEUROINFLAMMATION. **2009** Mar 26;6(1):11. PMID: 19323833.
10. Richard C, Lauzier B, Delemasure S, **Talbot Sébastien**, Ghibu S, Collin B, Sénécal J, Menetrier F, Vergely C, Couture R and Rochette L. Effects of angiotensin-1 converting enzyme inhibition on oxidative stress and bradykinin receptor expression during doxorubicin-induced cardiomyopathy in rats. JOURNAL OF CARDIOVASCULAR PHARMACOLOGY. **2008** Sep;52(3):278-85. PMID: 18806609.
11. Ismael MA, **Talbot Sébastien**, Carbonneau CL, Beauséjour CM and Couture R. Blockade of sensory abnormalities and kinin B(1) receptor expression by N-acetyl-L-cysteine and ramipril in a rat model of insulin resistance. EUROPEAN JOURNAL OF PHARMACOLOGY. **2008** Jul 28;589(1-3):66-72. PMID: 18555989.
12. Abdouh M, **Talbot Sébastien**, Couture R and Hasséssian HM. Retinal plasma extravasation in streptozotocin-diabetic rats mediated by kinin B(1) and B(2) receptors. BRITISH JOURNAL OF PHARMACOLOGY. **2008** May;154(1):136-43. PMID: 18311190.
13. Gallant MA, Slipetz D, Hamelin E, Rochdi MD, **Talbot Sébastien**, de Brum-Fernandes AJ and Parent JL. Differential regulation of the signaling and trafficking of the two prostaglandin D2 receptors, prostanoid DP receptor and CRTH2. EUROPEAN JOURNAL OF PHARMACOLOGY. **2007** Feb 28;557(2-3):115-23. PMID: 17207480.

16.2. Chapitre de livre

14. **Talbot Sébastien**, Lin JC and Couture R. Kinin receptors. 2ND EDITION OF THE HANDBOOK OF BIOLOGICALLY ACTIVE PEPTIDES. Amsterdam; Boston: Academic Press; **2012**.

16.3. Article soumis

15. de Brito Gariépy H, **Talbot Sébastien** and Couture R. Mechanism underlying behavioral activity induced by activation of brain kinin B1 receptor in hypertensive rats. BEHAV BRAIN RESEARCH. Submitted: 13/05/2012. PIN: 2010-BJP-0457-RP

16. Chahmi E, **Talbot Sébastien** and Couture R. Role and localization of kinin B1 receptor in a rat model of neuropathic pain. NEUROPEPTIDES. Submitted: 01/06/2011. PIN : NPEP-D-11-00037

17. **Talbot Sébastien**, de Brito Gariépy H, Saint-Denis J and Couture R. Activation of kinin B1 receptor evokes hyperthermia through a vagal sensory mechanism in the rat. JOURNAL OF NEUROINFLAMMATION. Submitted: 18/05/2012. PIN: 1138800117338343