



UNIVERSITÉ DE STRASBOURG

École Doctorale des Sciences  
de la Vie et de la Santé



École Doctorale  
des Sciences de la Vie  
et de la Santé  
S : R A S S B O U R G

THÈSE présentée par :

Salim Megat

Soutenue le 29 septembre 2014

Pour obtenir le grade de : **Docteur de l'Université de Strasbourg**

Spécialité : Neurosciences

---

# Traitement de la douleur neuropathique : des antidépresseurs aux inhibiteurs de phosphodiesterases

---

**THÈSE dirigée par :**

**M. Michel BARROT**

Directeur de recherche, CNRS UPR 3212, Strasbourg

**RAPPORTEURS :**

**M. Aziz MOQRICH**

Directeur de recherche, CNRS-Université d'Aix-Marseille, UMR 7288

**M. François RASSENDREN**

Directeur de recherche, CNRS-Université de Montpellier, UMR 5203

**EXAMINATEUR :**

**M. Yannick GOUMON**

Chargé de recherche, CNRS UPR 3212, Strasbourg



# *Re m e r c i e m e n t s*

---

*Je tiens tout d'abord à remercier Monsieur le Docteur Michel Barrot pour avoir dirigé cette thèse et m'avoir permis de la réaliser dans les meilleures conditions. Grâce à la confiance qu'il m'a témoignée tout au long de ces années j'ai pu m'épanouir pleinement sur le plan professionnel et pour cela je lui en serai toujours reconnaissant.*

*Je souhaiterais remercier chaleureusement Madame le Docteur Ipek Yalcin sans qui une grande partie de ce projet n'aurait pu avoir lieu. Sa gentillesse, sa générosité et sa disponibilité n'ont rendu que meilleures ces 3 années passées au laboratoire.*

*Je désire faire part de ma gratitude à l'égard de Madame le Professeur Freund-Mercier sans qui cette thèse n'aurait probablement pas eu lieu. Je la remercie également pour le temps passé à corriger cette thèse, pour sa gentillesse et sa disponibilité au quotidien.*

*Je voudrais témoigner de ma sincère gratitude à l'égard de Monsieur le Docteur Sylvain Hugel pour toute l'aide qu'il a apporté à ce projet. Je tiens à le remercier pour la patience dont il a fait preuve à mon égard et surtout pour sa gentillesse, son humeur et sa disponibilité.*

*Je désire aussi faire part de ma gratitude à Monsieur le Professeur Rémy Schlichter pour tous les bons conseils ainsi que les discussions scientifiques que nous avons pu avoir tout au long de ces années.*

*Je souhaite faire part de ma gratitude à l'égard de Monsieur le Docteur François Rasseन्द्रen et Monsieur le Docteur Aziz Moqrh pour avoir accepté d'être rapporteurs de cette thèse.*

*Je voudrais également remercier très respectueusement Monsieur le Dr. Yannick Goumon pour avoir accepté d'être examinateur de cette thèse.*

*Un grand merci à Betty de m'avoir accueilli dès mon arrivée au laboratoire mais également pour sa gentillesse et sa disponibilité au quotidien.*

*Je tiens également à remercier Florent pour son humour et tous les bons moments partagés.*

*Je tiens à remercier tout les anciens du laboratoire Hugues, Yo hann, Sophie qui m'ont rapidement intégré à l'équipe.*

*Je souhaite également remercier Romain pour sa gentillesse, Fred et Jérôme pour leur humour et tous les bons moments partagés.*

*Je tiens à remercier Clémentine pour sa gentillesse et pour m'avoir supporté pendant une année dans notre bureau commun.*

*Je tiens à remercier tout les membres du laboratoire, Maria-José, Taddy, Alice, Mélanie, Dorothée et Jim.*

*Je tiens évidemment à remercier mes parents, ma famille pour leur soutien inconditionnel depuis le début.*

# *Publications et communications*

---

## Publications liées aux travaux de thèse :

### **Antidepressants suppress neuropathic pain by peripheral $\beta$ 2-adrenoceptor mediated anti-TNF $\alpha$ mechanism.**

Yohann Bohren, Luc-Henri Tessier, **Salim Megat**, Hugues Petitjean, Sylvain Hugel, Dorothee Daniel, Mélanie Kremer, Sylvie Fournel, Lutz Hein, Remy Schlichter, Marie-José Freund-Mercier, Ipek Yalcin, Michel Barrot. *Neurobiol Dis*, 2013, 60:39-50.

### **The sciatic nerve cuffing model of neuropathic pain in mice.**

Ipek Yalcin, **Salim Megat**, Florent Barthas, Elisabeth Waltisperger, Mélanie Kremer, Eric Salvat, Michel Barrot. *J Vis Exp*, 2014, 89:e51608.

### **Role of kappa-opioid receptor in the antidepressant treatment of neuropathic pain.**

**Salim Megat**, Yohann Bohren, Stephane Doridot, Claire Gaveriaux-Ruff, Brigitte Kieffer, Marie-José Freund-Mercier, Ipek Yalcin, Michel Barrot. *En ré vision*.

### **Phosphodiesterase type 4 inhibitors in the treatment of neuropathic pain.**

**Salim Megat**, Sylvain Hugel, Yohann Bohren, Remy Schlichter, Marie-José Freund-Mercier, Ipek Yalcin, Michel Barrot.

En écriture.

### **Role of the opioid system in the antiallodynic effect of phosphodiesterase inhibitors.**

**Salim Megat**, Ipek Yalcin, Marie-José Freund-Mercier, Michel Barrot.

En écriture.

## Communications affichées :

### **Phosphodiesterases as targets for the treatment of neuropathic pain.**

**Salim Megat**, Yohann Bohren, Elisabeth Waltisperger, Brigitte Kieffer, Marie-José Freund-Mercier, Ipek Yalcin, Michel Barrot.

Meeting annuel Neurex, Bâle, Suisse, Octobre 2011.

### **Antiallodynic action of phosphodiesterase inhibitors in a murine model of neuropathic pain.**

**Salim Megat**, Yohann Bohren, Luc-Henri Tessier, Elisabeth Waltisperger, Claire Gaveriaux-Ruff, Brigitte Kieffer, Marie-José Freund-Mercier, Ipek Yalcin, Michel Barrot.

Meeting annuel Neurex, Strasbourg, France, Octobre 2012.

### **Anti-TNF $\alpha$ drug relief of neuropathic pain in mice.**

Mélanie Kremer, **Salim Megat**, Dorothee Daniel, Marie-José Freund-Mercier, Ipek Yalcin, Michel Barrot.

Meeting annuel Neurex, Strasbourg, France, Octobre 2012.

### **Phosphodiesterase inhibitors in the treatment of neuropathic pain.**

**Salim Megat**, Yohann Bohren, Marie-José Freund-Mercier, Ipek Yalcin, Michel Barrot.

4<sup>th</sup> International Congress on Neuropathic Pain, Toronto, Canada, Mai 2013.

**Antidepressants drugs relieve neuropathic allodynia by a peripheral  $\beta$ 2-adrenoceptor mediated anti-TNF $\alpha$  mechanism.**

Ipek Yalcin, Yohann Bohren, Luc-Henri Tessier, **Salim Megat**, Hugues Petitjean, Sylvain Hugel, Mélanie Kremer, Dorothée Daniel, Lutz Hein, Remy Schlichter, Sylvain Hugel, Marie-José Freund-Mercier, Michel Barrot.

4<sup>th</sup> International Congress on Neuropathic Pain, Toronto, Canada, Mai 2013.

**Antidepressants drugs relieve neuropathic allodynia by a peripheral  $\beta$ 2-adrenoceptor mediated anti-TNF $\alpha$  mechanism.**

Marie-José Freund-Mercier, Yohann Bohren, Luc-Henri Tessier, Hugues Petitjean, **Salim Megat**, Mélanie Kremer, Dorothée Daniel, Lutz Hein, Remy Schlichter, Sylvain Hugel, Ipek Yalcin, Michel Barrot.

Société des Neurosciences, 11<sup>ème</sup> Colloque, Lyon, France, Mai 2013.

**Communication orale :**

**Traitement de la douleur neuropathique : des antidépresseurs aux inhibiteurs de phosphodiesterases.**

**Salim Megat**, Yohann Bohren, Marie-José Freund-Mercier, Ipek Yalcin, Michel Barrot.

10<sup>ème</sup> Symposium Réseau Inserm de Recherche sur la Douleur, Montpellier, Mars 2014

**Financement de la thèse :**

Contrat doctoral (concours Ecole Doctorale Vie & Santé, Université de Strasbourg), 01/10/2011 au 30/09/2014.

# *Résumé*

---

## Traitement de la douleur neuropathique : des antidépresseurs aux inhibiteurs de phosphodiesterases

---

### Résumé

Les antidépresseurs ont un effet antialloodyne qui dépend de la stimulation des récepteurs  $\beta_2$ -adrénergiques. Ceux-ci stimulent la production d'adénosine monophosphate cyclique (AMPc), qui est régulé par les phosphodiesterases de type 4 (PDE4). Nous avons ici étudié l'effet d'inhibiteurs de PDE (iPDE) sur la douleur neuropathique, grâce à des approches de pharmacologie comportementale chez la souris complétées par de l'imagerie calcium et des approches moléculaires. Nos résultats montrent un effet antialloodyne des iPDE4 et des iPDE5. L'action des iPDE4 est liée à une diminution d'expression du TNF $\alpha$  dans le ganglion rachidien et au recrutement des récepteurs delta des opioïdes. Celle des iPDE5 nécessite à la fois les récepteurs mu et delta. Nous montrons aussi que l'action d'un iPDE4 dépend de la dose, l'activation de cellules gliales semblant corrélée à l'effet antialloodyne à faible dose, alors que celle des neurones à forte dose a un effet pronociceptif via les récepteurs TRPV1.

Mots-clés : douleur neuropathique, PDE4, PDE5, TNF $\alpha$ , ganglion rachidien, TRPV1

### Abstract

Antidepressants have an antialloodynic action that is dependent on  $\beta_2$ -adrenoceptor stimulation. These receptors stimulate the cAMP production, which is regulated by type 4 phosphodiesterases (PDE4). Here, we studied that action of PDE inhibitors (iPDE) on neuropathic pain, using behavioral pharmacology approaches in mice, completed by calcium imaging and molecular approaches. Our results show the iPDE4s and iPDE5s have an antialloodynic action. The iPDE4s act through a decreased expression of TNF $\alpha$  in dorsal root ganglia and the recruitment of the delta opioid receptors. The action of iPDE5 requires both mu and delta opioid receptors. We also show that the action of an iPDE4 depends on the dose, the activation of glial cells at low dose being correlated with an antialloodynic action, while the recruitment of neurons at higher doses has a pronociceptive action via TRPV1 receptors.

Keywords: neuropathic pain, PDE4, PDE5, TNF $\alpha$ , dorsal root ganglia, TRPV1

# *S o m m a i r e*

---

<b>Introduction</b>	<b>1</b>
<b>I. Avant-propos</b>	<b>3</b>
<b>II. Traitement de la douleur neuropathique : des antidépresseurs aux <math>\beta</math>2-agonistes</b>	<b>6</b>
A. Traitement par les antidépresseurs	6
1. Activité antalgique des antidépresseurs	6
2. Principales classes thérapeutiques	6
a. Les antidépresseurs tricycliques	6
b. Les inhibiteurs sélectifs de la recapture de sérotonine et de noradrénaline	7
c. Les inhibiteurs sélectifs de la recapture de sérotonine	7
B. Rôle du système monoaminergique dans le mécanisme d'action des antidépresseurs	9
1. Le système sérotonergique	9
a. Efficacité des ISRS : données précliniques	9
b. Mécanisme d'action : balance 5-HT <sub>1</sub> /5-HT <sub>2</sub>	10
2. Le système noradrénergique	11
a. Les récepteurs $\alpha$ 2-adrénergiques	11
b. Les récepteurs $\beta$ 2-adrénergiques	12
c. Effet antiallodynie des $\beta$ 2-agonistes	12
d. Données cliniques	14
C. Le système nerveux périphérique : site d'action des antidépresseurs	14
1. Antidépresseurs et système nerveux sympathique	14
a. Généralités	15
b. Données précliniques	15
c. Le ganglion rachidien : lieu d'action des antidépresseurs	16
2. Antidépresseurs et système opioïdérique	16
<b>III. Le système nociceptif périphérique : Rôle des ganglions rachidiens dans la douleur neuropathique</b>	<b>19</b>
A. Le système nociceptif périphérique	19
1. Généralités	19
2. Anatomie des ganglions rachidiens	19
B. Les afférences sensorielles primaires	20
1. Diversité des afférences sensorielles primaires	20
2. Transmission de l'information nociceptive	20
a. Les nocicepteurs de type A $\delta$	20
b. Les nocicepteurs de type C	22
C. Rôle des ganglions rachidiens dans la physiopathologie de la douleur neuropathique	23
1. Les neurones sensoriels primaires	23
a. Propriétés électrophysiologiques	23
b. Rôle des canaux sodium voltage-dépendants	24
c. Rôle des canaux calcium voltage-dépendants	24
d. Rôle des canaux potassium voltage-dépendants	27
2. Les cellules satellites gliales	28
a. Activation des cellules satellites gliales : expression de marqueurs gliaux	28
b. Rôle des jonctions communicantes (jonctions GAP)	28
c. Cellules satellites gliales et cytokines	29
3. Les cellules immunitaires	30
a. Recrutement de cellules immunitaires dans les ganglions rachidiens	30
b. Implications fonctionnelles : rôle des macrophages	31
<b>IV. Rôle du TNF<math>\alpha</math> dans la physiopathologie de la douleur neuropathique</b>	<b>34</b>
A. Généralités	34
1. Structure du TNF $\alpha$ (Tumor Necrosis Factor- $\alpha$ ) et de ses récepteurs	34
2. Signalisation intracellulaire	34
B. Rôle du TNF $\alpha$ dans le système nerveux périphérique et central	35
1. Généralités	35
2. Le TNF $\alpha$ dans le système nerveux périphérique	37
a. Site de lésion	37
b. Ganglion rachidien	37
c. Rôle fonctionnel	39
i. TNF $\alpha$ , allodynie et hyperalgésie	39

ii. Dégénérescence wallérienne et TNF $\alpha$	39
iii. Apoptose et TNF $\alpha$	39
iv. Activation de la voie des MAPK (Mitogen-Associated Protein Kinases)	40
3. Le TNF $\alpha$ dans le système nerveux central	40
a. Expression et rôle du TNF $\alpha$ au niveau spinal	41
i. Rôle des astrocytes	41
ii. Rôle de la microglie	42
iii. TNF $\alpha$ et activité synaptique	42
b. Expression et rôle du TNF $\alpha$ au niveau supraspinal	42
C. TNF $\alpha$ et traitement de la douleur neuropathique	43
1. Effet anti-TNF $\alpha$ d'un traitement par les antidépresseurs	43
2. Effet anti-TNF $\alpha$ d'un traitement par des $\beta$ 2-agonistes	43
3. Efficacité des traitements anti-TNF $\alpha$	44
a. Traitement par l'etanercept (Enbrel®)	44
b. Traitement par l'infliximab (Remicade®)	44
c. Les inhibiteurs gliaux : rôle des phosphodiesterases ?	45
<b>V. Rôle des phosphodiesterases dans le traitement de la douleur</b>	<b>46</b>
A. Nomenclature, structure et distribution des phosphodiesterases	46
1. Nomenclature	46
2. Structure et distribution des phosphodiesterases	47
a. Structure des phosphodiesterases	47
b. Distribution des phosphodiesterases	47
B. Rôle des PDE dans le traitement de la douleur	49
1. Inhibiteurs non-sélectifs de PDE et traitement de la douleur	49
a. Efficacité de l'AV411 (Ibutilast)	49
b. Efficacité des méthylxanthines	49
2. Rôle des PDE5 dans le traitement de la douleur	50
a. Monoxyde d'azote, PDE5 et GMP cyclique	50
b. Inhibiteurs de PDE5 et douleur inflammatoire	50
c. Inhibiteurs de PDE5 et douleur neuropathique	51
d. La voie NO-GMPc : douleur et analgésie	51
e. IPDE5 et système opioïdérique	52
3. Rôle des PDE4 dans le traitement de la douleur	53
a. Structure, distribution et compartimentalisation du signal AMPc	53
i. Structure des PDE4	53
ii. Distribution des PDE4	53
iii. Compartimentalisation du signal AMPc	55
b. Efficacité des inhibiteurs de PDE4 (iPDE4) dans le traitement de la douleur	57
i. iPDE4 et douleur inflammatoire	57
ii. iPDE4 et douleur neuropathique	57
c. PDE4, récepteurs $\beta$ 2 adrénergiques et effet anti-TNF $\alpha$	58
<b>Objectif de thèse</b>	<b>61</b>
<b>Méthodes générales</b>	<b>65</b>
<b>I. Animaux</b>	<b>67</b>
A. Animaux C57BL/6J	67
B. Animaux déficients pour les récepteurs $\beta$ 2-adrénergiques ( $\beta$ 2-AR)	67
C. Animaux déficients pour les récepteurs Mu, Delta et Kappa (MOR, DOR, KOR) des opioïdes	67
<b>II. Modèle de douleur neuropathique et évaluation de l'allodynie mécanique</b>	<b>68</b>
<b>III. Procédures de traitement</b>	<b>68</b>
A. Traitement par les inhibiteurs de phosphodiesterases (iPDE)	69
B. Traitement par les $\beta$ 2-agonistes	69
C. Traitement par les antagonistes des récepteurs des opioïdes	69
<b>IV. Immunoblot</b>	<b>69</b>
A. Prélèvement	69
B. Extraction et dosage des protéines	69
C. Migration et transfert des protéines	70
<b>V. Imagerie calcium sur des cultures de ganglions rachidiens</b>	<b>70</b>

A. Préparation des boîtes de culture	70
B. Mise en culture	71
C. Imagerie calcium	71
1. La sonde Fura-2	71
2. Protocole d'introduction de la sonde dans les cellules	72
3. Acquisitions des images	72
4. Préparation et application des solutions	73
5. Analyse des résultats	73
<b>VI. Statistiques</b>	<b>74</b>
A. Tests comportementaux	74
B. Western blot	74
C. Imagerie calcium	74
<b>Résultats</b>	<b>75</b>
<b>Chapitre 1 Modèle de douleur neuropathique</b>	<b>77</b>
I. The sciatic nerve cuffing model of neuropathic pain in mice	78
<b>Chapitre 2 Effet antiallodymique des inhibiteurs de phosphodiesterases (PDE)</b>	<b>87</b>
I. Criblage pharmacologique	89
A. Introduction	89
B. Protocole	89
C. Résultats	89
E. Statistiques	90
F. Conclusion	90
II. Dose-réponse de l'effet antiallodymique d'un iPDE4 et d'un iPDE5	92
A. Introduction	92
B. Protocole	92
C. Résultats	92
1. Effet d'un traitement prolongé par un iPDE4 : dose-réponse	92
2. Effet d'un traitement prolongé par un iPDE5 : dose-réponse	94
D. Statistiques	94
E. Conclusion	95
<b>Chapitre 3 Des antidépresseurs aux inhibiteurs de PDE : rôle du système opioïdérique</b>	<b>95</b>
I. Role of kappa opioid receptor in the antidepressant treatment of neuropathic pain	96
II. Rôle du système opioïdérique dans l'effet thérapeutique des $\beta_2$ -agonistes	120
A. Introduction	120
B. Protocole	120
C. Résultats	120
1. Effet antiallodymique d'un $\beta_2$ -agoniste : rôle des DOR, MOR et KOR	120
2. Effet d'une injection aiguë d'antagoniste des DOR : le naltrindole	122
D. Statistiques	122
E. Conclusion	122
III. Rôle du système opioïdérique dans l'effet thérapeutique des iPDE4 et iPDE5	123
A. Introduction	123
B. Protocole	123
C. Résultats	123
1. Effet thérapeutique d'un iPDE4 et iPDE5 : Rôle des DOR, MOR et KOR	123
2. Effet d'une injection d'antagonistes des DOR, des MOR ou des KOR sur l'effet thérapeutique d'un traitement par un iPDE4 et un iPDE5	125
D. Discussion et conclusion	125
E. Statistiques	127
IV. Des antidépresseurs aux inhibiteurs de PDE : localisation de l'effet opioïdérique	128
A. Introduction	128
B. Protocole	128
C. Résultats	128
D. Statistiques	128
E. Discussion et conclusion	130
<b>Chapitre 4 Des antidépresseurs aux inhibiteurs de PDE : rôle du TNF<math>\alpha</math></b>	<b>131</b>
I. Antidepressants suppress neuropathic pain by a peripheral $\beta_2$ -adrenoceptor mediated anti-TNF $\alpha$ mechanism	132
II. Effet anti-TNF $\alpha$ d'un traitement prolongé par un iPDE4	145
A. Introduction	145
B. Protocole	145

C. Résultats	145
D. Statistiques	145
E. Conclusion	147
<b>Chapitre 5 Mécanisme d'action d'un inhibiteur de PDE4 : utilisation d'une approche par imagerie calcium</b>	<b>149</b>
I. Identification des neurones et des cellules non-neuronales du DRG	150
A. Introduction	150
B. Protocole	150
C. Résultats	150
1. Identification des neurones du DRG : approche morphologique	150
2. Identification des neurones du DRG : approche fonctionnelle	152
3. Identification des cellules non-neuronales du DRG	152
D. Statistiques	154
E. Conclusion	154
II. Sensibilité des neurones et des cellules non-neuronales à un iPDE4	155
A. Introduction	155
B. Protocole	155
C. Résultats	155
1. Effet d'un iPDE4 sur des cultures de DRG d'animaux neuropathiques	155
2. Dose-réponse	155
3. Identification du sous-type de neurone recruté par un iPDE4	157
D. Statistiques	157
E. Discussion et conclusion	159
III. Origine du calcium et rôle du récepteur $\beta_2$ -adrénergique	161
A. Introduction	161
B. Protocole	161
C. Résultats	161
1. Origine du calcium ( $\text{Ca}^{2+}$ )	161
2. Rôle du récepteur $\beta_2$ -adrénergique	162
D. Statistiques	162
E. Conclusion	162
IV. Rolipram et hyperalgésie : rôle du récepteur TRPV1	165
A. Introduction	165
B. Protocole	165
1. Imagerie calcium : protocole de désensibilisation	165
2. Effet d'une application topique de capsaïcine	166
C. Résultats	166
1. Rolipram et récepteur TRPV1	166
2. Sensibilité mécanique	168
D. Statistiques	168
E. Discussion et conclusion	168
<b>Discussion</b>	<b>171</b>
I. Considérations relatives au modèle <i>in vivo</i> de douleur neuropathique	173
A. Validité homologique	173
B. Validité phénoménologique	174
1. Modélisation de comportements provoqués	175
2. Modélisation de comportements spontanés	176
C. Validité prédictive	177
II. Considérations relatives au modèle <i>ex vivo</i>	179
A. Hypersensibilité des neurones à un iPDE4	179
B. Imagerie calcium et signal AMPc	180
C. Mise en évidence de l'origine du calcium dans les réponses à un iPDE4	181
III. Mécanisme d'action d'un iPDE4 dans les cellules non-neuronales du DRG	182
A. Recrutement du $\text{Ca}^{2+}$	182
B. Inhibition de la production de TNF $\alpha$	182
1. AMPc et TNF $\alpha$	182
2. Rôle de la voie NF- $\kappa$ B	183
3. Rôle de la voie des MAP kinases	184
IV. Mécanisme d'action d'un iPDE4 dans les neurones du DRG	186
A. AMPc et récepteur TRPV1	186
B. AMPc et récepteurs $\delta$ des opioïdes (DOR)	187

V. Mécanisme d'action d'un iPDE5	191
VI. Délai thérapeutique	194
<b>Perspectives</b>	<b>197</b>
<b>Bibliographie</b>	<b>201</b>



# *Introduction*

---



## **I Avant-propos**

La douleur neuropathique se définit selon l'IASP comme une « douleur secondaire à une lésion ou une maladie affectant le système somatosensoriel » (Jensen et al., 2011). Ces douleurs sont généralement chroniques, invalidantes et parmi les plus difficiles à traiter. Une étude épidémiologique a mis en évidence qu'environ 7% de la population française souffriraient de douleurs chroniques à composante neuropathique, représentant presque un tiers des patients douloureux chroniques (Bohassira et al., 2008).

Les douleurs neuropathiques sont généralement classées en fonction de l'origine neuroanatomique de la lésion causale. Ainsi, nous distinguons les douleurs neuropathiques liées à une lésion du système nerveux périphérique ou central. Les douleurs neuropathiques périphériques incluent la douleur post-zostérienne, celles liées aux lésions nerveuses post-chirurgicales (thoracotomie), les radiculopathies chroniques (névralgies cervicobrachiales, cruralgies, sciatalgies) et la neuropathie douloureuse du diabète (Attal, 2011). Les douleurs neuropathiques d'origine centrale peuvent se manifester suite à une lésion des voies sensitives médullaires ou chez des patients ayant subi un accident vasculaire cérébral.

En règle générale, la douleur neuropathique se traduit par l'apparition de signes cliniques de plusieurs types. D'une part, on distingue les signes dits « positifs » qui se traduisent par l'apparition de sensations anormales (dysesthésies, paresthésies), de douleurs spontanées (continues ou paroxystiques) et/ou de douleurs provoquées comme l'allodynie et l'hyperalgésie. L'allodynie est une douleur en réponse à un stimulus non nociceptif alors que l'hyperalgésie est une réponse exacerbée à un stimulus nociceptif. D'autre part, on observe chez la plupart des patients l'apparition de signes dits « négatifs » qui sont essentiellement des déficits sensitifs comme une hypoesthésie ou une anesthésie de la zone anatomique concernée (**Tableau I-1**).

Les douleurs neuropathiques ne sont pas ou peu soulagées par les traitements antalgiques usuels tels que les anti-inflammatoires non stéroïdiens ou les opiacés (Baron, 2006). Actuellement, les traitements les plus efficaces reposent sur des molécules d'abord utilisées pour d'autres pathologies du système nerveux, comme les antidépresseurs et les anti-épileptiques. Néanmoins, ces molécules montrent une efficacité partielle chez les patients et entraînent des effets indésirables souvent gênants (Attal, 2011). De nombreuses données de la littérature s'accordent à dire

**Tableau I-1. Sémiologie des douleurs neuropathiques**

Douleurs spontanées	Continues	→	Brûlure, étou
	Paroxystiques	→	Décharges électriques, élancements
Douleurs provoquées	Allodynie	→	Statique, dynamique
	Hyperalgésie	→	Chaud, froid
Sensations anormales	Dysesthésies Paresthésies	→	Fourmillements Picotements Démangeaisons
Déficits sensitifs	Hypoesthésie Anesthésie	→	/

(d'après Attal et al., 2006)

que l'effet antalgique des antidépresseurs est lié à leur action sur les systèmes de modulation de la douleur. Une meilleure compréhension des mécanismes cellulaires et moléculaires mis en jeu semble cependant nécessaire afin de permettre la mise en évidence de nouvelles cibles thérapeutiques et le développement de nouveaux traitements pharmacologiques.

C'est dans ce contexte que s'inscrit mon travail de thèse. Grâce à un modèle murin de douleur neuropathique, nous avons mis évidence que l'effet thérapeutique des antidépresseurs est lié à son action sur le système nerveux périphérique et plus particulièrement au sein des ganglions rachidiens (DRG). Cet effet serait lié à un recrutement du système noradrénergique (Yalcin et al., 2009b) et du système opioïdérique endogène (Benbouzid et al., 2008c; Bohren et al., 2010). De plus, les effets anti-allodyniques observés sont corrélés à une diminution de la synthèse de médiateurs pro-inflammatoires tels que le TNF $\alpha$  (Tumor Necrosis Factor- $\alpha$ ) (Bohren et al., 2013). Dans la lignée de ces résultats, nous avons mis en évidence que les phosphodiésterases pourraient aussi constituer une cible thérapeutique dans le traitement de la douleur neuropathique.

La première partie de l'introduction sera consacrée à un état de l'art des connaissances cliniques et précliniques concernant le mécanisme d'action des antidépresseurs, en insistant tout particulièrement sur le rôle des récepteurs  $\beta_2$  adrénergiques. La deuxième partie sera dédiée au rôle du système nerveux périphérique et notamment du ganglion rachidien dans la physiopathologie de la douleur neuropathique. La troisième partie de l'introduction abordera le rôle du TNF $\alpha$  au sein du système nerveux central et périphérique. Nous évoquerons l'implication des interactions neuro-immuno-gliales et le rôle central du TNF $\alpha$  dans ces mécanismes. Enfin, dans une quatrième partie, nous résumerons l'implication des phosphodiésterases (PDE) dans les douleurs inflammatoires et neuropathiques et leur traitement.

## **II. Traitement de la douleur neuropathique : des antidépresseurs aux $\beta_2$ -agonistes**

### **A. Traitement par les antidépresseurs**

#### **1. Activité antalgique des antidépresseurs**

Il y a 50 ans et pour la première fois, une étude préliminaire met en évidence le pouvoir analgésique des antidépresseurs imipraminiques dans les douleurs neuropathiques (Paoli et al, 1960). Une quinzaine d'années plus tard, une étude clinique menée sur 8 patients atteints de polyneuropathies diabétiques démontre l'effet analgésique d'un traitement prolongé par les antidépresseurs tricycliques (Davis et al, 1977). Bien qu'il ait fallu attendre la fin des années 90 pour que les agences de contrôle du médicament autorisent leur mise sur le marché, les antidépresseurs constituent aujourd'hui le traitement de référence de ces douleurs (Attal et al, 2006). Une enquête menée en 2006 rapporte que les antidépresseurs représentent environ 29% des prescriptions, arrivant néanmoins loin derrière les analgésiques classiques (opiacés, anti-inflammatoires non stéroïdiens) et les antiépileptiques dans le traitement de la douleur neuropathique (Mc Dermott et al, 2006). Leur efficacité relève majoritairement de la capacité à moduler la transmission de l'information douloureuse, indépendamment de leur action sur les troubles de l'humeur (Saarto and Wiffen, 2007). Plusieurs arguments cliniques viennent étayer cette hypothèse. D'une part, l'efficacité des antidépresseurs a été mise en évidence chez des patients douloureux non dépressifs (Onghe na and Van Houdenhove, 1992). D'autre part, l'effet antalgique se manifeste à des doses plus faibles (Ruoff, 1996; Goldstein et al, 2005) et dans des délais plus courts que ceux observés dans le traitement de la dépression (Hirschfeld et al, 2005). Malgré de nombreux arguments allant en faveur d'une action antalgique propre, on ne peut exclure dans certains cas un probable bénéfice thérapeutique lié aux propriétés thymoanaleptiques des antidépresseurs (Mico et al, 2006).

#### **2. Principales classes thérapeutiques**

##### **a. Les antidépresseurs tricycliques**

L'efficacité des antidépresseurs tricycliques (ATC) est bien établie dans le traitement de douleurs neuropathiques à l'exception de la neuropathie liée au sida

(Dworkin et al., 2007; Attal et al., 2010). Peu d'antidépresseurs tricycliques possèdent une autorisation de mise sur le marché (AMM) en tant que traitement de ces douleurs, parmi lesquels on peut citer l'amitriptyline (Laroxyl®), l'imipramine (Tofranil®), la clomipramine (Anafranil®) ou la duloxétine (Cymbalta®) (**Tableau I-2**). L'effet thérapeutique est observé environ 1 semaine après le début du traitement (Attal, 2008). Leurs effets indésirables constituent le problème majeur des ATC et sont liés à leurs propriétés anticholinergiques (sécheresse de la bouche, constipation, tachycardie) et adrénoalytiques (hypotension orthostatique). Ces effets sont dépendants de la dose utilisée. Les doses efficaces sont 3 à 4 fois plus faibles que celles utilisées dans le traitement de la dépression (Spencer and Wilde, 1998) ce qui peut expliquer la diminution de la fréquence d'apparition de ces effets indésirables dans le traitement de la douleur neuropathique.

b. Les inhibiteurs sélectifs de la recapture de sérotonine et de noradrénaline (IRSN)

L'efficacité de la venlafaxine et de la duloxétine a été confirmée dans des essais cliniques contrôlés chez des patients atteints de neuropathies périphériques, (Rowbotham et al., 2004; Goldstein et al., 2005; Wemick et al., 2006) bien que la duloxétine soit la seule à avoir obtenu une AMM dans le traitement des neuropathies diabétiques. Les données issues de méta-analyses semblent indiquer qu'ils présentent une efficacité moindre que les ATC (Finne rup et al., 2005). De manière générale les effets indésirables sont similaires à ceux observés avec les ATC bien que leur fréquence d'apparition reste relativement faible (Arnold et al., 2004; Chappell et al., 2008).

c. Les inhibiteurs sélectifs de la recapture de sérotonine

La plupart des études cliniques s'accordent à dire que les inhibiteurs sélectifs de la recapture de la sérotonine (ISRS) sont quasi-inefficaces dans le traitement de la douleur neuropathique (Dworkin et al., 2007) et l'effet analgésique de la fluoxétine (ISRS) n'a été observé que sur des patients douloureux et dépressifs (Max et al., 1992). Néanmoins, il faut noter que certaines études ont démontré une efficacité d'autres ISRS comme la paroxétine (Mylan®) ou l'escitalopram (Seroplex®) chez des patients atteints de douleurs neuropathiques, indépendamment de leurs effets thymonalectiques (Sindrup et al., 1990; Otto et al., 2008). Ces effets restent toutefois

**Tableau I-2 : Antidépresseurs et traitement de la douleur neuropathique**

<b>Classe pharmacologique</b>	<b>Molécule</b>	<b>Etiologie</b>
Antidépresseur tricyclique	Amitriptyline (Laroxyl®)	Polyneuropathie diabétique, Neuropathie post-zostérienne
	Imipramine (Tofranil®)	Polyneuropathie diabétique, Neuropathie post-zostérienne
	Clomipramine (Anafranil®)	Efficacité dans plusieurs étiologies
Antidépresseur IRSN	Duloxétine (Cymbalta®)	Polyneuropathie diabétique

(d'après Attal et al., 2008)

moins prononcés (Jackson and St Onge, 2003), avec environ 1 patient soulagé sur 6 (Otto et al., 2008) contre 1 sur 3 pour les ATC (Finnerup et al., 2005). Enfin, nous pouvons noter qu'une étude de cas a mis en évidence un effet antalgique d'un inhibiteur sélectif de la recapture de la noradréline, la réboxétine (Krell et al., 2005). Ces données, associées à l'efficacité modérée des ISRS, suggèrent que le système noradrénergique joue un rôle prépondérant dans l'effet thérapeutique des antidépresseurs. Nous pouvons émettre l'hypothèse d'une efficacité variable selon les patients, probablement liée à la diversité des mécanismes physiopathologiques mis en jeu dans la douleur neuropathique.

## **B. Rôle du système monoaminergique dans le mécanisme d'action des antidépresseurs**

De manière générale, les données concernant le mécanisme d'action des antidépresseurs proviennent d'études précliniques utilisant des modèles animaux. Notons que dans la majorité de ces études, l'effet antinociceptif est mesuré dans des modèles de douleur aiguë, situation dans laquelle les antidépresseurs ne sont jamais utilisés. En ce sens, il semble nécessaire de favoriser l'utilisation de modèles de douleurs chroniques associés à une mesure de l'analgésie lors d'un traitement prolongé par les antidépresseurs.

### **1. Le système sérotonergique**

#### **a. Efficacité des ISRS : données précliniques**

Les données semblent indiquer que l'activation des contrôles descendants monoaminergiques peut exercer, selon les cas, une action inhibitrice ou facilitatrice sur la transmission de l'information nociceptive (Millan, 2002). Cela dépendra en partie du type de douleur, aiguë ou chronique, ainsi que du type de récepteur mis en jeu (Bardin et al., 2000; Jeong et al., 2004; Sommer, 2006). Étant donné le rôle primordial de l'activation des contrôles descendants dans la transmission de l'information nociceptive, il semble légitime de supposer que l'action antalgique des antidépresseurs nécessite le recrutement du système sérotonergique (Mico et al., 2006). Les études menées chez les animaux déficients pour le transporteur de la sérotonine ( $SERT^{-/-}$ ) montrent que les souris ne développent pas d'hyperalgésie thermique, mais une allodynie mécanique bilatérale, suite à l'induction d'une

neuropathie (Vogel et al, 2003). Si certains groupes ont pu mettre en évidence un effet antialloodynique d'un traitement aigu (Anjaneyulu and Chopra, 2006) ou prolongé (Kato et al, 2013; Zarei et al, 2014) par la fluoxétine (ISRS) chez l'animal, d'autres données démontrent le contraire (Benbouzid et al, 2008a). De plus, une étude comparative met en évidence l'efficacité d'un traitement par ISRS dans un modèle de neuropathie diabétique, alors que celui-ci reste inefficace dans un modèle de neuropathie d'origine traumatique (Ikeda et al, 2009). Enfin, il semblerait que l'efficacité de ces traitements dépende aussi de la nature du stimulus sensoriel testé. Ainsi, la fluoxétine (ISRS) atténue l'allodynie mécanique alors qu'aucun effet n'est observé sur l'hyperalgésie thermique (Pedersen et al, 2005).

#### b. Mécanisme d'action : balance 5-HT<sub>1</sub>/5-HT<sub>2</sub>

L'identification des mécanismes moléculaires et cellulaires responsables de l'effet thérapeutique des antidépresseurs a permis de réaliser une avancée considérable dans la compréhension des phénomènes de « résistance » aux IRS. En effet, des données mettent en évidence que la co-administration d'antagonistes des récepteurs de la sérotonine 5-HT<sub>1A</sub> (5-Hydroxytryptamine) potentialise l'effet antinociceptif d'un ATC (Ardid et al, 2001) et du tramadol (Berrocso et al, 2007) dans un modèle de neuropathie périphérique. De plus, l'administration intracérébro-ventriculaire d'ARN anti-sens dirigé contre le récepteur 5-HT<sub>1</sub> (Hernandez et al, 2004), ainsi que l'injection intrathécale d'antagonistes de ce récepteur, suffit à atténuer l'hyper sensibilité mécanique induite par la neuropathie (Wei and Pertovaara, 2006). Cet effet serait lié au blocage d'auto récepteurs 5-HT<sub>1</sub> situés dans les noyaux sérotonergique supraspinaux et induisant un contrôle inhibiteur sur la libération de sérotonine (Berrocso et al, 2007). A l'inverse, le récepteur 5-HT<sub>2</sub> semble nécessaire à l'effet antialloodynique d'un ISRS (Honda et al, 2006), et sa seule stimulation pharmacologique est capable de soulager significativement l'allodynie neuropathique (Obata et al, 2001). Par ailleurs, il semble que dans le cas de douleur neuropathique diabétique, l'activité du récepteur 5HT<sub>2</sub> soit altérée par la surexpression d'une protéine d'échafaudage. L'administration d'un peptide permettant la dissociation de ce complexe protéique atténue l'hyper sensibilité mécanique et potentialise l'effet antialloodynique d'un ISRS, la fluoxétine (Pichon et al, 2010). Nous pouvons noter que le rôle de la sérotonine dans les réponses au traitement par antidépresseurs n'est pas univoque. En effet, nous avons pu observer

que celui-ci peut être pro ou antinociceptif en fonction du type de récepteur recruté. Par conséquent, nous pouvons envisager qu'en condition neuropathique, une altération de l'activité antinociceptive associée à une suractivation de la composante pronociceptive rend inefficaces les traitements par ISRS.

## **2. Le système noradrénergique**

Les données obtenues par des approches transgéniques mettent en évidence l'implication du système noradrénergique dans la modulation de la transmission de l'information nociceptive. Les animaux déficients pour le transporteur de la noradrénaline (NET<sup>-/-</sup>) affichent une profonde hypoalgésie thermique alors que ces effets restent négligeables chez les animaux SERT<sup>-/-</sup> (Hall et al., 2011). Les données obtenues au sein du laboratoire démontrent qu'un traitement prolongé par la fluoxétine n'a aucun effet antialloodynique dans un modèle de neuropathie périphérique (Benbouzid et al., 2008a). A l'inverse, un traitement par un inhibiteur sélectif de la recapture de noradrénaline (IRN), la réboxétine, soulage l'alloodynie neuropathique soulignant ainsi le rôle prépondérant du système noradrénergique (Yalcin et al., 2009a). De plus, une lésion des contrôles descendants noradrénergiques par la 6-hydroxydopamine (6-OHDA) supprime l'effet antialloodynique d'un IRSN, alors qu'une lésion sélective de fibres sérotonergiques n'a aucun effet (Suzuki et al., 2008). Ceci confirme donc que le système noradrénergique est nécessaire à l'effet thérapeutique des antidépresseurs.

### **a. Les récepteurs $\alpha_2$ -adrénergiques**

Les récepteurs  $\alpha_2$ -adrénergiques sont très largement exprimés dans les systèmes nerveux central et périphérique (Pertovaara, 2013). Une variation d'expression des récepteurs  $\alpha_2$ -adrénergiques au niveau spinal (Leiphart et al., 2003) et périphérique (Cho et al., 1997) a été observée suite à l'induction d'une neuropathie périphérique. En clinique, l'utilisation d'agonistes des récepteurs  $\alpha_2$ -adrénergiques comme la clonidine est une alternative aux traitements usuels dans le cas de douleur neuropathique (Smith et al., 2008). Leur rôle dans l'effet thérapeutique d'un traitement prolongé par les antidépresseurs reste peu connu. L'effet analgésique aigu d'un ATC est perdu chez des animaux déficients pour les récepteurs  $\alpha_2$  adrénergiques (Ozdogan et al., 2004). Dans un modèle de neuropathie cette fois-ci, l'administration locale d'antagonistes des récepteurs  $\alpha_2$ -adrénergiques bloque

l'effet antalgique aigu d'un IRSN (Cegielska-Perun et al., 2013). Bien que ces récepteurs soient impliqués dans l'effet antalgique aigu des antidépresseurs, leur impact dans l'effet d'un traitement prolongé semble limité (Yalcin et al., 2009b; Yalcin et al., 2009a; Choucair-Jaafar et al., 2014).

#### b. Les récepteurs $\beta_2$ -adrénergiques

Les récepteurs  $\beta_2$ -adrénergiques sont distribués dans le système nerveux central et périphérique (Nicholas et al., 1991; Nicholson et al., 2005) et des données montrent qu'ils peuvent être surexprimés dans les ganglions rachidiens suite à une lésion du nerf sciatique (Maruo et al., 2006). Le rôle des récepteurs  $\beta_2$ -adrénergiques dans l'effet antalgique aigu des antidépresseurs a déjà été suggéré dans un modèle de douleur inflammatoire (Mico et al., 1997). Dans un modèle de douleur neuropathique, un traitement par la nortriptyline (ATC) est efficace après environ une dizaine de jours (Benbouzid et al., 2008a; Yalcin et al., 2009b), ce qui est relativement proche des délais d'actions observés en clinique chez les patients traités par les antidépresseurs (Attal, 2008). Ainsi, la co-administration d'antagonistes des récepteurs  $\beta$ -adrénergiques supprime l'effet antiallo-dynique de la nortriptyline, alors que l'administration d'antagonistes des récepteurs  $\alpha_2$ -adrénergiques n'a aucun effet (Yalcin et al., 2009b). De même, alors qu'un antagoniste sélectif des récepteurs  $\beta_2$ -adrénergiques bloque l'effet d'un ATC, l'injection d'antagonistes des récepteurs  $\beta_1$  et  $\beta_3$ -adrénergiques reste inefficace, suggérant un rôle préférentiel des récepteurs  $\beta_2$ -adrénergiques (Yalcin et al., 2009a). Ces données ont ensuite été confirmées par la perte d'efficacité des ATC (nortriptyline, désipramine) chez des animaux déficients pour le récepteur  $\beta_2$ -adrénergique (Yalcin et al., 2009b; Yalcin et al., 2009a). Cette perte d'efficacité a aussi été observée pour d'autres classes d'antidépresseurs comme les IRSN (duloxétine) et les IRN (réboxétine) (Yalcin et al., 2009a). On peut également noter que l'administration intrathécale lombaire, mais pas intracérébroventriculaire d'antagonistes de ces récepteurs, supprime l'action antiallo-dynique des antidépresseurs, excluant ainsi un rôle des structures supra-spinales dans cet effet (Yalcin et al., 2009a) (**Tableau I-3**).

#### c. Effet antiallo-dynique des $\beta_2$ -agonistes

Les récepteurs  $\beta_2$ -adrénergiques semblent nécessaires à l'action des antidépresseurs, mais leur seule stimulation est également suffisante pour obtenir un

		<b>ATC</b> Nortriptyline	<b>IRSN</b> Venlafaxine	<b>IRN</b> Réboxétine
Antagonistes	Voie d'administration			
$\alpha_2$ -AR	i.p.	↔	↔	↔
$\beta$ -AR	i.p.	↓	non testé	non testé
$\beta_3$ -AR	i.p.	↔	non testé	non testé
$\beta_1$ -AR	i.p.	↔	non testé	non testé
$\beta_2$ -AR	i.p.	↓	↓	↓
$\beta_2$ -AR	i.c.v	non testé	↔	non testé
$\beta_2$ -AR	i.t.	non testé	↓	non testé

**Tableau I-3. Rôle du système noradrénergique dans l'effet antialloodyne des antidépresseurs.** Approche pharmacologique utilisant des administrations systémique ou locale d'antagonistes des récepteurs adrénergiques. Le blocage des récepteurs adrénergiques supprime l'effet thérapeutique de l'antidépresseur (↓) ou n'a aucun effet (↔). Liste d'abréviations :  $\alpha$ -AR,  $\alpha$ -adrenoceptor; ATC, antidépresseur tricyclique;  $\beta$ -AR,  $\beta$ -adrenoceptor; i.c.v, intracérébroventriculaire; i.p, intrapéritonéale; IRN, inhibiteur sélectif de la recapture de noradrénaline; IRSN, inhibiteur de la recapture de noradrénaline et sérotonine; i.t, intrathécale

effet antiallo-dynique. En effet, un traitement prolongé par des  $\beta_2$ -agonistes atténue l'allo-dynie neuropathique lésionnelle (Yalcin et al., 2010) ou diabétique (Choucair-Jaafar et al., 2014). Cette action a été observée avec 11  $\beta_2$ -agonistes différents (bambutérol, clenbutérol, fénotérol, formotérol, isoprénaline, métoprotérol, procatérol, ritaline, salbutamol, salmétérol, terbutaline) (Choucair-Jaafar et al., 2009; Yalcin et al., 2010). Comme pour les antidépresseurs, l'effet antiallo-dynique des  $\beta_2$ -agonistes est observé après environ 10 jours de traitement. Que ce soit pour les antidépresseurs ou les  $\beta_2$ -agonistes, le délai d'action ne semble pas être dépendant des doses utilisées (Benbouzid et al., 2008a; Choucair-Jaafar et al., 2009). Ceci démontre que le délai thérapeutique ne serait pas uniquement dû aux propriétés pharmacocinétiques de la molécule, mais d'avantage lié à la mise en place de phénomènes de neuroplasticités moléculaire et cellulaire (Barrot et al., 2009). Par ailleurs, il est important de préciser que les  $\beta_2$ -agonistes présentent une efficacité à de faibles doses (Choucair-Jaafar et al., 2009) similaires à celles utilisées pour le traitement de pathologies des voies respiratoires. Cela permet entre autre, de limiter les effets néfastes d'un traitement prolongé sur le système cardiovasculaire (Choucair-Jaafar et al., 2011)

#### d. Données cliniques

Au niveau clinique, une étude de cas menée sur 6 patients souffrant de douleurs neuropathiques démontre que l'administration prolongée d'un  $\beta_2$ -agoniste, le salbutamol, diminue de manière significative les symptômes douloureux (Cok et al., 2010). En outre, des données épidémiologiques ont mis en évidence que le risque de développer des douleurs neuropathiques post-thoracotomie est divisé par 5 chez les patients traités par des  $\beta_2$ -agonistes (Salvat et al., 2014, en révision). La preuve de leur efficacité nécessite des études cliniques contrôlées, randomisées en double aveugle, et une telle étude est actuellement en cours aux hôpitaux Universitaires de Strasbourg.

### C. Le système nerveux périphérique : site d'action des antidépresseurs

#### 1. Antidépresseurs et système nerveux sympathique

#### a. Généralités

Le système nerveux sympathique constitue une des composantes du système nerveux autonome. Schématiquement, les neurones pré-ganglionnaires cholinergiques émergent de la moelle épinière thoraco-lombaire et rejoignent la chaîne sympathique paravertébrale par le biais du rameau communicant blanc. Les neurones post-ganglionnaires noradrénergiques communiquent avec le nerf spinal via le rameau communicant gris. En condition physiologique, il n'existe aucune interaction entre les neurones post-ganglionnaires du système nerveux sympathique et les neurones sensoriels primaires dans les ganglions rachidiens dorsaux (DRG) (Ramer and Bisby, 1999). En condition neuropathique, l'utilisation de blocs nerveux sympathiques, ou de sympathectomies soulagent significativement certains patients (Hannington-Kiff, 1974; Bonica, 1990), mais restent inefficaces chez d'autres (Bonica, 1990). Ces observations ont amené à différencier 2 types de douleurs neuropathiques dites « dépendante du système sympathique » (SMP) et « indépendante du système sympathique » (SIP).

#### b. Données précliniques

Des études précliniques ont montré l'apparition d'une arborisation sympathique autour du soma des neurones du DRG suite à une lésion nerveuse périphérique (Chung et al., 1993). Ces modifications morphologiques semblent être à l'origine de l'apparition de l'allodynie mécanique et de l'hyperalgésie thermique (Ramer and Bisby, 1998). Les données de la littérature démontrent clairement que l'origine et le délai d'apparition de ce phénomène varie en fonction du modèle utilisé (Lee et al., 1998). En effet, dans le cas d'un modèle de lésion proximale, c'est-à-dire proche des DRG (Chung et al., 1993), les bourgeonnements sympathiques sont issus de la régénération des fibres sympathiques post-ganglionnaires lésées (Ramer and Bisby, 1999). A l'inverse, dans un modèle de lésion distale, l'arborisation sympathique provient majoritairement des fibres post-ganglionnaires innervant les vaisseaux sanguins (Ramer and Bisby, 1999). Dans un modèle de ligature des nerfs spinaux, on observe une disparition totale de l'allodynie mécanique et de l'hyperalgésie thermique suite à une sympathectomie lombaire (Kim et al., 1993). Ceci souligne l'importance de l'innervation sympathique post-ganglionnaire dans les mécanismes sous-tendant l'apparition de comportements nocifs. A l'inverse, lors d'une lésion distale, le bourgeonnement des fibres noradrénergiques ne semble pas jouer un rôle

primordial dans le développement et le maintien de la douleur neuropathique (Bohren et al., 2013).

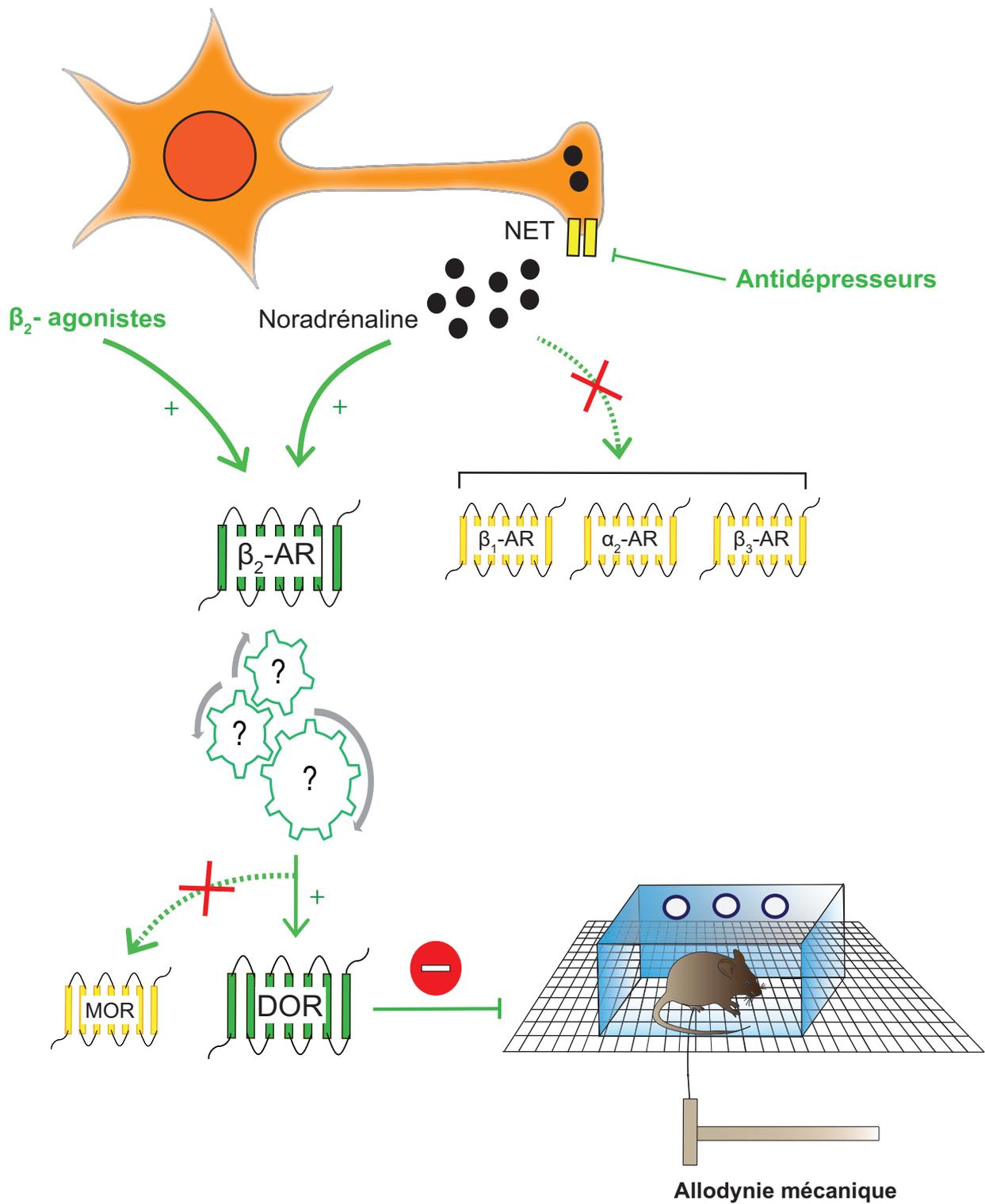
### c. Le ganglion rachidien : lieu d'action des antidépresseurs

Les études précédentes utilisant des administrations locales d'antagonistes des récepteurs  $\beta_2$ -adrénergiques suggèrent que le site d'action des antidépresseurs pourrait se situer soit au niveau spinal soit dans le système nerveux périphérique (Yalcin et al., 2009a). Une étude récente a mis en évidence que la source de noradrénaline responsable de l'effet thérapeutique des antidépresseurs se situe dans les DRG (Bohren et al., 2013). Nous avons réalisé des lésions des voies noradrénergiques centrales ou périphériques en utilisant de la guanéthidine, agent sympatholytique ne passant pas la barrière hématoencéphalique (Neil et al., 1991). L'effet antialloodynique d'un traitement prolongé par un ATC est perdu suite à une lésion des fibres noradrénergiques périphériques. À l'inverse, l'administration intrathécale thoracique de guanéthidine, ayant pour but de léser les contrôles descendants, n'a aucune influence sur l'effet thérapeutique des antidépresseurs (Bohren et al., 2013). Ces données suggèrent que dans un modèle de lésion du nerf sciatique, le bourgeonnement des fibres sympathiques dans le DRG constitue le substrat anatomique de l'effet thérapeutique des antidépresseurs.

## **2. Antidépresseurs et système opioïdérique**

L'implication du système opioïdérique endogène a été suggérée par la mise en évidence d'une augmentation de la libération de peptides opioïdes (De Felipe et al., 1985) et une modification de la densité des récepteurs des opioïdes supraspinaux (Hamon et al., 1987) suite à un traitement chronique par antidépresseurs. De plus, des études comportementales démontrent que l'administration d'un antagoniste non-sélectif des récepteurs des opioïdes supprime les effets antinociceptifs d'un traitement par les antidépresseurs (Biegon and Samuel, 1980; Escalier et al., 1981; Gray et al., 1998). Les données de la littérature concernant l'implication respective des différents types de récepteurs des opioïdes sont assez contradictoires. Ainsi, certains auteurs démontrent une implication des récepteurs de type  $\mu$  (MOR) et  $\delta$  des opioïdes (DOR) (Marchand et al., 2003; Nozaki and Kamei, 2006), alors que d'autres soutiennent un rôle préférentiel des DOR (Gray et al., 1998; Schreiber et al., 1999). Ces divergences sont liées d'une part, au protocole d'administration des

antidépresseurs qui peut être aigu (Gray et al, 1998; Schreiber et al, 1999; Nozaki and Kamei, 2006) ou chronique (Marchand et al, 2003; Benbouzid et al, 2008a) et d'autre part aux problèmes de sélectivité des différents antagonistes utilisés. Dans le cas d'une administration chronique d'antidépresseurs chez des animaux neuropathiques, des données démontrent un rôle préférentiel des DOR (Benbouzid et al, 2008c). Ces approches de pharmacologie comportementale ont été complétées par l'utilisation d'outils génétiques, permettant ainsi de s'affranchir des problèmes de sélectivité des différents antagonistes. L'administration prolongée d'antidépresseurs chez des animaux déficients pour les différents types de récepteurs des opioïdes confirment que les DOR (Benbouzid et al, 2008c) mais pas les MOR (Bohren et al, 2010) sont nécessaires à l'effet antialloodynique des antidépresseurs (**Figure I-1**).



**Figure I-1. Mécanisme d'action des antidépresseurs.** La noradrénaline recrutée par les antidépresseurs agit sélectivement sur les récepteurs  $\beta_2$ -adrénergiques. Une succession de mécanismes moléculaire et cellulaire aboutit au recrutement du système opioïdérique endogène et plus particulièrement des DOR. Liste d'abréviations :  $\beta_1$ -AR,  $\beta_1$ -adrenoceptor;  $\beta_2$ -AR,  $\beta_2$ -adrenoceptor;  $\beta_3$ -AR,  $\beta_3$ -adrenoceptor; DOR, delta-opioid receptor; MOR, mu-opioid receptor; NET, norepinephrine transporter.

### **III. Le système nociceptif périphérique : Rôle des ganglions rachidiens dans la douleur neuropathique**

#### **A. Le système nociceptif périphérique**

##### **1. Généralités**

D'un point de vue anatomique, la sensibilité somatique périphérique peut se diviser en 2 groupes : l'innervation crânienne, qui va correspondre à la sensibilité de la face (nerfs crâniens) et l'innervation rachidienne qui correspond à la sensibilité du reste du corps (nerfs rachidiens). Dans la suite du propos, nous traiterons uniquement de l'innervation rachidienne. L'information sensorielle est transmise depuis la périphérie par un réseau d'afférences sensorielles primaires. Celle-ci transite dans la racine dorsale avant d'atteindre le réseau spinal et supraspinal, formant le système nerveux central. Les stimulations sensorielles peuvent être de nature superficielle, on parlera d'extéroception ou de sensibilité cutanée (toucher, pression, température), ou profondes, on parlera alors de proprioception en référence à la sensibilité musculaire et articulaire (étirement, contraction) nous renseignant sur la position de notre corps dans l'espace. Au niveau périphérique, la jonction entre la racine dorsale (sensorielle) et ventrale (motrice) forme un nerf mixte auquel s'ajoutent des fibres issues du système nerveux végétatif (sympathique ou parasymphatique).

##### **2. Anatomie des ganglions rachidiens**

Les DRG sont définis comme des renflements des racines dorsales situés dans le foramen intervertébral. Chez l'Homme on distingue 29 paires de DRG et 31 paires de nerfs rachidiens qui portent le nom du segment vertébral dont ils sont issus.

D'un point de vue histologique, les DRG contiennent les corps cellulaires des neurones sensoriels dont les axones forment les fibres afférentes primaires. Chez l'Homme, chaque DRG contient plus de 15 000 neurones sensoriels (Hogan, 2010) et le diamètre du soma varie de 20 à 150 µm (20 à 50 µm chez la souris). Les neurones sensoriels présentent une structure pseudo-unipolaire en T. La branche axonale périphérique formera le nerf rachidien innervant la peau, les muscles et les viscères, alors que la branche axonale centrale transite dans la racine dorsale avant d'établir une première synapse dans la corne dorsale de la moelle épinière. Les cellules de Schwann sont des cellules gliales qui entourent les fibres nerveuses périphériques et

assurent la myélinisation des axones. Au sein du DRG, les cellules satellites gliales forment une fine enveloppe autour du corps cellulaire des neurones, évitant ainsi tout contact synaptique (Shinder et al., 1998).

## **B. Les afférences sensorielles primaires**

### **1. Diversité des afférences sensorielles primaires**

Historiquement, les premières classifications se sont basées sur des critères cytologiques. En effet, en se référant au diamètre et à la densité des neurofilaments cytoplasmique, 2 classes de neurones ont été identifiées comme étant des neurones « large light » et « small dark » (Andres, 1961). Des études électrophysiologiques ont ensuite démontré qu'il existait des différences fonctionnelles entre ces neurones (vitesse de conduction, nature de la stimulation détectée) (Lawson and Waddell, 1991). Principalement 3 types de fibres afférentes ont été décrits (A $\beta$ , A $\delta$  et C), chacune présentant des caractéristiques morphologiques et fonctionnelles qui leur sont propres (Figure I-2).

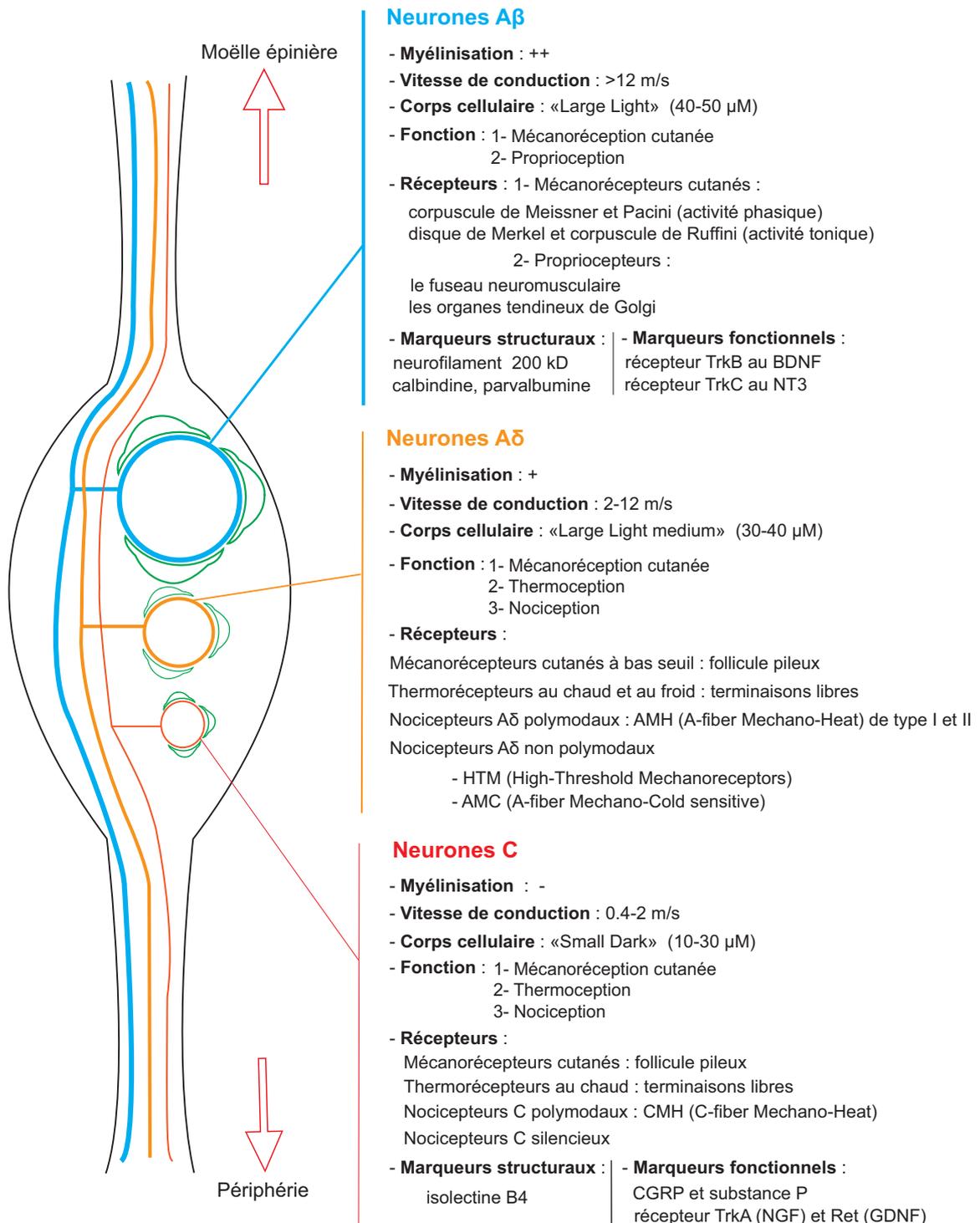
### **2. Transmission de l'information nociceptive**

Il y a près d'un siècle, Sherrington proposa l'existence de nocicepteurs qui permettraient la détection de stimulations potentiellement dommageables, nocives pour l'organisme. Ce n'est que quelques années plus tard qu'une étude amène la preuve physiologique de l'existence de récepteurs à haut seuil d'activation responsables de la détection de stimulations douloureuses (Burgess and Perl, 1967). Les nocicepteurs sont capables de détecter des stimulations de différentes natures (thermique, mécanique, chimique). On distingue classiquement les nocicepteurs de type A $\delta$  et C, bien que des données suggèrent l'existence de nocicepteurs de type A $\beta$  (Djohri and Lawson, 2004; Devor, 2009).

#### **a. Les nocicepteurs de type A $\delta$**

Les nocicepteurs de type A $\delta$  peuvent être subdivisés en 3 grandes classes :

Les nocicepteurs AMH (A fiber Mechano-Heat sensitive) « polymodaux » sensibles aux stimulations mécaniques et thermiques au chaud, ils représentent 86% des nocicepteurs de type A (Treed et al., 1998).



**Figure I-2. Caractéristiques morphologiques et fonctionnelles des afférences sensorielles primaires.** Les différents types de neurones du ganglions rachidien sont représentés ainsi que les caractéristiques morphologiques et fonctionnelles qui leur sont propres. Liste d'abréviations : BDNF, brain-derived neurotrophic factor; CGRP, calcitonine gene-related peptide; GDNF, glial cell line-derived neurotrophic factor; NT3, neurotrophine 3; TrkA, tropomyosine receptor kinase A; TrkB, tropomyosine receptor kinase B; TrkC, tropomyosine receptor kinase C.

Les nocicepteurs HIM (High Threshold Mecano sensitive) sont sensibles aux stimulations mécaniques de haut seuil.

Les nocicepteurs AMC (A fiber Cold sensitive) sensibles aux stimulations nociceptives thermiques au froid (Simone and Kjaander, 1997).

Parmi les nocicepteurs AMH on distingue 2 sous-populations : les récepteurs AMH de type 1, qui répondent à des stimulations thermiques chaudes de haut seuil (> 53°C), et les récepteurs AMH de type 2, présentant un seuil de détection thermique plus faible (42-46°C) également capables de détecter des stimulations mécaniques de haut seuil (Treede et al, 1998). Outre les critères fonctionnels basés sur la vitesse de conduction de l'information ou la nature des stimulations détectées, l'utilisation de marqueurs moléculaires permet l'identification des différentes sous populations neuronales. La présence de la forme phosphorylée du neurofilament 200 constitue un bon critère d'identification des fibres de type A (Lawson and Waddell, 1991). De plus, on peut noter que 21% des neurones de type A $\delta$  sécrètent de la substance P, et 38% le peptide relié au gène Calcitonine CGRP (calcitonin gene-related peptide). Ces deux molécules sont des neuropeptides majoritairement exprimés dans les neurones de petit diamètre (Lawson et al, 1993).

#### b. Les nocicepteurs de type C

La grande majorité des fibres de type C sont nociceptives mais il faut néanmoins préciser qu'une sous-population de fibre C va coder l'information non nociceptive mécanique et thermique (Abraira and Ginty, 2013). Nous pouvons également noter que les fibres de type C constituent plus de 80% des afférences cutanées (Guirmand and Le Bars, 1996) et sont regroupées en 4 catégories :

Les nocicepteurs C-MH (C fiber Mechano Heat sensitive) sensibles aux stimulations mécaniques et thermiques nociceptives (39-41°C).

Les nocicepteurs C-M (C fiber Mechano sensitive) sensibles à des stimulations mécaniques de haut seuil.

Les nocicepteurs C-H (C fiber Heat sensitive) sensibles à des stimulations thermiques plus élevées (42-48°C).

Les nocicepteurs C-MiH (« silencieux ») présentent une insensibilité aux stimulations mécaniques et thermiques en condition normale. En revanche, l'exposition à des agents algogènes comme la capsaïcine (agoniste des récepteurs TRPV1) induit une sensibilisation de ces récepteurs (Schmidt et al, 1995). Le groupe le plus important en

nombre est sans conteste celui des nocicepteurs polymodaux. En effet, ils représentent environ 75% des nocicepteurs de type C. Les études histologiques menées ces 20 dernières années (Carr and Nagy, 1993; Lawson et al., 1993; Price and Flores, 2007) ont permis d'établir 2 grandes classes de fibres de type C :

- **les fibres C peptidergiques** : elles secrètent deux types de neuropeptides, la substance P et le CGRP. Cette sous-population de fibres C exprime le récepteur TrkA (tyrosine related kinase) du NGF (Nerve Growth Factor). En effet, le NGF joue un rôle prépondérant au stade embryonnaire en permettant la survie des neurones durant le développement. Au stade adulte environ 40% des neurones des DRG expriment le récepteur TrkA (Molliver and Snider, 1997).

- **les fibres C non peptidergiques** : on observe durant la période post-natale une augmentation de l'expression du récepteur c-RET du GDNF (Glial Cell-Derived line Neurotrophic Factor) (Snider, 1998). De plus, ces neurones vont présenter une forte affinité pour l'isolectine B4 (IB4), protéine extraite de la plante Griffonia simplicifolia (Wang et al., 1994) et exprimer les récepteurs P2X3 de l'ATP (Julius and Basbaum, 2001).

### **C. Rôle des ganglions rachidiens dans la physiopathologie de la douleur neuropathique**

En clinique, on détecte chez les patients douloureux neuropathiques la présence de symptômes « positifs », c'est-à-dire l'apparition de signes sensoriels qui ne sont pas présents en condition normale. Parmi ceux-ci, on peut citer les douleurs spontanées dites « continues ou paroxystiques ». Dans ce cas, le patient va ressentir des sensations de douleur intense très caractéristiques de décharges électriques, d'élanements ou de coups de couteaux (Attal et al., 2006). Suite à des lésions nerveuses périphériques, on peut observer des modifications d'expression et de transport de certains canaux ioniques dans des structures clés du système nerveux périphérique. Ces modifications peuvent alors contribuer à la transmission de messages nerveux nociceptifs « spontanés » en l'absence de toute stimulation.

#### **1. Les neurones sensoriels primaires**

##### **a. Propriétés électrophysiologiques**

Les enregistrements microneurographiques, réalisés chez des patients douloureux chroniques, supportent l'idée d'un mécanisme de sensibilisation périphérique lié à l'apparition d'une activité électrique ectopique, pouvant être spontanée ou déclenchée par des stimulations non nociceptives (Serra, 2012). L'apparition d'une activité électrique spontanée peut s'expliquer par le profil électrophysiologique atypique de certains neurones du DRG (Devor, 1999). En effet, certains neurones présentent une activité électrique oscillatoire sous-liminaire liée à l'activation successive de canaux sodium et potassium (Amir et al., 1999). Ces phénomènes ont déjà été observés dans d'autres structures du système nerveux, notamment dans le cortex entorhinal (Dickson et al., 2000). Lorsque l'activité oscillatoire atteint un seuil de dépolarisation suffisant, on observe l'apparition de trains de potentiels d'action et la naissance d'une activité rythmique (Devor, 1999). Ce phénomène particulier prend son sens dans le cas de lésions nerveuses périphériques, où l'on a observé une augmentation de la proportion de neurones présentant une activité oscillatoire sous-liminaire ainsi qu'une activité spontanée (Amir et al., 1999). Bien que la contribution réelle de ce mécanisme soit encore mal connue, il semble que le profil d'activité électrique anormal des neurones du DRG en condition neuropathique soit étroitement lié à l'activation de canaux sodium voltage-dépendants (Amir et al., 2002). Une grande diversité de canaux sodium est exprimée dans les DRG (Wang et al., 2011b) et les études comportementales démontrent une diminution de l'activité ectopique suite à l'administration de lidocaïne (bloquant des canaux sodium voltage-dépendants) (Sheets et al., 2008).

#### b. Rôle des canaux sodium voltage-dépendants

Il existe 9 sous-types de canaux sodium voltage-dépendants ( $Na_v1.1$ -  $Na_v1.9$ ) sensibles ou non à la tétrodotoxine (TTX). On distingue les canaux sodium TTX-sensibles qui présentent une cinétique d'activation et d'inactivation rapide, et les canaux TTX-résistants ( $Na_v1.5$ ,  $Na_v1.8$  et  $Na_v1.9$ ) (Wang et al., 2011b). Dans un premier temps, l'implication des canaux sodium  $Na_v1.3$  dans la physiopathologie de la douleur neuropathique a été suggérée. En effet, ce canal est très faiblement exprimé en condition normale (Waxman et al., 1994), mais sa surexpression a été démontrée lors de lésions nerveuses périphériques (Lindia et al., 2005). Néanmoins la persistance d'une allodynie mécanique chez les souris déficientes pour le  $Na_v1.3$

(Nassar et al., 2006) semble indiquer que celui-ci n'est pas un élément primordial au développement et au maintien des symptômes douloureux.

Le canal  $Na_v1.7$  est majoritairement exprimé dans les neurones de petit diamètre du DRG (Black et al., 2004). Il présente une cinétique d'inactivation lente et une sensibilité à de faibles variations du potentiel de membrane (Cummins et al., 1998). Ainsi, il a récemment été montré que certains courants sodium persistants ( $I_{NaP}$ ) présentent une phase d'inactivation lente et pourraient contribuer à la genèse d'activités oscillatoires dans le cas d'une douleur neuropathique (Xie et al., 2011). Etant donnée sa cinétique d'activation, le canal  $Na_v1.7$  pourrait jouer un rôle important dans la genèse d'activités électriques spontanées. Toutefois, son rôle reste encore mal connu, car si des augmentations d'expression ont été observées dans un modèle de neuropathie diabétique (Hong et al., 2004), d'autres modèles suggèrent que la protéine serait réprimée (Kim et al., 2002a). De plus, les données comportementales montrent que la délétion du canal  $Na_v1.7$  dans le DRG n'affecte pas le développement et le maintien de l'allodynie mécanique dans un modèle de douleur neuropathique d'origine traumatique (Nassar et al., 2005). Enfin, une étude menée sur des DRG de patients ayant subi un traumatisme du plexus brachial montre une diminution de l'expression de  $Na_v1.7$  (Coward et al., 2001).

Le canal  $Na_v1.8$  semble principalement exprimé dans les neurones de petit diamètre non peptidergiques (Djouhri et al., 2003). Son rôle dans l'établissement ou le maintien de la douleur neuropathique est controversé. En effet, des données montrent que son expression est diminuée dans le DRG associé au nerf lésé mais accrue dans le DRG associé au nerf intact (Berta et al., 2008). Enfin, la délétion du canal  $Na_v1.8$  chez les animaux n'atténue pas l'hypersensibilité induite par la neuropathie (Abrahamson et al., 2008).

### c. Rôle des canaux calcium voltage-dépendants

Les canaux calcium voltage-dépendants ( $Ca_v$ ) représentent une des voies principales d'entrée du calcium dans le neurone, où ils participent activement à l'excitabilité cellulaire et aux processus moléculaires liés à la transmission synaptique. Les premières études électrophysiologiques ont permis de mettre en évidence 2 grandes classes de  $Ca_v$  qu'on appellera  $Ca_v$  à bas seuil d'activation (canaux de type T) et à haut seuil d'activation (canaux de type L, P/Q, R et N). Les  $Ca_v$  sont des protéines hétéromériques formées de l'association d'une sous-unité  $\alpha 1$ , d'un

domaine cytoplasmique  $\beta$ , d'une sous-unité  $\gamma$  et d'un domaine extracellulaire  $\alpha 2\delta$  (Bauer et al., 2010). La grande majorité des travaux dans le domaine de la nociception s'est orientée vers les  $Ca_v$  à haut seuil d'activation et notamment les  $Ca_v 2.2$ . En utilisant des souris déficientes en canal calcium de type N ( $Ca_v 2.2$ ), les auteurs ont démontré que celui-ci était nécessaire au développement et au maintien de l'allodynie neuropathique (Saegusa et al., 2001).

Les études se sont ensuite focalisées sur l'implication des différentes sous-unités régulatrices dans la physiopathologie de la douleur neuropathique. La sous-unité  $\alpha 2\delta$  semble jouer un rôle prépondérant dans le recyclage des canaux calcium à la membrane plasmique ainsi que dans la modulation des propriétés biophysiques du canal (Dolphin, 2012). Concernant cette sous-unité, des données indiquent que l'augmentation de l'expression de l'ARNm (Newton et al., 2001) et de la protéine (Luo et al., 2001) dans le DRG coïncide avec l'apparition de comportements associés à la douleur neuropathique (Luo et al., 2001). Par ailleurs, les souris présentant une surexpression de cette sous-unité développent une allodynie mécanique en l'absence totale de lésion (Li et al., 2006). A l'inverse, d'autres travaux montrent une apparition différée de l'allodynie neuropathique chez des souris déficientes pour cette sous-unité (Patel et al., 2013). De plus, il faut noter que la sous-unité  $\alpha 2\delta$  est le site d'action principal des gabapentinoïdes (Bourinet et al., 2014), utilisés en première ligne de traitement des douleurs neuropathiques en clinique (Attal et al., 2010). Ainsi, la surexpression d'une forme mutée de la sous-unité rend les animaux insensibles au traitement par la prégabaline (Field et al., 2006), indiquant son rôle primordial dans l'efficacité thérapeutique des gabapentinoïdes.

La sous-unité  $\beta$  des canaux calcium à haut seuil d'activation permet une modulation de l'expression, de la dégradation, ainsi que des propriétés cinétiques du canal (Buraei and Yang, 2013). Des données récentes montrent une surexpression de la sous-unité  $\beta_3$  au sein du DRG dans un modèle de ligation des nerfs spinaux (Li et al., 2012), et l'administration intrathécale d'ARN anti-sens dirigé contre cette sous-unité soulage l'allodynie neuropathique (Li et al., 2012).

Les  $Ca_v$  exprimés au sein du système nerveux périphérique semblent largement impliqués dans la physiopathologie de la douleur neuropathique. Néanmoins une meilleure compréhension du rôle des sous-unités régulatrices dans l'expression et l'adressage des canaux calcium est un élément primordial pour la mise en évidence de nouvelles cibles thérapeutiques.

#### d. Rôle des canaux potassium voltage-dépendants

Les canaux potassium voltage-dépendants ( $K_v$ ) jouent un rôle prépondérant dans le niveau d'excitabilité des neurones sensoriels primaires en favorisant l'étape de repolarisation lors de la genèse des potentiels d'action. Une réduction de l'activité des  $K_v$  est associée à une augmentation de la fréquence et de la durée des potentiels d'action aboutissant à une hyperexcitabilité membranaire (Waxman and Zamponi, 2014). Les neurones sensoriels expriment une grande variété de canaux potassium, les  $K_v1$ ,  $K_v2$ ,  $K_v3$ ,  $K_v4$  et  $K_v7$ , dont le niveau d'expression varie en fonction du sous-type de neurones (Rasband et al., 2001). Des données montrent clairement une réduction de l'expression des canaux  $K_v$  dans le DRG, que ce soit dans des modèles de douleur neuropathique d'origine traumatique (Rasband et al., 2001; Kim et al., 2002b; Tsantoulas and McMahon, 2014) ou diabétique (Cao et al., 2010). Cependant, les mécanismes moléculaires qui sous-tendent ces changements d'expression restent encore méconnus. Une étude récente a mis en évidence une diminution de l'expression du canal  $K_v1.2$  dans les neurones des DRG suite à une lésion du nerf périphérique (Zhao et al., 2013). Plus étonnant cette diminution serait liée à la synthèse endogène d'un ARN non codant dirigé contre le  $K_v1.2$ , aboutissant à une hyperexcitabilité des fibres afférentes primaires (Zhao et al., 2013). L'utilisation d'agents pharmacologiques permettant de potentialiser l'activité des canaux potassium peut présenter dans certains cas un intérêt limité (Tsantoulas and McMahon, 2014). Par conséquent, la découverte de molécules intermédiaires modulant l'activité ainsi que le niveau d'expression des canaux  $K_v$ , pourrait constituer une cible thérapeutique pour le développement de nouveaux traitements pharmacologiques (Tsantoulas and McMahon, 2014).

Les canaux HCN (Hyperpolarized-activated cyclic nucleotide channel) sont des canaux potassium voltage-dépendants caractérisés par une cinétique d'activation lente durant l'hyperpolarisation. Ils sont modulés par une liaison directe de l'adénosine monophosphate cyclique (AMPC) (He et al., 2014). L'inhibition pharmacologique des canaux HCN entraîne une diminution drastique de l'activité électrique spontanée des fibres  $A\beta$  ainsi que de l'hypersensibilité mécanique dans un modèle de ligature des nerfs spinaux (Chaplan et al., 2003). Enfin, la délétion sélective des canaux HCN dans les nocicepteurs exprimant le canal sodium  $Na_v1.8$  soulage l'allodynie neuropathique (Emery et al., 2011).

## 2. Les cellules satellites gliales

### a. Activation des cellules satellites gliales : expression de marqueurs gliaux

Les cellules satellites gliales (SGCs) sont caractérisées par un nombre important de marqueurs moléculaires (Hanani et al., 2002) facilitant ainsi leur identification. Néanmoins, contrairement aux astrocytes, les SGCs présentent en condition basale de faibles taux d'expression de la protéine GFAP (Glial Fibrillary Acidic Protein) (Jessen et al., 1984). Dans le cas d'une lésion nerveuse, une forte augmentation d'expression de cette protéine (Stephenson and Byers, 1995; Ohtori et al., 2004) ainsi que de la protéine S100 (Sandelin et al., 2004) a été observée dans les DRG. De plus le patron d'activation des SGCs semble dépendant du délai suivant l'induction de la neuropathie. En effet, à des temps précoces suivant la chirurgie, les SGCs activées semblent préférentiellement associées aux neurones de type A $\delta$  et C. A l'inverse, plusieurs semaines après l'induction de la neuropathie les SGCs activées se retrouvent majoritairement associées aux neurones de type A $\beta$  (Liu et al., 2012). Les variations d'expression de marqueurs gliaux semblent liées à des phénomènes de glioses réactionnelles dans le DRG. En effet, une prolifération cellulaire gliale (Shinder et al., 1999) a été décrite dans le cas d'une lésion nerveuse périphérique ainsi qu'une hypertrophie gliale dans un modèle de neuropathie d'origine cancéreuse (Peters et al., 2007).

### b. Rôle des jonctions communicantes (jonctions GAP)

Les études menées en microscopie électronique révèlent une croissance anormale des prolongements gliaux formant ainsi de nouvelles jonctions GAP avec les cellules gliales adjacentes (Hanani et al., 2002; Pannese et al., 2003). L'augmentation du couplage entre les SGCs a été observée dans des modèles de douleurs viscérale, inflammatoire et neuropathique (Dublin and Hanani, 2007; Ohara et al., 2008; Huang et al., 2010b). Ces données sont confortées par une étude montrant une surexpression de la connexine 43 (unité fonctionnelle des jonctions GAP) dans le DRG d'animaux douloureux neuropathiques (Ohara et al., 2008). Par ailleurs, l'administration de carbénoxolone, bloquant des jonctions GAP (Warwick and Hanani, 2013), et d'ARN anti-sens dirigé contre la connexine 43 (Jasmin et al., 2010) atténue les comportements associés à la douleur chronique. L'une des

hypothèses suggèrent que les jonctions GAP des SGCs auraient un rôle dans la régulation de la concentration extracellulaire de potassium (Kettenmann and Ransom, 1988). Cette hypothèse a été confirmée par une étude montrant l'expression de canaux potassium à rectification entrante (Kir) fonctionnels à la surface des SGCs (Vit et al, 2006). Ceux-ci permettent une recapture efficace du potassium libéré dans le cas d'une hyperexcitabilité neuronale, ainsi qu'une redistribution du potassium à travers les jonctions GAP nouvellement formées (Vit et al, 2006). Cette idée est supportée par le fait qu'une inactivation sélective des canaux Kir4.1 majoritairement exprimés sur les SGCs déclenche l'apparition d'une douleur spontanée en absence de lésion (Vit et al, 2008).

### c. Cellules satellites gliales et cytokines

Les cytokines sont des protéines solubles de signalisation cellulaire synthétisées par les cellules immunitaires (neutrophiles, macrophages, lymphocytes) mais également par des cellules non-immunitaires (cellules gliales et neurones). Les données précliniques démontrent le rôle prépondérant des cytokines dans la physiopathologie de la douleur neuropathique (Scholz and Woolf, 2007). Parmi les nombreuses familles de cytokines, on regroupe : (1) les cytokines pro-inflammatoires, dont le Tumor Necrosis Factor (TNF $\alpha$ ) et l'Interféron- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ), (2) les cytokines anti-inflammatoires, dont l'interleukine-10 (IL-10), et (3) les chimiokines comme le Monocyte Chemoattractant Protein (MCP-1) ou la fractalkine (CX3CL1) (Kiguchi et al, 2012) également pro-inflammatoires.

**Les cytokines :** des données ont montré une augmentation de l'expression des cytokines pro-inflammatoires IL-6 (Dubovy et al, 2010a; Brazda et al, 2013) et IL-1 $\beta$  dans les SGCs d'animaux neuropathiques modulant l'état d'excitabilité des neurones du DRG (Takeda et al, 2007). Dans une autre étude, les auteurs ont observé une augmentation de l'expression d'IL-6 dans les SGCs et de son récepteur sur les neurones du DRG (Dubovy et al, 2013).

**Les chimiokines :** Dans un modèle de neuropathie lié au HIV une augmentation de l'expression du récepteur CXCR4 dans les SGCs a pu être observée, et l'administration d'antagonistes de ce récepteur supprime l'hyper sensibilité mécanique (Bhangoo et al, 2007). D'autres données démontrent une surexpression concomitante du ligand SDF1 (Stromal Derived Factor 1) dans les SGCs et de son récepteur CXCR4 sur les neurones (Dubovy et al, 2010b) dans un modèle de

neuropathie d'origine traumatique. MCP-1 est une chimiochine possédant un effet chimio attractif sur les macrophages lors du processus inflammatoire (Kiguchi et al., 2012). Dans le DRG, MCP-1 est majoritairement exprimé par les neurones et les macrophages résidents (White et al., 2005; Jung et al., 2008), mais peu de données suggèrent pour l'instant rôle des SGCs. Néanmoins, une preuve indirecte a récemment été rapportée, à savoir que l'inhibition sélective de la voie NF- $\kappa$ B dans les SGCs diminue l'expression de MCP-1, phénomène coïncidant avec la disparition de l'allodynie mécanique (Fu et al., 2010).

## **2. Les cellules immunitaires**

La communication entre le système immunitaire et le système nerveux est bidirectionnelle. En effet, une lésion nerveuse entraîne la libération de neuro médiateurs activant le recrutement de cellules immunocompétentes (macrophages, lymphocytes). Ainsi, la libération de cytokines et de chimioamines par les cellules immunitaires permet une modulation de la transmission nociceptive en agissant dans le système nerveux périphérique et central (Scholz and Woolf, 2007).

### **a. Recrutement de cellules immunitaires dans les ganglions rachidiens**

En condition basale, les cellules immunitaires sont peu représentées, avec essentiellement la présence de macrophages résidents (Calvo et al., 2012). Dans le cas de douleurs neuropathiques, on observe une invasion massive de cellules immunocompétentes dans le DRG.

**Les neutrophiles.** On note une augmentation de la quantité de neutrophiles (Morin et al., 2007) au 14<sup>ème</sup> jour après l'induction de la neuropathie (Kim and Moalem-Taylor, 2011). Le nombre de neutrophiles est 5 à 10 fois plus élevé au site de la lésion que dans le DRG, et le recrutement tardif suggère un rôle dans le maintien de la douleur neuropathique (Kim and Moalem-Taylor, 2011).

**Les cellules dendritiques.** On observe une augmentation croissante de la quantité de cellules dendritiques entre le 3<sup>ème</sup> et 14<sup>ème</sup> jour post-chirurgie (Kim and Moalem-Taylor, 2011). Les cellules dendritiques sont des cellules présentatrices d'antigènes capables d'activer les lymphocytes T et de déclencher la mise en place d'une réponse immunitaire adaptative. Leur rôle dans la douleur neuropathique n'est pas connu mais une étude clinique a mis en évidence la présence de ces cellules dans

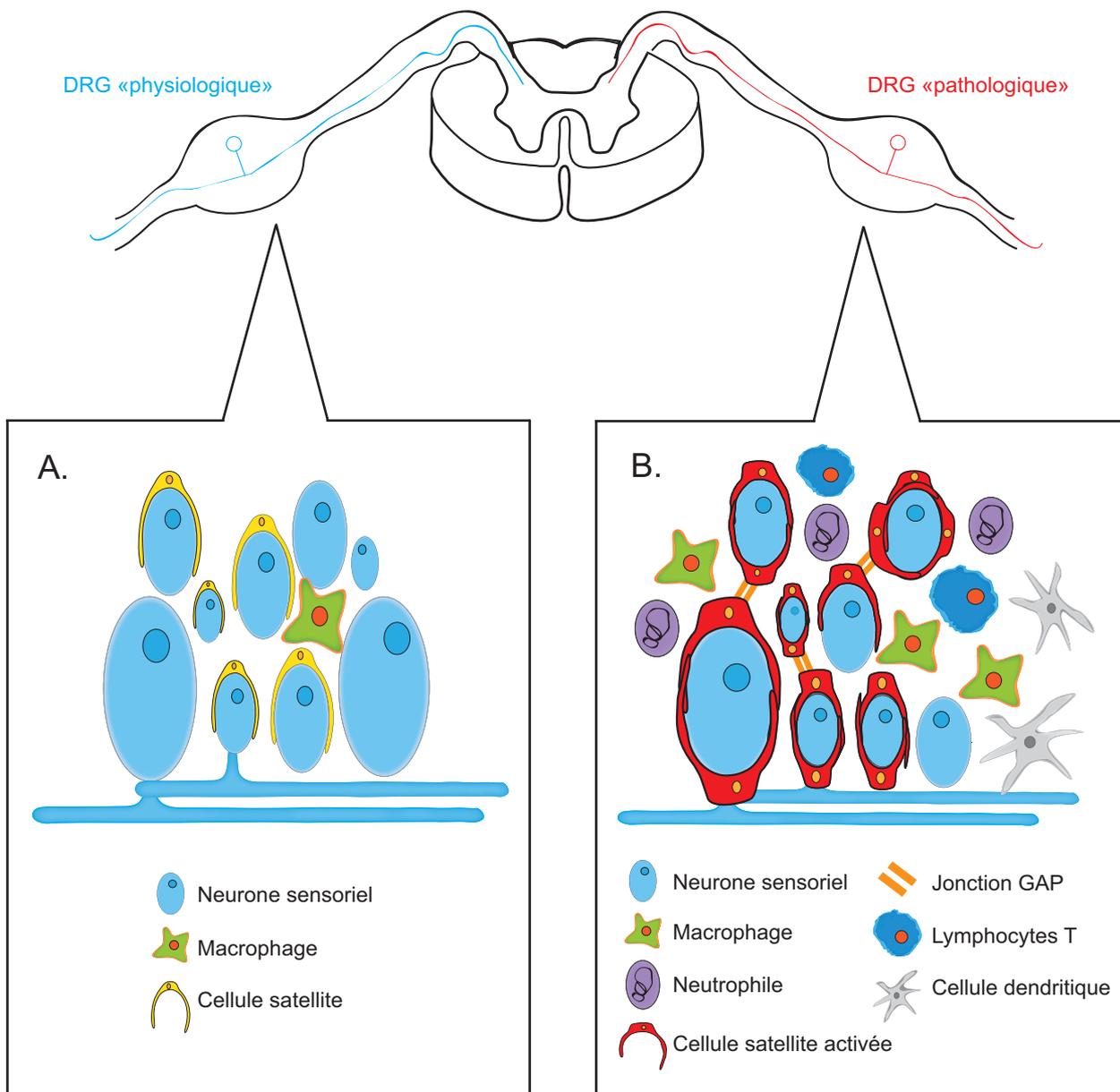
des biopsies de nerf sural de patients atteints du syndrome de Guillain-Barré (Press et al., 2005).

**Les lymphocytes T (L-T).** Le profil d'expression est similaire à celui observé pour les cellules dendritiques (Kim and Moalem-Taylor, 2011). Leur rôle semble dépendant de leur profil de production cytokinique. En effet, l'administration de L-T helper1, produisant majoritairement des cytokines pro-inflammatoires (IFN- $\gamma$ ), potentialise l'hypersensibilité mécanique liée à la compression du nerf sciatique. À l'inverse, l'administration de L-T helper2 produisant des cytokines anti-inflammatoires (IL-10) soulage l'allodynie neuropathique (Moalem et al., 2004). Enfin, des données montrent qu'une déficience globale en L-T chez le rat (Moalem et al., 2004) et chez la souris (Cao and DeLeo, 2008) se traduit par une baisse des comportements nocifs.

**Les macrophages.** Le recrutement massif de macrophages dans le DRG débute environ au 4<sup>ème</sup> jour après la lésion (Hu et al., 2007; Kim and Moalem-Taylor, 2011) et un pic de recrutement est observé une semaine après l'induction de la neuropathie (Kim and Moalem-Taylor, 2011). Une corrélation entre la diminution du recrutement des macrophages et l'intensité des comportements douloureux a été mise en évidence (Sommer and Schafers, 1998; Barclay et al., 2007), suggérant un rôle des macrophages dans le développement de la douleur neuropathique (**Figure I-3**).

#### b. Implications fonctionnelles : rôle des macrophages

Dans un modèle de ligature partielle du nerf sciatique, on observe une surexpression de la protéine MCP-1 dans les neurones du DRG seulement 4h après la lésion, et le pic d'activité est détecté à 48h (Tanaka et al., 2004). L'augmentation de la production locale de MCP-1 conduit d'une part à l'activation des macrophages résidents et d'autre part au recrutement de monocytes circulants (Scholz and Woolf, 2007). Parallèlement, d'autres travaux rapportent une augmentation de l'expression de CCR2 (C-C chemokine receptor type 2) sur les neurones ainsi que sur les macrophages (White et al., 2005). Des données suggèrent que l'activation du CCR2 neuronal augmente l'expression du canal Nav1.8 (Belkouch et al., 2011) et induit une sensibilisation du récepteur TRPV1 (Jung et al., 2008), pouvant contribuer à l'hyperexcitabilité neuronale. De plus les macrophages expriment une grande variété de récepteurs purinergiques indiquant que l'ATP est capable de moduler l'activité des cellules immunitaires (Scholz and Woolf, 2007). L'activation des P2X4



(adapté de Calvo et al., 2012)

**Figure I-3. Modifications physiopathologiques dans le ganglion rachidien.** (A) Populations cellulaires présentes dans le ganglion rachidien en condition physiologique. (B) Invasion de cellules immunocompétentes et activation/prolifération des cellules satellites gliales lors d'une lésion nerveuse périphérique. Les cellules immunitaires sont capables de libérer des médiateurs inflammatoires modulant l'excitabilité des neurones sensoriels primaires.

des macrophages entraîne une libération de prostaglandines responsables de l'apparition de comportements nocifensifs dans un modèle de douleur inflammatoire (Ulmann et al, 2010). De récentes données mettent en évidence une augmentation de l'expression de P2X4 sur les macrophages dans des modèles de douleur neuropathique (Nakai et al, 2010; Otsushi et al, 2010), ce qui pourrait contribuer à la synthèse de cytokines pro-inflammatoires, comme le TNF $\alpha$  (Otsushi et al, 2010).

## IV. Rôle du TNF $\alpha$ dans la physiopathologie de la douleur neuropathique

### A. Généralités

#### 1. Structure du TNF $\alpha$ (Tumor Necrosis Factor- $\alpha$ ) et de ses récepteurs

Le TNF $\alpha$  appartient à la famille des cytokines. Ce sont des glycoprotéines de faible poids moléculaire majoritairement sécrétées par les cellules immunocompétentes (lymphocytes T, macrophages et neutrophiles), mais aussi par les cellules du système nerveux. Le TNF $\alpha$  s'exprime sous deux formes : une protéine transmembranaire de 26 kDa (mTNF $\alpha$ ) assemblée en homotrimère et une protéine soluble de 17 kDa (sTNF $\alpha$ ) résultant du clivage de la forme membranaire par l'enzyme TACE (TNF- $\alpha$  converting enzyme) (Black et al., 1997). Ces deux formes sont physiologiquement actives (Horiuchi et al., 2010) et présentent des affinités différentes pour les récepteurs du TNF $\alpha$  (Grell et al., 1995). Deux récepteurs membranaires distincts ont été identifiés. Le récepteur de type I (TNFR1/p55) exprimé de manière ubiquitaire et constitutive, initiant la plupart des fonctions biologiques du TNF $\alpha$  et notamment son activité cytotoxique (Locksley et al., 2001). Le récepteur de type II (TNFR2/p75) est faiblement exprimé en condition normale et préférentiellement associé à certains types cellulaires (macrophages, lymphocytes T, monocytes) (Aggarwal, 2003). Le sTNF $\alpha$  est capable d'activer à la fois TNFR1 et TNFR2 bien qu'il possède une affinité plus forte pour le premier, alors que TNFR2 est sélectivement activé par le mTNF $\alpha$  (Grell et al., 1995).

#### 2. Signalisation intracellulaire

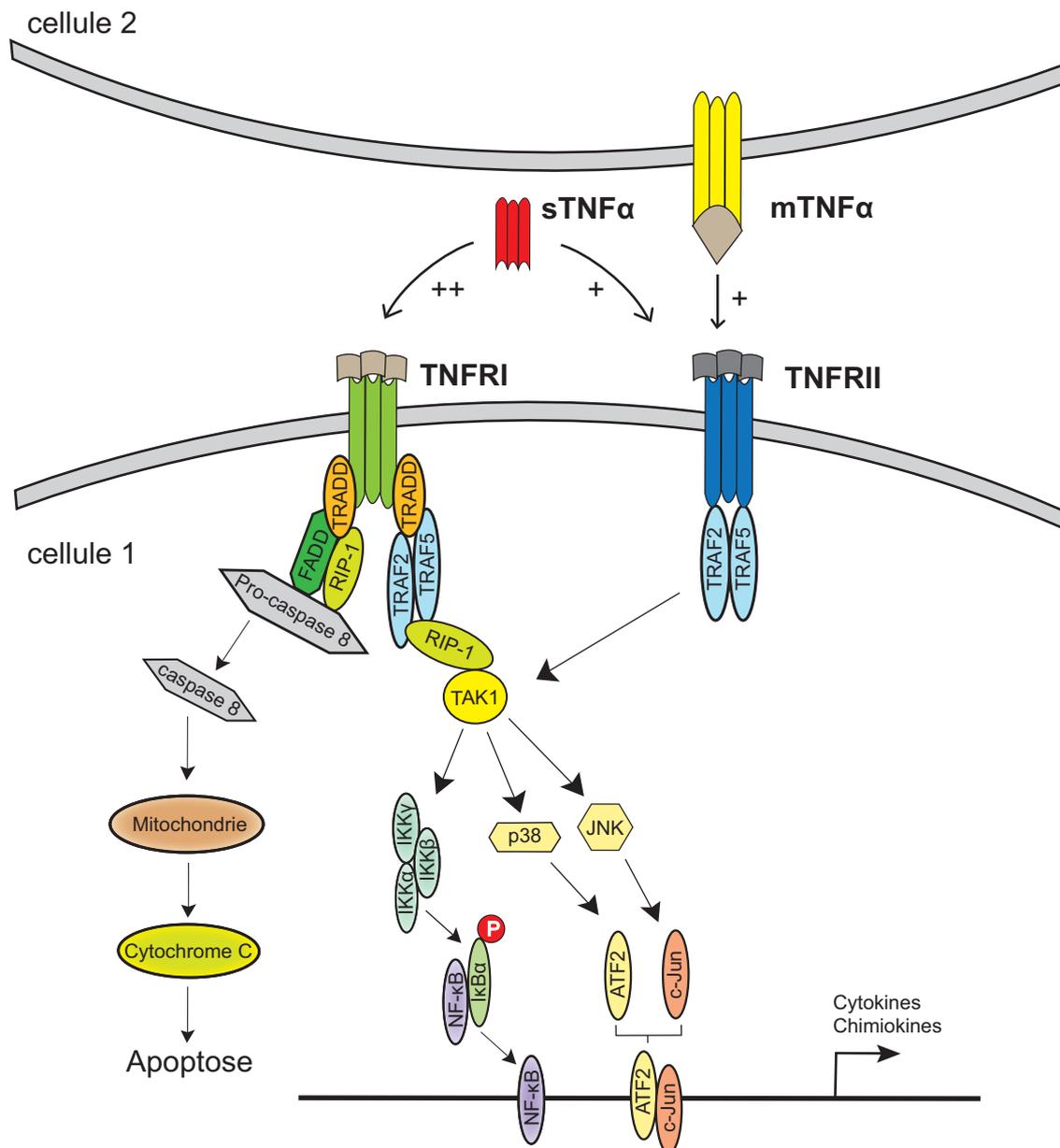
La liaison du TNF $\alpha$  sur le TNFR1 induit le recrutement d'une protéine adaptatrice, TRADD (TNF-receptor associated death domain) par une interaction directe avec le « death domain » situé sur la partie C-terminale intracellulaire du récepteur (Tartaglia et al., 1993). La protéine TRADD déclenche la synthèse de facteurs pro-apoptiques et l'activation de voies de signalisation intracellulaire de type JNK (c-jun N-Terminal Kinases), P38 MAPK (Mitogen-Activated Protein Kinases) et NF- $\kappa$ B (Nuclear Factor- $\kappa$ B), jouant un rôle dans la prolifération cellulaire et la production de cytokines pro-inflammatoires (McCoy and Tansley, 2008). A l'inverse, le TNFR2 ne contient pas de « death domain » dans sa partie C-terminale. L'activation du TNFR2 par le mTNF $\alpha$  conduit au recrutement des protéines adaptatrices TRAF1 et TRAF2 (Caballero

and Lazo, 2012). Celles-ci sont capables d'activer de facteurs de transcription du type NF- $\kappa$ B impliqués dans la synthèse de facteurs anti-apoptotiques (Rothe et al., 1994; Rothe et al., 1995). Il semble exister une dichotomie entre les processus liés à l'activation du TNFR1 et du TNFR2. Toutefois, des données suggèrent d'une part la possibilité de recrutement de la protéine TRAF2 suite à l'activation du TNFR1 (Hsu et al., 1996), et d'autre part l'existence d'une signalisation croisée entre les 2 types de récepteurs (Rodriguez et al., 2011). De plus, il faut noter que l'interaction juxtacrine du mTNF $\alpha$  et du TNFR2 déclenche une signalisation inverse dans les cellules exprimant le mTNF $\alpha$  (Horiuchi et al., 2010) qui pourrait en partie mettre en jeu la voie des MAPK (Kirchner et al., 2004) (**Figure 1-4**).

## **B. Rôle du TNF $\alpha$ dans le système nerveux périphérique et central**

### **1. Généralités**

Depuis le début du XXI<sup>ème</sup> siècle de nombreux groupes s'accordent à dire que les neurones ne sont pas les seuls acteurs conduisant au développement et au maintien de la douleur neuropathique. Les cellules gliales et les cellules immunitaires jouent un rôle primordial dans les modifications physiopathologiques associées à une lésion nerveuse périphérique (Scholz and Woolf, 2007; Calvo et al., 2012). Au site de lésion, l'activation des macrophages résidents stimule le recrutement de cellules immunitaires. Cette cascade d'événements moléculaires sous-tend le développement de « réactions inflammatoires » locales dans le DRG mettant en jeu à la fois des cellules du système immunitaire (macrophages, lymphocytes) ainsi que les SGCs. Ces signaux qui se propagent de manière rétrograde conduisent à l'activation de réseaux neuronaux et gliaux dans la corne dorsale de la moelle épinière contribuant au développement et au maintien des comportements douloureux (Vallejo et al., 2010). En étudiant le cas particulier d'une cytokine, des auteurs ont observé la mise en place d'un transport antérograde du TNF $\alpha$  endogène depuis les DRG vers le site de lésion (Shubayev and Myers, 2001; Schafers et al., 2002), et rétrograde en direction de la corne dorsale de la moelle épinière (Shubayev and Myers, 2002). L'existence d'un mécanisme de transport du TNF $\alpha$  endogène lors d'une lésion nerveuse périphérique suggère le recrutement successif de structures du système nerveux périphérique et central.



**Figure I-4. Signalisation intracellulaire du TNFR1 et du TNFR2.** Le TNFR1 est composé d'une protéine TRADD sur son extrémité C-terminale. Cette protéine contient un domaine de mort cellulaire "Death Domain" et permet le recrutement de protéines RIP1 et FADD impliquées dans l'activation de la pro-caspase 8 régulant le processus de mort cellulaire par apoptose. Le TNFR2 ne possède pas de domaine de mort cellulaire et sa stimulation conduit au recrutement de protéines TRAF1 et TRAF2 responsables de l'activation de la voie NF- $\kappa$ B et des MAPK. L'activation d'un complexe formé de 3 I $\kappa$ B kinases (IKK) entraîne la phosphorylation de I $\kappa$ B $\alpha$  (cercle rouge) et sa dégradation. L'activation de ces voies de signalisation cellulaire se traduit par la translocation du facteur de transcription NF- $\kappa$ B dans le noyau et la synthèse de cytokines pro-inflammatoires. Liste d'abréviation: FADD, fas-associated protein with death domain; IKK $\alpha$ , $\beta$ , $\gamma$ ; I $\kappa$ B kinase; JNK, c-Jun N-terminal kinase; mTNF $\alpha$ , membrane-bound TNF  $\alpha$ ; NF- $\kappa$ B, nuclear factor-kappa B; RIP, receptor interacting protein; sTNF $\alpha$ , soluble TNF $\alpha$ ; TAK1, TGF  $\beta$ -associated kinase 1; TNFR, tumor necrosis factor receptor; TRADD, TNF receptor-associated death domain protein; TRAF, TNF receptor associated factor.

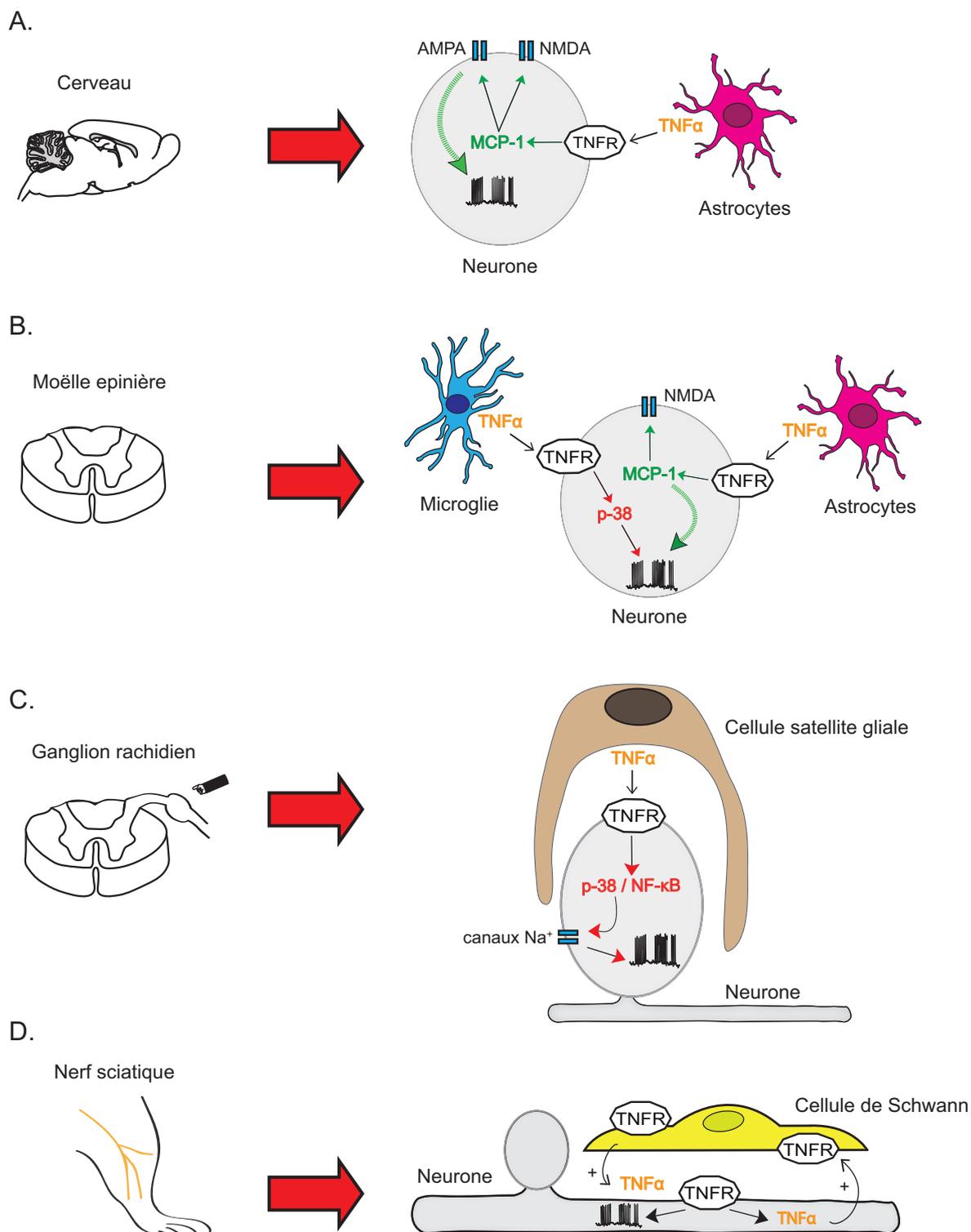
## 2. Le TNF $\alpha$ dans le système nerveux périphérique

### a. Site de lésion

Dans un modèle de lésion du nerf sciatique une augmentation de l'expression de l'ARNm du TNF $\alpha$  et de la protéine a été observée au site de lésion (George et al., 1999; Okamoto et al., 2001). L'augmentation d'expression de l'ARNm (Sacerdote et al., 2008) et de la protéine (George et al., 1999) est détectée environ 12h après l'induction de la neuropathie et peut se maintenir pendant environ deux semaines (George et al., 1999). Des données histologiques montrent que le TNF $\alpha$  est préférentiellement exprimé par les cellules de Schwann à proximité du site de lésion (Hayashi et al., 2008; Kato et al., 2009). Notons également que la modification d'expression du TNF $\alpha$  s'accompagne d'une variation d'expression de ses récepteurs. En effet, on observe une surexpression du TNFR1 et du TNFR2 dans les premiers jours suivant la chirurgie (George et al., 2005) et l'administration locale d'antagonistes de ces récepteurs atténue l'allodynie neuropathique (Sommer et al., 1998)(**Figure I-5**).

### b. Ganglion rachidien

Dans des modèles de douleur neuropathique d'origine traumatique, des données montrent une augmentation de l'expression de l'ARNm du TNF $\alpha$  dans les DRG quelques jours après la chirurgie (Sacerdote et al., 2008). Les niveaux élevés d'expression peuvent se maintenir jusqu'à 5 semaines post-chirurgie (Bohren et al., 2013). Au niveau histologique, de nombreuses études s'accordent à dire que le TNF $\alpha$  est exprimé dans les cellules satellites gliales alors que son récepteur semble majoritairement exprimé sur les neurones du DRG (Ohtori et al., 2004; Bohren et al., 2013). Tout comme au site de lésion, des études ont démontré une surexpression du TNFR1 et du TNFR2 dans des délais très courts après l'induction de la neuropathie (Schafers et al., 2003a). Les données présentées indiquent que les modifications précoces d'expression du TNF $\alpha$  au site de lésion et dans les DRG pourraient contribuer au déclenchement d'événements inflammatoires et à l'apparition des comportements nocifs (**Figure I-5**).



**Figure I-5. Action du TNF $\alpha$  dans le système nerveux périphérique et central.** (A) L'activation des récepteurs au TNF $\alpha$  (TNFR) induit la production de MCP-1 qui module l'activité des récepteurs AMPA et NMDA au glutamate. (B) Au niveau spinal les cellules microgliales et astrocytaires libèrent du TNF $\alpha$  qui active la voie p38 des MAPK et la synthèse MCP-1 modulant l'excitabilité neuronale. (C) Dans le DRG, la libération de TNF $\alpha$  active son récepteur situé sur les neurones sensoriels primaires. L'activation de la voie p38 peut induire l'ouverture de canaux sodium exprimés à la membrane. (D) Au site de lésion les cellules de Schwann libèrent du TNF $\alpha$  dans les premiers jours suivant la neuropathie. Liste d'abréviations : AMPA,  $\alpha$ -amino-3-hydroxy-5-méthylisoxazol-4-propionate; MCP-1, monocyte chemoattractant protein; NMDA, N-méthyl-D-aspartate; TNF $\alpha$ , tumor necrosis factor alpha; TNFR I et TNFR II, tumor necrosis factor receptor 1 et 2.

## c. Rôle fonctionnel

### i. TNF $\alpha$ , allodynie et hyperalgésie

Au niveau comportemental, une injection intraneurale de TNF $\alpha$  induit des comportements d'hyperalgésie et d'allodynie similaires à ceux observés lors d'une lésion nerveuse périphérique (Wagner and Myers, 1996; Zelenka et al., 2005). Suite à l'induction d'une neuropathie, l'administration locale d'anticorps permettant de neutraliser l'action du TNF $\alpha$  bloque le développement de l'allodynie mécanique et de l'hyperalgésie thermique (Schafers et al., 2001; Kato et al., 2009).

### ii. Dégénérescence wallérienne et TNF $\alpha$

Le développement de douleurs neuropathiques suite à une lésion nerveuse périphérique est intimement lié au processus de dégénérescence wallérienne. Ce phénomène se caractérise par la dégénérescence de l'axone et de sa gaine de myéline en aval de la lésion, ainsi qu'une prolifération secondaire des cellules de Schwann (Myers et al., 1993; Sommer et al., 1993). Parmi les acteurs potentiels, le TNF $\alpha$  semble jouer un rôle prépondérant dans la mise en place de ce phénomène en induisant notamment le recrutement de macrophages au site de lésion (Liefner et al., 2000). En utilisant une souche de souris mutantes qui se caractérise par un décalage d'apparition de la dégénérescence axonale (Perry et al., 1990), les auteurs ont démontré que la diminution de l'hyperalgésie est associée à une inhibition locale de la synthèse de TNF $\alpha$  (Myers et al., 1996; Sommer and Schafers, 1998). Par conséquent, la surexpression du TNF $\alpha$  par les cellules de Schwann semble être un élément clé dans les mécanismes moléculaires liés à la dégénérescence wallérienne ainsi que dans l'apparition des comportements nociceptifs qui y sont associés (Wagner and Myers, 1996; Myers and Shubayev, 2011).

### iii. Apoptose et TNF $\alpha$

La surexpression du TNF $\alpha$  dans les cellules de Schwann dans les heures qui suivent l'induction de la neuropathie souligne son rôle primordial dans l'apparition des comportements d'hyperalgésie (Campana et al., 2006). Lors d'une lésion nerveuse périphérique, le clivage du mTNF $\alpha$  (26 kDa) en sTNF $\alpha$  (17 kDa) par la MMP-2 (Shubayev and Myers, 2000) permet au sTNF $\alpha$  d'activer préférentiellement le TNFR1 (Grell et al., 1995) qui semble également surexprimé au site de lésion (George et al.,

2005). L'activation du TNFR1 par le TNF $\alpha$  déclenche des phénomènes de mort neuronale par apoptose (Thorburn, 2004) en stimulant la voie des caspases (Micheau and Tschopp, 2003). Dans un modèle de ligature des nerfs spinaux, l'augmentation de l'expression du TNF $\alpha$  coïncide avec la surexpression de la caspase 3 (marqueur apoptotique) dans les DRG (Kim et al., 2011b). Dans un modèle de neuropathie d'origine cancéreuse, l'administration d'inhibiteurs de caspases atténue l'hyperalgésie thermique (Joseph and Levine, 2004). Enfin, une étude démontre que le degré d'apoptose lié à la production locale de TNF $\alpha$ , est directement corrélé à la sévérité des symptômes observés (Sekiguchi et al., 2009).

#### iv. Activation de la voie des MAPK (Mitogen-Associated Protein Kinases)

L'action du TNF $\alpha$  sur son récepteur induit l'activation de la voie p-38 mitogen-activated protein kinase (p38 MAPK) et c-jun N-Terminal Kinase (JNK) dans les neurones du DRG (Pollock et al., 2002). Chez des animaux neuropathiques, une augmentation transitoire de la phosphorylation de p38 a été observée dans les neurones des DRG et celle-ci est bloquée par l'administration d'un agent anti-TNF $\alpha$  (Schafers et al., 2003b). De plus, l'injection locale de produits anti-TNF $\alpha$  et d'inhibiteurs de la voie p38 bloque le développement de l'allodynie neuropathique (Schafers et al., 2003b; Svensson et al., 2005). Une étude ex vivo a démontré que l'application de TNF $\alpha$  sur des cultures de DRG module l'activité des canaux calcium et sodium voltage-dépendants (Czeschik et al., 2008), et cet effet semble dépendant de l'activation de la voie p38 des MAPK (Jin and Gereau, 2006). Ces données suggèrent l'existence d'un lien direct entre l'activation du TNFR et la voie p38 des MAPK.

### 3. Le TNF $\alpha$ dans le système nerveux central

Les cellules gliales représentent environ 70% des cellules du système nerveux, et peuvent être séparées en deux catégories : les cellules macrogliales (astrocytes, oligodendrocytes) et les cellules microgliales qui représentent 5 à 12% des cellules du système nerveux (Watkins et al., 2007). Bien plus que des cellules de soutien, celles-ci jouent un rôle dans le maintien de l'homéostasie, la synthèse, la libération et la recapture de neurotransmetteurs (Watkins et al., 2007). Les recherches menées lors de la dernière décennie ont permis de mettre en évidence l'existence d'une

communication bidirectionnelle entre les neurones et les cellules gliales, suggérant un rôle actif dans la transmission synaptique (Fields and Stevens-Graham, 2002; Perea and Araque, 2006). De manière intéressante, les astrocytes et les cellules microgliales sont sujettes à une plasticité morphologique et fonctionnelle. Dans certains cas, cela peut conduire à une libération de cytokines (De Leo et al., 2004) impliquées dans les phénomènes de sensibilisation centrale observée en condition de douleur neuropathique (Mika et al., 2013).

#### a. Expression et rôle du TNF $\alpha$ au niveau spinal

##### i. Rôle des astrocytes

Au début des années 90, des chercheurs mettent en évidence une hypertrophie des astrocytes suite à une lésion nerveuse périphérique se traduisant par une augmentation de l'immunoréactivité GFAP (Glial Fibrillary Acidic Protein), marqueur de référence des astrocytes (Garrison et al., 1991). Notons que les astrocytes sont faiblement activés lors de la première semaine post-chirurgie, puis une augmentation exponentielle de cette activité est observée et peut se maintenir jusqu'à 3 mois après l'induction de la neuropathie (Coyle, 1998; Tanga et al., 2004). Le rôle du TNF $\alpha$  dans la douleur neuropathique a d'abord été étudié en utilisant des animaux transgéniques qui expriment le TNF $\alpha$  exclusivement dans les astrocytes. Les auteurs ont observé une augmentation de l'intensité des comportements nocifs suite à l'induction d'une neuropathie chez les animaux GFAP-TNF $\alpha$  par comparaison aux animaux contrôles (De Leo et al., 2000). Une surexpression du TNF $\alpha$  est observée en condition neuropathique et celle-ci semble majoritairement associée aux astrocytes (Ohtori et al., 2004; Zheng et al., 2011; Ishikawa et al., 2013). Les observations cliniques semblent aller dans le même sens. En effet, une surexpression du TNF $\alpha$  et de la GFAP a été détectée en post-mortem dans la moelle épinière d'un patient atteint de douleur neuropathique (Shi et al., 2012). Le rôle du TNF $\alpha$  libéré par les astrocytes est encore mal connu mais des données suggèrent une implication de la chimiochine MCP-1. Effectivement, une récente étude suppose que le TNF $\alpha$  libéré par les astrocytes induirait via le TNFR1 une surexpression de MCP-1 dans la corne dorsale de la moelle épinière. Ce dernier aurait une action directe sur l'état d'excitabilité des neurones résidents de la moelle épinière, en modulant l'activité des récepteurs du glutamate (NMDA et AMPA) (Gao et al., 2009).

## ii. Rôle de la microglie

Les cellules microgliales sont définies comme les cellules immunitaires résidentes du système nerveux central, au même titre que les macrophages dans le système nerveux périphérique. En réponse à une lésion nerveuse, les cellules microgliales sont les premières cellules à être recrutées (Tanga et al., 2004) et restent actives pendant plusieurs semaines. De plus, cet état d'activation se traduit par la synthèse et la libération de cytokines pro-inflammatoires (Ren and Dubner, 2008). En condition de douleur neuropathique, une activation microgliale spinale a été observée (Sweitzer et al., 2001; Ishikawa et al., 2013) et dans certains cas, celle-ci est associée à une surexpression du TNF $\alpha$  (Hao et al., 2007; Zheng et al., 2011). En outre, l'administration intrathécale de minocycline (inhibiteur microglial) bloque l'allodynie neuropathique et cet effet est corrélé à une baisse de l'expression du TNF $\alpha$  (Ledebouer et al., 2005). L'activation de la voie p38 des MAPK semble être un élément prépondérant dans le développement de la douleur neuropathique (Leung and Cahill, 2010). Une augmentation d'expression de la forme phosphorylée de p38 et du TNF $\alpha$  est détectée dans la moelle épinière d'animaux neuropathiques 2 semaines après la chirurgie (Xu et al., 2007). De plus, l'administration d'antagonistes du TNFR1 inhibe l'activité microgliale et soulage l'allodynie neuropathique (Xu et al., 2007), mécanisme qui semble être dépendant de l'activation de la voie p38 des MAPK (Hao et al., 2007).

## iii. TNF $\alpha$ et activité synaptique

Dans un modèle de ligature du nerf sciatique, une étude a mis en évidence que l'application exogène de TNF $\alpha$  induit une potentialisation à long terme (LTP) des fibres C dans la corne dorsale de la moelle épinière, et cet effet est bloqué par l'administration de PDTC (Pyrrolidine dithiocarbamate) connu pour être un inhibiteur de la voie NF- $\kappa$ B (Liu et al., 2007b). Par ailleurs, le TNF $\alpha$  semble capable d'agir localement sur les neurones de la corne dorsale de la moelle épinière. En effet, de part son effet sur l'activité électrique des interneurons GABAergique (Zhang and Dougherty, 2013), le TNF $\alpha$  peut participer à la mise en place d'une « désinhibition spinale » aboutissant à une hyperexcitabilité neuronale (Wolf and Mannion, 1999).

### b. Expression et rôle du TNF $\alpha$ au niveau supraspinal

Dans un modèle de douleur neuropathique périphérique par constriction du nerf sciatique, une augmentation de l'expression du TNF $\alpha$  a été observée dans

l'hippocampe (Ignatowski et al., 1999; Covey et al., 2000), le locus cœruleus (Covey et al., 2000; Covey et al., 2002) et le noyau rouge (Li et al., 2008). Le blocage pharmacologique de l'action du TNF $\alpha$  dans l'hippocampe et le noyau rouge semble induire un effet analgésique (Ignatowski et al., 1999; Li et al., 2008). Dans un modèle de neuropathie trigéminale, les auteurs ont démontré une surexpression du TNF $\alpha$  dans les astrocytes du bulbe rostro-ventral (RVM), augmentation bloquée par l'injection locale d'un inhibiteur de l'activité gliale. De plus, l'administration intra-RVM de TNF $\alpha$  induit un comportement d'allodynie mécanique lié à l'activation du TNFRI et une modulation de la transmission glutamérique (Wei et al., 2008). Par conséquent, il semblerait que la libération de TNF $\alpha$  par les astrocytes module l'activité des récepteurs NMDA supraspiniaux, participant ainsi à l'établissement et au maintien de la douleur neuropathique (**Figure I-5**).

### **C. TNF $\alpha$ et traitement de la douleur neuropathique**

#### **1. Effet anti-TNF $\alpha$ d'un traitement par les antidépresseurs**

Les antidépresseurs constituent la première ligne de traitement de la douleur neuropathique (Attal et al., 2006). Un effet anti-TNF $\alpha$  d'un traitement par un ATC (amitriptyline) a déjà été mis en évidence dans un modèle de douleur inflammatoire (Sadeghi et al., 2011). Dans un modèle de douleur neuropathique, un traitement prolongé pendant 2 semaines par un antidépresseur tétracyclique, la mirtazapine, inhibe la synthèse de TNF $\alpha$ , et cet effet semble lié à une inhibition de la voie NF- $\kappa$ B (Zhu et al., 2008).

#### **2. Effet anti-TNF $\alpha$ d'un traitement par des $\beta_2$ -agonistes**

En clinique, les  $\beta_2$ -agonistes sont utilisés pour le traitement de pathologies inflammatoires comme l'asthme et les BCPO (Broncho-pneumopathie chronique obstructive), et indiqués chez la femme enceinte lorsque le risque d'accouchement prématuré est avéré.

Lors de la stimulation par le LPS (Lipopolysaccharide), agent inflammatoire, d'une culture de monocytes, on observe une augmentation de la synthèse de cytokines pro-inflammatoires. Un co-traitement par des  $\beta_2$ -agonistes (salmétérol, formotérol) bloque l'augmentation du TNF $\alpha$  (Donnelly et al., 2010; Tanaka et al., 2010) et cet effet semble dépendant de la concentration intracellulaire d'AMPc (Elenkov et al.,

2000). De plus, le traitement d'une culture de monocytes par un inhibiteur de phosphodiésterase de type 4 (PDE4) augmente les taux d'AMPc et diminue aussi la synthèse de TNF $\alpha$  induite par le LPS (Link et al, 2008). L'activité anti-TNF $\alpha$  d'un  $\beta_2$ -agoniste, le clenbutérol, a également été observée sur des cultures d'astrocytes, et son effet est potentialisé par un inhibiteur de PDE4 (Christiansen et al, 2011).

### **3. Efficacité des traitements anti-TNF $\alpha$**

#### **a. Traitement par l'éta nercept (Enbre®)**

Au niveau préclinique, les premières études réalisées à la fin des années 90, ont pour la plupart utilisé des anticorps dirigés contre le TNF $\alpha$  pour neutraliser son activité. Ces données ont tout d'abord démontré que l'administration périopératoire d'agent anti-TNF $\alpha$  soulage l'allodynie neuropathique (Sommer et al, 1998; Lindenlaub et al, 2000). L'éta nercept, protéine de fusion associant le récepteur p75 et un fragment constant de l'immunoglobuline, est une molécule présentant une AMM dans le traitement de la polyarthrite rhumatoïde. Au niveau clinique, des études contrôlées randomisées en double-aveugle contre placebo ont démontré l'effet thérapeutique d'une administration systémique (Genevay et al, 2004) ou locale (Cohen et al, 2009) d'éta nercept chez des patients atteints de sciatalgies.

#### **b. Traitement par l'infliximab (Remicade®)**

L'infliximab est indiqué dans le traitement de la polyarthrite rhumatoïde et de la maladie de Crohn. C'est un anticorps monoclonal chimérique (humain-murin) capable de se fixer à la forme soluble et membranaire du TNF $\alpha$  et ainsi d'inhiber son activité. L'administration d'infliximab supprime l'allodynie mécanique dans un modèle de neuropathie diabétique et cet effet est associé à une diminution de l'expression du TNF $\alpha$  dans les DRG (Yamakawa et al, 2011). Une étude pilote menée sur 10 patients atteints de sciatalgies démontre qu'une administration systémique d'infliximab soulage significativement les patients (Karpinen et al, 2003) et l'effet reste présent jusqu'à 1 an après le début du traitement (Korhonen et al, 2004).

### c. Les inhibiteurs gliaux : rôle des phosphodiésterases ?

La propentofylline est une méthylxanthine connue pour avoir un effet inhibiteur sur les cellules gliales et modulateur de l'activité des phosphodiésterases. Son effet anti-TNF $\alpha$  a tout d'abord été mis en évidence *in vitro* sur des cultures de cellules gliales (Si et al., 1998) puis *in vivo* dans plusieurs modèles de douleurs neuropathiques (Sweitzer et al., 2001). L'AV411, connu sous le nom d'ibudilast, est un inhibiteur non-sélectif de phosphodiésterases développé à l'origine pour le traitement de pathologies respiratoires. Les données précliniques démontrent que l'ibudilast est capable de diminuer l'activité gliale et la synthèse de cytokines pro-inflammatoires sous-tendant l'apparition de l'allodynie mécanique dans un modèle de douleur neuropathique (Ledeboer et al., 2006).

## V. Rôle des phosphodiésterases dans le traitement de la douleur

### A. Nomenclature, structure et distribution des phosphodiésterases

La signalisation intracellulaire liée aux nucléotides cycliques fait référence à l'activation et la synthèse d'adénosine monophosphate cyclique (AMPc) et de guanosine monophosphate cyclique (GMPc). Ces molécules jouent le rôle de messagers intracellulaires et activent un nombre important d'effecteurs secondaires responsables de la transduction de l'information. Parmi ces effecteurs on retrouve les protéines kinases A (PKA) et G (PKG) directement activées par l'AMPc et le GMPc, les canaux ioniques activés par les nucléotides cycliques (cyclic-nucléotide-gated ion channel-CNG), les protéines d'échange activées par l'AMPc (EPAC1 et EPAC2) et enfin des enzymes de la famille des phosphodiésterases (PDE) contenant un site de liaison des nucléotides cycliques.

#### 1. Nomenclature

En 1958, un groupe de chercheurs met en évidence une activité enzymatique responsable de l'hydrolyse de la liaison phosphodiester 3'5' de l'AMPc formant le 5'AMP et traduisant l'activité des phosphodiésterases (Rall and Sutherland, 1958). La famille des phosphodiésterases (PDE) de nucléotides cycliques comporte 11 membres (PDE1-11). Ils se distinguent par leurs fonctions cellulaires, leurs structures primaires, leur affinité pour l'AMPc ou le GMPc ainsi que par leurs propriétés catalytiques (Conti and Beavo, 2007). La majorité des familles de PDE peuvent contenir plusieurs isoformes codées par des gènes différents, générant ainsi plus de 100 isoenzymes par des mécanismes d'épissages alternatifs. La diversité des PDE a incité la mise en place d'une nomenclature unique pouvant être utilisée par l'ensemble de la communauté scientifique. Ainsi, si nous prenons l'exemple de la PDE4B2, on la définira comme appartenant à la famille des PDE de type 4, codée par le gène **B** et provenant du variant d'épissage numéro **2** (Lugnier, 2006). Certaines PDE hydrolysent sélectivement l'AMPc (PDE4, PDE7 et PDE8) ou le GMPc (PDE5, PDE6 et PDE9) et d'autres peuvent avoir une affinité pour les deux (PDE1, PDE2, PDE3, PDE10 et PDE11) (Francis et al., 2011).

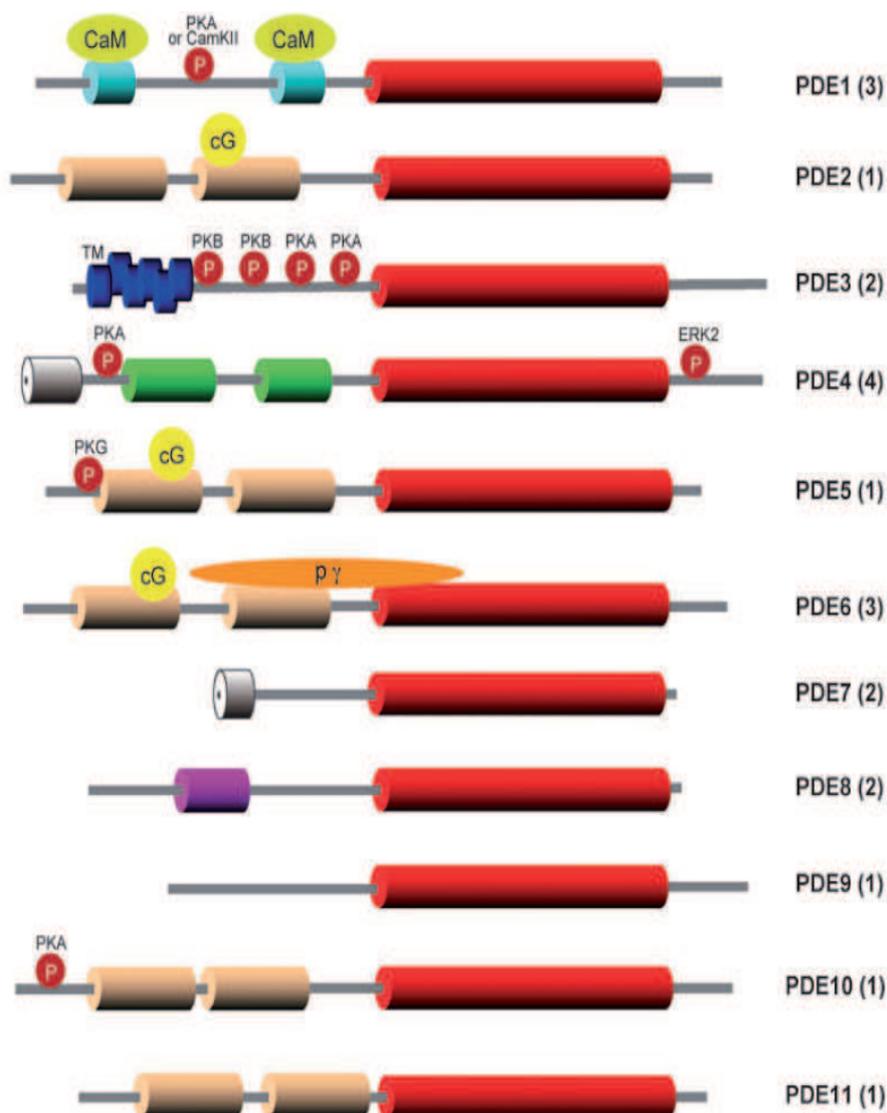
## 2. Structure et distribution des phosphodiésterases

### a. Structure des phosphodiésterases

Les différentes familles de PDE présentent une base structurale commune contenant un domaine catalytique sur sa partie C-terminale et un domaine régulateur du côté N-terminal (Lugnier, 2006). Le domaine catalytique est hautement conservé et les homologies de séquence en acides aminés varient de 25 à 51% entre les différentes familles de PDE (Francis et al., 2011). Ce domaine représente le cœur de la protéine. Il contient une séquence consensus qui permet la liaison des cofacteurs ( $Zn^{2+}$  et  $Mg^{2+}$ ) régulant les propriétés cinétiques de l'enzyme ainsi que la sensibilité aux différents inhibiteurs (Keravissand Lugnier, 2012). La région N-terminale est impliquée dans la régulation du domaine catalytique mais également dans la localisation subcellulaire des différentes PDE (Houslay, 2010). Les domaines GAF régulent la liaison allostérique du GMPc pour les PDE2, PDE5 et PDE6 et de l'AMPc pour la PDE10. Ce domaine joue également un rôle dans les changements de conformation de l'enzyme, rôle assuré par les domaines UCR (Upstream Conserved Region) pour les PDE4. Enfin, on y trouve des sites de phosphorylation par la PKA ou les MAPK, ainsi qu'un site de liaison du complexe calcium-calmoduline kinase pour la PDE1 (**Figure I-6**).

### b. Distribution des phosphodiésterases

D'une manière générale, les PDE se distribuent largement dans le système nerveux central et périphérique (Lakis et al., 2010). Leur différence structurale conditionne une localisation subcellulaire spécifique à chaque famille de PDE. En effet, des études menées sur le système cardio-vasculaire démontrent que les PDE4 sont préférentiellement associées au sarcolemme (Okruhlicova et al., 1996), les PDE3 au réticulum sarcoplasmique (Lugnier et al., 1993) et les PDE2 à l'appareil de Golgi (Geoffroy et al., 1999). Bien qu'elles soient distribuées de manière ubiquitaire notons que certains types cellulaires peuvent exprimer une seule famille de PDE. Cela concerne notamment les photorécepteurs où la PDE6 est exclusivement exprimée dans les cônes et les bâtonnets de la rétine, jouant un rôle primordial dans l'hydrolyse du GMPc et la phototransduction (Keravissand Lugnier, 2012).



(d'après Conti et al., 2007)

**Figure I-6. Structure des 11 familles de phosphodiésterases (PDE).** La famille de PDE est indiquée à droite de chaque structure et le chiffre entre parenthèses correspond au nombre de gènes composant chaque famille. Le domaine catalytique (en rouge) est localisé sur la partie C-terminale des PDE. Ce domaine est hautement conservé entre les différentes familles de PDE. Les protéines de liaison sont illustrées en jaune et les sites de phosphorylation sont marqués d'un cercle rouge. Liste d'abréviations: CamKII, Calcium/calmodulin-dependent protein kinase II; CaM, Calmodulin; cG, cGMP; ERK2, Extracellular signal-regulated kinase 2; GAF, cGMP-activated PDEs; PAS, Period, aryl-hydrocarbon receptor nuclear translocator; py, PDE  $\gamma$  subunit; PKA, Protein kinase A; PKB, Protein kinase B; TM, Transmembrane domain of PDE3; UCR, Upstream conserved region.

;

## **B. Rôle des PDE dans le traitement de la douleur.**

### **1. Inhibiteurs non-sélectifs de PDE et traitement de la douleur**

#### **a. Efficacité de l'AV411 (Ibuprofène)**

L'AV411, connu sous le nom d'ibuprofène, est une molécule utilisée en Asie pour le traitement de l'asthme, du fait de ses propriétés anti-inflammatoires et vasorelaxantes. Cette molécule est considérée comme un inhibiteur non sélectif de PDE, bien que ses propriétés pharmacologiques suggèrent une forte affinité pour PDE3 et PDE4 (Suzumura et al., 1999; Gibson et al., 2006). L'efficacité d'un traitement prolongé par l'ibuprofène a été démontrée dans 3 modèles différents de douleur neuropathique d'origine traumatique ou cancéreuse (Ledebouer et al., 2006). Les données *in vitro* suggèrent que cet effet est lié à une inhibition de la synthèse du TNF $\alpha$  et de MCP-1 par les cellules microgliales (Ledebouer et al., 2006). Une étude menée chez des volontaires sains démontre qu'un traitement à l'ibuprofène d'une durée de 14 jours est bien toléré chez les patients et les effets indésirables semblent peu fréquents (Rolan et al., 2008). Ces résultats encourageants doivent maintenant être confirmés par l'évaluation clinique de l'ibuprofène chez des patients atteints de douleur neuropathique.

#### **b. Efficacité des méthylxanthines**

La propentofylline (PPF) et la pentoxifylline (PIX) appartiennent à la famille des méthylxanthines connues pour leurs propriétés modulatrices de l'activité gliale, ainsi que pour leur capacité à inhiber l'activité des PDE (Sweitzer and De Leo, 2011)). Dans un modèle de douleur inflammatoire induit par l'injection de formaldéhyde, l'administration locale de PIX et de PPF réduit les symptômes douloureux, effet qui semble corrélé à une diminution de la synthèse de TNF $\alpha$  (Dora zil-Dudzik et al., 2004). Dans un modèle de douleur neuropathique l'administration systémique et intrathécale de PPF atténue l'allodynie neuropathique et cet effet coïncide avec une diminution de l'activité microgliale dans la moelle épinière (Sweitzer et al., 2001; Tawfik et al., 2007). Les résultats obtenus avec la PIX semblent aller dans le même sens. En effet, dans un modèle de ligation des nerfs spinaux, un traitement prolongé par la PIX atténue l'allodynie mécanique et l'hyperalgésie thermique et cet effet est lié à une diminution de l'expression du facteur de transcription NF- $\kappa$ B (Liu et al.,

2007a). Enfin, une étude de cas menée fin des années 80 avait déjà démontré l'efficacité d'un traitement par la PTX chez un patient atteint de douleur neuropathique d'origine diabétique (Kalmansohn et al., 1988).

La majorité des données de la littérature concernant le rôle des PDE dans le traitement de la douleur se sont focalisées sur les PDEs de type 4 et 5 (PDE4 et PDE5). Pour la plupart des études, le rôle respectif des PDE4 et PDE5 a été étudié en utilisant des inhibiteurs sélectifs de ces enzymes. En effet, le sildénafil (iPDE5) et le rolipram (iPDE4) constituent les molécules de référence utilisées dans le domaine de la recherche préclinique sur la douleur. Dans la suite du propos, nous traiterons dans un premier temps du rôle des PDE5 dans le traitement de la douleur inflammatoire et neuropathique, puis nous évoquerons le rôle de la PDE4 et de la signalisation AMPc dans le traitement de ces douleurs.

## **2. Rôle des PDE5 dans le traitement de la douleur**

### **a. Monoxyde d'azote, PDE5 et GMP cyclique**

Le monoxyde d'azote (NO) est un composé radicalaire et un neuromédiaire gazeux diffusant librement à travers les membranes cellulaires (Mellerand Gebhart, 1993). Il possède une demi-vie de quelques secondes et son action est limitée sur la distance qu'il peut parcourir durant ce laps de temps. Le NO est synthétisé à partir de L-arginine par 3 types de NO synthases (NOS), regroupant la NOS neuronale (nNOS) et endothéliale (eNOS), qui sont dépendantes du complexe calcium-calmoduline, et la NOS inducible (iNOS) faiblement exprimée en condition normale et indépendante du calcium intracellulaire. L'augmentation de la synthèse de GMPc intracellulaire résulte de l'activation de la guanylate cyclase soluble (GCs) par le NO (Mellerand Gebhart, 1993). Le guanosine monophosphate cyclique (GMPc) produit est ensuite hydrolysé par les PDE-GMPc dépendantes en 5'GMP. Au niveau cellulaire les PDE6, PDE9 et PDE5 hydrolysent sélectivement le GMPc (Beavo, 1995).

### **b. Inhibiteurs de PDE5 et douleur inflammatoire**

La majorité des études réalisées sur des modèles de douleur aiguë ou chronique ont utilisé le sildénafil (Viagra®), connu pour être un inhibiteur sélectif de la PDE5 (Turko et al., 1999). Son effet antinociceptif a été mis en évidence dans des modèles de douleurs inflammatoires somatiques (Jain et al., 2001; Araiza-Saldana et al., 2005)

et viscérales (Vale et al, 2007; Bezerra et al, 2008). En effet, l'injection systémique de sildénafil atténue l'hyperalgésie thermique induite par l'administration intraplantaire de caragénine et cet effet semble dépendant de l'activation de la voie NO-GMPc (Jain et al, 2001; Patil et al, 2004). D'autres études ont ensuite mis en évidence l'effet antinociceptif d'une administration intrathécale (Araiza-Saldana et al, 2005) et intraplantaire (Ambriz-Tututi et al, 2005) de sildénafil. Que ce soit au niveau du système nerveux central ou périphérique, il semble que l'effet antinociceptif du sildénafil nécessite le recrutement de la voie NO-GMPc ainsi que l'activation de canaux potassium dépendants de l'ATP (Ambriz-Tututi et al, 2005). Notons toutefois qu'une administration de 8-bromo GMPc (analogue non hydrolysable du GMPc) peut induire des effets anti- ou pro-nociceptifs en fonction des doses utilisées (Tege der et al, 2002).

#### c. Inhibiteurs de PDE5 et douleur neuropathique

En 2010, une étude de Huang et al, démontre que l'administration aiguë systémique de sildénafil bloque l'allodynie mécanique dans un modèle de ligature des nerfs spinaux, effet qui s'avère être dépendant de l'activation des récepteurs GABA<sub>A</sub> et GABA<sub>B</sub> (Huang et al, 2010a). Dans un modèle de neuropathie diabétique, les auteurs ont mis en évidence une surexpression de la PDE5 dans les cellules de Schwann associée à une diminution de l'expression de la PKG. Un traitement prolongé par le sildénafil soulage l'allodynie neuropathique et cet effet est corrélé à la diminution d'activité de la PDE5 dans le DRG (Wang et al, 2011a). A l'inverse, une autre étude démontre que l'administration intrathécale d'une forte dose de sildénafil aggrave les signes d'hyperalgésie observés chez les animaux neuropathiques. Par ailleurs, dans cette même étude, un prétraitement par des inhibiteurs de GCs et de NOS bloque l'effet pro-algique du sildénafil, suggérant une implication de la voie NO-GMPc (Patil et al, 2006).

#### d. La voie NO-GMPc : douleur et analgésie

Le NO joue un rôle prépondérant dans la modulation et la transmission de l'information nociceptive. Dans le système nerveux central et périphérique, de nombreuses données suggèrent que l'administration d'inhibiteurs de NOS atténue les symptômes douloureux dans des modèles de douleurs inflammatoire et neuropathique (Meller et al, 1992; Yoon et al, 1998; Chacur et al, 2010). De plus,

l'administration de donneurs de NO ou d'analogues du GMPc provoque des comportements d'hyperalgésie chez les animaux (Kitto et al., 1992; Machelska et al., 1998; Naik et al., 2006; Song et al., 2006). Néanmoins, de plus en plus d'études révèlent que le NO pourrait avoir des propriétés anti-nociceptives. En effet, des données suggèrent l'implication de la voie NO-GMPc dans l'effet analgésique d'agonistes des MOR, DOR et KOR (Granados-Soto et al., 1997; Nozaki-Taguchi and Yamamoto, 1998; Amarante and Duarte, 2002), des gabapentinoïdes, ainsi que des inhibiteurs de PDE (Mixcoatl-Zecuatl et al., 2000; Vale et al., 2007). Au vu des données présentées ici, il paraît évident que le NO possède une double action dans la modulation et la transmission de l'information nociceptive. Cette activité pro ou anti-nociceptive du NO serait dépendante du stimulus nociceptif testé (mécanique ou thermique) (Anbar and Gratt, 1997; Sousa and Prado, 2001) mais également de la dose utilisée (Sousa and Prado, 2001; Prado et al., 2002). Enfin, les données moléculaires suggèrent que l'effet anti-nociceptif d'un analogue du GMPc serait indépendant de l'activation de la protéine kinase G. A l'inverse, l'administration locale de fortes doses de GMPc conduit à une activation de la PKG phénomène semblant corrélié à l'apparition de l'hyperalgésie (Schmidtko et al., 2009).

#### e. iPDE5 et système opioïde rgique

En 1976, une première étude *in vitro* démontre que l'application exogène de morphine induit une augmentation de la production de GMPc dans les neurones du striatum (Minnehan and Iversen, 1976). Les études menées *in vivo* ont confirmé cette observation. En effet, l'action analgésique de la morphine nécessite le recrutement de la voie NO-GMPc et cela a pu être observé en condition normale (Ferreira et al., 1991) et pathologique (Hervera et al., 2011). Par ailleurs, l'effet analgésique d'un agoniste DOR et KOR semble également dépendant de la production de GMPc (Nozaki-Taguchi and Yamamoto, 1998; Amarante and Duarte, 2002). En outre, des données suggèrent que la stimulation de la voie NO-GMPc potentialise l'effet analgésique de la morphine (Pataki and Telegdy, 1998; Mixcoatl-Zecuatl et al., 2000), phénomène qui pourrait s'expliquer par une libération de peptides opioïdes. Enfin, il semblerait que l'effet antinociceptif d'un iPDE5 soit dépendant de l'activation des DOR et des MOR mais pas des KOR (Yoon et al., 2008a). Au vu des données présentées, l'existence d'un lien entre la voie NO-GMPc et le système opioïde rgique ne fait plus de doute et la communication entre les deux systèmes

semble être bi-directionnelle. En effet, si l'action analgésique de la morphine est dépendante de la production intracellulaire de NO, des données tendent à montrer que l'effet analgésique lié à la stimulation de la voie NO-GMPc nécessite le recrutement des récepteurs des opioïdes (Cury et al., 2011).

### 3. Rôle des PDE4 dans le traitement de la douleur

#### a. Structure, distribution et compartimentalisation du signal AMPc

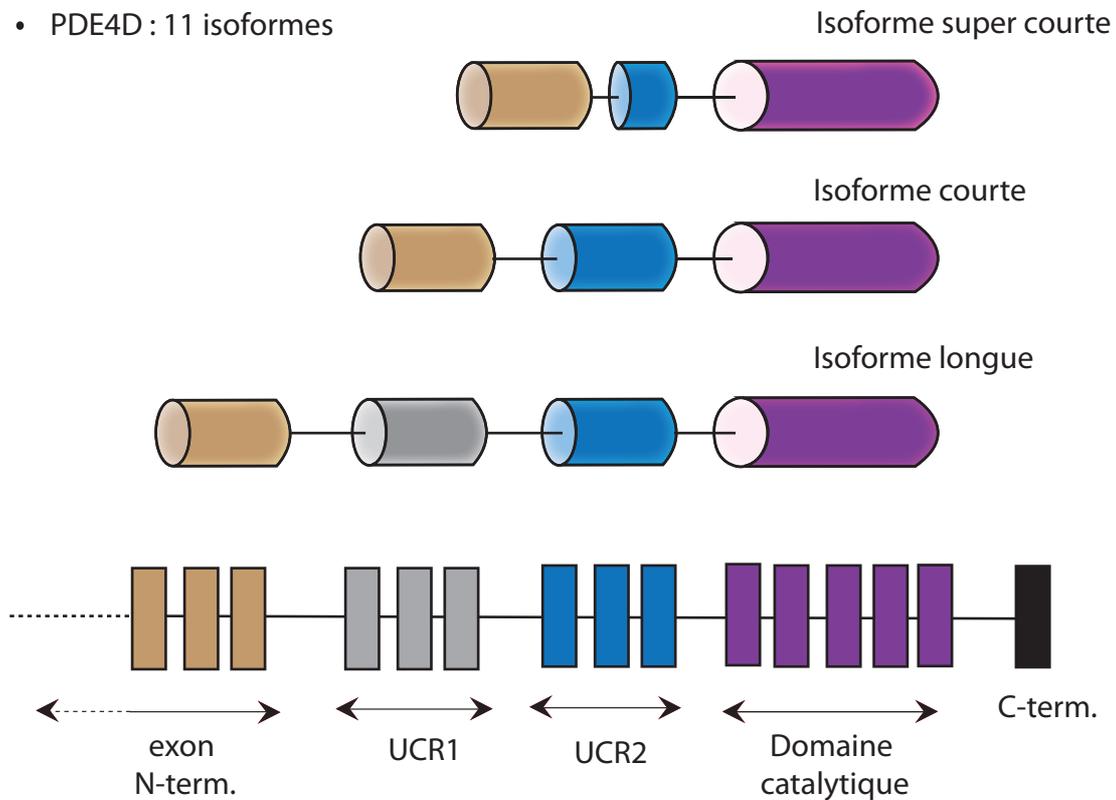
##### i. Structure des PDE4

Les PDE4 sont également appelées PDE sélectives de l'AMPc et sont principalement présentes dans le système nerveux, les cellules immunitaires et le système cardiovasculaire. Les PDE4 sont insensibles au GMPc et hydrolysent sélectivement l'AMPc ( $K_i = 2-4 \mu\text{M}$ ) (Lugnier et al., 1986). Les PDE4 sont codées par 4 gènes indépendants A, B, C et D générant plus d'une vingtaine d'isoformes différentes par des mécanismes d'épissages alternatifs (Lugnier, 2006). Au niveau N-terminal, on trouve des domaines caractéristiques des PDE4 appelés « Upstream Conserved Regions ou UCR ». Parmi ces différentes isoformes, on peut distinguer les formes « longues », contenant à la fois les domaines UCR1 et UCR2, les formes « courtes », contenant uniquement un domaine UCR2, et les formes « supercourtes » contenant seulement une partie de UCR2 (forme tronquée). Les domaines UCR contiennent des sites de phosphorylation par les PKA et les MAPK jouant un rôle primordial dans l'activité de l'enzyme. De plus, dans le cas d'un variant d'épissage dit de forme « longue » les domaines UCR1 et UCR2 sont impliqués dans la dimérisation de l'enzyme, mécanisme dépendant de la phosphorylation par la PKA (Richter and Conti, 2004) (**Figure I-7**).

##### ii. Distribution des PDE4

Une étude récente a porté sur l'expression de 18 des isoformes différentes de PDE en utilisant une approche de PCR quantitative (Lakis et al., 2010). La PDE4B est le sous-type le plus exprimé dans le système nerveux central. En effet, celle-ci est fortement exprimée au niveau spinal et supraspinal (hypothalamus, cervelet, thalamus et substance noire). La PDE4D est 10 fois moins exprimée que la PDE4B dans le système nerveux. Son expression est majoritairement localisée dans les

- PDE4A : 6 isoformes
- PDE4B : 5 isoformes
- PDE4C : 3 isoformes
- PDE4D : 11 isoformes



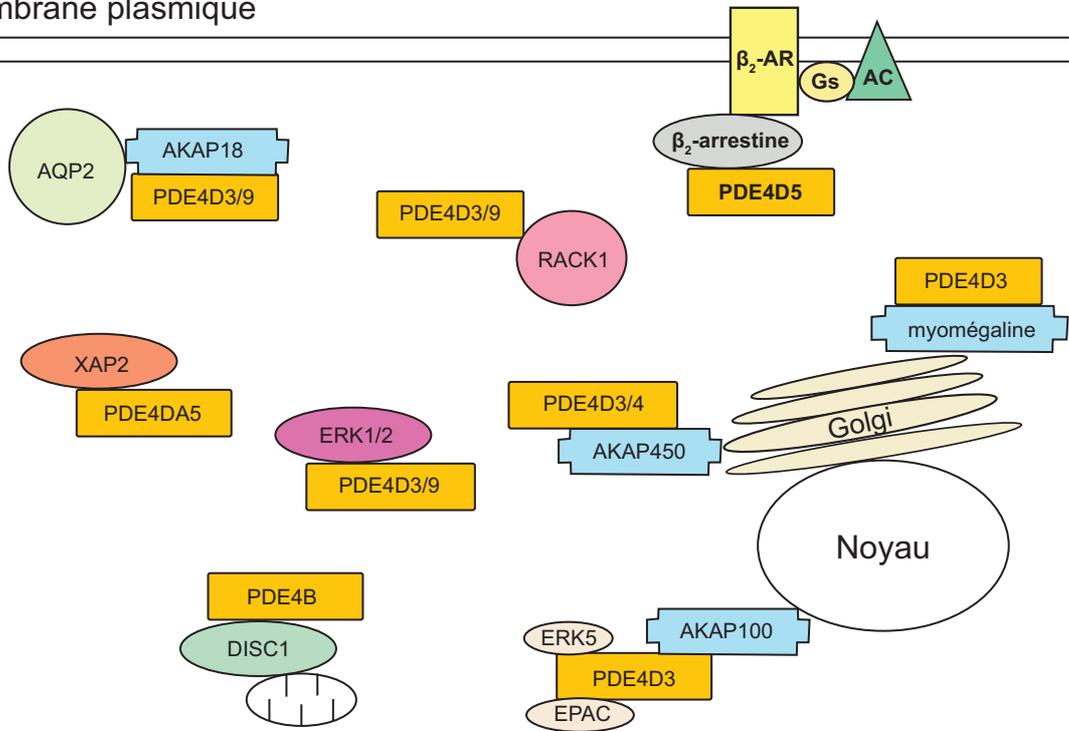
**Figure I-7. Structure des différentes isoformes de PDE4.** Quatre gènes codent pour 4 sous-types différents de PDE4 que l'on nomme PDE4A, B, C et D. Chacune des isoformes contient un domaine catalytique (en violet) nécessaire à l'activité enzymatique et contient également le site d'action des inhibiteurs pharmacologiques. On dénombre 25 isoenzymes différentes qui sont dites de formes super courtes, courtes ou longues. La différence se situe dans les domaines UCR indispensables à la dimérisation de l'enzyme *in vivo*. En effet, les formes super courtes possèdent une région UCR2 tronquée (en bleu), les formes courtes contiennent une région UCR2 complète alors que les formes longues possèdent une région UCR1 et UCR2 (en gris). Liste d'abréviations : C-term, C-terminal region; N-term, N-terminal region; UCR, upstream conserved region 1 et 2.

structures périphériques, comme la glande thyroïde, le cœur, les poumons ou le foie. D'une manière générale, les PDE4A et C sont faiblement exprimées dans le système nerveux central et périphérique. Enfin, pour les PDE4B et PDE4D, on note une faible expression dans le système nerveux périphérique et plus particulièrement dans les DRG (Lakis et al., 2010).

### iii. Compartimentalisation du signal AMPc

La notion de compartimentalisation de la signalisation AMPc a été suggérée pour la première fois au début des années 1980, en étudiant les conséquences fonctionnelles d'une stimulation des récepteurs  $\beta$ -adrénergiques sur des cultures de cardiomyocytes (Brunton et al., 1981). La découverte de l'existence de protéines d'ancrage au PKA (A-Kinase Anchored Protein ou AKAP) a permis de confirmer l'existence potentielle d'un mécanisme de compartimentalisation du signal AMPc. Cette compartimentalisation s'établit grâce à la formation de signalosomes intracellulaires (McCahill et al., 2008) (**Figure I-8**). Au sein de ces signalosomes on trouve des effecteurs secondaires (PKA, EPAC, PKG) associés à un ou plusieurs sous-types de PDE ainsi qu'à d'autres protéines d'échafaudage (AKAP,  $\beta$ -arrestine). Les protéines AKAP ont une double action : elles permettent d'une part l'adressage subcellulaire des PKA à proximité des sites de phosphorylation, et forment d'autre part des macrocomplexes intracellulaires contenant un ou plusieurs sous-types de PDE. La distribution subcellulaire des complexes AKAP/PDE/PKA permet une régulation fine des gradients de nucléotides cycliques (Maurice et al., 2014). Dans un modèle *in vitro*, les auteurs ont mis en exergue l'existence d'un macrocomplexe associant une protéine AKAP, PKA, PDE4D3 ainsi que ERK5 (Dodge-Kafka et al., 2005). De manière intéressante, la sensibilité aux variations de concentrations intracellulaires d'AMPc est différente pour chacune des protéines du complexe. En effet, la PKA sensible à des variations de l'ordre du nanomolaire s'active en premier et induit une phosphorylation de la PDE4D3. La phosphorylation de la PDE4D3 par la PKA augmente son activité catalytique alors que la phosphorylation par ERK5 diminue son activité. Ainsi, la phosphorylation de la PDE4D3 par la PKA induit le recrutement d'une protéine Rap1 permettant une diminution de la phosphorylation par ERK. Les mécanismes de transactivation observés entre les différentes protéines du complexe permettent la mise en place d'un rétrocontrôle négatif régulant les

membrane plasmique



(d'après McCahill et al., 2008)

**Figure I-8. Compartimentalisation du signal AMPc et interactome PDE4.** Chaque sous-type de PDE4 (en orange) est associé à une protéine intracellulaire. L'activation de voies de signalisation entraîne le recrutement de ces complexes protéiques permettant l'hydrolyse de l'AMPc au sein de microdomaines cytoplasmique. Liste d'abréviations : AC, adénylate cyclase; AKAP, A-kinase anchor protein; AQP2, Aquaporine 2; DISC1, disrupted in schizophrenia 1; EPAC, exchange protein directly activated by cAMP; ERK1/2, extracellular signal-regulated kinases; PDE4, Phosphodiesterase de type 4.

variations de concentrations d'AMPc au sein de microdomaines cytoplasmiques (Dodge-Kafka et al., 2005).

## b. Efficacité des inhibiteurs de PDE4 (iPDE4) dans le traitement de la douleur

### i. iPDE4 et douleur inflammatoire

L'efficacité d'un traitement par iPDE4 a été soulignée dans des modèles de douleurs inflammatoires somatiques (Pieretti et al., 2006) et viscérale (Keshavarzian et al., 2007). Des données suggèrent que l'effet pro- ou antinociceptif dépend de la voie d'administration utilisée. En effet une injection intraplantaire de rolipram (iPDE4) potentialise l'action hyperalgésique d'une injection de formaline (Tobres-Lopez et al., 2002), de prostaglandine E2 (Ouseph et al., 1995) et de caragénine (Cunha et al., 1999). A l'inverse, l'administration intrathécale de rolipram ou d'un analogue de l'AMPc a un effet anti-nociceptif (Dolan and Nolan, 2001; Tobres-Lopez et al., 2002). Dans un modèle de douleur inflammatoire chronique, une étude a démontré qu'une administration par voie orale d'un iPDE4, le rolipram, atténue l'hyperalgésie chez les animaux arthritiques et cet effet semble corrélé à une diminution de la production de TNF $\alpha$  (Francischi et al., 2000). Des données obtenues *in vitro* à partir de cultures de membranes synoviales de patients atteints de polyarthrite rhumatoïde, démontrent que l'aprémilast (iPDE4) inhibe de manière dose-dépendante la production de TNF $\alpha$  (McCann et al., 2010). Au niveau histologique, cet effet se traduit par une diminution de l'hyperplasie synoviale, du dépôt de fibrine ainsi que d'une réduction de la destruction du cartilage en comparaison aux animaux non traités (McCann et al., 2010). Plus récemment, l'efficacité d'un traitement prolongé par l'aprémilast a été mise en évidence chez des patients atteints de spondylarthrite ankylosante (Pathan et al., 2013).

### ii. iPDE4 et douleur neuropathique

L'efficacité des iPDE4 dans le traitement de la douleur neuropathique reste encore très peu documentée. Une étude récente a mis en évidence qu'un traitement prolongé par le rolipram atténue significativement l'allodynie mécanique dans un modèle de douleur neuropathique périphérique (Kim et al., 2011a). L'efficacité du rolipram a également été mise en évidence dans un modèle de

douleur neuropathique d'origine centrale. En effet, une administration aiguë de rolipram induit un effet antiallodynique dans un modèle de lésion de la moelle épinière. De surcroît, l'effet thérapeutique observé semble corrélé à une diminution du recrutement de neutrophiles et de macrophages au site de lésion (Bao et al., 2011). Les lésions des voies sensitives médullaires induisent une surexpression de cytokines pro-inflammatoires telles que le TNF $\alpha$  et l'interleukine-1 $\beta$  (Yakovlev and Faden, 1994; Streit et al., 1998) qui modulent l'activité des cellules microgliales. De plus, en condition neuropathique, certains auteurs ont observé une surexpression de la PDE4B dans les cellules microgliales de la corne dorsale de la moelle épinière, mécanisme lié à l'action du TNF $\alpha$  sur ces cellules (Ghosh et al., 2012). Il semble que l'activation du TNFR situé sur les cellules microgliales provoque une diminution de la synthèse d'AMPC. Cet effet est lié à une augmentation de l'activité catalytique de la PDE4B participant ainsi au mécanisme de rétrocontrôle positif responsable de la synthèse de cytokines pro-inflammatoires.

#### c. PDE4, récepteurs $\beta_2$ adrénergiques et effet anti-TNF $\alpha$

Des données suggèrent que la noradrénaline est capable de moduler l'expression de médiateurs inflammatoires dans les cellules gliales (Feinstein et al., 2002; Dello Russo et al., 2004). Certains des effets observés seraient associés à une augmentation de la production d'AMPC liée à la stimulation des récepteurs  $\beta$ -adrénergiques (Szabo et al., 1997; Elenkov et al., 2000). En effet, des données obtenues *in vitro* sur des cultures de monocytes montrent que les agonistes des récepteurs  $\beta$ -adrénergiques inhibent la production de TNF $\alpha$  et stimulent la synthèse de l'IL-10 (Farmer and Pugin, 2000). Le rôle de la signalisation AMPC dans l'activité anti-inflammatoire des catécholamines et des  $\beta$ -agonistes, est conforté par les données démontrant que l'inhibition pharmacologique de la PDE4 possède une action immunomodulatrice (Francischi et al., 2000; McCann et al., 2010). Le récepteur  $\beta_2$  adrénergique est un récepteur couplé à une protéine G stimulatrice de l'adénylate cyclase. L'activation de l'adénylate cyclase induit une production locale d'AMPC aboutissant au recrutement de la PKA. De récentes études menées sur des cultures de cardiomyocytes ont établi que la stimulation du récepteur  $\beta_2$  adrénergique entraîne le recrutement d'un complexe protéique constitué de la  $\beta$ -arrestine et de la PDE4D5. Celui-ci permet une hydrolyse locale de l'AMPC, participant ainsi au mécanisme de rétrocontrôle négatif (Richter et al., 2008). Sur des

cultures primaires d'astrocytes, des auteurs ont mis en évidence que l'effet anti-TNF $\alpha$  d'un agoniste des récepteurs  $\beta$ -adrénergiques est potentialisé par un iPDE4 mais pas par un iPDE3 (Christiansen et al., 2011). Dans un modèle de douleur neuropathique, il a précédemment été montré que l'effet antialloodynique des antidépresseurs nécessite le recrutement des récepteurs  $\beta_2$ -adrénergiques (Yalcin et al., 2009b). De plus, leur seule stimulation suffit à obtenir un effet thérapeutique (Choucair-Jaafar et al., 2009). Par conséquent, les inhibiteurs de PDE4, en limitant l'hydrolyse de l'AMPc et en renforçant les voies de signalisation mises en jeu au travers de ce second messager, pourraient peut-être présenter des effets similaires à ceux induits lors d'un traitement par  $\beta_2$  agonistes ou par antidépresseur.



# *Objetif de thèse*

---



Les travaux antérieurs de notre équipe ont montré que l'effet antiallodynique des antidépresseurs nécessite le recrutement des récepteurs  $\beta_2$ -adrénergiques. De plus, la seule stimulation de ces récepteurs suffit pour obtenir un effet thérapeutique. La stimulation des récepteurs  $\beta_2$ -adrénergiques entraîne la production d'AMPc, dont la concentration intracellulaire est étroitement régulée par les PDE4. L'utilisation d'inhibiteurs pharmacologiques de ces enzymes pourraient éventuellement avoir un effet antiallodynique similaire à celui observé lors d'un traitement par les antidépresseurs ou les  $\beta_2$ -agonistes. Cette thèse a été en grande partie consacrée à l'étude de l'effet des iPDE dans le traitement de la douleur neuropathique.

La **1<sup>ère</sup> partie** des résultats décrit le modèle de neuropathie utilisé permettant ainsi sa mise en œuvre par d'autres groupes de recherche. Pour atteindre cet objectif, un article a été consacré à la revue de la littérature concernant le modèle du Cuff ainsi qu'au tournage d'une vidéo décrivant la procédure de chirurgie et le déroulement des tests nociceptifs utilisés.

La **2<sup>ème</sup> partie** des résultats est consacrée à l'étude de l'effet des iPDE dans le traitement de la douleur neuropathique. Nous avons utilisé une approche de pharmacologie comportementale permettant de mettre en évidence l'effet antiallodynique d'un traitement prolongé par différents iPDE. Ces expériences de criblage pharmacologique ont ensuite été complétées par des études de dose-réponse pour l'effet antiallodynique d'un iPDE4 et d'un iPDE5.

La **3<sup>ème</sup> partie** des résultats a porté sur le rôle du système opioïdérique endogène dans les effets thérapeutiques d'un traitement par antidépresseurs,  $\beta_2$ -agonistes ou par les iPDE. Pour cela, un traitement au long cours par un antidépresseur, un  $\beta_2$ -agoniste, un iPDE4 ou un iPDE5 a été effectué chez des animaux neuropathiques. Par une approche pharmacologique utilisant des antagonistes des différents récepteurs opioïdes nous avons évalué le rôle respectif de ces récepteurs dans les effets thérapeutiques observés. Les résultats issus de ces expériences ont ensuite été confirmés par l'utilisation d'animaux déficients pour les différents récepteurs des opioïdes chez lesquels l'effet antiallodynique d'un traitement prolongé par les antidépresseurs, les  $\beta_2$ -agonistes ou les iPDE a été évalué.

La **4<sup>ème</sup> partie** concerne le rôle du TNF $\alpha$  dans l'effet antiallodynique des antidépresseurs, des  $\beta_2$ -agonistes et des iPDE4. Nous avons procédé à une analyse moléculaire par la technique de Western Blot, ce qui nous a permis de mesurer l'expression du TNF $\alpha$  dans les DRG issus d'animaux neuropathiques ainsi que chez des animaux traités par un antidépresseur, un  $\beta_2$ -agoniste ou un iPDE4.

La **5<sup>ème</sup> partie** est dédiée à la compréhension du mécanisme d'action des iPDE4 dans le traitement de la douleur neuropathique. Pour cela, nous avons utilisé une approche d'imagerie calcium ex vivo sur des cultures de DRG dissociés. Cette approche nous a permis d'identifier le(s) type(s) cellulaire(s) impliqué(s) dans l'action thérapeutique des iPDE. De plus, une étude de dose-réponse a permis de déterminer la sensibilité des neurones et des cellules non-neurales à un iPDE4. Cette approche nous a ensuite permis d'évaluer le rôle des récepteurs  $\beta_2$ -adrénergiques et de déterminer l'origine du calcium mis en jeu dans ces réponses. Enfin, nous avons étudié l'implication du récepteur TRPV1 dans les réponses neuronales à un iPDE4.

# *Méthodes générales*

---



## **I. Animaux**

L'animalerie est agréée par les services vétérinaires pour l'hébergement et l'expérimentation animale (N° d'agrément C67-482-1). Toutes les procédures sont réalisées en accord avec le guide de l'expérimentation animale de l'IASP (International Association for the Study of Pain).

### **A. Animaux C57BL/6J**

Des souris mâles C57BL/6J (Charles River) âgées de 6 à 8 semaines en début d'expérience sont utilisées afin d'évaluer l'impact des iPDE sur l'allodynie neuropathique. Les animaux sont repartis en cages de 5 individus, soumis à des cycles lumière/obscurité de 12 heures, nourriture et eau disponibles ad libitum. Le poids des souris est contrôlé chaque semaine.

### **B. Animaux déficients pour les récepteurs $\beta_2$ -adrénergiques ( $\beta_2$ -AR)**

Une lignée de souris déficientes pour les récepteurs  $\beta_2$ -adrénergiques nous a été fournie par l'équipe de Professeur Lutz Hein (IPTCE, Fribourg). La création de cette lignée a été décrite précédemment (Rohrer et al., 1998). Les souris des expériences sont obtenues par croisement d'hétérozygotes. Les expériences sont réalisées sur des souris déficientes pour les récepteurs  $\beta_2$ -adrénergiques et des souris sauvages de mêmes portées. Les animaux étaient répartis en cage de 3 à 5 individus, soumis à des cycles lumière/obscurité de 12 heures, nourriture et eau disponibles ad libitum. Le poids des souris est contrôlé chaque semaine. Les expériences ont démarré après une période d'habituation aux locaux et aux tests de 2 semaines.

### **C. Animaux déficients pour les récepteurs Mu, Delta et Kappa (MOR, DOR, KOR) des opioïdes**

Les lignées de souris déficientes pour les MOR, DOR et KOR nous ont été fournies par l'équipe du Professeur Brigitte Kieffer (IGBMC, Illkirch). La génération des souris déficientes pour les MOR, DOR et KOR a été décrite précédemment (Matthes et al., 1996; Simonin et al., 1998; Filliol et al., 2000). Ces lignées sont sur fond génétique C57BL/6J et les souris sont obtenues par croisement d'hétérozygotes et génotypées au sevrage. Les expériences sont menées sur des souris mâles adultes déficientes pour les MOR (Oprm1<sup>-/-</sup>), les DOR (Oprd1<sup>-/-</sup>), les KOR (Oprk1<sup>-/-</sup>) et les souris sauvages de même portée. L'ensemble des animaux est réparti en cages de 3 à 5 individus et

les expériences ont démarré après une période d'habituation aux locaux de 2 semaines.

## **II. Modèle de douleur neuropathique et évaluation de l'allodynie mécanique**

La description précise du modèle de douleur neuropathique utilisé a donné lieu à une publication en collaboration dans la revue JoVE (Journal of Visualized Experiment). La neuropathie se traduit chez les animaux par l'apparition d'une allodynie mécanique statique et ipsilatérale à la lésion. L'allodynie neuropathique est évaluée en utilisant le test des filaments de von Frey. La procédure de test nociceptif et de chirurgie seront détaillées dans le **Chapitre 1** des **Résultats** et sont disponibles en ligne sous forme de vidéo (<http://www.jove.com/video/51608/the-sciatic-nerve-cuffing-model-of-neuropathic-pain-in-mice>).

## **III. Procédures de traitement**

### **A. Traitement par les inhibiteurs de phosphodiésterases (iPDE)**

Les iPDE sont mis en suspension dans un solvant contenant de la méthylcellulose à 1% et de l'éthanol à 5%. Ce solvant a également servi de solution contrôle. Les molécules sont administrées par voie intrapéritonéale (ip.) dans un volume de 5 mL/kg représentant de 0,1 à 0,15 mL selon le poids de l'animal. Nous avons évalué l'effet d'un traitement prolongé par les iPDE sur l'allodynie mécanique consécutive à la neuropathie. Des tests sont réalisés jusqu'à 2 semaines après la chirurgie afin de vérifier le développement d'une allodynie mécanique statique ipsilatérale. Les traitements débutent 15 jours après la chirurgie et sont maintenus sur une durée minimum de 3 semaines. Pour l'ensemble des iPDE des injections biquotidiennes (matin et soir) ont été réalisées. Les tests sont effectués le matin avant la première injection, afin de déterminer l'impact d'un traitement chronique par les iPDE. Enfin, la mesure du seuil de sensibilité mécanique est poursuivie pendant toute la durée du traitement avec une fréquence de 2 à 3 tests par semaine. Nous avons également effectué une mesure de l'effet antalgique aigu de certains iPDE. Dans ce cas, un pré-test correspondant à la ligne de base est réalisé puis une mesure du seuil de sensibilité mécanique est effectuée sur une durée de 90 minutes post-injection (post-test).

## **B. Traitement par les $\beta_2$ -agonistes**

Les  $\beta_2$  mimétiques sont dissous dans une solution de NaCl 0,9% qui a également servi de solution contrôle. La terbutaline (0,5 mg/kg) est administrée de manière intrapéritonéale (i.p.), matin et soir sur une période de 3 semaines. Les procédures de tests sont les mêmes que celles décrites dans la section III.A.

## **C. Traitement par les antagonistes des récepteurs des opioïdes**

Afin de mesurer l'implication du système opioïdergique sur le traitement par les iPDE, une administration aiguë d'antagonistes des récepteurs des opioïdes a été réalisée. En effet, les animaux « Cuff » ayant subi un traitement prolongé par iPDE sont soumis à une injection aiguë d'antagonistes des MOR : la naloxonazine (20 mg/kg) ; des DOR : la naltrindole (5 mg/kg) ; et des KOR : la norbinaltorphimine (5 mg/kg). De plus, une administration d'un antagoniste des récepteurs des opioïdes ne passant pas la barrière hématoencéphalique (naloxone méthiodide) est effectuée après 3 semaines de traitement par les iPDE. L'ensemble des injections d'antagonistes est réalisé par voie sous-cutanée (s.c.) et l'effet de ces traitements est mesuré avec le test des filaments de von Frey.

## **IV. Immunoblot**

### **A. Prélèvement**

A la fin de la période de traitement, des prélèvements des ganglions rachidiens ont été effectués chez des animaux neuropathiques « Cuff » traités par iPDE,  $\beta_2$ -mimétiques et non traités ainsi que chez des animaux non neuropathiques « Sham ». Les animaux sont sacrifiés par dislocation cervicale. Le dos est isolé au niveau lombaire L4, L5, L6 et une incision médiane est effectuée afin d'isoler les ganglions rachidiens. Ceux-ci sont conservés à -80°C.

### **B. Extraction et dosage des protéines**

Les ganglions rachidiens sont prélevés et mélangés à 150  $\mu$ L de tampon de lyse (20 mM de Tris pH 7,5 ; 150 mM de NaCl ; 10% de glycérol ; 1% de NP40 ; inhibiteurs de protéases sans EDTA, Roche). Les tissus sont broyés à l'aide d'un potter, homogénéisés par sonication (3 fois 15 secondes) et centrifugés (12000 g, 4°C pendant 10 minutes). Le surnageant (100  $\mu$ L) est utilisé pour le dosage protéique

réalisé avec le kit DC Protein Assay (Bio Rad). Après ajustement de la concentration protéique de tous les échantillons, ceux-ci sont conservés à -20°C.

### **C. Migration et transfert des protéines**

Quinze µg de protéines sont déposés dans les puits d'un gel de polyacrylamide à 12% (15 à 20 µL par puits) en présence de sodium dodécylsulfate (SDS). La migration par électrophorèse est effectuée dans un tampon de migration (250 mM Tris Base, 192 mM Glycine pH 8,3) en présence de 0,1 % de SDS pendant 1 heure. Le gel est ensuite déposé sur une membrane de fluorure de polyvinylidène, PVDF, (Immobilon, transfert membranes, Millipore, IPVH00010) et le transfert des protéines est réalisé dans un tampon de transfert, sous agitation à 4°C, avec application d'un courant électrique (1 heure, 100V). Une saturation des sites aspécifiques est effectuée à l'aide d'un agent bloquant (ECL Blocking Agent, Advance Western Blotting Detection System Kit). Les membranes sont ensuite incubées une nuit à 4°C en présence d'anticorps primaires dirigés contre la tubuline (Santa Cruz, N20, sc-9935) au 1/10000<sup>ème</sup> et le TNFα (RD systems, AF-410-NA) dilué au 1/500<sup>ème</sup>. Après des rinçages successifs dans une solution de TBS (tris-buffer-saline)-tween à 0,1%, les membranes sont incubées avec des anticorps secondaires pendant 1 heure à température ambiante. Le couplage des anticorps secondaires à la HRP (horse radish peroxydase) permet l'utilisation d'un système de détection par chimiluminescence (ECL Advance Western Blotting Detection System Kit, Amersham Biosciences, RPN 2135). La révélation des bandes est effectuée sur un film photographique adapté (Hyperfilm, Amersham Bioscience, RPN 1674K). Les bandes obtenues sont ensuite analysées à l'aide du logiciel PhotoShop CS3, et le rapport de densité mTNFα/tubuline est calculé pour chaque échantillon.

## **V. Imagerie calcium sur des cultures de ganglions rachidiens**

### **A. Préparation des boîtes de culture**

Nous avons utilisé des boîtes de cultures de 35 mm de diamètre dont le fond a été percé (Ø 1cm) et remplacé par une lamelle de verre. Ces boîtes présentent donc un puits central à fond de verre où les cellules seront ensemencées. Les boîtes sont préalablement désinfectées à l'alcool 70% et stérilisées par rayonnement UV pendant 20 minutes. Après séchage des boîtes, un volume de 200 µL d'une solution

de poly-D-lysine à 0,02 mg/mL mélangé à du tampon borate est déposé sur la lamelle de verre. Les boîtes sont ensuite placées à l'incubateur pendant 24 heures.

## **B. Mise en culture**

Les ganglions rachidiens correspondants aux segments lombaires L4, L5 et L6 sont prélevés chez des souris adultes neuropathiques « Cuff » et non neuropathiques « Sham » entre 5 et 8 semaines post-chirurgie. Une deuxième dissection est réalisée sous loupe binoculaire afin de pouvoir séparer les DRG de leurs racines centrales et périphériques. Les DRG sont collectés dans un tube falcon de 15 mL contenant du PBS (Phosphate Buffer Saline). Une digestion enzymatique des tissus est alors réalisée en utilisant un mélange de trypsine-EDTA (0,5 g/L, Seromed) et de collagénase 1A (2 mg/mL, Sigma Aldrich) pendant 20 minutes à 37°C. Le processus de dissociation enzymatique est interrompu par ajout du milieu de culture MEMa (minimum essential medium alpha, Gibco, France) complété avec 10% v/v de sérum de cheval (Gibco) et 2% v/v d'une solution de pénicilline-streptomycine. Une fois le processus de dissociation enzymatique terminé, des triturations mécaniques sont effectuées à l'aide d'un pipetman afin de réaliser une dissociation mécanique des DRG. Le tube contenant les DRG est centrifugé à 1200 rpm pendant 10 minutes et le surnageant est retiré. Un volume de 200 µL de MEMa est ajouté et la suspension cellulaire obtenue est mise en culture. Les cultures sont disposées à l'incubateur à 37°C dans une atmosphère composée de 95% d'air et 5% de CO<sub>2</sub>. Les expériences d'imagerie calcium ont été réalisées entre 18 et 24 heures après ensemencement.

## **C. Imagerie calcium**

### **1. La sonde Fura-2**

Le Fura-2 est une sonde ratio métrique double excitation/mono émission. Cela signifie que lors de la liaison du calcium à la sonde, on observera d'une part une variation de son intensité lumineuse et d'autre part un déplacement de son spectre d'excitation. L'émission de fluorescence du Fura-2 à 515 nm est mesurée en réponse à une excitation à 340 nm (F<sub>340</sub>) puis à 380 nm (F<sub>380</sub>). La liaison du Ca<sup>2+</sup> à la sonde se traduit par une augmentation de F<sub>340</sub> corrélée à une diminution de F<sub>380</sub>. C'est la mesure du rapport  $R = F_{340}/F_{380}$  qui permet le calcul de [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> selon la formule de Grynkiewicz (Grynkiewicz et al., 1985)  $[Ca^{2+}]_i = K_d \cdot \beta \cdot (R - R_{min}) / (R_{max} - R)$ , où K<sub>d</sub>

correspond à la constante de dissociation du  $\text{Ca}^{2+}$  pour la sonde,  $\beta$  est le rapport entre  $F_{380}$  en l'absence de  $\text{Ca}^{2+}$  et  $F_{380}$  en concentration saturante de  $\text{Ca}^{2+}$ .  $R_{\min}$  et  $R_{\max}$  représentent les valeurs extrêmes de  $R$  obtenues respectivement en absence de  $\text{Ca}^{2+}$  et en condition de  $\text{Ca}^{2+}$  saturantes. Les constantes  $K_d$ ,  $\beta$ ,  $R_{\min}$  et  $R_{\max}$  n'ont pas été déterminées dans notre étude et les résultats présentés correspondent à la mesure du rapport  $R$ .

## **2. Protocole d'introduction de la sonde dans les cellules**

Les boîtes de culture sont rincées 2 à 3 fois avec une solution extracellulaire contenant : 130 mM de NaCl ; 5 mM de KCl ; 1 mM de  $\text{CaCl}_2$  ; 1 mM de  $\text{MgCl}_2$  ; 10 mM de glucose ; 10 mM d'HEPES à pH 7.3 et qui servira également de solution de perfusion durant toute la durée de l'enregistrement. Les cellules sont ensuite incubées dans une solution extracellulaire d'un volume de 1 mL contenant 2  $\mu\text{M}$  de Fura-2 acétoxyméthyle ester (F1201, Molecular Probes, USA) et 0.001% (v/v) d'acide pluronique (Molecular Probes) pendant 1 heure à l'obscurité et à température ambiante. Enfin les boîtes de cultures sont rincées 2 à 3 fois à l'aide de la solution extracellulaire et disposées pour l'enregistrement.

## **3. Acquisitions des images**

Les enregistrements ont été réalisés à l'aide d'un microscope inversé à épifluorescence (Axiovert 35, Zeiss) équipé d'un objectif X40 à immersion à huile. L'alternance de l'excitation à 350 et 380 nm se fait grâce à l'utilisation de filtres disposés sur une roue porte-filtre à 10 positions (Lambda 10-2, Sutter Instruments, USA). Un contrôle informatique de la position de la roue aux longueurs d'ondes d'intérêt permet l'acquisition des données. Enfin, les photons émis à une longueur d'onde supérieure à 520 nm sont captés par une caméra CCD numérique (CoolSnap HQ, Photometrics). L'acquisition est réalisée avec le logiciel Imaging Workbench 4.0 (Axon Instruments) et la fréquence d'acquisition du couple de mesures avec excitation à 350 et 380 nm est de 0,5 Hz.

## **4. Préparation et application des solutions**

Les solutions ont été diluées dans la solution extracellulaire d'enregistrement. Les concentrations utilisées sont les suivantes : KCl, 50 mM ; ATP, 50  $\mu\text{M}$  ; ADP, 50  $\mu\text{M}$  ; UIP, 50  $\mu\text{M}$  ; rolipram (1 mM, 300  $\mu\text{M}$ , 100  $\mu\text{M}$ , 30  $\mu\text{M}$ , 10  $\mu\text{M}$ , 3  $\mu\text{M}$  et 1  $\mu\text{M}$ ) ; capsaïcine, 2

$\mu\text{M}$ . Le système d'application est composé d'un dispositif à 13 voies connectées à un tube de sortie unique. Celui-ci est relié à un micromanipulateur permettant le déplacement de la perfusion à proximité du champ enregistré. Chacune des voies est également connectée à différents réservoirs de solutions dont la libération est contrôlée manuellement et l'écoulement se fait par gravité (Ulmann et al., 2007). Nous disposons également d'un système de macro-perfusion qui permet le renouvellement permanent de la solution extracellulaire et dont le débit est contrôlé par une molette de réglage.

### 5. Analyse des résultats

Lors de l'enregistrement, des régions d'intérêt (ROI) sont sélectionnées manuellement. Pour chaque ROI, nous suivons l'évolution de la fluorescence à F350, F380 et de R en fonction du temps. Pour chacun des champs enregistrés une photo est prise en microscopie à fond clair en début d'enregistrement. Tous les champs sont analysés a posteriori avec soustraction du bruit de fond correspondant aux deux longueurs d'ondes d'excitation. Les valeurs de R au cours du temps pour chacune des ROI sont reportées dans un logiciel d'analyse. Nous avons considéré de manière arbitraire que le seuil de détection d'un changement de R noté  $\Delta R$  devait correspondre à une valeur minimum égale à six fois la valeur de l'écart-type associée à la moyenne de  $\Delta R$  établie durant les 10 secondes précédant le stimulus. Ensuite, un contrôle visuel a posteriori nous permet de vérifier que  $\Delta R$  provient de la cellule enregistrée et non d'une cellule adjacente présentant une forte réponse à l'application de la substance. Enfin, il est également nécessaire de vérifier que le changement  $\Delta R$  enregistré ne provient pas de la libération d'une substance liée à l'activation d'une cellule adjacente. Pour cela, nous avons déterminé de manière arbitraire l'intervalle de temps ( $\Delta T$ ) nécessaire à l'apparition d'un changement  $\Delta R$  en fonction de la substance qui est appliquée. Ainsi,  $\Delta T$  doit être inférieur ou égal à 5 secondes lors de l'activation de canaux voltage-dépendants (KCl, ATP, capsaïcine). En revanche,  $\Delta T$  doit être compris entre 5 et 20 secondes lorsque les changements  $\Delta R$  nécessitent l'activation de voies de signalisation intracellulaire.

## **VI. Statistiques**

### **A. Tests comportementaux**

Les données sont exprimées sous forme de moyenne  $\pm$  l'erreur standard à la moyenne (SEM). L'analyse statistique est réalisée avec le logiciel STATISTICA 8 (Statsoft, Tulsa, OK, USA), en utilisant un test d'analyse de la variance (ANOVA) à mesures répétées. L'effet de la chirurgie (Sham vs Cuff) et du traitement sont considérés comme des variables indépendantes alors que les points temporels sont analysés comme des variables dépendantes. Lorsque le test ANOVA est significatif ( $p < 0,05$ ), des comparaisons multiples sont effectuées en utilisant le test post-hoc de Duncan.

### **B. Western blot**

Les analyses statistiques des résultats obtenus en Western Blot sont réalisées par un test non-paramétrique de Kruskal-Wallis ( $p < 0,05$ ) et une comparaison entre les groupes est faite en utilisant le test U de Mann Whitney.

### **C. Imagerie calcium**

Les proportions de cellules ayant répondu à une application de la substance dans la condition « Sham » et « Cuff » sont comparées par la méthode d'analyse des tableaux de contingence, en utilisant le test exact de Fisher. Afin de déterminer la population neuronale recrutée suite à l'application de la substance, une représentation cumulée de la fréquence des réponses calciques en fonction du diamètre des neurones est réalisée. L'analyse statistique entre les différentes distributions est réalisée en utilisant le test de Kolmogorov-Smirnov ( $p < 0,05$ ).

# *Ré sultats*

---



## **Chapitre 1**

### **Modèle de douleur neuropathique**

## **I The sciatic nerve cuffing model of neuropathic pain in mice**

Ipek Yalcin, Salim Megat, Florent Barthas, Elisabeth Waltisperger, Mélanie Kremer, Eric Salvat, Michel Barot

En raison de difficultés d'étude chez l'homme, l'utilisation de modèles animaux visant à reproduire les douleurs neuropathiques semble nécessaire pour permettre la dissection des mécanismes cellulaires, moléculaires et électrophysiologiques sous-tendant l'apparition de ce syndrome. Bien que ces douleurs présentent une grande variété de causes et de manifestations cliniques, la plupart des études réalisées dans ce domaine utilisent des modèles de lésion mécanique du système nerveux périphérique (Bennett and Xie, 1988; Seltzer et al., 1990; Kim and Chung, 1992; Decosterd and Woolf, 2000).

Le modèle du cuff, développé chez le rat (Mosconi and Kruger, 1996; Fisher et al., 1998), consiste en la pose d'un manchon de polyéthylène (Cuff) de 2 mm de longueur et diamètre interne de 0,38 mm, unilatéralement autour de la branche principale du nerf sciatique. La facilité d'accès du nerf sciatique en fait une cible privilégiée dans la plupart des modèles utilisés. De plus, le nerf sciatique présente une large innervation des pattes postérieures de l'animal permettant de tester facilement les comportements nocifs consécutifs à la lésion. Par ailleurs, ce modèle a l'avantage d'induire une pression calibrée sur le nerf et de réduire la variabilité entre les différents expérimentateurs. Du fait de ses nombreux avantages, ce modèle a donc été adapté et caractérisé au sein de l'équipe chez la souris (Benbouzid et al., 2008b).

Afin de pouvoir faciliter la diffusion et l'utilisation de ce modèle par d'autres groupes de recherches, notre équipe a réalisé une vidéo montrant les détails de la procédure chirurgicale ainsi que le déroulement du test des filaments de von Frey permettant de suivre l'apparition d'une allodynie mécanique ipsilatérale. Mon rôle dans cet article a été de réaliser un travail de recherche bibliographique sur le modèle du Cuff, et de participer au tournage de la vidéo pour assister sur la démonstration de la chirurgie et pour montrer la procédure de von Frey.

## Video Article

# The Sciatic Nerve Cuffing Model of Neuropathic Pain in Mice

Ipek Yalcin<sup>1</sup>, Salim Megat<sup>1,2</sup>, Florent Barthas<sup>1,2</sup>, Elisabeth Waltisperger<sup>1</sup>, Mélanie Kremer<sup>1,2</sup>, Eric Salvat<sup>1,2,3</sup>, Michel Barrot<sup>1</sup><sup>1</sup>Institut des Neurosciences Cellulaires et Intégratives UPR3212, Centre National de la Recherche Scientifique<sup>2</sup>Université de Strasbourg<sup>3</sup>Hôpitaux Universitaires de StrasbourgCorrespondence to: Ipek Yalcin at [yalcin@inci-cnrs.unistra.fr](mailto:yalcin@inci-cnrs.unistra.fr)URL: <http://www.jove.com/video/51608>DOI: [doi:10.3791/51608](https://doi.org/10.3791/51608)

Keywords: Medicine, Issue 89, pain, neuropathic pain, allodynia, von Frey, mouse, model, sciatic, cuff

Date Published: 7/16/2014

Citation: Yalcin, I., Megat, S., Barthas, F., Waltisperger, E., Kremer, M., Salvat, E., Barrot, M. The Sciatic Nerve Cuffing Model of Neuropathic Pain in Mice. *J. Vis. Exp.* (89), e51608, doi:10.3791/51608 (2014).

## Abstract

Neuropathic pain arises as a consequence of a lesion or a disease affecting the somatosensory system. This syndrome results from maladaptive changes in injured sensory neurons and along the entire nociceptive pathway within the central nervous system. It is usually chronic and challenging to treat. In order to study neuropathic pain and its treatments, different models have been developed in rodents. These models derive from known etiologies, thus reproducing peripheral nerve injuries, central injuries, and metabolic-, infectious- or chemotherapy-related neuropathies. Murine models of peripheral nerve injury often target the sciatic nerve which is easy to access and allows nociceptive tests on the hind paw. These models rely on a compression and/or a section. Here, the detailed surgery procedure for the "cuff model" of neuropathic pain in mice is described. In this model, a cuff of PE-20 polyethylene tubing of standardized length (2 mm) is unilaterally implanted around the main branch of the sciatic nerve. It induces a long-lasting mechanical allodynia, *i.e.*, a nociceptive response to a normally non-nociceptive stimulus that can be evaluated by using von Frey filaments. Besides the detailed surgery and testing procedures, the interest of this model for the study of neuropathic pain mechanism, for the study of neuropathic pain sensory and anxiodepressive aspects, and for the study of neuropathic pain treatments are also discussed.

## Video Link

The video component of this article can be found at <http://www.jove.com/video/51608/>

## Introduction

Neuropathic pain is usually chronic and arises as a consequence of a lesion or a disease affecting the somatosensory system. Maladaptive changes in injured sensory neurons and along the entire nociceptive pathway within the central nervous system participate in this complex syndrome. Various models have been developed in rodents for studying neuropathic pain and its treatments<sup>1-3</sup>.

Based on known etiologies, the models of neuropathic pain aim at mimicking the polyneuropathy observed in diabetes, the injuries to peripheral nerves, the central injuries, the trigeminal neuralgia, the neuropathies consecutive to chemotherapy, the post-herpetic neuralgia, etc. Different models of peripheral nerve injury in rodents focus on the sciatic nerve. These models depend on a compression and/or a section of this nerve. Indeed, the sciatic nerve affords relative easy surgery and allows for tests based on paw withdrawal reflexes. The models of chronic nerve compression include for example: the chronic constriction injury (CCI)<sup>4,5</sup>, the sciatic nerve cuffing<sup>6-9</sup>, the partial sciatic nerve ligation (PSL)<sup>10</sup>, the spinal nerve ligation (SNL)<sup>11</sup>, or the common peroneal nerve ligation<sup>12</sup>. Models referred to as "spared nerve injury" (SNI) are also widely used. They consist of a tight ligation and axotomy of two out of the three terminal branches of the sciatic nerve, while the third branch remains intact<sup>13-15</sup>. The various models of neuropathic pain, which target the sciatic nerve, result in a chronic mechanical allodynia (a nociceptive response to a normally non-nociceptive stimulus) on the injured hind paw.

Here, the detailed surgery procedure for the "cuff model" of neuropathic pain in mice is described. It consists in the implantation of a polyethylene cuff around the main branch of the sciatic nerve<sup>6-9</sup>. The use of von Frey filaments is also described. These filaments allow assessing the mechanical allodynia which is a long lasting nociceptive symptom present in this model.

## Protocol

Protocols have been approved by the "comité d'éthique en matière d'expérimentation animale de Strasbourg" (CREMEAS).

### 1. Baseline Measurement of Paw Withdrawal Thresholds

1. Allow the mice to habituate to the animal facilities for at least 10 days to 2 weeks before initiating the testing procedures.
2. Habituate the mice to the von Frey testing set-up and to the von Frey procedure that are described in section 4.

3. Before surgery, evaluate the mechanical paw withdrawal thresholds with von Frey filaments as described in the section 4.3. Note: Repeat the procedure on separate days until at least three stable consecutive values are obtained for paw withdrawal thresholds.
4. Assign the mice to the different experimental groups so that these groups do not initially differ for paw withdrawal thresholds.

## 2. Surgery Procedure for Cuff Implantation

1. Weigh the animal. Note: Mouse body weight should be over 20 g for the cuff insertion procedure described below.
2. Anesthetize the animal with an intraperitoneal injection of 4 ml/kg of a mixture of ketamine (17 mg/ml) and xylazine (2.5 mg/ml) in 0.9% NaCl, which provides around 45 min of anesthesia.
3. Check the absence of paw reflexes by pinching a hind paw with tweezers and check the absence of eye reflexes to make sure that the animal is fully anesthetized.
4. Shave the right leg from the knee to the hip using an electrical shaver.
5. Apply protective eye liquid gel to the eyes with a cotton-tipped swab.
6. Place the animal on its left side and place the right hind limb on a small pillow and maintain the right hind limb to the pillow with adhesive tape.
7. Disinfect the surgery field with chlorhexidine and 70% ethanol using gauze pad or cotton-tipped swab.
8. Find the femur using the forefinger and make an incision of approximately 0.5 cm, parallel to the femur and approximately 1.5 mm anterior to the femur.
9. Separate the muscles close to the femur with two autoclaved sticks. Notes: Never cut the muscle. Normally, the muscle layers separate easily without any bleeding and the sciatic nerve is then visible. In case of bleeding, use a sterile cotton-tipped swab to absorb the blood.
10. Insert two autoclaved sticks below the sciatic nerve to expose its main branch, and hydrate the nerve with a sterile physiological solution (0.9% NaCl).
11. Hold the pre-prepared sterile 2 mm section of split PE-20 polyethylene tubing (cuff), 0.38 mm ID / 1.09 mm OD, with the help of a pointed steel stick and a bulldog clamp.
  1. Insert the pointed steel stick into the cuff, which will slightly open it.
  2. Using the cuff lateral opening, insert the bulldog at one end of the cuff and parallel to the cuff. Rotate the bulldog (180°) so that it will hold the cuff by the side that is opposite to the lateral opening. Close the bulldog and remove the pointed steel stick. Note: The rotation is done to allow holding-on the cuff in an optimized position for the insertion, the bulldog clamp is also helping to maintain the cuff partly open. The model and the size of the bulldog clamp are critical for this step of the procedure.
12. Have a second experimenter hold the two sticks under the nerve and gently separate the sticks to facilitate the access to a section of sciatic nerve that is around 4 mm long.
13. Insert the 2 mm cuff around the main branch of the sciatic nerve, starting by inserting the part of the cuff that is distal to the bulldog around the part of the nerve that is proximal to the hip.
14. Close the cuff gently by exerting pressure on its two distal sides with pliers, without squeezing or changing the form of the tube. Turn the cuff to ensure that it is closed correctly.
15. Suture the shaved skin layer with surgical knots.
16. Place the mouse on its left side in a clean home cage. Keep it under the heat lamp until the mouse is awake.
17. Add extra water and place some chow directly in the home cage.

## 3. Surgery Procedure for Sham Controls

1. Apply the same surgery procedure as described above from step 2.1 to step 2.9, then follow with steps 2.15 to 2.17. For sham controls, omit the steps 2.10 to 2.14 that only concern the cuff insertion.

## 4. von Frey Testing

1. Place the mice in clear individual boxes (7 cm x 9 cm x 7 cm) with holes, on an elevated perforated plate of smooth stainless steel (1 m x 50 cm, 5 mm circle perforations with 2.5 mm between perforation borders). Note: Up to 12 mice can be concomitantly tested on this set-up. Operated animals can be tested the day after the surgery. However, 3 days of recovery are recommended to diminish the post-surgery hypersensitivity observed in sham controls.
2. Allow the animals to habituate for 15 min prior to testing.
3. Apply the von Frey filaments to the plantar surface of each hind paw in a series of ascending forces. Notes: The von Frey filaments are plastic hairs of calibrated diameters. They are 5 cm long and are fixed on hand-held applicators. The speed of filament application, the degree of bending and the duration of the application can influence the threshold values that are obtained with this test<sup>3</sup>. With the present procedure in mice, the filaments that are the most often used are the 0.16, 0.4, 0.6, 1, 1.4, 2, 4, 6, 8, and 10 g.
  1. Apply the chosen filament to the plantar surface of the left paw until the filament just bends. Repeat the procedure three to five consecutive times, and then do the same to the right paw. Once the filament has been tested on both paws, test the next animal. Notes: Avoid paw lateral borders which can be more sensitive. The expected response is a paw withdrawal, sudden flinching or paw licking. Consider the response as positive if at least three expected responses are observed out of five trials. A given paw is always tested three times, but the fourth and the fifth trials are done only if 1 or 2 response(s) was (were) observed during the first three tests. In C57BL/6J mice, start the pre-surgery tests with the 1.4 g filament. After surgery, start the tests with the 0.4 g filament. If a positive response is observed with the first tested filament, test a filament of lower force (instead of greater) at step 4.3.2.
  2. Apply the same filament to the next animals according to the 4.3.1 procedure. Once all animals are tested, start again on the first animal with the next filament of greater force. Repeat the procedure until all mice give a positive response. Notes: Test each animal

until two consecutive filaments give a positive response. Consider the gram value of the lower filament that gave a positive response as the paw withdrawal threshold for this animal.

## Representative Results

The data are expressed as mean  $\pm$  SEM. Statistical analyses were performed using multi-factor analysis of variance (ANOVA) or unpaired *t*-tests in accordance with the experimental design. For these analyses, the Sham and Cuff surgery groups as well as the saline vs. drug treatments were considered as between-group factors. When appropriate, repeated measure analyses were used for the time course data. The post-hoc comparisons were performed using the Duncan test. Statistical significance was considered at  $p < 0.05$ .

When using the procedures that are described above, the cuff implantation results in an ipsilateral allodynia as illustrated in **Figure 1**. Once the mouse is habituated to the testing procedure, the values for paw withdrawal thresholds in the von Frey test remain stable over time and are not affected by the surgical procedure *per se*, as illustrated in Sham animals. It should however be noted that a transitory post-surgical allodynia can usually be observed in Sham mice. When such allodynia is present, the paw withdrawal response returns to baseline after a few days post-surgery. In Cuff mice, the ipsilateral allodynia is already present on the first days post-surgery and is maintained for more than 2 months (see **9**, and **Figure 1**;  $F_{8,344} = 29.5$ ,  $p < 0.001$ ). The cuff-induced allodynia remains ipsilateral in C57BL/6J mice when it is measured by the von Frey test as described above, but in other conditions a presence of allodynia on the contralateral paw can also be observed<sup>8</sup>. The absolute values for baseline are usually between 4 and 6 g in C57BL/6J mice, but the testing protocol may affect these values.

Tricyclic antidepressants are among clinical first-line treatments for neuropathic pain. In this model, the tricyclic antidepressant drug nortriptyline (5 mg/kg, intraperitoneal, twice a day) relieves the neuropathic allodynia after around 2 weeks of treatment, as illustrated in **Figure 2** ( $F_{7,91} = 15.3$ ,  $p < 0.001$ ; *post-hoc*: (CuffNor=Sham) > CuffSal at  $p < 0.001$  on days 29 - 34). At this dose, no acute analgesic action of the antidepressant is observed<sup>16,17</sup>. To mimic the lasting pain relief that is present in patients taking such drugs, the mice can be tested before the morning drug administration rather than after. Such procedure allows assessment of a long-lasting effect primed by previous days of treatment. In this case, it requires 1 to 2 weeks of treatment to observe a lasting relief of the neuropathic allodynia. When the treatment is interrupted, a relapse is usually observed within 3 to 4 days<sup>18</sup>. Beside some antidepressants, gabapentinoids are the other first-choice treatments for neuropathic pain. Gabapentin has an acute and transitory analgesic action in this model<sup>16</sup>, but it also displays a delayed and long-lasting antiallodynic action when testing the animal each day before the drug administration (**Figure 3**;  $p < 0.001$ ). This action is faster than with antidepressant drugs.

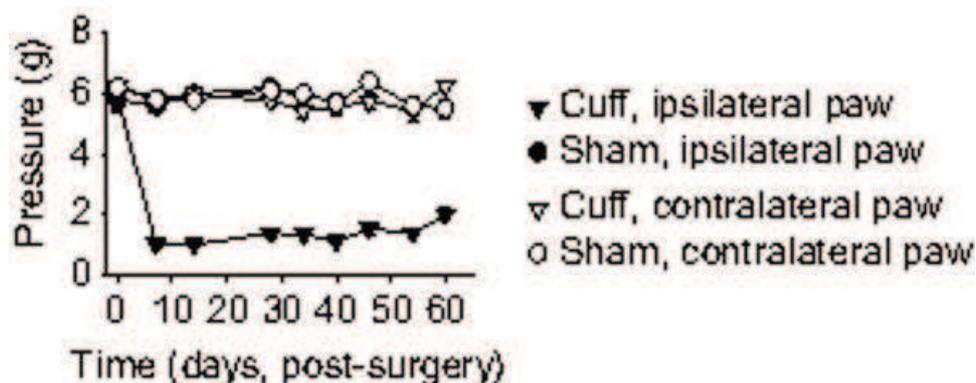


Fig. 1

**Figure 1. Mechanical paw withdrawal thresholds in the cuff model of neuropathic pain in mice.** Adult male C57BL/6J mice were habituated to the von Frey procedure until a stable baseline was obtained (the baseline is represented at point 0 on the graph). Both paws were tested. The Cuff mice display ipsilateral mechanical allodynia as showed by the lowered paw withdrawal thresholds ( $n = 10$  per group).

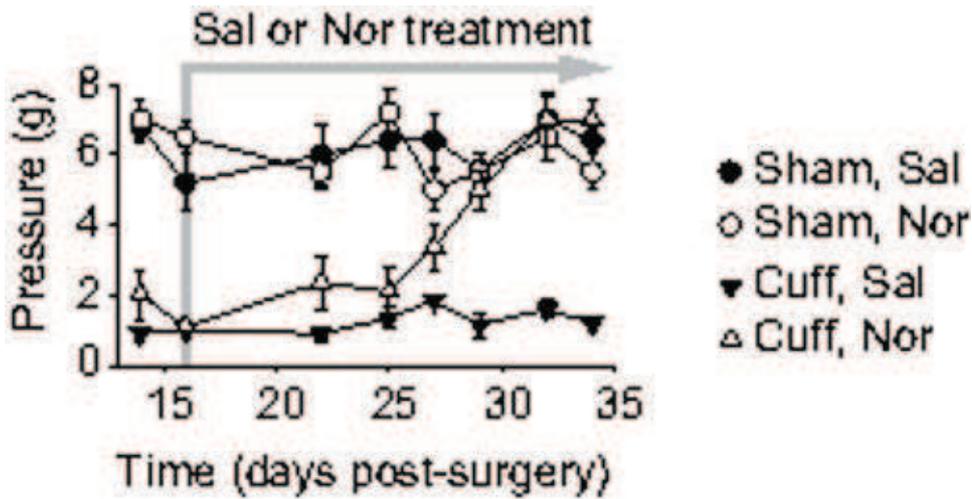


Fig.2

**Figure 2. Delayed antiallodynic action of a tricyclic antidepressant.** After two weeks post-surgery, mice received intraperitoneal treatment twice a day (morning and evening) with either 0.9% NaCl or 5 mg/kg nortriptyline hydrochloride (n=5 or 6 per group). The von Frey test was done before the morning treatment. With this procedure, a delayed antiallodynic action of nortriptyline is observed, which requires around 12 days of treatment.

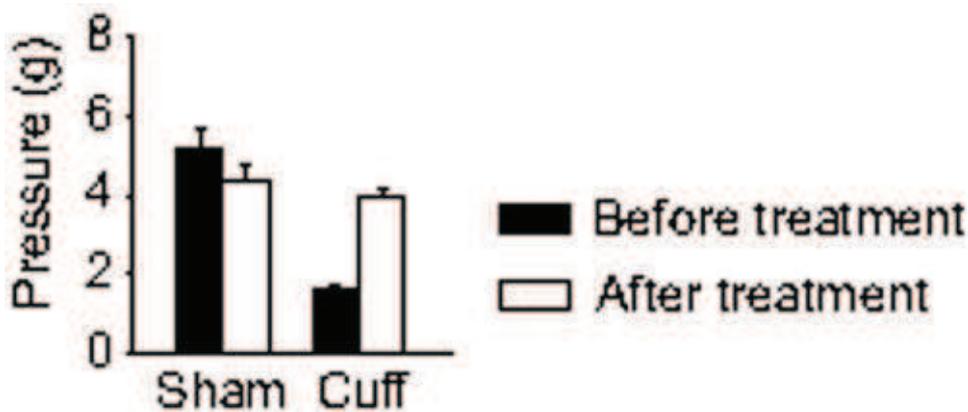


Fig.3

**Figure 3. Antiallodynic action of a gabapentinoid.** After three weeks post-surgery, mice received intraperitoneal treatment twice a day (morning and evening) with either 0.9% NaCl or 10 mg/kg gabapentin (n=5 per group). The von Frey test was done before the morning treatment. With this procedure, a delayed and lasting antiallodynic action of gabapentin is observed. Data are presented before starting the treatments and at the 6th day of treatments.

## Discussion

The "cuff" model was initially developed in rats to obtain a standardized and reproducible chronic constriction injury with the implantation of multiple cuffs around the sciatic nerve<sup>6</sup>. It was then modified to implant a single cuff<sup>7,8</sup>, even though some research groups still use multiple cuff insertion<sup>19-22</sup>. It was then adapted to mice<sup>9,23</sup>, which opened the possibility to use transgenic animals. The cuff is usually 2 mm long, but other lengths have also been used in rats<sup>22</sup>. The polyethylene tubing depends on the species: PE-20 in mice<sup>9</sup>, and PE-60<sup>24,25</sup> or PE-90<sup>7,8,26,27</sup> in rats.

The mechanical allodynia is measured with von Frey hairs. In this test, the absolute values for paw withdrawal thresholds may depend upon the surface on which the animal stands<sup>28</sup> or upon the duration of filament bending<sup>3</sup>, but these factors do not affect the detection of the neuropathic allodynia.

The "cuff" model is of interest for the study of neuropathic pain mechanisms. It was used to study morphological changes in myelinated and unmyelinated fibers<sup>6,29</sup>, and functional changes in sensory neurons, primary afferents and spinal neurons<sup>19,21,22,30-35</sup>. It allowed demonstration that glial activation and a central shift in neuronal anion gradient participate in changes in the activity and in the responses of spinal nociceptive neurons and in neuropathic allodynia<sup>24,36-38</sup>. The influence of glutamate receptors<sup>7,39-41</sup>, of opioid receptors<sup>16,42-45</sup> and of nicotinic receptors<sup>46</sup> was also studied in this model.

Another interest of the model is its response to current treatments of neuropathic pain, *i.e.*, gabapentinoids and antidepressants. Similar to clinical observations: gabapentinoids display both an acute short-lasting analgesic action at high dose and a delayed sustained relieving action that is observed after a few days of treatment, tricyclic antidepressants and selective serotonin and noradrenaline reuptake inhibitors have no acute analgesic effect at relevant dose but they display a delayed sustained relieving action that requires 1 to 2 weeks of treatment, and the selective serotonin reuptake inhibitor fluoxetine is ineffective<sup>16</sup>. The model is thus appropriate to study the molecular mechanism underlying these treatments<sup>16-18,44,45,47</sup>, which may reveal new therapeutic targets to test in patients<sup>48-51</sup>.

Lastly, the model also allows the study of the anxiodepressive consequences of neuropathic pain. Clinically, these consequences affect around a third of neuropathic pain patients but are preclinically less studied than the sensory aspects of pain. In this model, a time-dependent development of anxiety-like and depressive-like phenotypes is present<sup>52</sup> and the related mechanism can thus be addressed.

The standardized cuffs and procedures in this mouse model of neuropathic pain result in low interindividual variability for the mechanical allodynia. The possibility to use genetically modified animals<sup>17,18,44-47,52</sup>, the long-lasting allodynia, the response to clinically used treatments and the time-dependent development of anxiodepressive symptoms make this model appropriate for the study of the various aspects and consequences of neuropathic pain and its treatments, which have already brought valuable information to this field of research.

## Disclosures

The authors declare that they have no competing financial interests.

## Acknowledgements

This work was supported by the Centre National de la Recherche Scientifique (contract UPR3212), the University of Strasbourg and by a NARSAD Young Investigator Grant from the Brain & Behavior Research Foundation (to I.Y.). Publication costs are supported by the Neurex network (Program Interreg IV Upper Rhine).

## References

1. Colleoni, M., & Sacerdote, P. Murine models of human neuropathic pain. *Biochim. Biophys. Acta.* **1802**, 924-933, doi: 10.1016/j.bbadis.2009.10.012, (2010).
2. Jaggi, A. S., Jain, V., & Singh, N. Animal models of neuropathic pain. *Fundam. Clin. Pharmacol.* **25**, 1-28, doi: 10.1111/j.1472-8206.2009.00801.x., (2011).
3. Barrot, M. Tests and models of nociception and pain in rodents. *Neuroscience.* **211**, 39-50, doi: 10.1016/j.neuroscience.2011.12.041, (2012).
4. Bennett, G. J., & Xie, Y.K. A peripheral mononeuropathy in rat that produces disorders of pain sensation like those seen in man. *Pain.* **33**, 87-107, doi:10.1016/0304-3959(88)90209-6, (1988).
5. Austin, P. J., Wu, A., & Moalem-Taylor, G. Chronic constriction of the sciatic nerve and pain hypersensitivity testing in rats. *J. Vis. Exp.* (61), doi:pil: 3393. 10.3791/3393, (2012).
6. Mosconi, T., & Kruger, L. Fixed-diameter polyethylene cuffs applied to the rat sciatic nerve induce a painful neuropathy: ultrastructural morphometric analysis of axonal alterations. *Pain.* **64**, 37-57, doi:10.1016/0304-3959(95)00077-1, (1996).
7. Fisher, K., Fundytus, M.E., Cahill, C.M., &Coderre, T.J. Intrathecal administration of the mGluR compound, (S)-4CPG, attenuates hyperalgesia and allodynia associated with sciatic nerve constriction injury in rats. *Pain.* **77**, doi:10.1016/S0304-3959(98)00082-7, (1998).
8. Pitcher, G. M., Ritchie, J., & Henry, J. L. Nerve constriction in the rat: model of neuropathic, surgical and central pain. *Pain.* **83**, 37-46 (1999).
9. Benbouzid, M. *et al.* Sciatic nerve cuffing in mice: a model of sustained neuropathic pain. *Eur. J. Pain.* **12**, 591-599, doi:10.1016/j.ejpain.2007.10.002, (2008).
10. Seltzer, Z., Dubner, R., & Shir, Y. A novel behavioral model of neuropathic pain disorders produced in rats by partial sciatic nerve injury. *Pain.* **43**, 205-218, doi:10.1016/0304-3959(90)91074-S, (1990).
11. Kim, S.H., & Chung, J.M. An experimental model for peripheral neuropathy produced by segmental spinal nerve ligation in the rat. *Pain.* **50**, 355-363, doi:10.1016/0304-3959(92)90041-9, (1992).

12. Vadakkan, K. I., Jia, Y. H., & Zhuo, M. A behavioral model of neuropathic pain induced by ligation of the common peroneal nerve in mice. *J. Pain*. **6**, 747-756, doi: 10.1016/j.jpain.2005.07.005, (2005).
13. Decosterd, I., & Woolf, C. J. Spared nerve injury: an animal model of persistent peripheral neuropathic pain. *Pain*. **87**, 149-158, doi: 10.1016/S0304-3959(00)00276-1, (2000).
14. Shields, S. D., Eckert, W. A., & Basbaum, A. I. Spared nerve injury model of neuropathic pain in the mouse: a behavioral and anatomic analysis. *J. Pain*. **4**, 465-470, doi: 10.1067/S1526-5900(03)00781-8, (2003).
15. Richner, M., Bjerrum, O.J., Nykjaer, A., & Vaegter, C.B. The spared nerve injury (SNI) model of induced mechanical allodynia in mice. *J. Vis. Exp.* (54), doi: 10.3791/3092, (2011).
16. Benbouzid, M. *et al.* Chronic, but not acute, tricyclic antidepressant treatment alleviates neuropathic allodynia after sciatic nerve cuffing in mice. *Eur. J. Pain*. **12**, 1008-1017, doi: 10.1016/j.ejpain.2008.01.010, (2008).
17. Yalcin, I. *et al.* B2-adrenoceptors are essential for desipramine, venlafaxine or reboxetine action in neuropathic pain. *Neurobiol. Dis.* **33**, 386-394, doi: 10.1016/j.nbd.2008.11.003, (2009).
18. Yalcin, I. *et al.* B2-adrenoceptors are critical for antidepressant treatment of neuropathic pain. *Ann. Neurol.* **65**, 218-225, doi: 10.1002/ana.21542, (2009).
19. Balasubramanyan, S., Stenkowski, P.L., Stebbing, M.J., & Smith, P.A. Sciatic chronic constriction injury produces cell-type-specific changes in the electrophysiological properties of rat substantia gelatinosa neurons. *J. Neurophysiol.* **96**, 579-590, doi: 10.1152/jn.00087.2006, (2006).
20. Ikeda, T. *et al.* Effects of intrathecal administration of newer antidepressants on mechanical allodynia in rat models of neuropathic pain. *Neurosci. Res.* **63**, 42-46, doi: 10.1016/j.neures.2008.10.002, (2009).
21. Thakor, D. K. *et al.* Increased peripheral nerve excitability and local Nav1.8 mRNA up-regulation in painful neuropathy. *Mol. Pain*. **5**, **14**, doi: 10.1186/1744-8069-5-14, (2009).
22. Zhu, Y.F., Wu, Q., & Henry, J. L. Changes in functional properties of A-type but not C-type sensory neurons *in vivo* in a rat model of peripheral neuropathy. *J. Pain Res.* **5**, 175-192, doi: 10.2147/JPR.S26367, (2012).
23. Cheng, H.Y. *et al.* DREAM is a critical transcriptional repressor for pain modulation. *Cell*. **108**, 31-43, doi: 10.1016/S0092-8674(01)00629-8, (2002).
24. Zhang, J., & De Koninck, Y. Spatial and temporal relationship between monocyte chemoattractant protein-1 expression and spinal glial activation following peripheral nerve injury. *J. Neurochem.* **97**, 772-783, doi: 10.1111/j.1471-4159.2006.03746.x, (2006).
25. Beggs, S., Liu, X.J., Kwan, C., & Salter, M. W. Peripheral nerve injury and TRPV1-expressing primary afferent C-fibers cause opening of the blood-brain barrier. *Mol. Pain*. **6**, 74, doi: 10.1186/1744-8069-6-74, (2010).
26. Vachon, P., Massé, R., & Gibbs, B. F. Substance P and neurotensin are up-regulated in the lumbar spinal cord of animals with neuropathic pain. *Can. J. Vet. Res.* **68**, 86-92 (2004).
27. Aouad, M., Petit-Demoulière, N., Goumon, Y., & Poisbeau, P. Etifoxine stimulates allopregnanolone synthesis in the spinal cord to produce analgesia in experimental mononeuropathy. *Eur. J. Pain*. **18**, 258-68, doi: 10.1002/j.1532-2149.2013.00367.x, (2014).
28. Pitcher, G. M., Ritchie, J., & Henry, J. L. Paw withdrawal threshold in the von Frey hair test is influenced by the surface on which the rat stands. *J. Neurosci. Methods*. **87**, 185-193, doi: 10.1016/S0165-0270(99)00004-7, (1999).
29. Beaudry, F., Girard, C., & Vachon, P. Early dexamethasone treatment after implantation of a sciatic-nerve cuff decreases the concentration of substance P in the lumbar spinal cord of rats with neuropathic pain. *Can. J. Vet. Res.* **71**, 90-97 (2007).
30. Pitcher, G. M., & Henry, J. L. Cellular mechanisms of hyperalgesia and spontaneous pain in a spinalized rat model of peripheral neuropathy: changes in myelinated afferent inputs implicated. *Eur. J. Neurosci.* **12**, 2006-2020, doi: 10.1046/j.1460-9568.2000.00087.x, (2000).
31. Pitcher, G. M., & Henry, J. L. Nociceptive response to innocuous mechanical stimulation is mediated via myelinated afferents and NK-1 receptor activation in a rat model of neuropathic pain. *Exp. Neurol.* **186**, 173-197, doi: 10.1016/j.expneurol.2003.10.019, (2004).
32. Pitcher, G. M., & Henry, J. L. Governing role of primary afferent drive in increased excitation of spinal nociceptive neurons in a model of sciatic neuropathy. *Exp. Neurol.* **214**, 219-228, doi: 10.1016/j.expneurol.2008.08.003, (2008).
33. Lu, V.S. *et al.* Brain-derived neurotrophic factor drives the changes in excitatory synaptic transmission in the rat superficial dorsal horn that follow sciatic nerve injury. *J. Physiol.* **587**, 1013-1032, doi: 10.1113/jphysiol.2008.166306, (2009).
34. Ruangsri, S., Lin, A., Mulpuri, Y., Lee, K., Spigelman, I., & Nishimura, I. Relationship of axonal voltage-gated sodium channel 1.8 (Nav1.8) mRNA accumulation to sciatic nerve injury-induced painful neuropathy in rats. *J. Biol. Chem.* **286**, 39836-39847, doi: 10.1074/jbc.M111.261701, (2011).
35. Zhu, Y. F., & Henry, J. L. Excitability of AB sensory neurons is altered in an animal model of peripheral neuropathy. *BMC Neurosci.* **13**, 15, doi: 10.1186/1471-2202-13-15, (2012).
36. Coull, J. A. *et al.* Trans-synaptic shift in anion gradient in spinal lamina I neurons as a mechanism of neuropathic pain. *Nature*. **424**, 938-942, doi: 10.1038/nature01868, (2003).
37. Coull, J. A. *et al.* BDNF from microglia causes the shift in neuronal anion gradient underlying neuropathic pain. *Nature*. **438**, 1017-1021, doi:10.1038/nature04223, (2005).
38. Keller, A. F., Beggs, S., Salter, M. W., & De Koninck, Y. Transformation of the output of spinal lamina I neurons after nerve injury and microglia stimulation underlying neuropathic pain. *Mol. Pain*. **3**, 27, doi:10.1186/1744-8069-3-27, (2007).
39. Fundytus, M. E., Fisher, K., Dray, A., Henry, J. L., &Coderre, T. J. *In vivo* antinociceptive activity of anti-rat mGluR1 and mGluR5 antibodies in rats. *Neuroreport*. **9**, 731-735 (1998).
40. Fundytus, M.E., *et al.* Knockdown of spinal metabotropic glutamate receptor 1 (mGluR(1)) alleviates pain and restores opioid efficacy after nerve injury in rats. *Br. J. Pharmacol.* **132**, 354-367, doi: 10.1038/sj.bjp.0703810, (2001).
41. Coderre, T. J., Kumar, N., Lefebvre, C. D., & Yu, J. S. Evidence that gabapentin reduces neuropathic pain by inhibiting the spinal release of glutamate. *J. Neurochem.* **94**, 1131-1139, doi: 10.1111/j.1471-4159.2005.03263.x, (2005).
42. Kabli, N., & Cahill, C. M. Anti-allodynic effects of peripheral delta opioid receptors in neuropathic pain. *Pain*. **127**, 84-93, doi: 10.1016/j.jpain.2006.08.003, (2007).
43. Holdridge, S. V., & Cahill, C. M. Spinal administration of a delta opioid receptor agonist attenuates hyperalgesia and allodynia in a rat model of neuropathic pain. *Eur. J. Pain*. **11**, 685-693, doi: 10.1016/j.ejpain.2006.10.008, (2007).
44. Benbouzid, M. *et al.*  $\Delta$ -opioid receptors are critical for tricyclic antidepressant treatment of neuropathic allodynia. *Biol. Psychiatry*. **63**, 633-636, doi: 10.1016/j.biopsych.2007.06.016, (2008).
45. Bohren, Y. *et al.*  $\mu$ -opioid receptors are not necessary for nortriptyline treatment of neuropathic allodynia. *Eur. J. Pain*. **14**, 700-704, doi: 10.1016/j.ejpain.2009.11.014, (2010).

46. Yalcin, I. *et al.* Nociceptive thresholds are controlled through spinal B2-subunit-containing nicotinic acetylcholine receptors. *Pain*. **152**, 2131-2137, doi: 10.1016/j.pain.2011.05.022, (2011).
47. Bohren, Y. *et al.* Antidepressants suppress neuropathic pain by a peripheral B2-adrenoceptor mediated anti-TNF $\alpha$  mechanism. *Neurobiol. Dis.* **60**, 39-50, doi: 10.1016/j.nbd.2013.08.012, (2013).
48. Choucair-Jaafar, N., Yalcin, I., Rodeau, J. L., Waltisperger, E., Freund-Mercier, M. J., & Barrot, M. B2-adrenoceptor agonists alleviate neuropathic allodynia in mice after chronic treatment. *Br. J. Pharmacol.* **158**, 1683-1694, doi: 10.1111/j.1476-5381.2009.00510.x, (2009).
49. Yalcin, I. *et al.* Chronic treatment with agonists of B2-adrenergic receptors in neuropathic pain. *Exp. Neurol.* **221**, 115-121, doi: 10.1016/j.expneurol.2009.10.008, (2010).
50. Cok, O. Y., Eker, H. E., Yalcin, I., Barrot, M., & Aribogan, A. Is there a place for B-mimetics in clinical management of neuropathic pain? Salbutamol therapy in six cases. *Anesthesiology*. **112**, 1276-1279, doi: 10.1097/ALN.0b013e3181d40399, (2010).
51. Choucair-Jaafar, N. *et al.* Cardiovascular effects of chronic treatment with a B2-adrenoceptor agonist relieving neuropathic pain in mice. *Neuropharmacology*. **61**, 51-60, doi: 10.1016/j.neuropharm.2011.02.015, (2011).
52. Yalcin, I. *et al.* A time-dependent history of mood disorders in a murine model of neuropathic pain. *Biol. Psychiatry*. **70**, 946-953, doi: 10.1016/j.biopsych.2011.07.017, (2011).

**Materials List for:**

**The Sciatic Nerve Cuffing Model of Neuropathic Pain in Mice**

Ipek Yalcin<sup>1</sup>, Salim Megat<sup>1,2</sup>, Florent Barthas<sup>1,2</sup>, Elisabeth Waltisperger<sup>1</sup>, Mélanie Kremer<sup>1,2</sup>, Eric Salvat<sup>1,2,3</sup>, Michel Barrot<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Institut des Neurosciences Cellulaires et Intégratives UPR3212, Centre National de la Recherche Scientifique

<sup>2</sup>Université de Strasbourg

<sup>3</sup>Hôpitaux Universitaires de Strasbourg

Correspondence to: Ipek Yalcin at [yalcin@inci-cnrs.unistra.fr](mailto:yalcin@inci-cnrs.unistra.fr)

URL: <http://www.jove.com/video/51608>

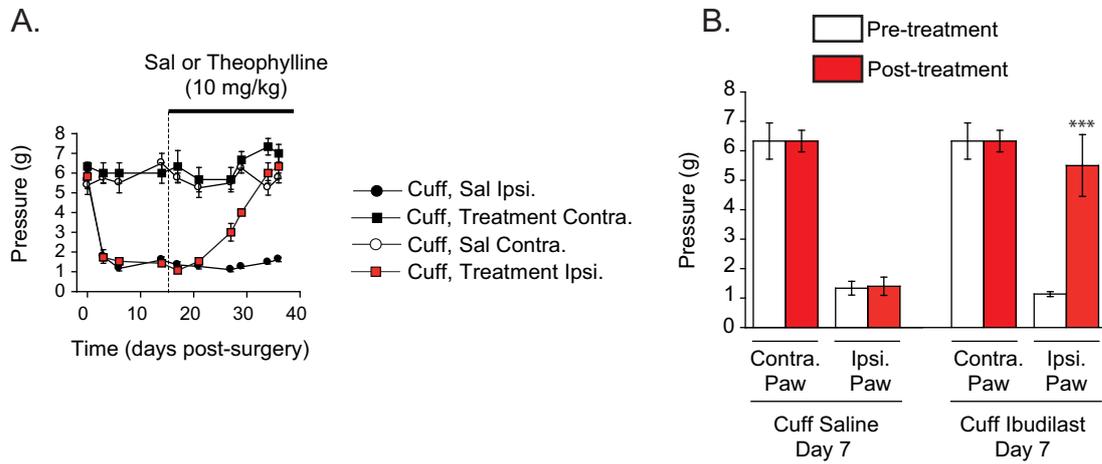
DOI: [doi:10.3791/51608](https://doi.org/10.3791/51608)

**Materials**

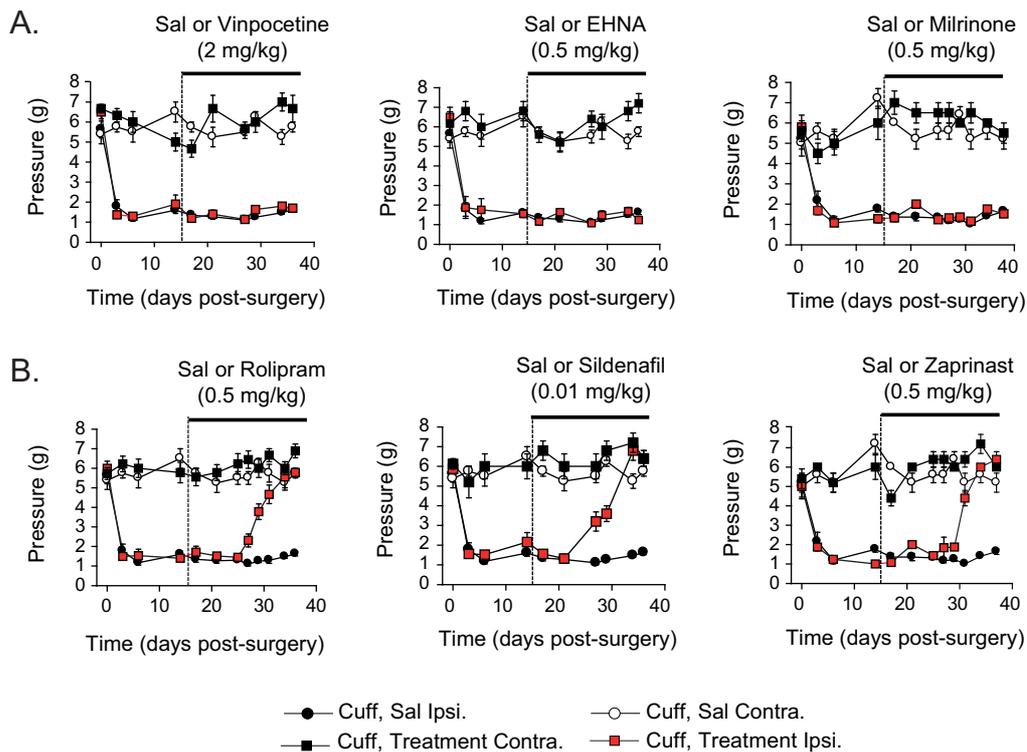
Name	Company	Catalog Number	Comments
PE-20 polyethylene tubing	Harvard Apparatus	PY2-59-8323	Splitted before surgery
Ketamine	Centravet	IMA004	
Xylazine HCl	Sigma	X1251	Freshly prepared before surgery
Ocry-gel	Centravet		
Pliers	FST	11003-12	52.5 mm straight
Bulldog clamp	FST	p130 18038-45	
Perforated plate	CTTM		
von Frey filaments	Bioseb	NC-12775	

## **Chapitre 2**

# **Effet antiallodynique des inhibiteurs de phosphodiesterases (PDE)**



**Figure R-1. Effet d'un traitement par iPDE non-sélectif sur l'allodynie neuropathique.** Au jour 0, le manchon de polyéthylène est posé autour de la branche principale du nerf sciatique pour les animaux du groupe "Cuff". Le traitement débute au jour 15 (pointillés) et se poursuit jusqu'au jour 36 post-chirurgie. Les animaux reçoivent des injections intrapéritonéales bi-quotidiennes. Le seuil de sensibilité mécanique est évalué par le test des filaments de von Frey. **(A)** Un traitement prolongé par la théophylline (n=6/groupe) soulage l'allodynie neuropathique. **(B)** L'administration répétée d'ibudilast (n=5/groupe) supprime l'allodynie neuropathique. Les données sont exprimées en moyennes  $\pm$  SEM. Contra., controlatérale ; Ipsi., ipsilatérale ; Sal, saline.



**Figure R-2. Effet de différents iPDE sur l'allodynie neuropathique.** Au jour 0, le manchon de polyéthylène est posé autour de la branche principale du nerf sciatique pour les animaux du groupe "Cuff". Le traitement débute au jour 15 (pointillés) et se poursuit jusqu'au jour 36 post-chirurgie. Les animaux reçoivent des injections intrapéritonéales bi-quotidiennes. Le seuil de sensibilité mécanique est évalué par le test des filaments de von Frey. **(A)** Le traitement par la vinpocétine (n=6/groupe) ; l'EHNA (n=5/groupe) ou la milrinone (n=5/groupe) n'a aucun effet sur l'allodynie induite par la pose du manchon. **(B)** Le traitement prolongé par le rolipram (n=9/groupe) soulage l'allodynie neuropathique. De la même façon une administration répétée de sildénafil (n=5/groupe) et de zaprinast (n=5/groupe) supprime l'allodynie neuropathique. Les données sont exprimées en moyennes  $\pm$  SEM. Contra., controlatérale ; Ipsi., ipsilatérale ; Sal, saline.

## I. Criblage pharmacologique

### A. Introduction

Un traitement prolongé par les antidépresseurs (Yalcin et al., 2009b) et les  $\beta_2$ -agonistes (Choucair-Jaafar et al., 2009; Yalcin et al., 2010) est nécessaire pour obtenir l'effet antiallodynique chez la souris. Dans la lignée de ces résultats, nous avons évalué l'effet d'un traitement prolongé par différents inhibiteurs de phosphodiesterases (iPDE) sur l'allodynie neuropathique.

### B. Protocole

Les expériences ont été réalisées sur des souris mâles adultes C57BL/6J. Le traitement par les différents iPDE débute au jour 15 post-chirurgie et se poursuit jusqu'au jour 37. Les injections sont biquotidiennes (matin et soir) et réalisées par voie intrapéritonéale. Les tests nociceptifs sont effectués avant l'injection du matin, afin d'évaluer l'effet antiallodynique d'un traitement prolongé.

### C. Résultats

Le seuil nociceptif mécanique des animaux est déterminé grâce aux filaments de von Frey avant la chirurgie et constitue la ligne de base observée avant le jour 0 (**Figure R-1.A**). Un traitement prolongé par la théophylline, iPDE non sélectif, soulage l'allodynie mécanique après 2 semaines (**Figure R-1.A**), la récupération étant totale au 19<sup>ème</sup> jour de traitement. Un traitement répété par l'ibudilast, iPDE non sélectif, supprime aussi l'allodynie neuropathique (**Figure R-1.B**). En utilisant des inhibiteurs sélectifs de diverses PDE, nous montrons que des iPDE1 (vinpocétine), iPDE2 (EHNA) et iPDE3 (milrinone) n'ont pas d'effet sur le seuil de sensibilité mécanique (**Figure R-2.A**). Par contre le rolipram (iPDE4) bloque l'allodynie induite par la pose du manchon, cet effet étant significatif à partir du 14<sup>ème</sup> jour de traitement. Un retour à des valeurs équivalentes aux contrôles s'observe après 16 jours de traitement (**Figure R-2.B**). De la même façon, le sildénafil (iPDE5) augmente le seuil de sensibilité mécanique chez les animaux Cuff après 12 jours de traitement (**Figure R-2.B**). Enfin, le zaprinast (iPDE5, 6 et 9) soulage également l'allodynie neuropathique, après 16 jours de traitement (**Figure R-2.B**). Nous avons ensuite vérifié si l'effet antiallodynique du rolipram est généralisable à d'autres iPDE4. Ainsi, on observe une réduction

significative de l'allodynie mécanique chez les animaux traités par l'YM976 (**Figure R-3.A**) ou l'étazolate (**Figure R-3.B**) au 14<sup>ème</sup> jour de traitement.

### E. Statistiques

Molécules	Analyse de la variance (ANOVA)			Analyse post-hoc (Test de Duncan)			
	Interaction	Statistique	P-valeur	Comparaison des groupes	Jours post-chirurgie	Jours de traitement	P-valeur
Théophylline	Patte X Traitement X Temps	$F_{9,216} = 3,98$	<b>&lt; 0,01</b>	Cuff Theo. Ipsi. > Cuff Sal. Ipsi.	Jour 27-36		<b>&lt; 0,001</b>
				Cuff Theo. Ipsi. = Cuff Sal. Contro.	Jour 34-36		> 0,05
Ibutilast	Patte X Traitement X Temps	$F_{4,80} = 8,14$	<b>&lt; 0,001</b>	Cuff Ibd. Ipsi. > Cuff Sal. Ipsi.		Jour 3-7	<b>&lt; 0,001</b>
				Cuff Ibd. Ipsi. = Cuff Sal. Contro.		Jour 4-7	> 0,05
Vinpocétine	Patte X Traitement X Temps	$F_{11,264} = 1,47$	> 0,05				
EHNA	Patte X Traitement X Temps	$F_{11,242} = 0,50$	> 0,05				
Milrinone	Patte X Traitement X Temps	$F_{11,242} = 1,42$	> 0,05				
Rolipram	Patte X Traitement X Temps	$F_{11,330} = 4,47$	<b>&lt; 0,001</b>	Cuff Rol. Ipsi. > Cuff Sal. Ipsi.	Jour 29-36		<b>&lt; 0,05</b>
				Cuff Rol. Ipsi. = Cuff Sal. Contro.	Jour 31-36		> 0,05
Sildénafil	Patte X Traitement X Temps	$F_{9,198} = 6,51$	<b>&lt; 0,001</b>	Cuff Sild. Ipsi. > Cuff Sal. Ipsi.	Jour 27-36		<b>&lt; 0,05</b>
				Cuff Sild. Ipsi. = Cuff Sal. Contro.	Jour 34-36		> 0,05
Zaprinast	Patte X Traitement X Temps	$F_{11,197} = 3,91$	<b>&lt; 0,001</b>	Cuff Zap. Ipsi. > Cuff Sal. Ipsi.	Jour 31-36		<b>&lt; 0,05</b>
				Cuff Zap. Ipsi. = Cuff Sal. Contro.	Jour 34-36		> 0,05
YM976	Patte X Traitement X Temps	$F_{11,264} = 6,99$	<b>&lt; 0,001</b>	Cuff YM. Ipsi. > Cuff Sal. Ipsi.	Jour 29-36		<b>&lt; 0,05</b>
				Cuff YM. Ipsi. > Cuff Sal. Contro.	Jour 34-36		<b>&lt; 0,05</b>
Etazolate	Patte X Traitement X Temps	$F_{9,180} = 9,90$	<b>&lt; 0,001</b>	Cuff Theo. Ipsi. > Cuff Sal. Ipsi.	Jour 29-36		<b>&lt; 0,05</b>
				Cuff Eta. Ipsi. = Cuff Sal. Contro.	Jour 34-36		> 0,05

### F. Conclusion

Ce criblage pharmacologique a mis en évidence l'effet antiallodynique d'un traitement prolongé par des iPDE non-sélectifs et par des iPDE4 et iPDE5. Le délai thérapeutique des iPDE est en général similaire à celui observé lors d'un traitement par les antidépresseurs (Benbouzid et al., 2008a) et les  $\beta_2$ -mimétiques (Choucair-Jaafar et al., 2009), soit environ 2 semaines. Par contre, il est intéressant de noter que pour l'ibutilast 7 jours de traitement ont suffi pour soulager l'allodynie neuropathique. Cette donnée est à rapprocher d'une étude récente dans laquelle une administration répétée d'ibutilast (10 mg/kg) soulageait l'allodynie neuropathique, avec un délai d'action similaire à celui observé dans notre étude (Ledebouer et al., 2006). Divers mécanismes pourraient donc sous-tendre l'action des iPDE sur la douleur neuropathique.



**Figure R-3. Généralisation de l'effet antialloodyne des iPDE4.** Au jour 0, le manchon de polyéthylène est posé autour de la branche principale du nerf sciatique pour les animaux du groupe "Cuff". Le traitement débute au jour 15 (pointillés) et se poursuit jusqu'au jour 36 post-chirurgie. Les animaux reçoivent des injections intrapéritonéales bi-quotidiennes. Le seuil de sensibilité mécanique est évalué par le test des filaments de von Frey. **(A)** Le traitement par l'YM976 (n=6/groupe) bloque l'allodynie induite par la pose du manchon. **(B)** Le traitement prolongé par l'étazolate (n=4/groupe) soulage l'allodynie neuropathique. Les données sont exprimées en moyennes  $\pm$  SEM. Contra., controlatérale ; Ipsi., ipsilatérale ; Sal, saline.

## II. Dose-réponse de l'effet antiallodynique d'un iPDE4 et d'un iPDE5

### A. Introduction

Au vu des données de la littérature et des résultats précédents, nous nous sommes intéressés à l'effet antiallodynique des iPDE4 et des iPDE5. Les données antérieures montrent que l'effet antiallodynique des  $\beta_2$ -agonistes reste présent à faible dose (Choucair-Jaafar et al., 2009), similaires à celles utilisées en clinique pour le traitement de pathologies respiratoires. Ainsi, nous avons voulu tester si l'effet antiallodynique des iPDE4 et iPDE5 dépendait de la dose utilisée.

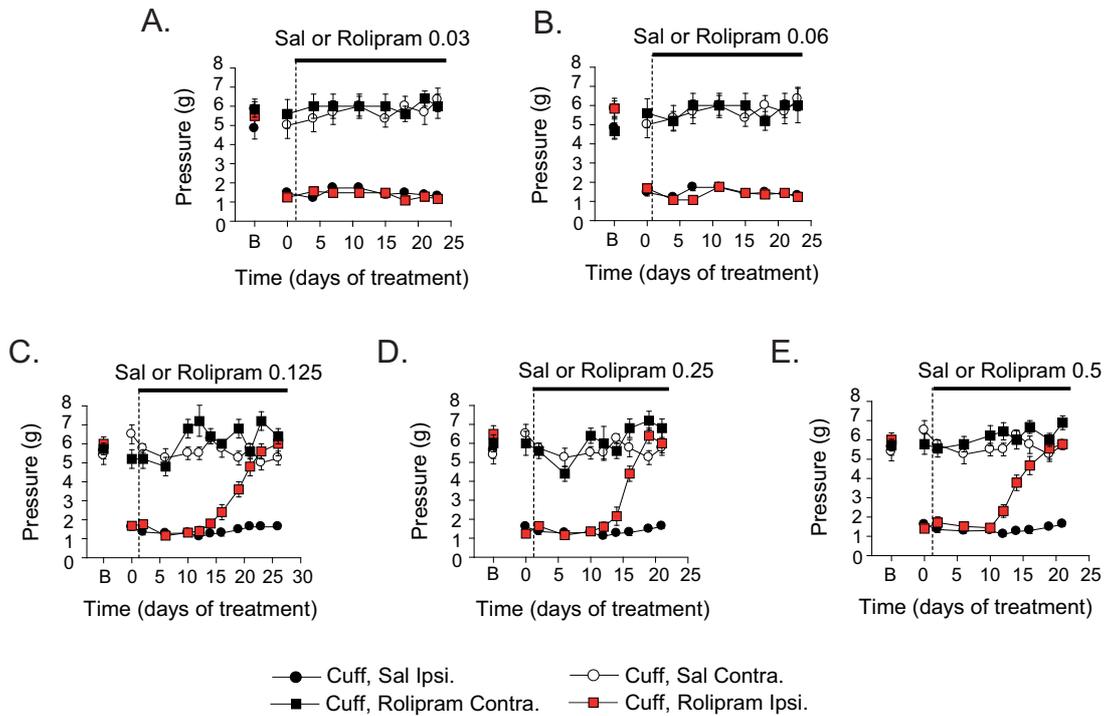
### B. Protocole

Nous avons utilisé des souris mâles adultes C57BL/6J âgées de 6 à 8 semaines en début d'expérience. Les expériences comportementales sont menées selon le même schéma expérimental que précédemment (section III.A partie **protocole**).

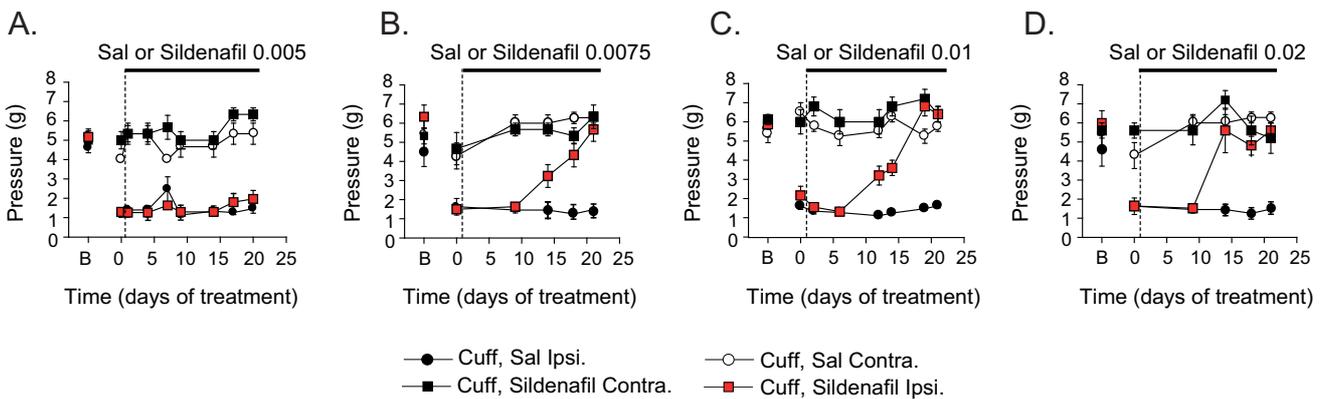
### C. Résultats

#### 1. Effet d'un traitement prolongé par un iPDE4 : dose-réponse

La dose minimum efficace (DME) de rolipram est de 0,125 mg/kg (**Figure R-4.C**). En effet, un traitement prolongé par le rolipram à une dose de 0,03 mg/kg et 0,06 mg/kg n'induit aucun changement du seuil de sensibilité mécanique chez les animaux (**Figure R-4.A et B**). L'administration répétée de rolipram à 0,5 mg/kg augmente le seuil de sensibilité mécanique à partir de 2 semaines de traitement. Un retour à des valeurs équivalentes à la patte controlatérale s'observe à partir du 16<sup>ème</sup> jour de traitement (**Figure R-4.E**). A la dose de 0,25 mg/kg, l'effet antiallodynique débute après 16 jours de traitement (**Figure R-4.D**). Enfin, la dose de 0,125 mg/kg ne soulage l'allodynie neuropathique qu'après 19 jours de traitement. Notons, qu'à cette dose ce n'est qu'au 25<sup>ème</sup> jour de traitement que le seuil de sensibilité mécanique des animaux atteint des valeurs similaires à celles mesurées pour la patte controlatérale (**Figure R-4.C**). Ainsi, nous pouvons voir qu'en diminuant progressivement les doses de rolipram, l'effet antiallodynique est retardé.



**Figure R-4. Effet antialloodyne d'un iPDE4 : dose-réponse.** Au jour 0, le manchon de polyéthylène est posé autour de la branche principale du nerf sciatique pour les animaux du groupe "Cuff". Le traitement débute au jour 15 (pointillés) et se poursuit jusqu'au jour 36 post-chirurgie. Les animaux reçoivent des injections intrapéritonéales bi-quotidiennes. Le seuil de sensibilité mécanique est évalué par le test des filaments de von Frey avant la chirurgie correspondant à la ligne de base "B" et à plusieurs reprises après la chirurgie. (A) Un traitement prolongé par le rolipram à la dose de 0,03 mg/kg (n=5/groupe) et (B) 0,06 mg/kg (n=5/groupe) n'induit aucun changement du seuil de sensibilité mécanique. (C) (D) (E) Un traitement par le rolipram à 0,125 mg/kg (n=5/groupe) à 0,25 mg/kg (n=5/groupe) ou à 0,5 mg/kg (n=9/groupe) soulage de façon durable l'allodynie neuropathique. Les données sont exprimées en moyennes  $\pm$  SEM. Contra., controlatérale ; Ipsi., ipsilatérale ; Sal, saline.



**Figure R-5. Effet antialloodyne d'un iPDE5 : dose-réponse.** Au jour 0, le manchon de polyéthylène est posé autour de la branche principale du nerf sciatique pour les animaux du groupe "Cuff". Le traitement débute au jour 15 (pointillés) et se poursuit jusqu'au jour 36 post-chirurgie. Les animaux reçoivent des injections intrapéritonéales bi-quotidiennes. Le seuil de sensibilité mécanique est évalué par le test des filaments de von Frey avant la chirurgie correspondant à la ligne de base "B" et à plusieurs reprises après la chirurgie (A) Un traitement prolongé par le sildénafil à la dose de 0,005 mg/kg (n=5/groupe) n'induit aucun changement du seuil de sensibilité mécanique. (B) (C) (D) Un traitement par le sildénafil à 0,0075 mg/kg (n=5/groupe), à 0,01 mg/kg (n=6/groupe) ou à 0,02 mg/kg (n=6/groupe) soulage l'allodynie neuropathique. Les données sont exprimées en moyennes  $\pm$  SEM. Contra., controlatérale ; Ipsi., ipsilatérale ; Sal, saline.

## 2. Effet d'un traitement prolongé par un iPDE5 : dose-réponse

Le sildénafil, à la dose de 0,01 mg/kg et 0,02 mg/kg, bloque l'allodynie induite par la pose du manchon. Cet effet est toujours ipsilatéral et débute respectivement 12 et 14 jours après le début du traitement (**Figure R-5.C et D**). A la dose de 0,0075 mg/kg, correspondant à la DME, l'effet antiallodynique du sildénafil apparaît au 14<sup>ème</sup> jour de traitement (**Figure R-5.B**). Enfin, l'effet thérapeutique est perdu lorsque la dose de sildénafil est de 0,005 mg/kg (**Figure R-5.A**).

### D. Statistiques

Molécules	Analyse de la variance (ANOVA)			Analyse post-hoc (Test de Duncan)		
	Interaction	Statistique	P-valeur	Comparaison des groupes	Jours de traitement	P-valeur
Rol. (0,5 mg/kg)	Patte X Traitement X Temps	F <sub>11,330</sub> = 4,47	< 0,001	Cuff Rol. Ipsi. > Cuff Sal. Ipsi.	Jour 14-21	< 0,05
				Cuff Rol. Ipsi. = Cuff Sal. Contro.	Jour 16-21	> 0,05
Rol. (0,25 mg/kg)	Patte X Traitement X Temps	F <sub>11,242</sub> = 3,77	< 0,001	Cuff Rol. Ipsi. > Cuff Sal. Ipsi.	Jour 16-21	< 0,05
				Cuff Rol. Ipsi. = Cuff Sal. Contro.	Jour 19-21	> 0,05
Rol. (0,125 mg/kg)	Patte X Traitement X Temps	F <sub>13,208</sub> = 2,83	< 0,001	Cuff Rol. Ipsi. > Cuff Sal. Ipsi.	Jour 19-25	< 0,01
				Cuff Rol. Ipsi. = Cuff Sal. Contro.	Jour 25-28	> 0,05
Rol. (0,06 mg/kg)	Patte X Traitement X Temps	F <sub>8,144</sub> = 0,32	> 0,05			
Rol. (0,03mg/kg)	Patte X Traitement X Temps	F <sub>8,144</sub> = 0,42	> 0,05			
Sild. (0,02 mg/kg)	Patte X Traitement X Temps	F <sub>5,100</sub> = 4,03	< 0,01	Cuff Sild. Ipsi. > Cuff Sal. Ipsi.	Jour 14-21	< 0,01
				Cuff Sild. Ipsi. = Cuff Sal. Contro.	Jour 14-21	> 0,05
Sild. (0,01 mg/kg)	Patte X Traitement X Temps	F <sub>9,198</sub> = 6,51	< 0,001	Cuff Sild. Ipsi. > Cuff Sal. Ipsi.	Jour 12-21	< 0,001
				Cuff Sild. Ipsi. = Cuff Sal. Contro.	Jour 19-21	> 0,05
Sild. (0,075 mg/kg)	Patte X Traitement X Temps	F <sub>5,110</sub> = 3,77	< 0,01	Cuff Sild. Ipsi. > Cuff Sal. Ipsi.	Jour 14-21	< 0,05
				Cuff Sild. Ipsi. = Cuff Sal. Contro.	Jour 21	> 0,05
Sild. (0,005 mg/kg)	Patte X Traitement X Temps	F <sub>5,110</sub> = 0,53	> 0,05			

### E. Conclusion

Cette étude dose-réponse montre que l'effet antiallodynique du sildénafil et du rolipram reste présent à faible dose. Ces données indiquent, l'existence d'un effet « tout ou rien ». En effet, un traitement par le sildénafil ou le rolipram aux doses efficaces induit un soulagement complet de l'allodynie neuropathique. Au cours de cette étude, nous n'avons pas observé de doses pour lesquelles on a un soulagement partiel de l'allodynie mécanique, suggérant l'existence d'un effet seuil.

## **Chapitre 3**

# **Des antidépresseurs aux inhibiteurs de PDE : rôle du système opioïdérique**

## **I. Role of kappa opioid receptor in the antidepressant treatment of neuropathic pain**

**Salim Megat \***, Yohann Bohren \*, Stephane Doridot, Claire Gaveriaux-Ruff, Brigitte L. Kieffer, Marie-José Freund-Mercier, Ipek Yalcin and Michel Barrot

Les antidépresseurs tricycliques constituent le traitement de référence des douleurs neuropathiques (Attal et al., 2010). Les données précliniques ont mis en évidence que les récepteurs  $\delta$  des opioïdes (DOR) (Benbouzid et al., 2008c) mais pas les récepteurs  $\mu$  (MOR) (Bohren et al., 2010) sont nécessaires à l'effet antiallodymique des antidépresseurs. Dans cette étude, nous avons évalué le rôle des récepteurs  $\kappa$  des opioïdes (KOR).

Pour cela, nous avons utilisé un modèle de douleur neuropathique induit par la pose d'un manchon de polyéthylène « Cuff » autour de la branche principale du nerf sciatique (Benbouzid et al., 2008b). La compression induite par la pose du manchon entraîne l'apparition d'une allodynie mécanique ipsilatérale mesurée par le test des filaments de von Frey.

Un traitement prolongé par la nortriptyline soulage complètement l'allodynie neuropathique chez les animaux sauvages et déficients pour les KOR. Néanmoins, l'injection aiguë de norbinaltorphimine (nor-BNI), antagoniste des KOR, supprime l'effet thérapeutique de la nortriptyline. De manière intéressante, l'effet du nor-BNI est présent chez les animaux sauvages et déficients pour les KOR suggérant un effet non-sélectif de la molécule. En utilisant des administrations aiguës d'agonistes des DOR, des KOR ou des MOR, nous avons mis en évidence que la sélectivité du nor-BNI est dépendante du temps après l'injection. En effet, lorsque le test est effectué 60 minutes après l'injection, le nor-BNI bloque l'effet analgésique d'un agoniste des DOR et des KOR. A l'inverse, le nor-BNI bloque sélectivement l'effet analgésique d'un agoniste KOR lorsque le test est effectué 8 heures après l'injection.

Cette étude révèle que les KOR ne sont pas nécessaires à l'effet antiallodymique des antidépresseurs. Par ailleurs, le nor-BNI bloque l'effet antiallodymique de la nortriptyline, et cet effet semble lié à son action sur les DOR mais pas les MOR.

Dans cette étude j'ai participé à la réalisation des expériences, ainsi qu'à l'écriture de l'article. Le manuscrit est actuellement en révision.

## **Kappa-opioid receptors are not necessary for the antidepressant treatment of neuropathic pain**

Running title: kappa-opioid receptors and antidepressants

Salim Megat<sup>1,2\*</sup>, Yohann Bohren<sup>1,2\*</sup>, Stephane Doridot<sup>2</sup>, Claire Gaveriaux-Ruff<sup>2,3</sup>, Brigitte L. Kieffer<sup>3,4</sup>, Marie-José Freund-Mercier<sup>1,2</sup>, Ipek Yalcin<sup>1</sup> and Michel Barrot<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Institut des Neurosciences Cellulaires et Intégratives, Centre National de la Recherche Scientifique, Strasbourg, France; <sup>2</sup>Université de Strasbourg, Strasbourg, France; <sup>3</sup>Institut de Génétique et de Biologie Moléculaire et Cellulaire, Centre Nationale de la Recherche Scientifique UMR7104 - INSERM U964, Illkirch, France ; and <sup>4</sup>Douglas Hospital Research Center, McGill University, Montréal, Canada.

\*Salim Megat and Yohann Bohren equally contributed to this work.

**Correspondence** Dr. Michel Barrot, Institut des Neurosciences Cellulaires et Intégratives, 5 rue Blaise Pascal, 67084 Strasbourg cedex, France. Tel: (33) 3 90 24 14 50; fax: (33) 3 88 61 33 47; e-mail: mbarrot@inci-cnrs.unistra.fr

**Key words** antidepressant, neuropathic pain, mechanical allodynia, opioid receptors, morphine

## Summary

**BACKGROUND AND PURPOSE.** Tricyclic antidepressants are clinically first line treatments of neuropathic pain. Opioid receptors participate in this pain-relieving action, and preclinical studies in receptor-deficient mice have highlighted a critical role of the delta, but not mu opioid receptors. In this work, we address the question of the role of kappa opioid receptors (KOP) in the antiallodynic action of tricyclic antidepressants.

**EXPERIMENTAL APPROACH.** We used a model of neuropathic pain induced by unilateral sciatic nerve cuffing. In this model, the mechanical allodynia was evaluated using the von Frey filaments. Experiments were conducted in C57BL/6J mice, in KOP-deficient mice and their wild-type littermates. The tricyclic antidepressant nortriptyline (5 mg.kg<sup>-1</sup>) was delivered twice a day over two weeks. Agonists and antagonists of opioid receptors allowed testing the selectivity of the KOP antagonist norbinaltorphimine (nor-BNI) in mice with neuropathic pain.

**KEY RESULTS.** After 12 days of treatment, nortriptyline suppressed neuropathic allodynia in both wild-type and KOP-deficient mice. Surprisingly, acute nor-BNI reversed nortriptyline action in both wild-type and KOP-deficient mice. Further experiments exploring the time-dependent selectivity of nor-BNI showed that nor-BNI action is KOP-selective at a late time-point after administration (8 h), but not selective at a short time-point when it may also interact with delta opioid receptors.

**CONCLUSIONS AND IMPLICATIONS.** KOP are not necessary to the action of a tricyclic antidepressant against neuropathic allodynia. The KOP antagonist nor-BNI may not be selective at a short time-point after its administration. This time-dependent selectivity has to be taken into account when using nor-BNI to address KOP functions.

**Abbreviations:** ANOVA, analysis of variance; DOP, delta-opioid receptor; i.p, intraperitoneal; KOP, kappa-opioid receptor; MOP, mu-opioid receptor; nor-BNI, norbinaltorphimine; s.c, subcutaneous; SEM, standard error of the mean; SNRI, serotonin and noradrenaline reuptake inhibitors; SNC80, 4-[(R)-[(2S,5R)-2,5-dimethyl-4-prop-2-enylpiperazin-1-yl)-(3-methoxyphenyl)methyl]-N,N-diethylbenzamide; TCA, tricyclic antidepressant drugs; U-50,488H, trans-3,4-dichloro-N-methyl-N-[2-(1-pyrrolidinyl)-cyclohexyl]-benzeneacetamide.

## Introduction

Neuropathic pain is defined as a consequence of a lesion or a disease affecting the somatosensory system (Jensen *et al.*, 2011). It is generally a chronic condition resistant to classical analgesic drug (Attal *et al.*, 2010). The recommended pharmacotherapy for neuropathic pain includes the use of inhibitors of monoamines reuptake inhibitors, such as tricyclic antidepressant drugs (TCA) or serotonin and noradrenaline reuptake inhibitors (SNRI) (Dworkin *et al.*, 2007; Attal *et al.*, 2010). Preclinically, studies on TCA action in neuropathic pain models highlighted an implication of opioid receptors (Valverde *et al.*, 1994; Gray *et al.*, 1998; Marchand *et al.*, 2003; Anjaneyulu and Chopra 2006; Mico *et al.*, 2006; Nozaki and Kamei 2006; Benbouzid *et al.*, 2008a,b; Bohren *et al.*, 2010; Wattiez *et al.*, 2011). However, these pharmacological studies showed some discrepancies concerning the role of the different opioid receptors.

Some studies showed a preferential involvement of the delta opioid receptor (DOP) in the antinociceptive effect of antidepressants (Gray *et al.*, 1998; Schreiber *et al.*, 1999; Benbouzid *et al.*, 2008a), while others have shown an involvement of both mu opioid receptors (MOP) and DOP (Schreiber *et al.*, 2000; Marchand *et al.*, 2003; Nozaki and Kamei., 2006). The conflicting results observed in the literature may be related to differences between the models of neuropathic pain used or the studied symptom, but also to the limited *in vivo* selectivity of opioid receptor antagonists. The problems of selectivity may be solved in part by using genetic approaches with different opioid receptor knockout mice. Indeed, using a murine model of neuropathic pain that is sensitive to long-term but not acute antidepressant treatment (Benbouzid *et al.*, 2008a,b,c; Yalcin *et al.*, 2009), we recently showed that the antiallodynic effect of chronic nortriptyline treatment was lost in DOP-deficient mice (Benbouzid *et al.*, 2008c). Conversely this effect was maintained in MOP-deficient mice (Bohren *et al.*, 2010), demonstrating the critical role of DOP but not MOP in the antiallodynic action of a tricyclic antidepressant. However the role of kappa opioid receptors (KOP) in the neuropathic pain treatment remains unclear.

The endogenous kappa opioid system is involved in a variety of physiological processes including analgesia, addiction, antipruritic activity, diuresis, feeding, respiratory and cardiovascular functions (DeHaven-Hudkins and Dolle 2004; Feng *et al.*, 2012; Butelman *et al.*, 2013). KOP are widely expressed throughout the brain, spinal cord, and dorsal root ganglia (Minami and Satoh 1995; Sim and Childers 1997),

and they can display antinociceptive activity in a variety of animal pain models, particularly concerning visceral pain (Simonin *et al.*, 1998; Riviere, 2004). Moreover, mice lacking prodynorphin display increased tail-flick responses (Wang *et al.*, 2001), while an upregulation of dynorphin, an endogenous KOP ligand, occurs in the dorsal horn of the spinal cord following persistent inflammatory pain (Parra *et al.*, 2002). This is supportive of a pain modulation by the endogenous KOP pathway. In neuropathic pain models, the intraplantar injection of a KOP agonist produces a significant antinociceptive effect, reversed by the co-administration of the KOP antagonist nor-BNI (Keita *et al.*, 1995). A sustained release of endogenous prodynorphin-derived opioid peptides increases KOP activation in spinal dorsal horn and produces antinociceptive effects after sciatic nerve ligation (Xu *et al.*, 2004), and KOP-deficient mice have enhanced thermal hyperalgesic response, similar to nor-BNI treated mice following sciatic nerve ligation (Xu *et al.*, 2004). While the kappa opioid system can be altered in neuropathic condition, its implication in the therapeutic effect of antidepressant drugs is yet to be elucidated. A pharmacological study in neuropathic mice treated with the TCA nortriptyline showed that nor-BNI could acutely reverse the antiallodynic action of the chronic TCA treatment (Benbouzid *et al.*, 2008a). However, this effect was only present with 5 mg.kg<sup>-1</sup>, but not 2 mg.kg<sup>-1</sup>, of nor-BNI and has not been controlled using KOP-deficient mice.

In the present study we used genetic and pharmacological approaches to determine whether KOP participates to the action of nortriptyline in neuropathic pain. Our data provide evidence that KOP are not necessary for the antiallodynic action of nortriptyline. We also show that the KOP antagonist nor-BNI displays a time-dependent selectivity. In particular, it still acts in KOP knockout mice at short time-points after its subcutaneous administration, demonstrating its lack of acute selectivity.

## Methods

The nomenclature for drugs and for their molecular targets conforms to the British Journal of Pharmacology Guide to Receptors and Channels (Alexander *et al.*, 2013).

### *Animals*

The generation of mice lacking KOP was previously described (Simonin *et al.*, 1998). These mice were under a C57BL/6J background for over 10 generations. Heterozygotes mice (KOP<sup>+/-</sup>) were bred in our animal facilities, genotyped upon weaning, and the experiments were conducted on adult male KOP<sup>+/+</sup> and KOP<sup>-/-</sup> littermate mice weighing 25-30 g. The pharmacological experiments of Figure 5 used adult male C57BL/6J mice provided by the onsite breeding facilities of the Chronobiotron UMS3415, with ages between 8 and 12 weeks at surgery time.

Mice were group-housed three to five per cage, maintained under a 12-h light/dark cycle and allowed access to water and food *ad libitum*. The animal facilities are legally registered for animal experimentation under Animal House Agreement C67-482-1. All procedures were performed in accordance with the guidelines for animal experimentation of the International Association for the Study of pain (IASP) and the European Communities Council Directive 86/609. All studies involving animals are reported in accordance with the ARRIVE guidelines for reporting experiments involving animals (Kilkenny *et al.*, 2010; McGrath *et al.*, 2010) and a total of 192 animals were used in the experiments described here.

### *Neuropathic pain model*

The neuropathic pain was induced by inserting a cuff around the main branch of the right sciatic nerve (Benbouzid *et al.*, 2008c; Yalcin *et al.*, 2014). Surgeries were done under ketamine/xylazine anesthesia (ketamine: 17 mg.mL<sup>-1</sup>, xylazine: 2.5 mg.mL<sup>-1</sup>, intraperitoneal, 4 mL.kg<sup>-1</sup>) (Centravet, Taden, France). The common branch of the right sciatic nerve was exposed and a 2 mm section of split PE-20 polyethylene tubing (Harvard Apparatus, Les Ulis, France) was placed around it (Cuff group). The shaved skin was closed using suture. Sham-operated mice underwent the same surgical procedure described above without implantation of the cuff (Sham group).

### *Nociceptive test*

The mechanical threshold of hindpaw withdrawal was determined using von Frey hairs and results were expressed in grams (Bohren *et al.*, 2010; Barrot, 2012; Yalcin *et al.*, 2014). Mice were placed in clear Plexiglas® boxes (7 cm × 9 cm × 7 cm) on an elevated mesh screen. Calibrated von Frey filaments (Bioseb, Chaville, France) were applied to the plantar surface of each hindpaw in a series of ascending forces. Each filament was applied until it just bent. The gram value of the lower filament that gave a positive response, i.e. that induced at least 3 paw responses out of 5 trials, was considered as the paw withdrawal threshold for this animal. The effect of long-term antidepressant treatment was evaluated at given time-points (at least twice per week), before the morning antidepressant injection; the effect of acute drug injections was evaluated before (pre-test) and at different time-points (post-tests or time-course) following the injection of the considered drug.

### *Chemicals*

The following drugs were used: nortriptyline hydrochloride, norbinaltorphimine dihydrochloride (nor-BNI), naltrindole hydrochloride, 4-[(R)-[(2S,5R)-2,5-dimethyl-4-prop-2-enylpiperazin-1-yl)-(3-methoxyphenyl)methyl]-N,N-diethylbenzamide (SNC80) were obtained from Sigma-Aldrich (St Quentin Fallavier, France) and trans-3,4-dichloro-N-methyl-N-[2-(1-pyrrolidinyl)-cyclohexyl]-benzeneacetamide (U-50,488H) was obtained from Tocris Biosciences (Bristol, UK). Morphine sulphate was kindly supplied by Francopia (Paris, France). All the drugs were dissolved in 0.9% physiological saline solution (NaCl) that was also used for control injections.

### *Treatments*

The nortriptyline (5 mg.kg<sup>-1</sup>) treatment began 15 days after the surgery, and treatment lasted at least 20 days (Benbouzid *et al.*, 2008a). Both nortriptyline and NaCl solutions were administered intraperitoneally twice per day (morning and evening) in a volume of 5 mL.kg<sup>-1</sup>. The subcutaneous injection of the DOP antagonist naltrindole (5 mg.kg<sup>-1</sup>) or the KOP antagonist nor-BNI (5 mg.kg<sup>-1</sup>) was done after at least two weeks of nortriptyline treatment.

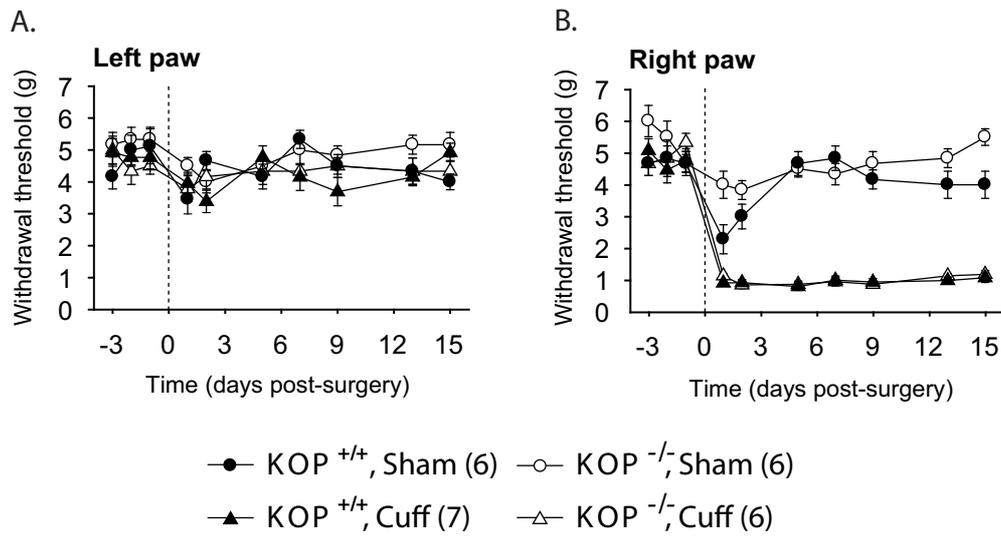
### *Pharmacological profile of nor-BNI*

The subcutaneous injection of morphine, of the KOP agonist U-50,488H or the DOP agonist SNC80 was done in the neuropathic condition only. At first, a pretreatment

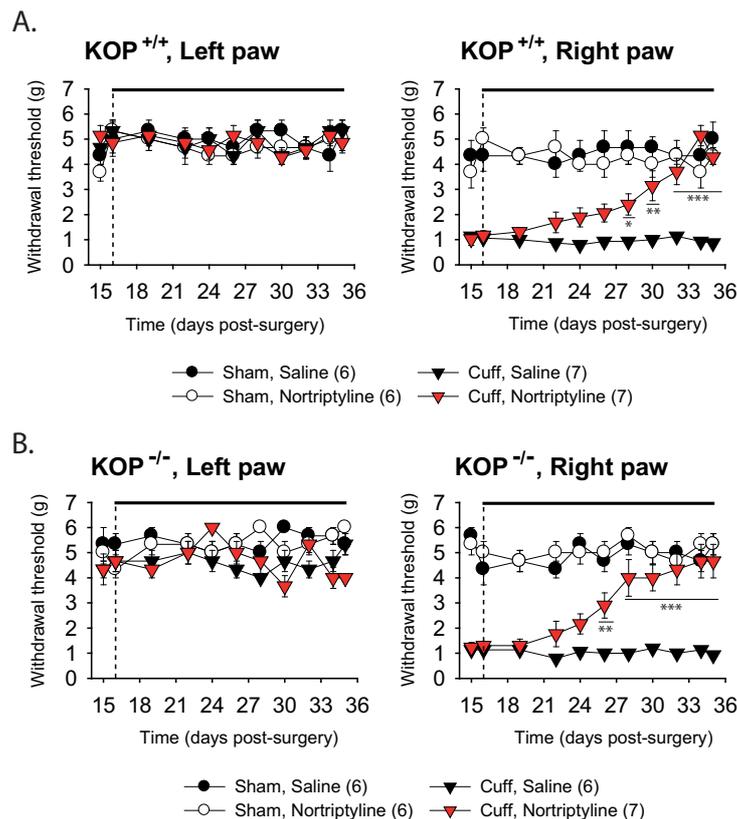
was done with nor-BNI or its control (NaCl 0.9%). To test the nor-BNI selectivity in the early phase after its injection, morphine (10 mg.kg<sup>-1</sup>), SNC80 (10 mg.kg<sup>-1</sup>) and U-50,488H (5 mg.kg<sup>-1</sup>) were injected 30 min later. The mice were tested before and 60 min after the pretreatment. To test the nor-BNI selectivity in the late phase after its injection, morphine, SNC80 and U-50,488H were injected 7 h 30 after the pretreatment. In this condition the mice were tested before and 8 h after the pretreatment. Each condition was tested in independent sets of mice.

#### *Statistical analysis*

Data are expressed as mean  $\pm$  SEM. Statistical analyses were performed using multifactor analysis of variance (ANOVA). The surgery procedure (Sham or Cuff) and the treatments (saline vs. drug injections) were taken as between-group factors. When needed, the time of test (either time course or preinjection vs. postinjection data) was taken as a within-subject factor. The Duncan test was used for post hoc comparisons. The significance level was set at  $P < 0.05$ .



**Figure 1 Long-lasting mechanical allodynia after sciatic nerve injury in KOP<sup>+/+</sup> and KOP<sup>-/-</sup> mice.** Unilateral cuffing of the main branch of the sciatic nerve induced long-lasting mechanical allodynia, as tested using von Frey filaments. (A) The cuff implantation did not affect the mechanical threshold of the contralateral paw (left paw). (B) The cuff implantation induced an ipsilateral (right paw) mechanical allodynia in both KOP<sup>+/+</sup> and KOP<sup>-/-</sup> mice. Data are expressed as mean  $\pm$  SEM, n (number of animals) are given between brackets.



**Figure 2 A chronic antidepressant treatment relieves neuropathic allodynia in KOP<sup>+/+</sup> and KOP<sup>-/-</sup> mice.** Nortriptyline treatment (5 mg.kg<sup>-1</sup>, i.p. twice injection per day) or its saline control (NaCl 0.9%) began on day 16 post-surgery and was maintained for at least 20 days (the black line above the graph indicates the treatment period). The mechanical threshold was measured before the morning drug injection to test the effect of chronic treatment. In KOP<sup>+/+</sup> (A) and KOP<sup>-/-</sup> mice (B), the antidepressant treatment did not affect the mechanical threshold of the contralateral paw (left paw), but it suppressed the neuropathic allodynia on the ipsilateral paw (right paw). Data are expressed in mean  $\pm$  SEM, n (number of animals) are given between brackets. \* P < 0.05, \*\* P < 0.01, \*\*\* P < 0.001 Cuff treated versus Cuff saline group.

## Results

### *Mechanical sensitivity*

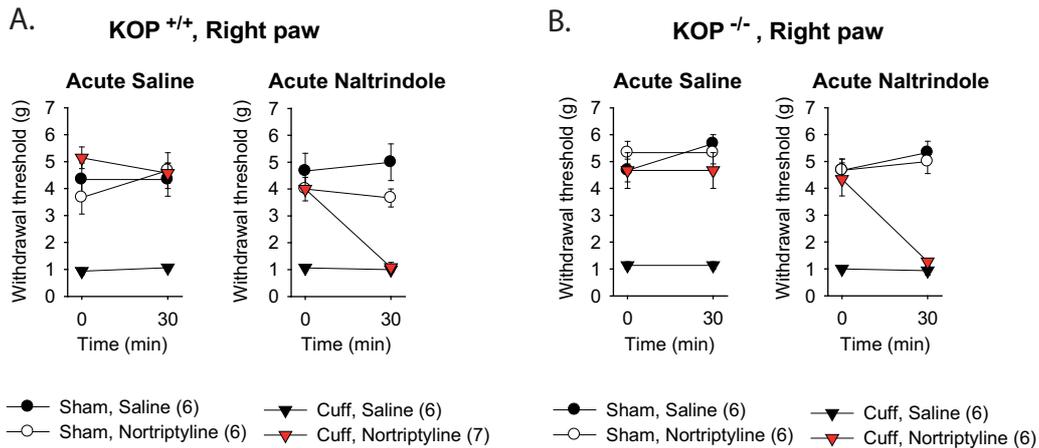
KOP<sup>-/-</sup> mice had the same baseline values for mechanical sensitivity as their wild-type littermates (Figure 1A and 1B). The sham surgery did not affect the long-term paw withdrawal threshold, although a transitory drop of mechanical sensitivity was observed after the surgical procedure (Figure 1B). Conversely, cuff-implanted mice showed long-lasting ipsilateral mechanical allodynia, which was present in KOP<sup>+/+</sup> and in KOP<sup>-/-</sup> mice (Surgery × Time interaction, KOP<sup>+/+</sup>  $F_{6,138} = 2.4$ ,  $P < 0.05$ , KOP<sup>-/-</sup>  $F_{6,132} = 2.4$ ,  $P < 0.05$ ; post-hoc: Cuff < Sham in each genotype at  $P < 0.0001$  on post-surgery days 1-15) (Figure 1B). No difference was observed in the allodynia measure depending on the presence or absence of the KOP (Genotype effect,  $F_{6,270} = 1.0$ ,  $P > 0.40$ ).

### *Antiallodynic effect of the antidepressant drug nortriptyline*

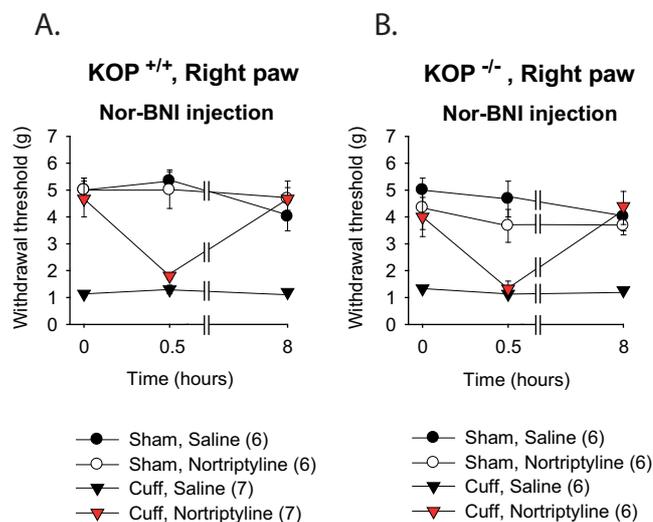
Two weeks after the surgery, we started the treatment with either nortriptyline (5 mg.kg<sup>-1</sup>) or the control saline solution (NaCl 0.9%). The mice received two injections per day and were tested in the morning before drug injection. Previous data reported that this treatment has no acute analgesic effect whereas it suppresses the neuropathic allodynia after 10 to 12 days of treatment (Benbouzid *et al.*, 2008a; Bohren *et al.*, 2010). Similarly, the nortriptyline treatment alleviated the cuff-induced allodynia in KOP<sup>+/+</sup> mice after about 12 days of treatment (Surgery × Treatment × Time interaction,  $F_{9,189} = 6.71$ ,  $P < 0.0001$ ; post-hoc: (CuffNor = Sham) > CuffSal at  $P < 0.01$  on post-surgery days 28-35) (Figure 2A). The same antiallodynic effect was also present in KOP<sup>-/-</sup> mice ( $F_{9,180} = 3.7$ ,  $P < 0.0001$ ; post-hoc: (CuffNor = Sham) > CuffSal at  $P < 0.01$  on post-surgery days 26-35) (Figure 2B). In both cases, nortriptyline suppressed the cuff-induced allodynia without affecting the mechanical threshold of the mice with sham surgery. Thus KOP did not appear necessary to the antiallodynic action of nortriptyline.

### *DOP antagonist effect*

Previous data highlighted a critical role of DOP in the antiallodynic action of nortriptyline (Benbouzid *et al.*, 2008a,b; Choucair-Jaafar *et al.*, 2014). We thus tested the effects of an acute injection of the DOP antagonist naltrindole (5 mg.kg<sup>-1</sup>) in the KOP<sup>+/+</sup> and KOP<sup>-/-</sup> mice. After at least 2 weeks of treatment with nortriptyline, the



**Figure 3 Acute DOP antagonist injection suppressed the antiallodynic effect of nortriptyline treatment in KOP<sup>+/+</sup> and KOP<sup>-/-</sup> mice.** After at least 2 weeks of antidepressant or saline treatment, the animals received an injection of the DOP antagonist naltrindole (5 mg.kg<sup>-1</sup>, s.c.) or its control saline solution. The mechanical threshold was measured before and 30 min after injection. (A) While acute saline injection did not change the paw withdrawal threshold, naltrindole induced a relapse of mechanical allodynia in neuropathic KOP<sup>+/+</sup> mice treated by nortriptyline. No effect of naltrindole or saline was seen in sham mice or in saline-treated neuropathic animals. (B) Similar results were obtained in KOP<sup>-/-</sup> mice. Data are expressed as mean  $\pm$  SEM, n (number of animals) are given between brackets.



**Figure 4 Acute nor-BNI injection suppressed the antiallodynic effect of nortriptyline treatment in KOP<sup>+/+</sup> and KOP<sup>-/-</sup> mice.** After at least 2 weeks of antidepressant or saline treatment, the animals received an injection of the KOP antagonist nor-BNI (5 mg.kg<sup>-1</sup>, s.c.) or its control saline solution. The mechanical threshold was measured before, 30 min and 8 h after nor-BNI injection. (A) nor-BNI induced a transitory relapse of mechanical allodynia in neuropathic KOP<sup>+/+</sup> mice treated by nortriptyline. (B) Similar results were obtained in KOP<sup>-/-</sup> mice. Data are expressed as mean  $\pm$  SEM, n (number of animals) are given between brackets.

injection of naltrindole acutely blocked the antiallodynic effect of nortriptyline (KOP<sup>+/+</sup>  $F_{1,20} = 10.6$ ,  $P < 0.01$ ; KOP<sup>-/-</sup>  $F_{1,20} = 9.8$ ,  $P < 0.01$ ) (Figure 3A and 3B). The injection of naltrindole induced a relapse of allodynia within 30 min after its administration, and this effect was present in both KOP<sup>-/-</sup> and KOP<sup>+/+</sup> mice. We also observed that naltrindole did not induce any change in the mechanical sensitivity of mice with sham surgery or of neuropathic mice treated with saline (Figure 3A and 3B).

#### *KOP antagonist effect*

A previous study showed that an acute administration of 5 mg.kg<sup>-1</sup> of the KOP antagonist nor-BNI, but not 2 mg.kg<sup>-1</sup>, attenuated the antidepressant-induced antiallodynic action (Benbouzid *et al.*, 2008a). On account of discrepancies between pharmacological and knockout results, we then tested the consequences of an injection of nor-BNI (5 mg.kg<sup>-1</sup>) in the KOP<sup>+/+</sup> and KOP<sup>-/-</sup> mice. After at least 2 weeks of treatment with nortriptyline or saline, the injection of nor-BNI suppressed the antiallodynic effect of nortriptyline treatment (Figure 4A). This effect was however present both in KOP<sup>+/+</sup> and KOP<sup>-/-</sup> mice when we tested mice 30 min after nor-BNI injection (KOP<sup>+/+</sup>  $F_{1,20} = 3.4$ ,  $P < 0.05$ ; KOP<sup>-/-</sup>  $F_{1,20} = 3.4$ ,  $P < 0.05$ ; post-hoc: (CuffNor = CuffSal) < Sham at  $P < 0.001$ ) (Figure 4A and 4B). The effect of nor-BNI in KOP<sup>-/-</sup> mice supported a lack of selectivity of the nor-BNI at the 30 min time point. Previous studies showed that nor-BNI has long-lasting KOP antagonist activity (Spanagel *et al.*, 1994; Patkar *et al.*, 2013). Moreover, it was proposed that nor-BNI may act on MOP in the first hour after its administration, whereas the KOP antagonistic action gradually increases, reaching its maximum effect a few hours after the injection (Endoh *et al.*, 1992; Wettstein and Grouhel 1996). Therefore we tested the mice 8 h after the nor-BNI injection and at this time-point the nor-BNI had no more effect on the mechanical threshold in both KOP<sup>+/+</sup> and KOP<sup>-/-</sup> neuropathic nortriptyline-treated mice (Figure 4A and 4B).

#### *Time-dependent selectivity of nor-BNI*

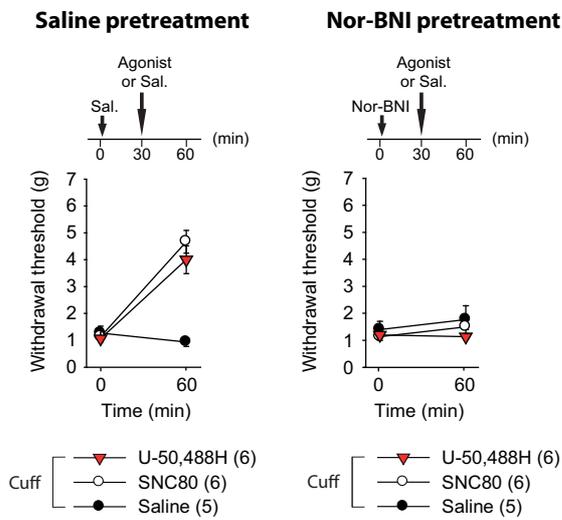
To further study the selectivity of nor-BNI, we analyzed the antiallodynic action of a KOP agonist, U-50,488H (5 mg.kg<sup>-1</sup>), and a DOP agonist, SNC80 (10 mg.kg<sup>-1</sup>) in neuropathic mice. We observed an acute antiallodynic action of the KOP and DOP agonists 60 min after a saline pretreatment ( $F_{1,15} = 26.4$ ,  $P < 0.0001$ ; post-hoc (U-50,488H = SNC80) > Sal,  $P < 0.0001$ ). However, these antiallodynic effects of U-50,488H

or SNC80 were lost 60 min after nor-BNI pretreatment ( $F_{1,15} = 0.5$ ,  $P > 0.6$ ) (Figure 5A). Therefore, at a short time-point, the nor-BNI is able to block the antiallodynic effect of both a KOP and a DOP agonist.

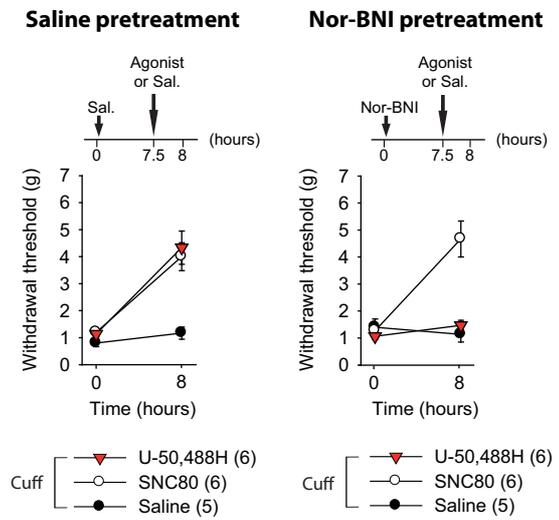
We then did a similar experiment 8 h after a saline or nor-BNI pretreatment. The KOP and DOP agonists displayed an antiallodynic action after the saline pretreatment ( $F_{1,15} = 11.00$ ,  $P < 0.01$ ; post-hoc (U-50,488H = SNC80) > Sal,  $P < 0.0001$ ), but 8 h after the nor-BNI pretreatment the antinociceptive action of the KOP agonist was blocked whereas the DOP agonist remained fully effective ( $F_{1,15} = 19.6$ ,  $P < 0.0001$ ; post-hoc: (U-50,488H = Sal) < SNC80 at  $P < 0.001$ ) (Figure 5B). These data illustrate that nor-BNI become selective of the KOP few hours after its injection, but may affect DOP at short time-points.

Last, we tested whether nor-BNI could block the antiallodynic effect of morphine (10 mg.kg<sup>-1</sup>), which acts mainly through the MOP to induce its analgesic action (Matthes *et al.*, 1996; Sora *et al.*, 1997). We observed that nor-BNI had no effect on the morphine-induced mechanical analgesia whether 60 min ( $F_{1,10} = 0.02$ ,  $P > 0.8$ ) (Figure 5C) or 8 h ( $F_{1,10} = 0.8$ ,  $P > 0.1$ ) (Figure 5D) after nor-BNI pretreatment. These experiments show that nor-BNI becomes selective for the KOP several hours after injection, and the non-specific effect observed at the short time-point was mainly due to an action on DOP but not on MOP.

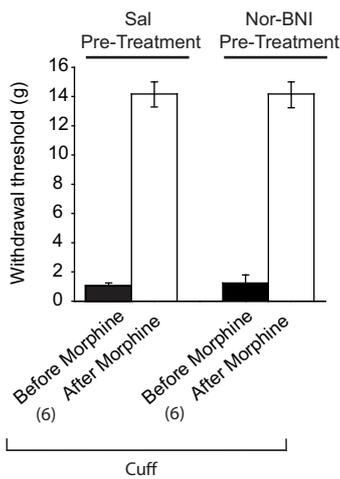
**A. 60 minutes after Nor-BNI pretreatment**



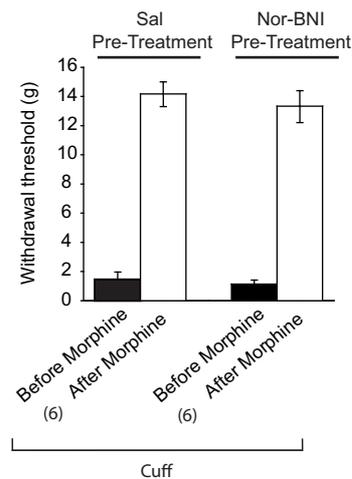
**B. 8 hours after Nor-BNI pretreatment**



**C. 60 minutes after Nor-BNI pretreatment**



**D. 8 hours after Nor-BNI pretreatment**



**Figure 5 The KOP antagonist nor-BNI has a time-dependent selectivity for opioid receptors.**

(A) A pretreatment with saline (s.c.) or nor-BNI (5 mg.kg<sup>-1</sup>, s.c.) was done in neuropathic animals (cuff). The mice then received an acute administration of a DOP agonist (SNC80, 10 mg.kg<sup>-1</sup>, s.c.), a KOP agonist (U-50,488H, 5 mg.kg<sup>-1</sup>, s.c.) or of saline 30 min after the nor-BNI injection, and the mechanical threshold was tested before and 60 min after the pretreatment. Nor-BNI prevented the analgesic effect of both agonists. (B) The same procedure was used, except that the DOP and KOP agonists were administered 7 h 30 after nor-BNI pretreatment, and the hindpaw mechanical threshold was tested before and 8 h after pretreatment. Nor-BNI prevented the antiallodynic effect of the KOP agonist but not of the DOP agonist. (C) (D) The effect of nor-BNI was also evaluated on morphine-induced analgesia (10 mg.kg<sup>-1</sup>, s.c.) in neuropathic animals (cuff). Nor-BNI did not affect the morphine-induced analgesia, whether morphine was administered 30 min (C) or 7 h 30 (D) after nor-BNI. Data are expressed as mean ± SEM, n (number of animals) are given between brackets.

## Discussion and conclusions

In this work, we studied the involvement of KOP in the antiallodynic action of the tricyclic antidepressant nortriptyline. We show that KOP is not necessary to this antiallodynic action, while a DOP antagonist suppresses it. Finally, we provide evidence supporting the poor selectivity of nor-BNI at short time-points after its injection.

The basal mechanical sensitivity was similar in KOP<sup>+/+</sup> and KOP<sup>-/-</sup> mice. This is in agreement with findings from other laboratories (Xu *et al.*, 2004; Schepers *et al.*, 2008), even though a study also detected a slight reduction in the basal mechanical sensitivity threshold in the KOP<sup>-/-</sup> mice (Gaveriaux-Ruff *et al.*, 2008), which may depend on the von Frey testing procedure (Barrot, 2012). Following induction of the neuropathy by sciatic nerve cuffing, the intensity of the mechanical allodynia was also similar for both genotypes. However, it should be noted that enhanced allodynia can be observed in another model of neuropathic pain (Xu *et al.*, 2004). In certain conditions, KOP may thus have a modulatory action on mechanical sensitivity, but these receptors do not play a critical role in the establishment or the maintenance of neuropathic allodynia.

Behavioral pharmacology studies have shown that the antidepressant-induced analgesia can be inhibited by naloxone, a non-selective opioid receptors antagonist (Biegon and Samuel 1980; Eschalier *et al.*, 1981; Gray *et al.*, 1998). Moreover, it has also been proposed that chronic antidepressant treatment can change the opioid receptors densities and increase the level of opioid peptides in different regions of the nervous system (Antkiewicz-Michaluk *et al.*, 1987; Hamon *et al.*, 1987). While some authors pharmacologically suggested an implication of MOP (Schreiber *et al.*, 2000; Marchand *et al.*, 2003), this is not supported by study in MOP deficient mice (Bohren *et al.*, 2010) and DOP appears to be a major target of the antiallodynic action of antidepressants (Gray *et al.*, 1998; Schreiber *et al.*, 1999; Ozturk *et al.*, 2006; Benbouzid *et al.*, 2008c; Choucair-Jaafar *et al.*, 2014). The link between the opioid system and antidepressant drugs is not limited to their action in a pain context (Lutz and Kieffer 2013). Indeed, the pharmacological blockade of opioid receptors suppresses the antidepressant effect of antidepressant compounds in a behavioral model of depression (Berrocoso *et al.*, 2004). DOP deficient mice display anxiogenic and depressive-like behavior compared to the wild-type animals (Filliol *et al.*, 2000), and DOP recruitment by a selective agonist has antidepressant-like effects in rodents

(Pradhan *et al.*, 2011). Although the opioidergic system appears to be a common target for the treatment of depression and pain, the precise downstream mechanism involved remains to be elucidated.

The role of the KOP in the antidepressant treatment of neuropathic pain remains controversial, only few studies suggested an implication of the KOP (Schreiber *et al.*, 1999; Schreiber *et al.*, 2002; Benbouzid *et al.*, 2008a). Using a genetic approach, we observe that the therapeutic benefit of a chronic antidepressant treatment remains present in KOP<sup>-/-</sup> mice. These results suggest that, as for MOP (Bohren *et al.*, 2010), KOP is not necessary for the antiallodynic effect of nortriptyline. However, it has been previously shown that the acute administration of the KOP antagonist nor-BNI acutely suppressed the antiallodynic effect of chronic nortriptyline treatment (Benbouzid *et al.*, 2008a). We presently confirm this acute action of nor-BNI, but we observed it in both wild-type and KOP<sup>-/-</sup> mice.

Our data may question the *in vivo* selectivity of nor-BNI. Nor-BNI has a high *in vitro* binding selectivity on KOP versus MOP and DOP receptors, with Ki values of 0.28, 47.2 and 42.9 nM for KOP, MOP and DOP receptors, respectively (Takemori *et al.*, 1988). Although nor-BNI has a high KOP antagonist activity *in vitro* (Takemori *et al.*, 1988) and a long-lasting KOP antagonist activity *in vivo* (Endoh *et al.*, 1992; Horan *et al.*, 1992; Broadbear *et al.*, 1994), the temporal component seems to be a critical factor for its *in vivo* selectivity (Endoh *et al.*, 1992; Spanagel *et al.*, 1994). For example, in the tail pinch test the KOP antagonistic action of nor-BNI gradually increases to reach a maximum effect at 2 h and is maintained over 4 days (Endoh *et al.*, 1992). Moreover, nor-BNI (10 mg.kg<sup>-1</sup>) can still be present in brain homogenates up to 21 days after a single intraperitoneal administration, and is still able to block KOP agonist-induced analgesia 7 days after nor-BNI pretreatment (Patkar *et al.*, 2013). This nor-BNI long lasting action *in vivo* (Horan *et al.*, 1992; Butelman *et al.*, 1993; Broadbear *et al.*, 1994) is present despite a non-covalent binding *in vitro* (Bruchas *et al.*, 2007). However, it should be noted that previous pharmacokinetics studies (Kishioka *et al.*, 2013; Patkar *et al.*, 2013) have only detected the nor-BNI molecule itself, which cannot exclude the possibility that nor-BNI is also biotransformed *in vivo* to long-lasting metabolites that covalently bind to KOP (Bruchas *et al.*, 2007). Nor-BNI has also been reported to antagonize morphine but not U-50,488H-induced analgesia in the first 30 min after its administration (Endoh *et al.*, 1992). The non-selective activity of nor-BNI may in some cases be explained by doses. It appears to be the case for its interaction with MOP-

related mechanisms: nor-BNI suppressed morphine-induced analgesia at a very high dose (30 mg.kg<sup>-1</sup>) but not at milder doses (3 and 10 mg.kg<sup>-1</sup>) (Wettstein and Grouhel 1996), which is in agreement with our results showing no effect of 5 mg.kg<sup>-1</sup> nor-BNI on morphine-induced analgesia. At a dose often used for *in vivo* studies (Butelman *et al.*, 1993; Menendez *et al.*, 1993), our study evidences an interaction of nor-BNI with DOP-related mechanisms at short time points after its administration, but supports the KOP selectivity 8 h after nor-BNI administration. Lastly, we can note that our experiments were all conducted on the antiallodynic action in a model of neuropathic pain. Most of the studies that showed a time-dependent selectivity of nor-BNI on the KOP have been done with naïve animals (Endoh *et al.*, 1992; Horan *et al.*, 1992; Butelman *et al.*, 1993). However, some works have shown neuropathy-induced plasticity in the endogenous kappa opioid system (Stevens *et al.*, 1991; Xu *et al.*, 2004). Therefore we cannot rule out the possibility that a yet unknown mechanism induces off-target actions of nor-BNI in a neuropathic pain state.

In conclusion, KOP are not necessary for the antiallodynic action of the tricyclic antidepressant nortriptyline. Together with previous studies on opioid receptor deficient mice, the present findings support the idea that DOP is the only opioid receptor critical for the relief of neuropathic mechanical allodynia after tricyclic antidepressant treatment. Furthermore, caution should be taken when using nor-BNI as KOP antagonist for behavioral studies. In particular, its time-dependent selectivity should be taken into account.

### **Acknowledgments**

This work was supported by the Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS, UPR3212), the University of Strasbourg and the Neurex network (Program Interreg IV Upper Rhine).

### **List of authors contributions**

MB, SM, YB and IY designed the experiments. SM and YB performed and analyzed the experiments. IY performed the surgeries. BK and CG supplied the transgenic mouse breeders. SD managed the transgenic mouse colonies. MB, SM, MJF, IY, CG and BK wrote the article.

### **Conflicts of interest**

The authors state no conflict of interest.

## References

- Alexander, SP, Benson, HE, Faccenda, E, Pawson, AJ, Sharman, JL, Spedding, M *et al.* (2013). The Concise Guide to PHARMACOLOGY 2013/14: G protein-coupled receptors. *Br J Pharmacol* **170**: 1459-1581.
- Anjaneyulu, M, Chopra, K (2006). Possible involvement of cholinergic and opioid receptor mechanisms in fluoxetine mediated antinociception response in streptozotocin-induced diabetic mice. *Eur J Pharmacol* **538**: 80-84.
- Antkiewicz-Michaluk, L, Michaluk, J, Rokosz-Pelc, A, Marona-Lewicka, D, Vetulani, J (1987). The effect of chronic imipramine and electroconvulsive shock treatment on [3H]DADLE binding to cortical membranes of rats pretreated with chronic reserpine or 6-hydroxydopamine. *Pharmacol Biochem Behav* **26**: 203-206.
- Attal, N, Cruccu, G, Baron, R, Haanpaa, M, Hansson, P, Jensen, TS *et al.* (2010). EFNS guidelines on the pharmacological treatment of neuropathic pain: 2010 revision. *Eur J Neurol* **17**: 1113-e1188.
- Barrot, M (2012). Tests and models of nociception and pain in rodents. *Neuroscience* **211**: 39-50.
- Benbouzid, M, Choucair-Jaafar, N, Yalcin, I, Waltisperger, E, Muller, A, Freund-Mercier, MJ *et al.* (2008a). Chronic, but not acute, tricyclic antidepressant treatment alleviates neuropathic allodynia after sciatic nerve cuffing in mice. *Eur J Pain* **12**: 1008-1017.
- Benbouzid, M, Gaveriaux-Ruff, C, Yalcin, I, Waltisperger, E, Tessier, LH, Muller, A *et al.* (2008b). Delta-opioid receptors are critical for tricyclic antidepressant treatment of neuropathic allodynia. *Biol Psychiatry* **63**: 633-636.
- Benbouzid, M, Pallage, V, Rajalu, M, Waltisperger, E, Doridot, S, Poisbeau, P *et al.* (2008c). Sciatic nerve cuffing in mice: a model of sustained neuropathic pain. *Eur J Pain* **12**: 591-599.
- Berrocioso, E, Rojas-Corrales, MO, Mico, JA (2004). Non-selective opioid receptor antagonism of the antidepressant-like effect of venlafaxine in the forced swimming test in mice. *Neurosci Lett* **363**: 25-28.
- Biegon, A, Samuel, D (1980). Interaction of tricyclic antidepressants with opiate receptors. *Biochem Pharmacol* **29**: 460-462.
- Bohren, Y, Karavelic, D, Tessier, LH, Yalcin, I, Gaveriaux-Ruff, C, Kieffer, BL *et al.* (2010). Mu-opioid receptors are not necessary for nortriptyline treatment of neuropathic allodynia. *Eur J Pain* **14**: 700-704.

Broadbear, JH, Negus, SS, Butelman, ER, de Costa, BR, Woods, JH (1994). Differential effects of systemically administered nor-binaltorphimine (nor-BNI) on kappa-opioid agonists in the mouse writhing assay. *Psychopharmacology (Berl)* **115**: 311-319.

Bruchas, MR, Yang, T, Schreiber, S, Defino, M, Kwan, SC, Li, S *et al* (2007). Long-acting kappa opioid antagonists disrupt receptor signaling and produce noncompetitive effects by activating c-Jun N-terminal kinase. *J Biol Chem* **282**: 29803-29811.

Butelman, ER, Negus, SS, Ai, Y, de Costa, BR, Woods, JH (1993). Kappa opioid antagonist effects of systemically administered nor-binaltorphimine in a thermal antinociception assay in rhesus monkeys. *J Pharmacol Exp Ther* **267**: 1269-1276.

Butelman, ER, Yuferov, V, Kreek, MJ (2012). kappa-opioid receptor/dynorphin system: genetic and pharmacotherapeutic implications for addiction. *Trends Neurosci* **35**: 587-596.

Choucair-Jaafar, N, Salvat, E, Freund-Mercier, MJ, Barrot, M (2014). The antiallodynic action of nortriptyline and terbutaline is mediated by beta(2) adrenoceptors and delta opioid receptors in the ob/ob model of diabetic polyneuropathy. *Brain Res* **1546**: 18-26.

DeHaven-Hudkins, DL, Dolle, RE (2004). Peripherally restricted opioid agonists as novel analgesic agents. *Curr Pharm Des* **10**: 743-757.

Dworkin, RH, O'Connor, AB, Backonja, M, Farrar, JT, Finnerup, NB, Jensen, TS *et al.* (2007). Pharmacologic management of neuropathic pain: evidence-based recommendations. *Pain* **132**: 237-251.

Endoh, T, Matsuura, H, Tanaka, C, Nagase, H (1992). Nor-binaltorphimine: a potent and selective kappa-opioid receptor antagonist with long-lasting activity in vivo. *Arch Int Pharmacodyn Ther* **316**: 30-42.

Eschalier, A, Montastruc, JL, Devoize, JL, Rigal, F, Gaillard-Plaza, G, Pechadre, JC (1981). Influence of naloxone and methysergide on the analgesic effect of clomipramine in rats. *Eur J Pharmacol* **74**: 1-7.

Feng, Y, He, X, Yang, Y, Chao, D, Lazarus, LH, Xia, Y (2012). Current research on opioid receptor function. *Curr Drug Targets* **13**: 230-246.

Filliol, D, Ghozland, S, Chluba, J, Martin, M, Matthes, HW, Simonin, F *et al.* (2000). Mice deficient for delta- and mu-opioid receptors exhibit opposing alterations of emotional responses. *Nat Genet* **25**: 195-200.

Gaveriaux-Ruff, C, Karchewski, LA, Hever, X, Matifas, A, Kieffer, BL (2008). Inflammatory pain is enhanced in delta opioid receptor-knockout mice. *Eur J Neurosci* **27**: 2558-2567.

Gray, AM, Spencer, PS, Sewell, RD (1998). The involvement of the opioidergic system in the antinociceptive mechanism of action of antidepressant compounds. *Br J Pharmacol* **124**: 669-674.

Hamon, M, Gozlan, H, Bourgoin, S, Benoliel, JJ, Mauborgne, A, Taquet, H *et al* (1987). Opioid receptors and neuropeptides in the CNS in rats treated chronically with amoxapine or amitriptyline. *Neuropharmacology* **26**: 531-539.

Horan, P, Taylor, J, Yamamura, HI, Porreca, F (1992). Extremely long-lasting antagonistic actions of nor-binaltorphimine (nor-BNI) in the mouse tail-flick test. *J Pharmacol Exp Ther* **260**: 1237-1243.

Jensen, TS, Baron, R, Haanpaa, M, Kalso, E, Loeser, JD, Rice, AS *et al* (2011). A new definition of neuropathic pain. *Pain* **152**: 2204-2205.

Keita, H, Kayser, V, Guilbaud, G (1995). Antinociceptive effect of a kappa-opioid receptor agonist that minimally crosses the blood-brain barrier (ICI 204448) in a rat model of mononeuropathy. *Eur J Pharmacol* **277**: 275-280.

Kilkenny, C, Browne, W, Cuthill, IC, Emerson, M, Altman, DG (2010). Animal research: reporting in vivo experiments: the ARRIVE guidelines. *Br J Pharmacol* **160**: 1577-1579.

Kishioka, S, Kiguchi, N, Kobayashi, Y, Yamamoto, C, Saika, F, Wakida, N *et al* (2013). Pharmacokinetic evidence for the long-lasting effect of nor-binaltorphimine, a potent kappa opioid receptor antagonist, in mice. *Neurosci Lett* **552**: 98-102.

Lutz, PE, Kieffer, BL (2013). Opioid receptors: distinct roles in mood disorders. *Trends Neurosci* **36**: 195-206.

Marchand, F, Ardid, D, Chapuy, E, Alloui, A, Jourdan, D, Eschalier, A (2003). Evidence for an involvement of supraspinal delta- and spinal mu-opioid receptors in the antihyperalgesic effect of chronically administered clomipramine in mononeuropathic rats. *J Pharmacol Exp Ther* **307**: 268-274.

Matthes, HW, Maldonado, R, Simonin, F, Valverde, O, Slowe, S, Kitchen, I *et al* (1996). Loss of morphine-induced analgesia, reward effect and withdrawal symptoms in mice lacking the mu-opioid-receptor gene. *Nature* **383**: 819-823.

McGrath, JC, Drummond, GB, McLachlan, EM, Kilkenny, C, Wainwright, CL (2010). Guidelines for reporting experiments involving animals: the ARRIVE guidelines. *Br J Pharmacol* **160**: 1573-1576.

Menendez, L, Andres-Trelles, F, Hidalgo, A, Baamonde, A (1993). Involvement of spinal kappa opioid receptors in a type of footshock induced analgesia in mice. *Brain Res* **611**: 264-271.

Minami, M, Satoh, M (1995). Molecular biology of the opioid receptors: structures, functions and distributions. *Neurosci Res* **23**: 121-145.

Nozaki, C, Kamei, J (2006). Possible involvement of opioidergic systems in the antinociceptive effect of the selective serotonin reuptake inhibitors in sciatic nerve-injured mice. *Eur J Pharmacol* **552**: 99-104.

Ozturk, Y, Aydin, S, Beis, R, Herekman-Demir, T (2006). The involvement of endogenous opioid mechanisms in the antinociceptive effects induced by antidepressant drugs, desipramine and trimipramine. *Pharmacol Biochem Behav* **83**: 592-597.

Parra, MC, Nguyen, TN, Hurley, RW, Hammond, DL (2002). Persistent inflammatory nociception increases levels of dynorphin 1-17 in the spinal cord, but not in supraspinal nuclei involved in pain modulation. *J Pain* **3**: 330-336.

Patkar, KA, Wu, J, Ganno, ML, Singh, HD, Ross, NC, Rasakham, K *et al.* (2013). Physical presence of nor-binaltorphimine in mouse brain over 21 days after a single administration corresponds to its long-lasting antagonistic effect on kappa-opioid receptors. *J Pharmacol Exp Ther* **346**: 545-554.

Pradhan, AA, Befort, K, Nozaki, C, Gaveriaux-Ruff, C, Kieffer, BL (2011). The delta opioid receptor: an evolving target for the treatment of brain disorders. *Trends Pharmacol Sci* **32**: 581-590.

Riviere, PJ (2004). Peripheral kappa-opioid agonists for visceral pain. *Br J Pharmacol* **141**: 1331-1334.

Schepers, RJ, Mahoney, JL, Gehrke, BJ, Shippenberg, TS (2008). Endogenous kappa-opioid receptor systems inhibit hyperalgesia associated with localized peripheral inflammation. *Pain* **138**: 423-439.

Schreiber, S, Backer, MM, Herman, I, Shamir, D, Boniel, T, Pick, CG (2000). The antinociceptive effect of trazodone in mice is mediated through both mu-opioid and serotonergic mechanisms. *Behav Brain Res* **114**: 51-56.

Schreiber, S, Backer, MM, Pick, CG (1999). The antinociceptive effect of venlafaxine in mice is mediated through opioid and adrenergic mechanisms. *Neurosci Lett* **273**: 85-88.

Schreiber, S, Bleich, A, Pick, CG (2002). Venlafaxine and mirtazapine: different mechanisms of antidepressant action, common opioid-mediated antinociceptive

effects--a possible opioid involvement in severe depression? *J Mol Neurosci* **18**: 143-149.

Sim, LJ, Childers, SR (1997). Anatomical distribution of mu, delta, and kappa opioid- and nociceptin/orphanin FQ-stimulated [35S]guanylyl-5'-O-(gamma-thio)-triphosphate binding in guinea pig brain. *J Comp Neurol* **386**: 562-572.

Simonin, F, Valverde, O, Smadja, C, Slowe, S, Kitchen, I, Dierich, A *et al.* (1998). Disruption of the kappa-opioid receptor gene in mice enhances sensitivity to chemical visceral pain, impairs pharmacological actions of the selective kappa-agonist U-50,488H and attenuates morphine withdrawal. *EMBO J* **17**: 886-897.

Sora, I, Takahashi, N, Funada, M, Ujike, H, Revay, RS, Donovan, DM *et al.* (1997). Opiate receptor knockout mice define mu receptor roles in endogenous nociceptive responses and morphine-induced analgesia. *Proc Natl Acad Sci USA* **94**: 1544-1549.

Spanagel, R, Almeida, OF, Shippenberg, TS (1994). Evidence that nor-binaltorphimine can function as an antagonist at multiple opioid receptor subtypes. *Eur J Pharmacol* **264**: 157-162.

Stevens, CW, Kajander, KC, Bennett, GJ, Seybold, VS (1991). Bilateral and differential changes in spinal mu, delta and kappa opioid binding in rats with a painful, unilateral neuropathy. *Pain* **46**: 315-326.

Takemori, AE, Ho, BY, Naeseth, JS, Portoghese, PS (1988). Nor-binaltorphimine, a highly selective kappa-opioid antagonist in analgesic and receptor binding assays. *J Pharmacol Exp Ther* **246**: 255-258.

Valverde, O, Mico, JA, Maldonado, R, Mellado, M, Gibert-Rahola, J (1994). Participation of opioid and monoaminergic mechanisms on the antinociceptive effect induced by tricyclic antidepressants in two behavioural pain tests in mice. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* **18**: 1073-1092.

Wang, Z, Gardell, LR, Ossipov, MH, Vanderah, TW, Brennan, MB, Hochgeschwender, U *et al.* (2001). Pronociceptive actions of dynorphin maintain chronic neuropathic pain. *J Neurosci* **21**: 1779-1786.

Wattiez, AS, Libert, F, Privat, AM, Loiodice, S, Fialip, J, Eschalier, A *et al.* (2011). Evidence for a differential opioidergic involvement in the analgesic effect of antidepressants: prediction for efficacy in animal models of neuropathic pain? *Br J Pharmacol* **163**: 792-803.

Wettstein, JG, Grouhel, A (1996). Opioid antagonist profile of SC nor-binaltorphimine in the formalin paw assay. *Pharmacol Biochem Behav* **53**: 411-416.

Xu, M, Petraschka, M, McLaughlin, JP, Westenbroek, RE, Caron, MG, Lefkowitz, RJ *et al.* (2004). Neuropathic pain activates the endogenous kappa opioid system in mouse spinal cord and induces opioid receptor tolerance. *J Neurosci* **24**: 4576-4584.

Yalcin, I, Choucair-Jaafar, N, Benbouzid, M, Tessier, LH, Muller, A, Hein, L *et al* (2009). beta(2)-adrenoceptors are critical for antidepressant treatment of neuropathic pain. *Ann Neurol* **65**: 218-225.

Yalcin, I, Megat, S, Barthas, F, Waltisperger, E, Kremer, M, Salvat, E *et al.* (2014). The sciatic nerve cuffing model of neuropathic pain in mice. *J. Vis. Exp (J Vis Exp* **89**:e51608).

## II. Rôle du système opioïdergique dans l'effet thérapeutique des $\beta_2$ -agonistes

### A. Introduction

Bien que l'implication du système opioïdergique dans l'effet antiallodynique des antidépresseurs ne fasse plus de doute, peu d'études se sont intéressées à son rôle dans l'effet thérapeutique des  $\beta_2$ -agonistes. Une étude relate que l'administration aiguë de naltrindole, antagoniste des DOR, supprime l'effet antiallodynique d'un  $\beta_2$ -agoniste (Yalcin et al., 2010). Cette spécificité de l'implication des DOR reste tout de même à confirmer en utilisant des souris déficientes pour les MOR, les DOR ou les KOR.

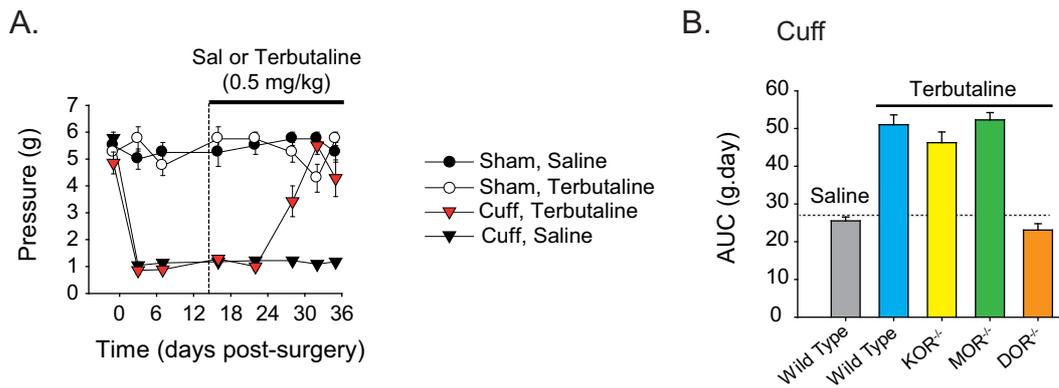
### B. Protocole

La génération des souris déficientes pour les MOR, DOR et KOR a été décrite précédemment (Matthes et al., 1996; Simonin et al., 1998; Filliol et al., 2000). Les expériences sont menées sur des mâles adultes. Le traitement prolongé par la terbutaline (0,5 mg/kg, i.p.) est effectué selon le même schéma expérimental que précédemment (Section **Méthodes générales, III-B et C**). A l'issue de la période traitement une injection de naltrindole (5 mg/kg, s.c.), antagoniste des DOR, a été réalisée.

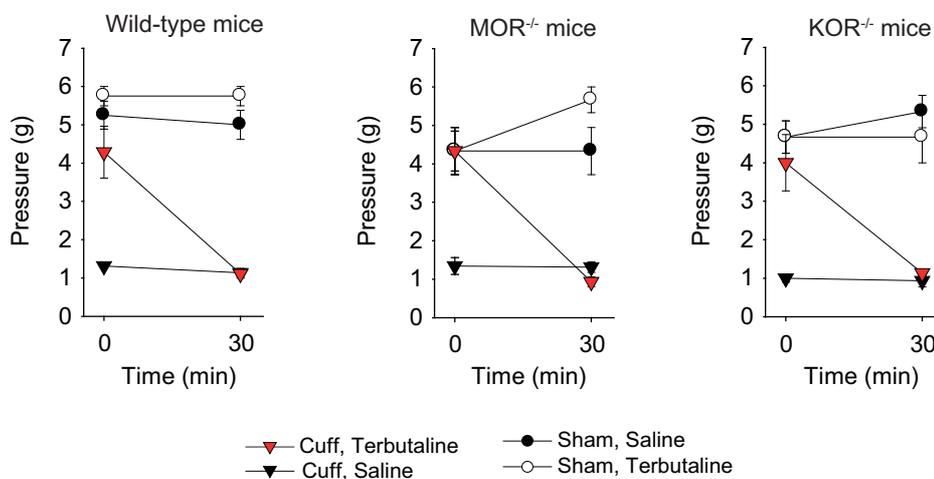
### C. Résultats

#### 1. Effet antiallodynique d'un $\beta_2$ -agoniste : rôle des DOR, MOR et KOR

Un traitement prolongé par la terbutaline supprime l'allodynie induite par la neuropathie et l'effet apparaît après une douzaine de jours de traitement (**Figure R-6.A**). Le seuil de sensibilité des animaux traités par la terbutaline atteint des valeurs similaires à celles observées pour les animaux Sham au 16<sup>ème</sup> jour de traitement. Afin d'évaluer le rôle du système opioïdergique, nous avons utilisé des souris déficientes pour les MOR, les DOR ou les KOR ainsi que leur phénotype sauvage. Les résultats sont exprimés sous la forme d'aires sous la courbe (AUC), et correspondent à la période de traitement qui s'établit du 16<sup>ème</sup> au 36<sup>ème</sup> jour post-chirurgie (**Figure R-6.B**). Un traitement par terbutaline soulage l'allodynie neuropathique chez les souris sauvages et déficientes pour les MOR et les KOR. A l'inverse, l'effet antiallodynique de la terbutaline est perdu chez les animaux déficients pour les DOR.



**Figure R-6. Effet de la terbutaline sur l'allodynie neuropathique chez des animaux wild-type, MOR<sup>-/-</sup>, KOR<sup>-/-</sup> et DOR<sup>-/-</sup>.** Au jour 0, le manchon de polyéthylène est disposé autour de la branche principale du nerf sciatique pour les animaux du groupe Cuff. Le traitement débute au jour 15 (pointillés) et se poursuit jusqu'au jour 36 post-chirurgie. Les animaux reçoivent des injections intrapéritonéales bi-quotidiennes. Le seuil de sensibilité mécanique est évalué par le test des filaments de von Frey. **(A)** Un traitement prolongé par le terbutaline soulage l'allodynie neuropathique. **(B)** Le seuil de sensibilité mesuré pendant la période de traitement est exprimé en aire sous la courbe (AUC). Un traitement prolongé par la terbutaline supprime l'allodynie mécanique chez les animaux sauvages, KOR<sup>-/-</sup> et MOR<sup>-/-</sup>. Aucun effet n'est observé chez les animaux DOR<sup>-/-</sup>. Les données sont exprimées en moyennes  $\pm$  SEM (n=8/groupe pour les animaux Sham et n=9-12/groupe pour les animaux Cuff).



**Figure R-7. Effet d'une injection aiguë d'antagoniste DOR, la naltrindole.** Après 3 semaines de traitement par la terbutaline (0,5 mg/kg) ou une solution saline, les souris ont reçu une injection aiguë d'antagoniste des DOR, la naltrindole (5 mg/kg s.c). Le seuil nociceptif est évalué avant (0 min) et 30 minutes après l'injection. L'injection de naltrindole supprime l'effet antiallodynique d'un traitement par la terbutaline chez les souris sauvages et déficientes pour les MOR et les KOR. Aucun effet du naltrindole n'est observé chez les animaux Sham. Les données sont exprimées en moyennes  $\pm$  SEM (n=6-8/groupe pour les animaux Sham et n=6-12/groupe pour les animaux Cuff).

## 2. Effet d'une injection aiguë d'antagoniste des DOR : la naltrindole.

Après environ 3 semaines de traitement, une administration aiguë de la naltrindole (5 mg/kg) supprime l'effet antiallodymique de la terbutaline chez les souris sauvages (**Figure R-7.A**). Le même effet est observé chez les animaux déficients pour les MOR et les KOR (**Figure R-7.B et C**). Notons que le naltrindole n'a aucun effet sur le seuil de sensibilité mécanique des animaux Sham traités ou non par la terbutaline (**Figure R-7.A, B, C**).

### D. Statistiques

		Analyse de la variance (ANOVA)			Analyse post-hoc (Test de Duncan)		
Traitement	Génotype	Interaction	Statistique	P-valeur	Comparaison des groupes	Temps	P-valeur
Terbutaline	WT	Chirurgie X Traitement X Temps	F <sub>7,231</sub> = 10.25	< 0.001	Cuff Terb. > Cuff Sal.	Jour 28-35	< 0.001
					Cuff Terb. = Sham Sal.	Jour 31-35	> 0.05
Terbutaline	WT DOR <sup>-/-</sup> MOR <sup>-/-</sup> KOR <sup>-/-</sup>	Anova à 1 facteur	F <sub>3,23</sub> = 23.82	< 0.001	Cuff Terb. WT > Cuff Terb DOR <sup>-/-</sup>		< 0.001
					Cuff Terb. WT = Cuff Terb. MOR <sup>-/-</sup>		> 0.05
Terbutaline + Naltrindole	WT	Chirurgie X Traitement X Temps	F <sub>1,33</sub> = 18.83	< 0.001	Cuff Terb. WT < Sham Sal. WT	30 min.	< 0.001
	MOR <sup>-/-</sup>	Chirurgie X Traitement X Temps	F <sub>1,21</sub> = 21.61	< 0.001	Cuff Terb. MOR <sup>-/-</sup> < Sham Sal. MOR <sup>-/-</sup>	30 min.	< 0.01
	KOR <sup>-/-</sup>	Chirurgie X Traitement X Temps	F <sub>1,20</sub> = 5.05	< 0.01	Cuff Terb. KOR <sup>-/-</sup> < Sham Sal. KOR <sup>-/-</sup>	30 min.	< 0.01

### E. Conclusion

Par une approche transgénique, nous avons confirmé que les DOR sont nécessaires à l'effet antiallodymique des  $\beta_2$ -agonistes. Cette donnée est à rapprocher de celles obtenues précédemment, démontrant le rôle crucial des DOR dans l'effet antiallodymique des antidépresseurs (Benbouzid et al., 2008c; Bohren et al., 2010; Chapitre 3 section I. des Résultats). De manière intéressante, l'effet de la naltrindole reste présent chez les animaux déficients pour les MOR et les KOR confirmant que les DOR sont les seuls récepteurs des opioïdes nécessaires à l'effet thérapeutique des  $\beta_2$ -agonistes.

### III. Rôle du système opioïdérique dans l'effet thérapeutique des iPDE4 et iPDE5

#### A. Introduction

Une récente étude a démontré que l'administration d'antagonistes des MOR, des DOR mais pas des KOR supprimait l'effet antinociceptif d'un traitement par le sildénafil (iPDE5) (Yoon et al., 2008a). Tout d'abord, nous avons utilisé une approche transgénique dans laquelle un traitement prolongé par un l'un ou l'autre iPDE a été effectué chez des animaux déficients pour les MOR, les DOR ou les KOR. Par ailleurs, une approche pharmacologique utilisant des administrations aiguës d'antagonistes des DOR, des MOR, ou des KOR a été réalisée chez des animaux traités par un iPDE4 ou un iPDE5.

#### B. Protocole

Les expériences ont été menées sur des souris mâles déficientes pour les MOR, les DOR, ou les KOR ainsi que leurs contrôles sauvages. Le traitement prolongé par le rolipram (0,5 mg/kg, i.p.) ou le sildénafil (0,02 mg/kg, i.p.) est effectué selon le même schéma expérimental que précédemment (Section **Méthodes générales, III-A**).

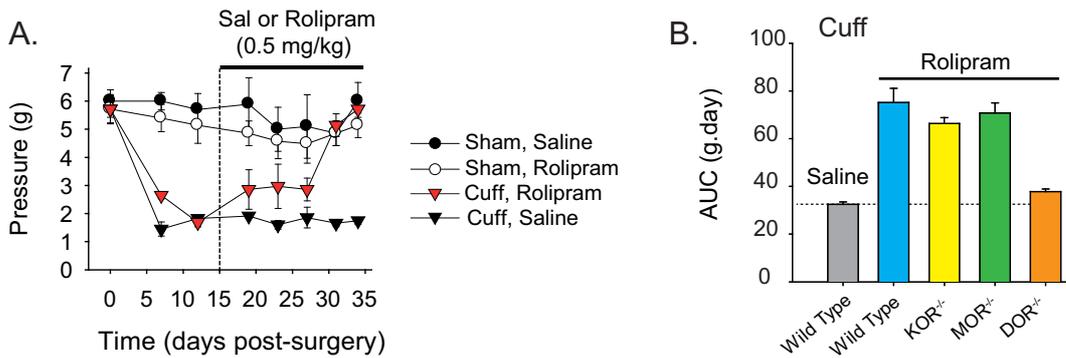
Une série d'expériences a ensuite été menée sur des souris mâles adultes C57BL/6J. De la même façon, ces animaux ont été traités au long cours par le rolipram ou le sildénafil (Section **Méthodes générales, III-A**). A l'issue de la période de traitement, une administration d'antagonistes des MOR, des DOR ou des KOR a été effectuée (Section **Méthodes générales III-C**).

#### C. Résultats

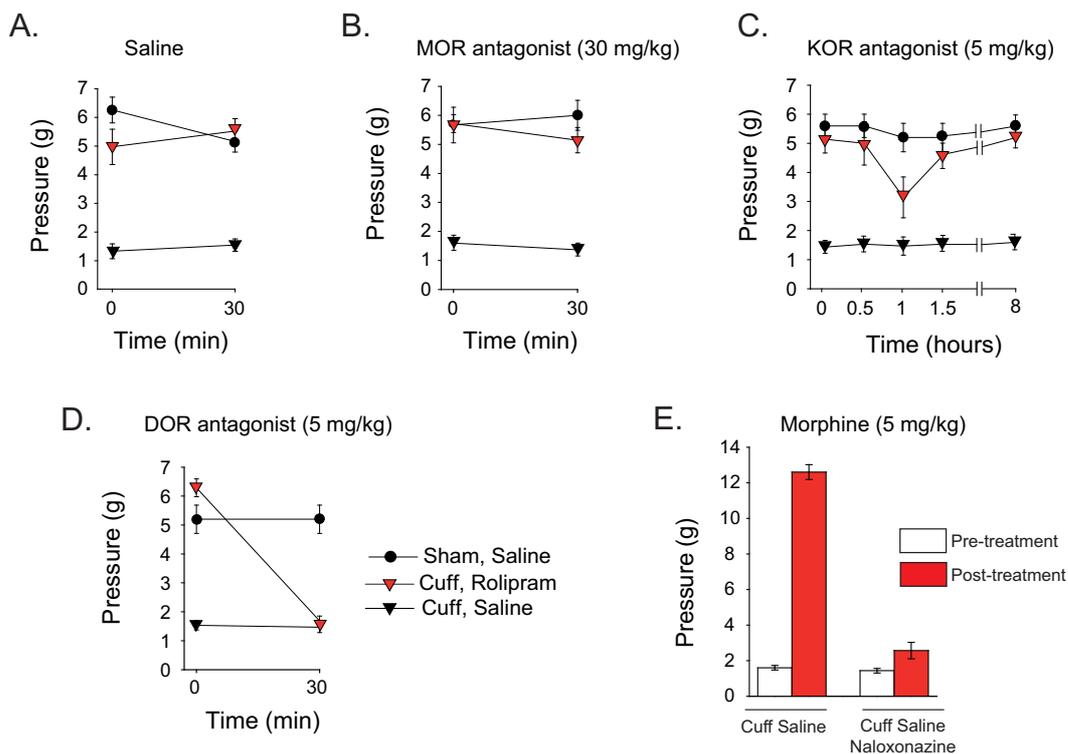
##### 1. Effet thérapeutique d'un iPDE4 et iPDE5 : rôle des DOR, MOR et KOR

De la même manière que pour un antidépresseur (Benbouzid et al., 2008a) ou un  $\beta_2$ -agoniste (Yalcin et al., 2010), un traitement prolongé par le rolipram (**Figure R-8.A**) ou le sildénafil (**Figure R-10.A**) soulage l'allodynie neuropathique. L'effet intervient après environ 12 jours de traitement par comparaison au traitement salin chez les souris sauvages. (**Figure R-8.A et R-10.A**)

Afin d'évaluer le rôle des récepteurs des opioïdes, nous avons utilisé des souris déficientes pour les MOR, les DOR ou les KOR ainsi que leur phénotype sauvage. Un traitement prolongé par le rolipram induit un effet anti-allodynique chez les souris



**Figure R-8. Effet du rolipram sur l'allodynie neuropathique chez des animaux wild-type, MOR<sup>-/-</sup>, KOR<sup>-/-</sup> et DOR<sup>-/-</sup>.** Au jour 0, le manchon de polyéthylène est disposé autour de la branche principale du nerf sciatique pour les animaux du groupe Cuff. Le traitement débute au jour 15 (pointillés) et se poursuit jusqu'au jour 36 post-chirurgie. Les animaux reçoivent des injections intrapéritonéales bi-quotidiennes. Le seuil de sensibilité mécanique est évalué par le test des filaments de von Frey. **(A)** Un traitement prolongé par le rolipram soulage l'allodynie neuropathique. **(B)** Le seuil de sensibilité mesuré pendant la période de traitement est exprimé en aires sous la courbe (AUC). Un traitement prolongé par le rolipram supprime l'allodynie mécanique chez les animaux sauvages, KOR<sup>-/-</sup> et MOR<sup>-/-</sup>. Aucun effet du traitement n'est observé chez les animaux DOR<sup>-/-</sup>. Les données sont exprimées en moyennes  $\pm$  SEM (n= 6/groupe pour les animaux Sham et n=7-9/groupe pour les animaux Cuff).



**Figure R9. Effet antiallodynie du rolipram: rôle des DOR.** Après 3 semaines de traitement par le rolipram (0,5 mg/kg) ou une solution saline, les souris ont reçu une injection aiguë d'antagonistes des MOR, la naloxonazine (30 mg/kg) ; des KOR, le nor-BNI (5 mg/kg) ou des DOR, la naltrindole (5 mg/kg). Le seuil nociceptif est évalué avant et 30 minutes après l'injection. **(A)** **(B)** **(C)** L'injection de naloxonazine, de nor-BNI ou de solution saline n'a aucun effet sur le seuil de réponse des animaux Cuff traités par le rolipram. **(D)** L'injection de naltrindole supprime l'effet antiallodynie d'un traitement par le rolipram. Aucun effet des différents antagonistes n'est observé chez les animaux Sham. **(E)** Un pré-traitement par la naloxonazine bloque l'effet analgésique de la morphine. Les données sont exprimées en moyennes  $\pm$  SEM. (n= 6 /groupe pour les animaux Sham et n= 6-7/groupe pour les animaux-Cuff).

sauvages et celles déficientes pour les MOR et les KOR, mais aucun effet n'est observé chez les animaux déficients pour les DOR (**Figure R-8.B**). L'effet antiallodynique du sildénafil est présent chez les animaux sauvages et déficients pour les KOR. A l'inverse, l'effet du sildénafil est perdu chez les animaux déficients pour les MOR et chez ceux déficients pour les DOR (**Figure R-10.B**).

## **2. Effet d'une injection d'antagoniste des DOR, des MOR ou des KOR sur l'effet thérapeutique d'un traitement par un iPDE4 et un iPDE5**

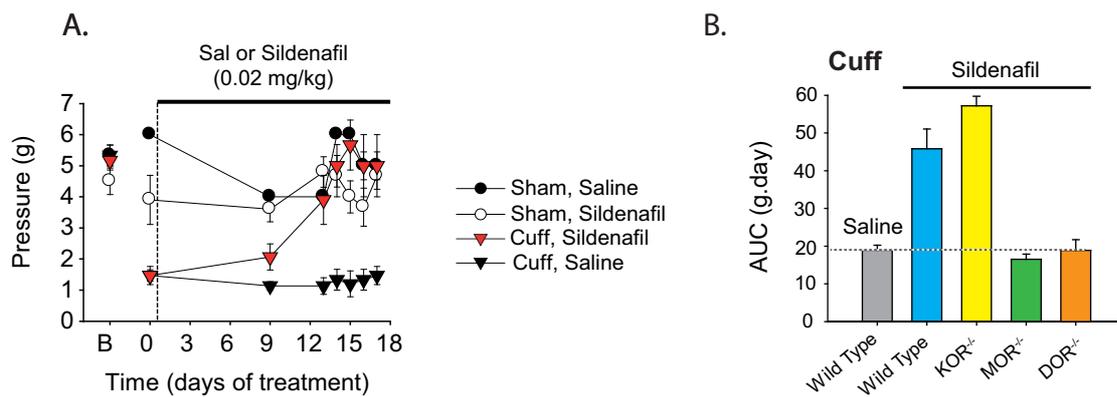
Après environ 3 semaines de traitement par le rolipram, une administration aiguë de naloxonazine (30 mg/kg), antagoniste des MOR, n'a aucun effet sur le seuil de sensibilité mécanique (**Figure R-9.B**). A l'inverse, la naloxonazine bloque l'effet antiallodynique du sildénafil (**Figure R-11.B**). Une injection de morphine (5 mg/kg) a aussi été effectuée chez des animaux neuropathiques préalablement traités par la naloxonazine (30 mg/kg). Ainsi, l'administration de naloxonazine bloque l'effet analgésique de la morphine (**Figure R-9.E**). Ce résultat valide la dose utilisée et indique que l'absence d'effet de l'antagoniste chez les animaux traités par le rolipram n'est pas liée à une incapacité à bloquer les MOR.

Chez les animaux traités par le rolipram, une injection de norbinaltorphimine (5 mg/kg), antagoniste des KOR, n'a aucun effet sur le seuil de sensibilité mécanique lorsque le test est effectué 30 minutes, 1h30 et 8 heures après l'injection (**Figure R-9.C**). Nous remarquons une légère diminution du seuil de réponse lorsque le test est réalisé 1h après l'injection (**Figure R-9.C**).

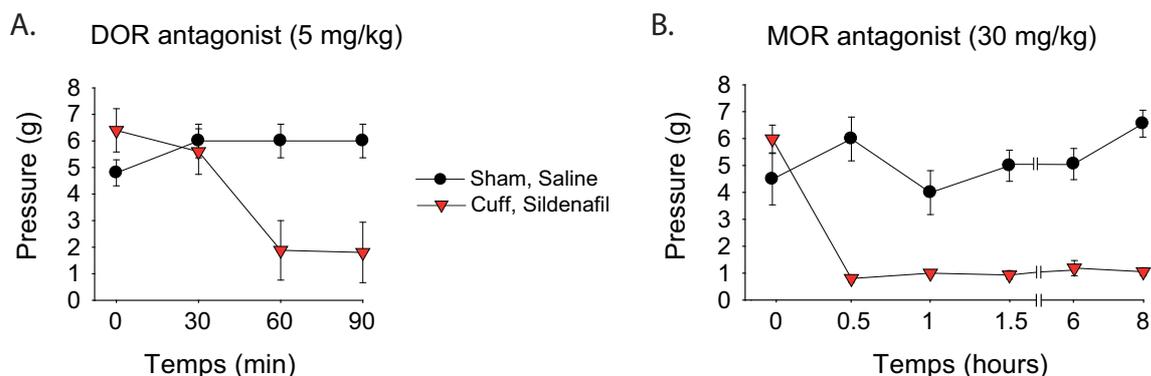
Enfin, l'injection de naltrindole (5 mg/kg), antagoniste des DOR, supprime l'effet antiallodynique du rolipram (**Figure R-9.D**) et du sildénafil (**Figure R-11.A**).

### **D. Discussion et conclusion**

L'utilisation d'antagonistes des récepteurs des opioïdes a révélé l'implication des DOR mais pas des MOR ni des KOR dans l'effet antiallodynique des iPDE4. En utilisant une approche transgénique, nous avons démontré que l'effet antiallodynique d'un iPDE4 est perdu chez les animaux déficients pour les DOR. Toutefois, l'administration d'un antagoniste des KOR diminue le seuil de sensibilité mécanique 1 heure après l'injection (**Figure R-9.C**). Bien que non significative, cette diminution peut s'expliquer par la non-sélectivité du nor-BNI à des temps courts après l'injection. Par conséquent, il semble nécessaire d'effectuer les tests comportementaux 8 heures



**Figure R-10. Effet du sildénafil sur l’allodynie neuropathique chez des animaux wild-type, MOR, KOR et DOR.** Au jour 0, le manchon de polyéthylène est disposé autour de la branche principale du nerf sciatique pour les animaux du groupe Cuff. Le traitement débute au jour 15 (pointillés) et se poursuit jusqu’au jour 36 post-chirurgie. Les animaux reçoivent des injections intrapéritonéales bi-quotidiennes. Le seuil de sensibilité mécanique est évalué par le test des filaments de von Frey. **(A)** Un traitement prolongé par le sildénafil soulage l’allodynie neuropathique. **(B)** Le seuil de sensibilité mesuré pendant la période de traitement est exprimé en aire sous la courbe (AUC). Un traitement prolongé par le terbutaline supprime l’allodynie mécanique chez les animaux sauvages et KOR<sup>-/-</sup>. Aucun effet du traitement n’est observé chez les animaux MOR<sup>-/-</sup> et DOR<sup>-/-</sup>. Les données sont exprimées en moyennes  $\pm$  SEM (n=8/groupe pour les animaux Sham et n=5-6/groupe pour les animaux Cuff).



**Figure R-11. Effet d’une injection d’antagonistes des DOR ou des MOR sur l’effet antiallodynique du sildénafil.** Après 3 semaines de traitement par le sildénafil (0,02 mg/kg) ou une solution saline, les souris ont reçu une injection aiguë d’antagonistes des DOR, la naltrindole (5 mg/kg) ou des MOR, la naloxonazine (30 mg/kg). Le seuil nociceptif est évalué avant et 30 minutes après l’injection. **(A)** L’injection de la naltrindole supprime l’effet antiallodynique d’un traitement par le sildénafil. **(B)** De la même façon, l’injection de naloxonazine supprime l’effet antiallodynique du sildénafil. Les données sont exprimées en moyennes  $\pm$  SEM (n=4-5/groupe pour les animaux Sham et n=6/groupe pour les animaux Cuff).

après l'injection permettant ainsi de se placer dans les conditions optimales de sélectivité de la molécule.

Par ailleurs, nous avons démontré que les DOR et les MOR sont nécessaires à l'effet antialloodyne du sildénafil (iPDE5). De manière intéressante, l'effet de la naltrindole apparaît 60 minutes après l'injection (**Figure R-11A**) alors que 30 minutes suffisent chez les animaux traités par le rolipram (**Figure R-9.D**). Il semble difficile de fournir une explication claire au phénomène observé. Néanmoins, cette différence pourrait s'expliquer par la localisation neuroanatomique des récepteurs. Ainsi, il serait intéressant de déterminer si les DOR nécessaires à l'effet thérapeutique du rolipram et du sildénafil se situent dans le système nerveux périphérique ou central.

## E. Statistiques

Traitement	Analyse de la variance (ANOVA)				Analyse post-hoc (Test de Duncan)			
	Génotype	Interaction	Statistique	P-valeur	Comparaison des groupes	Jour post-chirurgie	Jours traitement	P-valeur
Rolipram	WT	Chirurgie X Traitement X Temps	$F_{7,168} = 9.12$	<b>&lt; 0.001</b>	Cuff Rol. > Cuff Sal.	Jour 28-35		<b>&lt; 0.01</b>
					Cuff Rol. = Sham Sal.	Jour 31-35		> 0.05
Rolipram	DOR <sup>-/-</sup> MOR <sup>-/-</sup> KOR <sup>-/-</sup>	Anova à 1 facteur	$F_{3,23} = 19.13$	<b>&lt; 0.01</b>	Cuff Rol. WT > Cuff Rol. DOR <sup>-/-</sup>			<b>&lt; 0.001</b>
					Cuff Rol. WT = Cuff Rol. MOR <sup>-/-</sup> et KOR <sup>-/-</sup>			> 0.05
Sildénafil	WT	Chirurgie X Traitement X Temps	$F_{7,154} = 5.93$	<b>&lt; 0.001</b>	Cuff Sild. > Cuff Sal.		Jour 13-17	<b>&lt; 0.01</b>
					Cuff Sild. = Sham Sal.		Jour 13-17	> 0.05
Sildénafil	DOR <sup>-/-</sup> MOR <sup>-/-</sup> KOR <sup>-/-</sup>	Anova à 1 facteur	$F_{3,16} = 27.26$	<b>&lt; 0.001</b>	Cuff Sild. WT > Cuff Rol. DOR <sup>-/-</sup>			<b>&lt; 0.001</b>
					Cuff Sild. WT > Cuff Sild. MOR <sup>-/-</sup>			<b>&lt; 0.001</b>
					Cuff Sild. WT = Cuff Sild. KOR <sup>-/-</sup>			> 0.05

Traitement prolongé	Traitement aigu	Analyse de la variance (ANOVA)			Analyse post-hoc (Test de Duncan)		
		Interaction	Statistique	P-valeur	Comparaison des groupes	Temps post-injection (min)	P-valeur
Rolipram	Saline	Groupes X Temps	$F_{2,14} = 2.52$	> 0.05			
	Antagoniste MOR	Groupes X Temps	$F_{2,14} = 2.16$	> 0.05			
	Antagoniste KOR	Groupes X Temps	$F_{8,56} = 1.45$	> 0.05			
	Antagoniste DOR	Groupes X Temps	$F_{2,14} = 97.90$	<b>&lt; 0.01</b>	Cuff Rol. < Sham Sal.	T = 30	<b>&lt; 0.001</b>
Sildénafil	Antagoniste DOR	Groupes X Temps	$F_{3,24} = 17.25$	<b>&lt; 0.001</b>	Cuff Sild. < Sham Sal.	T = 60	<b>&lt; 0.001</b>
	Antagoniste MOR	Groupes X Temps	$F_{5,35} = 5.28$	<b>&lt; 0.01</b>	Cuff Sild. < Sham Sal.	T = 30	<b>&lt; 0.001</b>
	Morphine + Naloxonazine	Anova à 1 facteur	$F_{1,10} = 97.74$	<b>&lt; 0.01</b>	Cuff Sal. > Cuff Naloxonazine	T = 30	<b>&lt; 0.001</b>

## IV. Des antidépresseurs aux inhibiteurs de PDE : localisation de l'effet opioïdergique

### A. Introduction

Les résultats de l'équipe ont démontré qu'une administration intrathécale mais pas intracérébroventriculaire d'un antagoniste des récepteurs  $\beta_2$ -adrénergiques, supprime l'effet antiallodymique d'un  $\beta_2$ -agoniste (Choucair-Jaafar et al., 2009). De plus, une étude relate que les DRG pourraient constituer le site d'action d'un antidépresseur dans le traitement de la douleur neuropathique (Bohren et al., 2013, Chapitre 4 section I. des Résultats). Nous avons donc voulu tester la composante périphérique de l'effet opioïdergique des iPDE.

### B. Protocole

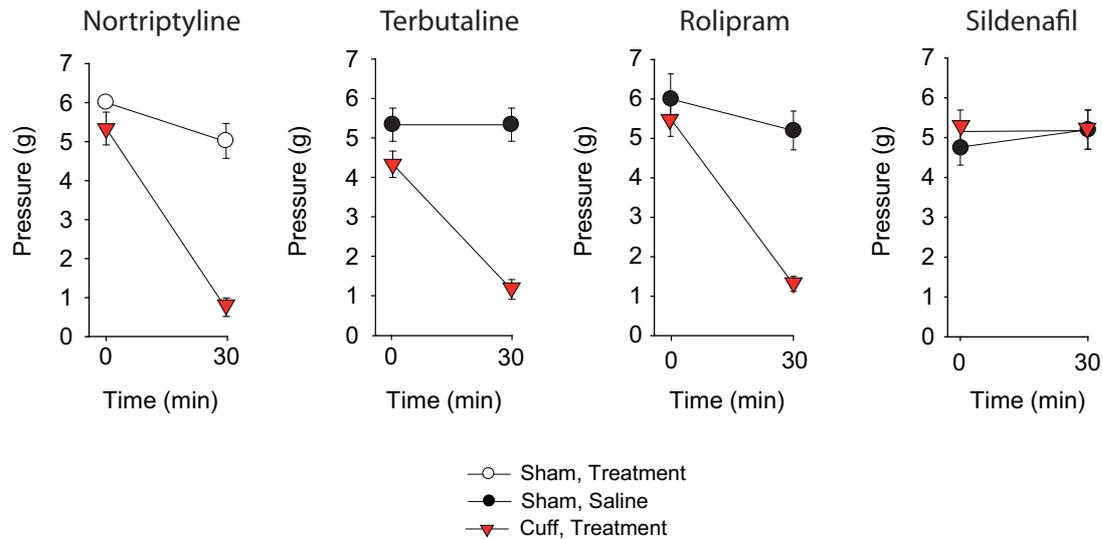
Les expériences ont été menées sur des souris mâles adultes C57BL/6J. Environ deux semaines après l'induction de la neuropathie, un traitement par la nortriptyline (5 mg/kg, i.p.), la terbutaline (0,5 mg/kg, i.p.), le rolipram (0,5 mg/kg, i.p.) ou le sildénafil (0,02 mg/kg, i.p.) a été effectué. A l'issue de la période de traitement, une administration aiguë de naloxone méthiodide (5 mg/kg, s.c.), antagoniste des récepteurs des opioïdes périphériques a été réalisée. Le groupement méthiodide de la naloxone prévient le passage de la barrière hématoencéphalique. Cet antagoniste a donc une action sur le système nerveux périphérique.

### C. Résultats

L'administration aiguë de naloxone méthiodide supprime l'effet antiallodymique de la nortriptyline, de la terbutaline ou du rolipram. (**Figure R-12**). En revanche aucun effet n'est observé chez les animaux traités par le sildénafil. De la même façon, cette injection est sans effet chez les animaux contrôles Sham.

### D. Statistiques

Traitement prolongé	Traitement aiguë	Analyse de la variance (ANOVA)			Analyse post-hoc (Test de Duncan)		
		Interaction	Statistique	P-valeur	Comparaison des groupes	Temps (min)	P-valeur
Nortriptyline	Nalox. Met.	Groupes X Temps	$F_{1,20} = 19,94$	<b>&lt; 0.001</b>	Cuff Nor. < Sham Sal.	T = 30	<b>&lt; 0.001</b>
Terbutaline	Nalox. Met.	Groupes X Temps	$F_{1,20} = 10,9$	<b>&lt; 0.01</b>	Cuff Terb. < Sham Sal.	T = 30	<b>&lt; 0.001</b>
Rolipram	Nalox. Met.	Groupes X Temps	$F_{1,7} = 14,01$	<b>&lt; 0.05</b>	Cuff Rol. < Sham Sal.	T = 30	<b>&lt; 0.05</b>
Sildénafil	Nalox. Met.	Groupes X Temps	$F_{1,8} = 0,11$	> 0.05			



**Figure R-12. Effet d'un antagoniste de récepteurs des opioïdes périphériques.** Après 3 semaines de traitement par la nortriptyline (5 mg/kg), la terbutaline (0,5 mg/kg), le rolipram (0,5 mg/kg) ou le sildénafil (0,02 mg/kg) les souris ont reçu une injection aiguë d'antagoniste des récepteurs des opioïdes ne passant pas la barrière hématoencéphalique, la naloxone méthiodide. Le seuil nociceptif est évalué avant et 30 minutes après l'injection. La naloxone méthiodide bloque l'effet antiallodymique de la nortriptyline, de la terbutaline et du rolipram. Aucun effet n'est observé chez les animaux traités par le sildénafil. Les données sont exprimées en moyennes  $\pm$  SEM. (n=6/groupe pour les animaux Sham et n=5-7/groupe pour les animaux Cuff).

## E. Discussion et conclusion

Les données obtenues suggèrent que l'effet antiallodynique d'un traitement prolongé par les antidépresseurs,  $\beta_2$ -agonistes ou iPDE4 nécessite le recrutement des récepteurs des opioïdes situés dans le système nerveux périphérique. Néanmoins, ces résultats ne permettent pas d'affirmer que les DOR périphériques soient les seuls responsables de l'effet thérapeutique observé. De manière intéressante, l'action du sildénafil ne semble pas dépendante des récepteurs opioïdes périphériques. Ainsi, l'effet tardif observé après administration de naltrindole (**Chapitre 3. Section III des Résultats**) pourrait s'expliquer par l'implication de récepteurs des opioïdes du système nerveux central. Bien que le rôle des DOR ne fasse plus de doute, la localisation neuroanatomique de ces récepteurs reste encore à déterminer. L'utilisation de souris présentant un knock-out conditionnel des DOR sur les neurones périphériques exprimant le canal sodium Nav1.8 pourrait présenter un intérêt dans notre étude (Gaveriaux-Ruff et al., 2011). Néanmoins une alternative moins onéreuse pourrait être envisagée. En effet, la naloxone méthiodide est un antagoniste non-sélectif des récepteurs opioïdes ne passant pas la barrière hématoencéphalique. Ainsi, l'effet d'une administration intracérébroventriculaire donnerait une indication sur le rôle des récepteurs des opioïdes situés dans le système nerveux central.

Dans le cas d'un iPDE5, l'effet observé semble dépendant de la présence des MOR et des DOR. Cette donnée est à rapprocher d'une étude ayant démontré que l'injection intrathécale d'antagonistes des DOR et des MOR supprime l'effet antinociceptif du sildénafil dans un modèle de douleur inflammatoire (Yoon et al., 2008a).

Au niveau cellulaire, les avancées techniques réalisées ces dernières années autorisent quelques espoirs. En effet, les analyses par immunohistochimie étaient rendues impossibles par la faible qualité des outils à notre disposition. La caractérisation de souris knock-in DOR-EGFP (Scherrer et al., 2006) et MOR-mcherry (Erbs et al., 2014) disponibles au sein du laboratoire, permettra l'étude de l'expression de ces récepteurs en condition normale, pathologique ainsi que chez des animaux traités au long cours par les antidépresseurs.

**Chapitre 4**  
**Des antidépresseurs aux inhibiteurs de PDE :**  
**rôle du TNF $\alpha$**

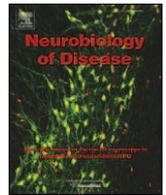
## **I. Antidepressants suppress neuropathic pain by a peripheral $\beta_2$ -adrenoceptor mediated anti-TNF $\alpha$ mechanism**

Yohann Bohren, Luc-Henri Tessier, **Salim Megat**, Hugues Petitjean, Sylvain Hugel, Dorothee Daniel, Mélanie Kremer, Sylvie Fournel, Lutz Hein, Remy Schlichter, Marie-José Freund-Mercier, Ipek Yalcin, Michel Barrot.

Les douleurs neuropathiques sont consécutives à une lésion ou une maladie affectant le système somatosensoriel (Jensen et al., 2011). En clinique, les antidépresseurs constituent un des traitements de référence de ces douleurs (Attal et al., 2010). Dans notre modèle, un traitement prolongé par un antidépresseur tricyclique (ATC) soulage l'allodynie neuropathique et l'effet intervient après une dizaine de jours de traitement. De plus, la noradrénaline recrutée par les ATC agirait sélectivement sur les récepteurs  $\beta_2$ -adrénergiques (Yalcin et al., 2009b), et la seule stimulation de ces récepteurs suffit pour obtenir un effet antiallodynique (Choucair-Jaafar et al., 2009).

Par des lésions des voies noradrénergiques centrales et périphériques, nous démontrons dans ce chapitre que le système nerveux périphérique constitue le site d'action des ATC. De plus, l'effet antiallodynique des ATC et des  $\beta_2$ -agonistes semble corrélé à une diminution d'expression de l'ARNm du TNF $\alpha$  et de la protéine dans les DRG. Un traitement par des agents anti-TNF $\alpha$  soulage l'allodynie neuropathique, soulignant l'importance de cette cytokine dans le développement des comportements nocifensifs. Nos données histologiques démontrent que le TNF $\alpha$  est majoritairement exprimé sur les SGCs du DRG. Enfin, par une approche d'imagerie calcium, nous avons mis en évidence que les récepteurs  $\beta_2$ -adrénergiques sont majoritairement exprimés par les SGCs du DRG.

Ces résultats indiquent que l'effet antiallodynique des ATC se localise dans le système nerveux périphérique et plus particulièrement dans le DRG. La noradrénaline recrutée agirait sur les récepteurs  $\beta_2$ -adrénergiques situés sur les SGCs du DRG, régulant ainsi l'expression de cytokines pro-inflammatoires comme le TNF $\alpha$ . Dans cette étude, mon travail a été d'évaluer l'effet anti-TNF $\alpha$  d'un traitement prolongé par la venlafaxine. De plus, en combinant des techniques de PCR quantitative et de Western Blot j'ai pu confirmer la surexpression de l'ARNm du TNF $\alpha$  et de la protéine dans les DRG d'animaux neuropathiques. J'ai également participé à la réalisation des expériences d'imagerie calcium.



## Antidepressants suppress neuropathic pain by a peripheral $\beta$ 2-adrenoceptor mediated anti-TNF $\alpha$ mechanism<sup>☆</sup>

Yohann Bohren<sup>a,b</sup>, Luc-Henri Tessier<sup>a</sup>, Salim Megat<sup>a,b</sup>, Hugues Petitjean<sup>a,b</sup>, Sylvain Hugel<sup>a</sup>, Dorothée Daniel<sup>a</sup>, Mélanie Kremer<sup>a,b</sup>, Sylvie Fournel<sup>b,c</sup>, Lutz Hein<sup>d,e</sup>, Rémy Schlichter<sup>a,b</sup>, Marie-José Freund-Mercier<sup>a,b</sup>, Ipek Yalcin<sup>a,1</sup>, Michel Barrot<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Institut des Neurosciences Cellulaires et Intégratives, Centre National de la Recherche Scientifique, 67084 Strasbourg, France

<sup>b</sup> Université de Strasbourg, 67084 Strasbourg, France

<sup>c</sup> Laboratoire de Conception et Application de Molécules Bioactives, Centre National de la Recherche Scientifique, 67401 Illkirch, France

<sup>d</sup> Institute of Pharmacology, University of Freiburg, 79104 Freiburg, Germany

<sup>e</sup> BIOS Centre for Biological Signalling Studies, University of Freiburg, 79104 Freiburg, Germany

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 5 April 2013

Revised 26 July 2013

Accepted 14 August 2013

Available online 23 August 2013

#### Keywords:

Allodynia  
Antidepressant  
Adrenoceptor  
Cytokine  
Dorsal root ganglia  
Satellite  
Neuropathy  
Noradrenergic  
Pain  
TNF $\alpha$

### ABSTRACT

Neuropathic pain is pain arising as a direct consequence of a lesion or disease affecting the somatosensory system. It is usually chronic and challenging to treat. Some antidepressants are first-line pharmacological treatments for neuropathic pain. The noradrenaline that is recruited by the action of the antidepressants on reuptake transporters has been proposed to act through  $\beta$ 2-adrenoceptors ( $\beta$ 2-ARs) to lead to the observed therapeutic effect. However, the complex downstream mechanism mediating this action remained to be identified. In this study, we demonstrate in a mouse model of neuropathic pain that an antidepressant's effect on neuropathic allodynia involves the peripheral nervous system and the inhibition of cytokine tumor necrosis factor  $\alpha$  (TNF $\alpha$ ) production. The antiallodynic action of nortriptyline is indeed lost after peripheral sympathectomy, but not after lesion of central descending noradrenergic pathways. More particularly, we report that antidepressant-recruited noradrenaline acts, within dorsal root ganglia, on  $\beta$ 2-ARs expressed by non-neuronal satellite cells. This stimulation of  $\beta$ 2-ARs decreases the neuropathy-induced production of membrane-bound TNF $\alpha$ , resulting in relief of neuropathic allodynia. This indirect anti-TNF $\alpha$  action was observed with the tricyclic antidepressant nortriptyline, the selective serotonin and noradrenaline reuptake inhibitor venlafaxine and the  $\beta$ 2-AR agonist terbutaline. Our data revealed an original therapeutic mechanism that may open novel research avenues for the management of painful peripheral neuropathies.

© 2013 Elsevier Inc. All rights reserved.

### Introduction

Neuropathic pain is defined as pain arising as a direct consequence of a lesion or disease affecting the somatosensory system (Jensen et al., 2011). This complex syndrome implicates maladaptive changes in injured sensory neurons and along the entire nociceptive pathway within the central nervous system (von Hehn et al., 2012). In the clinic, tricyclic antidepressants (TCAs) as well as selective serotonin and noradrenaline reuptake inhibitors are recommended among first-line treatments (Attal et al., 2006, 2010; Dworkin et al., 2007; Saarto and

Wiffen, 2007). In contrast, selective serotonin reuptake inhibitors are poorly effective (Attal et al., 2006; Benbouzid et al., 2008a; Dworkin et al., 2007), suggesting that the noradrenergic component of antidepressants has a key role in their action on neuropathic pain. Despite the fact that the therapeutic effect of antidepressants is well documented, the precise mechanism by which neuropathic pain is alleviated remains poorly understood (Mico et al., 2006).

Sustained antidepressant treatment is necessary to be effective against neuropathic pain, suggesting the recruitment of an indirect mechanism. Pharmacological and genetic approaches showed that antidepressant-recruited noradrenaline selectively acts through  $\beta$ 2-adrenoceptors ( $\beta$ 2-ARs) to relieve neuropathic allodynia (Yalcin et al., 2009a, 2009b), and that repeated stimulation of these receptors by direct agonists is sufficient to reach a therapeutic effect (Choucair-Jaafar et al., 2009, 2011; Yalcin et al., 2010). A clinical case report appears to support the action of  $\beta$ 2-mimetics against neuropathic pain (Cok et al., 2010).

To progress into the pain relief mechanism, it is important to identify its neuroanatomical substrate. A critical step is to determine the source of noradrenaline recruited by antidepressants. Indeed, noradrenaline

**Abbreviations:** Arbp, acidic ribosomal phosphoprotein P0;  $\beta$ 2-AR,  $\beta$ 2-adrenoceptor; CGRP, calcitonin gene related peptide; GS, glutamine synthetase; IL, interleukin; NF200, neurofilament 200; NP, neuropathic pain group; TCA, tricyclic antidepressant; TNF $\alpha$ , tumor necrosis factor  $\alpha$ ; TH, tyrosine hydroxylase.

<sup>☆</sup> Conflict of interest: The authors declare no competing financial interests.

\* Corresponding author at: Institut des Neurosciences Cellulaires et Intégratives, UPR3212 CNRS, 21 rue Descartes, 67084 Strasbourg cedex, France. Fax: +33 3 88 61 33 47.

E-mail address: [mbarrot@inci-cnrs.unistra.fr](mailto:mbarrot@inci-cnrs.unistra.fr) (M. Barrot).

Available online on ScienceDirect ([www.sciencedirect.com](http://www.sciencedirect.com)).

<sup>1</sup> These authors contributed equally to this work.

can be released within supraspinal structures (El Mansari et al., 2010), at the spinal level by descending noradrenergic pathways (Millan, 2002; Yoshimura and Furue, 2006), and at the peripheral level in dorsal root ganglia following neuropathy-induced noradrenergic sprouting of sympathetic nerve fibers (McLachlan et al., 1993; Ramer and Bisby, 1998). Previous data with local administration of a  $\beta$ 2-AR antagonist suggested that the initial substrate for antidepressants' antiallodynic action might be localized at the spinal cord and/or at the dorsal root ganglia level rather than at the supraspinal level (Yalcin et al., 2009b).

Although  $\beta$ 2-ARs are critical for the antiallodynic action of antidepressants, the downstream mechanism has not yet been identified. Experimental evidence supports a role of glial and/or immune cells in the pathophysiology of neuropathic pain, particularly through the recruitment of cytokines (Austin and Moalem-Taylor, 2011; Thacker et al., 2007; Vallejo et al., 2010). Clinical studies also support cytokine implication in neuropathic pain (Empl et al., 2001; Lindenlaub and Sommer, 2003). It is however not known whether antidepressant treatment targets these neuroimmune actors.

In this study, we demonstrate that the peripheral nervous system is essential for the antiallodynic effect of nortriptyline. We show that the noradrenaline recruited by this antidepressant acts within dorsal root ganglia, on  $\beta$ 2-ARs expressed by non-neuronal satellite cells. We also show that both nortriptyline and venlafaxine inhibit local TNF $\alpha$  production. These findings reveal a novel cellular and molecular substrate for the antiallodynic action of antidepressants.

## Material and methods

### Animals

Experiments were done using male C57BL/6J mice (Charles River, L'Arbresle, France), or with mice lacking  $\beta$ 2-ARs and their littermate controls. In the latter case, the mice were created in the laboratory of Brian Kobilka (Stanford University, CA) and have been described previously (Chruscinski et al., 1999). Heterozygotes (*Adrb2*<sup>+/-</sup>) were bred in our animal facilities, mice were genotyped upon weaning, and the experiments were conducted on male *Adrb2*<sup>+/+</sup> and *Adrb2*<sup>-/-</sup> littermate mice. All experiments started with 8- to 9-week-old mice. They were group-housed four to five per cage and kept under a 12-hour light/dark cycle (lights on at 6:00 AM) with food and water *ad libitum*. All animals received proper care in agreement with the guidelines for animal experimentation of the International Association for the Study of Pain and the European Communities Council Directive 86/609/EEC. The animal facilities are registered for animal experimentation with approved procedures by Alsace regional veterinary office (agreement C67-482-1) and the scientists in charge of the experiments possess the French legal certificate authorizing experimentation on living animals.

### Neuropathy and nociceptive testing

The neuropathy was induced by cuffing the main branch of the right sciatic nerve (Benbouzid et al., 2008b; Mosconi and Kruger, 1996). Surgeries were done under ketamine (17 mg/mL)/xylazine (2.5 mg/mL) anesthesia (i.p., 4 mL/kg) (Centravet, Taden, France). The common branch of the right sciatic nerve was exposed and a 2-mm section of split PE-20 polyethylene tubing (Harvard Apparatus, Les Ulis, France) was placed around it (neuropathic pain group: NP). The shaved skin was closed using suture. Sham-operated mice underwent the same surgical procedure without implantation of the cuff (Sham group). The mechanical allodynia was tested using von Frey hairs and results were expressed in grams. Mice were placed in clear Plexiglas boxes (7 cm  $\times$  9 cm  $\times$  7 cm) on an elevated mesh screen. Calibrated von Frey filaments (Bioseb, Vitrolles, France) were applied to the plantar surface of each hindpaw until they just bowed, in a series of ascending forces up to the mechanical threshold. Each filament was tested five times per

paw and the threshold was defined as the lower of two consecutive filaments for which three or more withdrawals out of the five trials were observed (Barrot, 2012; Bohren et al., 2010). To study the antiallodynic effect of chronic drug treatments, the mice were tested in the morning, before drug injections when applicable, thus reflecting the therapeutic action of previous treatment days, as previously described (Bohren et al., 2010; Yalcin et al., 2009a, 2009b).

### Treatment procedures

Treatments with the TCA nortriptyline, the selective serotonin and noradrenaline reuptake inhibitor venlafaxine, the  $\beta$ 2-mimetic terbutaline, or the anti-TNF $\alpha$  etanercept or infliximab, began fifteen or sixteen days after the neuropathy was induced, and they were maintained for either 2 or 3 weeks. During the treatments, the mice received two injections per day (morning and evening) of nortriptyline (5 mg/kg), venlafaxine (5 mg/kg) or terbutaline (0.5 mg/kg) (Sigma-Aldrich, Saint-Quentin Fallavier, France), one injection per day (morning, 5 mg/kg) of etanercept (ENBREL®, Wyeth Pharmaceuticals, Blois, France), one injection every other day (2 mg/kg) of etanercept, or one unique injection of infliximab (10 mg/kg, REMICADE®, Schering-Plough, Levallois-Perret, France). Drugs were dissolved in 0.9% NaCl solution that was also used for control injections, and they were administered intraperitoneally in a volume of 5 mL/kg. For cellular and molecular experiments, the nervous tissues were collected five weeks post-surgery, *i.e.* after three weeks of treatment.

### Noradrenergic lesions

Chemical noradrenergic lesion was done using guanethidine monosulfate (ISMELIN®, Laboratoires Genopharm, Saint-Thibault-des-Vignes, France) (Neil et al., 1991). Three different paradigms were used, each targeting different anatomical sites. (1) A group of mice underwent five daily intraperitoneal injections of guanethidine (30 mg/kg) in a volume of 5 mL/kg; (2) another received three daily intrathecal injections at the lumbar level (30  $\mu$ g in 10  $\mu$ L); and (3) a last group received three daily intrathecal injections at the thoracic level (30  $\mu$ g in 10  $\mu$ L). Intrathecal injections were performed under gaseous anesthesia (halothane 3%). Briefly, for lumbar intrathecal administration, a 27-gauge needle connected to a 50  $\mu$ L Hamilton syringe was inserted between the L5 and L6 vertebrae, into the sub-arachnoidal space. Placement of the needle was verified by the elicitation of a tail flick movement. For thoracic administration, the needle was inserted at the level of the last thoracic vertebrae, just above the lower rib used as mark. All guanethidine administrations were done two weeks before nerve injury. A control group of non-lesioned mice underwent the same nerve cuffing procedure as the lesioned groups.

### Immunostaining

Five weeks post-surgery, neuropathic and sham mice were deeply anesthetized with pentobarbital and perfused intracardially. Lumbar dorsal root ganglia (L4, L5 and L6) and spinal cord were dissected, postfixed, cryoprotected, embedded in OCT compound (Sakura Finetek, Villeneuve d'Ascq, France), frozen and cut into 14  $\mu$ m thick sections that were mounted on Superfrost®Plus slides (O. Kindler GmbH, Freiburg, Germany). To evaluate tyrosine hydroxylase (TH) expression, we used standardized procedures (Kaufling et al., 2010), incubating the sections with Sheep anti-mouse TH antibody (1:500, Millipore, AB1542, France Millipore, Molsheim, France). The sections were then incubated with secondary Cy3-conjugated antibodies done in donkey (1:400, Jackson ImmunoResearch, Newmarket, UK). Thereafter, the sections were washed, mounted with VECTASHIELD, and viewed under a Nikon E80i microscope with  $\times$ 10 and  $\times$ 20 objectives, and images acquired with MBF Bioscience camera CX9000 using Picture Frame acquisition software (MBF Bioscience, Magdeburg, Germany). For TNF $\alpha$  detection, mice

received an acute infliximab injection (10 mg/kg, i.p.) at least two weeks after sciatic nerve surgery, and were perfused 6 h post-injection. Cy3-conjugated anti-human antibodies (Jackson ImmunoResearch, 709-165-149) were used to detect infliximab. Costaining was done either by using Rabbit anti-glutamine synthetase (GS) (1:500, Sigma Aldrich, G2781) for satellite cells, NeuroTrace™ fluorescent Nissl for neurons (1:200, Molecular Probes, N-21479), or by using Rabbit anti-calcitonin gene related peptide (CGRP) (1:20,000, Amersham, RPN1842), Rabbit anti-neurofilament 200 (NF200) (1:2000, Sigma Aldrich, N4142) or Rabbit anti-substance P (1:15,000, gift from Dr. Tramu, Bordeaux) antibodies, or isolectin B<sub>4</sub> Alexa Fluor® 488 conjugate (2 µg/mL, Molecular Probes, I21411) for staining of different neuronal cell populations. When an additional fluorescent secondary antibody was required, we used Alexa Fluor® 488-conjugated antibodies (Molecular Probes). Microphotographs for detection of infliximab only were done with a Nikon E80i microscope with  $\times 4$ ,  $\times 10$  and  $\times 40$  objectives, and images acquired with MBF Bioscience camera CX9000 using Picture Frame acquisition software. Microphotographs for fluorescence double labeling were taken using a Leica confocal microscope TCS SP5 II, under  $\times 20$  objective, and analyzed using the Leica application suite advanced fluorescence software. For all pictures, Adobe Photoshop CS3 (Adobe, San José, CA, USA) was used to adjust contrast and brightness.

#### Dorsal root ganglia cell culture

Dorsal root ganglia cells were prepared from adult mice. Dorsal root ganglia from lumbar levels were dissected out, collected in phosphate-buffered solution, and enzymatically dissociated for 25 min at 37 °C with trypsin-EDTA (0.5 g/L, Seromed) and 2 mg/mL of collagenase IA/dispase (Invitrogen). Enzymatic dissociation was stopped by the addition of the culture medium which consisted of MEM $\alpha$  (minimum essential medium alpha, Gibco, France) supplemented with 10% v/v heat-inactivated horse serum (Gibco) and 50 IU/mL penicillin-streptomycin (Gibco). The cells were then mechanically dissociated by trituration with fire-polished Pasteur pipettes of decreasing tip diameter. Dorsal root ganglia cells were plated on 15 mm glass coverslips previously coated with poly-D-lysine (0.02 mg/mL). Cultures were maintained at 37 °C in a water-saturated atmosphere (95% air and 5% CO<sub>2</sub>). Cell cultures were suitable for single cell PCR or calcium imaging experiments and were respectively used between 2 and 5 h or between 12 and 15 h after the seeding.

#### Single cell PCR

Single-cell PCR experiments were conducted on dissociated dorsal root ganglia cell culture of naïve mice. Cells were collected individually from the coverslip using a patch clamp pipette filled with 8 µL of buffer solution (mM): 140 KCl, 1 MgCl<sub>2</sub>, 0.5 EGTA, pH 7.4. The glass pipette tip was then broken off into a thin-walled PCR reaction tube containing 40 µL of the reaction mix SuperScriptIII One-Step RT-PCR system (Invitrogen) and the first set of primers. This first set included couples of primers for NF200 (accession number: NM\_010904),  $\beta$ 2-AR (accession number: NM\_007420) and GS (accession number: AY044241). 2 µL of SuperScriptIII RT/Platinum Taq mix was added to each sample and cDNAs were synthesized by incubation at 50 °C for 30 min and the first PCR consisted of an initial denaturation at 94 °C for 2 min followed by 37 cycles (94 °C for 30 s, 52 °C for 45 s, 68 °C for 45 s) and a final extension at 68 °C for 5 min. The resulting product was diluted 1:100 and re-amplified by Taq PCR (Invitrogen) using a single couple of nested primers for each specific gene studied. The second amplification consisted of an initial denaturation step at 94 °C for 2 min followed by 35 cycles (94 °C for 30 s, 55 °C for 45 s, 72 °C for 45 s) and a final extension at 72 °C for 5 min. One-fifth of the PCR product was run on an agarose gel and stained with ethidium bromide.

#### Calcium imaging

Calcium imaging experiments were conducted on dissociated dorsal root ganglia cell culture of sham and neuropathic mice. During calcium measurements, the cells were continuously superfused with a saline solution containing (mM): 135 NaCl, 5 KCl, 2.5 CaCl<sub>2</sub>, 1 MgCl<sub>2</sub>, 10 glucose, 5 HEPES, pH 7.4. High KCl solution had the same composition, except: KCl, 50 mM and NaCl, 90 mM. The whole dish was perfused with saline solution, and the imaged field was perfused by a single-tip multichannel gravity-fed system, allowing a switch between various perfused solutions. Cells were loaded with Fura-2 by 60-minute incubation at room temperature in the recording solution with 2 µM Fura-2 acetoxymethyl ester (Fura-2/AM; Molecular Probes) and 0.001% (w/v) pluronic acid (Molecular Probes). Cells were washed three times with saline solution before and after loading. Fluorescence measurements on individual cells were performed on an inverted microscope (Axiovert 35; Zeiss) with an oil-immersion  $\times 40$  objective (Fluor 40, NA 1.30; Nikon) using a quantitative real-time imaging system comprising a cooled CCD camera (CoolSnap HQ, Photometrics) and an image analysis software package (Imaging Workbench 4.0 Software, Axon Instruments). Fluorescence was alternately excited at wavelengths of 350 and 380 nm with a lambda-10 filter wheel (Sutter Instruments), and emitted light was collected above 520 nm. Pairs of images were acquired every 2 s. Intracellular calcium is expressed throughout as the fluorescence ratio  $F_{350}/F_{380}$ , calculated after background subtraction. Experiments were performed at room temperature. All drugs were prepared as 1000 $\times$  concentrated stock solutions. ATP (50 µM), ADP (50 µM), UTP (50 µM) and terbutaline (100 µM) were diluted into saline solution immediately before use.

#### Real-time quantitative PCR

Quantification of gene expression in dorsal root ganglia in each group was assessed with a real-time quantitative PCR method. Total RNA was extracted using RNeasy (QIAGEN), and cDNA was generated with *High capacity RNA-to-cDNA master mix* from Applied Biosystems. Quantitative real-time PCR was performed on a StepOne Real-Time PCR system (Applied Biosystems) using SYBR Green PCR Master Mix assay (Applied Biosystems). The amplification reaction was performed for 40 cycles with denaturation at 95 °C for 10 min, followed by annealing at 95 °C for 15 s, and extension and detection at 60 °C for 1 min. All experiments were done with triplicate sample deposits on the amplification plates. The relative RNA abundance of each target gene transcript was normalized against endogenous gene control acidic ribosomal phosphoprotein P0 (*Arbp*). Data were analyzed according to relative gene expression by  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  method, where Ct represents the threshold cycle for each transcript (Schmittgen and Zakrajsek, 2000). Primers (designed from *Mus musculus* gene data bank using Applied Biosystems Primer Express Software version 3.0) are as follows: *Arbp* (or *Rp1p0*, acidic ribosomal phosphoprotein): 5'-GCCAGCTCAGAACAC TGGTCTA-3' and 5'-ATGCCAAAGCCTGGAAGA-3'; *Tnf* (TNF $\alpha$ , tumor necrosis factor): 5'-CAGCCGATGGGTGTACCTT-3' and 5'-GGCAGCCTT GTCCCTTGA-3'; *Il10* (IL-10, interleukin10): 5'-GATGCCCCAGGCAGAG AA-3' and 5'-CACCCAGGAATTCAAATGC-3'; *Tnfrsf1a* (TNF-R1, tumor necrosis factor receptor 1): 5'-TCCGCTGCAAATGTCACA-3' and 5'-GGCAACAGCACCGCAGTAC-3'; *Adbl2* ( $\beta$ 2-AR): 5'-TGGGAACGGCTACTC TAGCAA-3' and 5'-TGTTTGCTCCCTGTGTAGT-3'; *Ptgs2* (Cox-2, prostaglandin G/H synthase 2): 5'-TTCGGGAGCACAACAGAGTGT-3' and 5'-GCTCATCACCCACTCAGGAT-3'; *Il1a* (IL-1 $\alpha$ , interleukin 1 alpha): 5'-GGAGAGCCGGGTGACAGTATC-3' and 5'-TCAGCCGTCTCTTCAGAAT C-3'; *Il1b* (IL-1 $\beta$ , interleukin 1 beta): 5'-AGTTGACGGACCCCAAAGA-3' and 5'-GGACAGCCCAGGTCAAAGG-3'; and *Il6* (IL-6, interleukin 6): 5'-CCACGGCCTTCCCTACTTC-3' and 5'-TTGGGAGTGGTATCTCTGTGA-3'.

Two procedures were used depending on the set of experiments. One was done with a total of  $n = 9$  mice per group (Fig. 4B). To limit

potential interindividual differences due to either mice or the dissection procedure, we pooled samples from the 3 lumbar dorsal root ganglia of 3 mice from the same experimental group (i.e. 9 dorsal root ganglia). These pooled samples were processed for real-time PCR, each sample being present as triplicate on the plate. We repeated the experiment two other times, with pooled sets of 3 other animals each time. The other sets of experiments were conducted on samples from individual mice. All individual samples were compared to a reference composed of a mix of the controls' cDNAs and results were standardized by the  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  method as described above.

#### Immunoblotting analysis

Due to differences in optimized extraction procedures, real-time quantitative PCR and Western blot were always done on independent sets of mice. For Western blot, total protein was extracted in 150  $\mu$ L lysis buffer (20 mM Tris pH 7.5; 150 mM NaCl; 10% glycerol; 1% NP40; Protease Inhibitors Cocktail, Roche). The proteins were quantitated with DC protein assay kit (Bio-Rad) and 15  $\mu$ g of total protein from individual animals was resolved by 12% SDS-polyacrylamide gel electrophoresis under reducing conditions and then transferred to PVDF membrane. The blots were incubated for 1 h in blocking agent (ECL kit, Amersham Biosciences) and subsequently, overnight with the specific antibodies for TNF $\alpha$  (1:1000, R&D Systems, AF-410-NA) and  $\beta$ -tubulin (1:5000, Santa Cruz Biotechnology Inc., sc-9935) followed by anti-goat HRP-conjugated secondary antibodies (1:5000, Chemicon, AP307P and AP106P). Blots were evaluated by chemiluminescence (ECL Advance Western Blotting Detection System Kit, Amersham Biosciences, RPN 2135) using Hyperfilm substrates (Amersham Biosciences, RPN 1674K). Relative protein expression was determined using the densitometry tool of Adobe Photoshop CS3 software.

#### ELISA assays

Commercially available ELISA reagents were used to evaluate concentrations of TNF $\alpha$  (BD OptEIA™, BD Biosciences, San Diego, CA). All procedures were performed following the manufacturer's instructions. Results were expressed as cytokine concentration in pg/mL. The detection limit was 15 pg/mL.

#### Statistics

Data are expressed as mean  $\pm$  standard error of the mean (SEM). Statistical analyses were performed with STATISTICA 8 software (StatSoft, Tulsa, OK, USA), using multifactor analysis of variance (ANOVA). The surgery procedure (sham or cuff) and the treatments (saline vs. drug injections) were taken as between-group factors. When needed, the time of measurement (time course data) was taken as a within-subject factor. The Duncan test was used for post hoc comparisons. In calcium imaging experiments, the fraction of cells answering or not to terbutaline application in sham and neuropathic conditions were compared by a contingency table with an Exact Fischer's test. Finally, for quantitative PCR and immunoblotting experiments, statistical analyses were performed with a non-parametric test of Kruskal–Wallis and comparisons between groups were done by U Mann–Whitney test. The significance level was set at  $p < 0.05$ .

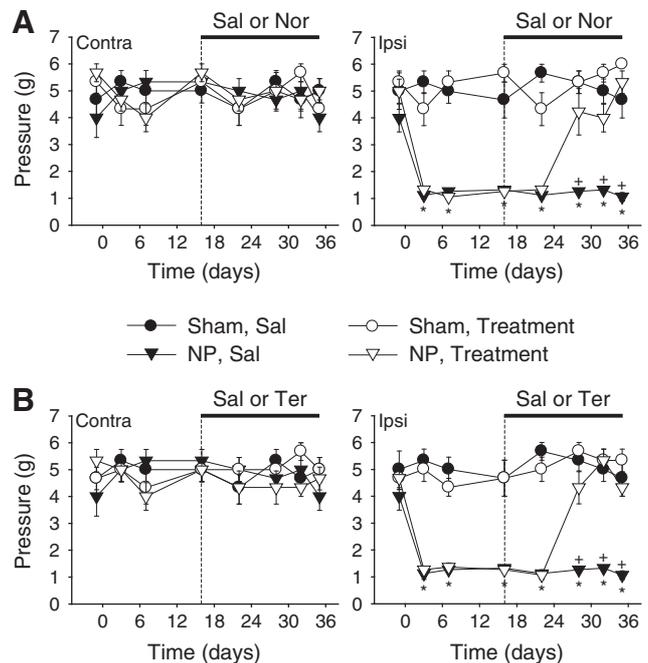
## Results

#### Antidepressant action on neuropathic pain requires peripheral noradrenaline

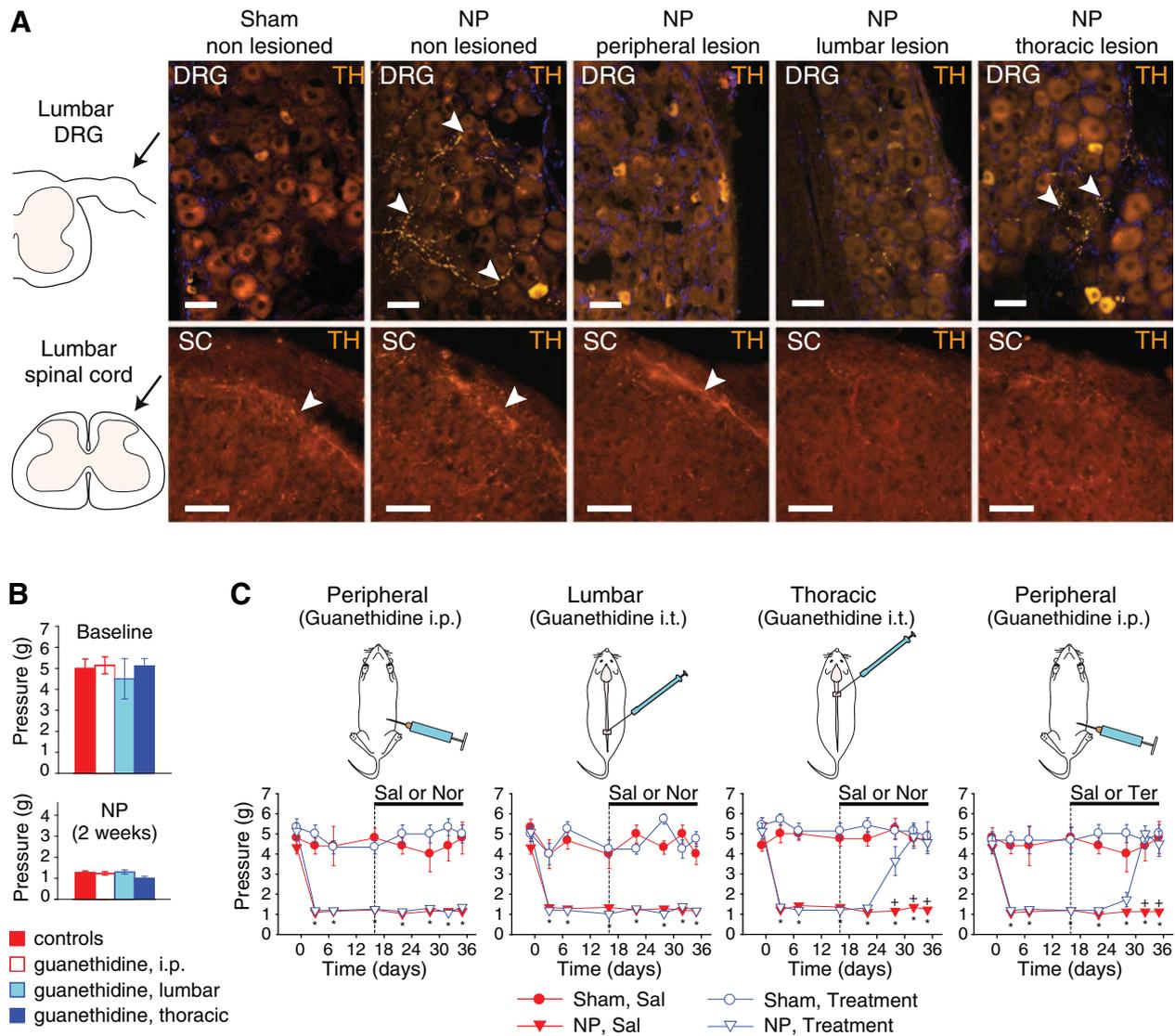
To mimic human neuropathy resulting from a trauma of peripheral nerves, we used chronic sciatic nerve cuffing in mice (Benbouzid et al., 2008b; Mosconi and Kruger, 1996). Mechanical allodynia is one of the symptoms distressing the patients. In the neuropathic mice, the ipsilateral allodynia appears on the first day post-surgery and persists over

three months (Benbouzid et al., 2008b). This allodynia is relieved by chronic treatment with the TCA nortriptyline or the  $\beta$ 2-AR agonist terbutaline (Benbouzid et al., 2008a; Choucair-Jaafar et al., 2009) (Fig. 1) (Nortriptyline, right paw:  $F_{7,140} = 3.77$ ,  $p < 0.001$ ; post-hoc: NP-Nortriptyline > NP-Saline at  $p < 0.0001$  on post-surgery days 28 to 35. Terbutaline, right paw:  $F_{7,140} = 3.09$ ,  $p < 0.005$ ; post-hoc: NP-Terbutaline > NP-Saline at  $p < 0.0001$  on post-surgery days 28 to 35). As observed in other neuropathic pain models (McLachlan et al., 1993; Ramer and Bisby, 1998), the cuff insertion also induced a sprouting of noradrenergic fibers in the lumbar dorsal root ganglia (Fig. 2A).

Since preclinical (Yalcin et al., 2009a) and clinical (Krell et al., 2005) data showed that the noradrenergic system is essential for the therapeutic action of antidepressant drugs, we investigated the possible source of endogenous noradrenaline which is targeted by antidepressant drugs to alleviate neuropathic allodynia. For this purpose, noradrenergic lesions were done two weeks before induction of the neuropathy, with guanethidine which does not cross the blood–brain barrier (Neil et al., 1991). This drug enters noradrenergic terminals through the noradrenaline transporter. While guanethidine at low dose is clinically used for peripheral depletion of noradrenaline storage sites, larger doses of guanethidine lead to the selective destruction of sympathetic fibers. This depletion of noradrenergic fibers did not affect *per se* the basal mechanical sensitivity or the neuropathic allodynia (Fig. 2B). However, both the intraperitoneal and the lumbar intrathecal injections of guanethidine prevented the antiallodynic action of nortriptyline (Fig. 2C) (Intraperitoneal:  $F_{7,175} = 2.72$ ,  $p < 0.015$ ; post-hoc: (NP-Nortriptyline = NP-Saline) < Sham-Saline at  $p < 0.0001$  on post-surgery days 3 to 35. Lumbar:  $F_{7,175} = 2.47$ ,  $p < 0.02$ ; post-hoc: (NP-Nortriptyline = NP-Saline) < Sham-



**Fig. 1.** Chronic nortriptyline or terbutaline treatments relieve neuropathic allodynia. Two weeks after nerve injury (NP, neuropathic pain group), treatment with the TCA nortriptyline (Nor, 5 mg/kg, twice a day), the  $\beta$ 2-AR agonist terbutaline (Ter, 0.5 mg/kg, twice a day) or their saline control (0.9% NaCl) started and was maintained for 3 weeks. The hindpaw mechanical threshold was tested using von Frey filaments. (A) Long-term nortriptyline treatment did not affect the threshold of the contralateral paw, but it suppressed the ipsilateral neuropathy-induced allodynia. (B) Similar results were observed with terbutaline. (Data from one experiment with  $n = 6$  mice per group, \* $p < 0.001$  vs. Sham, + $p < 0.05$  NP-treated vs. NP-Saline.) Data are expressed as mean  $\pm$  SEM.



**Fig. 2.** Peripheral noradrenergic fibers mediate allodynia relief by antidepressant drug. Guanethidine injections allowed lesioning the noradrenergic fibers. (A) Tyrosine hydroxylase (TH) immunostaining in the lumbar dorsal root ganglia (DRG; scale bars: 100  $\mu$ m) and the spinal cord (SC; scale bars: 50  $\mu$ m). The peripheral neuropathy (NP) induced a sympathetic sprouting in the DRG (white arrows). Intraperitoneal guanethidine (peripheral lesion) suppressed these fibers without affecting the spinal cord ones. Lumbar intrathecal guanethidine suppressed both DRG and dorsal horn noradrenergic fibers. Thoracic intrathecal guanethidine suppressed descending noradrenergic fibers, sparing DRG sprouting. (B) Two weeks after guanethidine injections, no difference was observed between control mice and mice that received intraperitoneal, lumbar intrathecal or thoracic intrathecal guanethidine (baseline, top graph). Similarly, these injections of guanethidine did not affect the neuropathic allodynia (NP at 2 weeks, bottom graph). (C) The peripheral and the lumbar intrathecal injections of guanethidine, but not the thoracic intrathecal one, prevented the antiallodynic action of the TCA nortriptyline (Nor). The antiallodynic action of the  $\beta$ 2-AR agonist terbutaline (Ter) was still present in mice which received peripheral guanethidine. (Data pooled from 2 independent experiments,  $n = 5$ –9 per group, \* $p < 0.001$  vs. Sham, + $p < 0.05$  NP-treated vs. NP-Saline).

Saline at  $p < 0.0001$  on post-surgery days 3 to 35). While intraperitoneal guanethidine induced a sympathectomy, suppressing peripheral noradrenergic fibers only, the lumbar intrathecal administration affected both the spinal cord and noradrenergic fibers in the lumbar dorsal root ganglia nearby the guanethidine injection site (Fig. 2A). This suggests a critical role of dorsal root ganglia noradrenergic sprouting in the TCA action, but it does not exclude a contribution of spinal descending pathways. To address this question, spinal noradrenergic fibers were suppressed without affecting the lumbar dorsal root ganglia sprouting, by doing thoracic intrathecal administration of guanethidine. This led to suppression of descending noradrenergic fibers, including at the lumbar level (Fig. 2A). In this case the antiallodynic action of nortriptyline was maintained (Fig. 2C) (Thoracic:  $F_{7,168} = 6.55$ ,  $p < 0.0001$ ; post-hoc: NP-Nortriptyline > NP-Saline at  $p < 0.005$  on post-surgery days 28 to 35). Together, these results indicate that noradrenergic sprouting in the dorsal root ganglia is a critical substrate for the antiallodynic action of a TCA.

In order to test the location of  $\beta$ 2-ARs in the therapeutic mechanism, we tested terbutaline in sympathectomized mice. This  $\beta$ -mimetic remained effective in the absence of sympathetic fibers in the dorsal root ganglia (Fig. 2C) ( $F_{7,147} = 4.14$ ,  $p < 0.0005$ ; post-hoc: NP-Terbutaline > NP-Saline at  $p < 0.0001$  on post-surgery days 32 and 35). It showed that the implicated  $\beta$ 2-ARs were neither on noradrenergic terminals nor upstream of the noradrenergic system; thus confirming a downstream, postsynaptic role of  $\beta$ 2-ARs.

*$\beta$ 2-ARs are located on non-neuronal dorsal root ganglia cells*

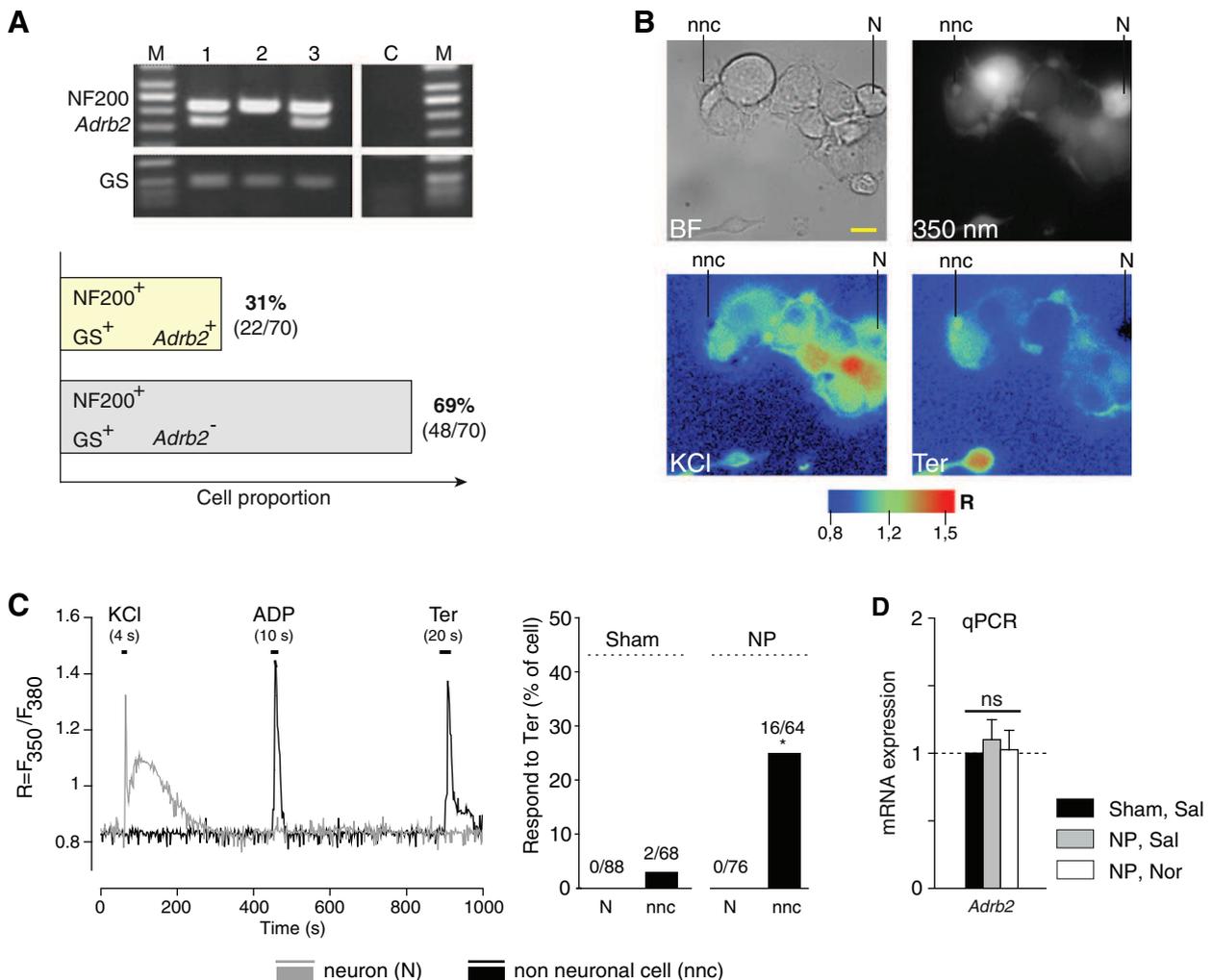
Antidepressant-recruited noradrenaline acts on  $\beta$ 2-ARs to relieve neuropathic allodynia (Yalcin et al., 2009a, 2009b). To identify the type of cells expressing mRNA encoding  $\beta$ 2-ARs in dorsal root ganglia, we performed single cell PCR on dissociated dorsal root ganglia cell culture (Fig. 3A). NF200 neurofilament was used as a neuronal marker (Ho and O’Leary, 2010) and GS as a marker of satellite glial cells in the

dorsal root ganglia (Hanani, 2005). About a third of the tested cells were positive for  $\beta$ 2-AR mRNA, but they were also positive for NF200 and GS (Fig. 3A), suggesting that individual dorsal root ganglia neurons could not be dissociated from the satellite cells tightly covering them (Hanani, 2005). We overcame this problem by using a functional approach with calcium imaging on dorsal root ganglia cell culture. High KCl was used as neuronal activator, a response to ADP and/or UDP in the absence of response to KCl allowed identifying non-neuronal cells, and terbutaline was used as selective  $\beta$ 2-AR agonist. In sham mice, around 3% of non-neuronal cells expressed functional  $\beta$ 2-ARs, whereas 25% of non-neuronal cells from neuropathic animals displayed a calcium response to terbutaline (Figs. 3B, C) (Fisher's exact test:  $p < 0.002$ ). The pathological condition thus increased functional  $\beta$ 2-ARs in dorsal root ganglia, without altering mRNA expression of these receptors (Fig. 3D). Contrasting with these non-neuronal cells, neurons from either sham or neuropathic mice never responded to terbutaline application (Fig. 3C), suggesting that functional  $\beta$ 2-ARs increasing intracellular calcium concentrations are selectively located in the plasma membrane of non-neuronal cells.

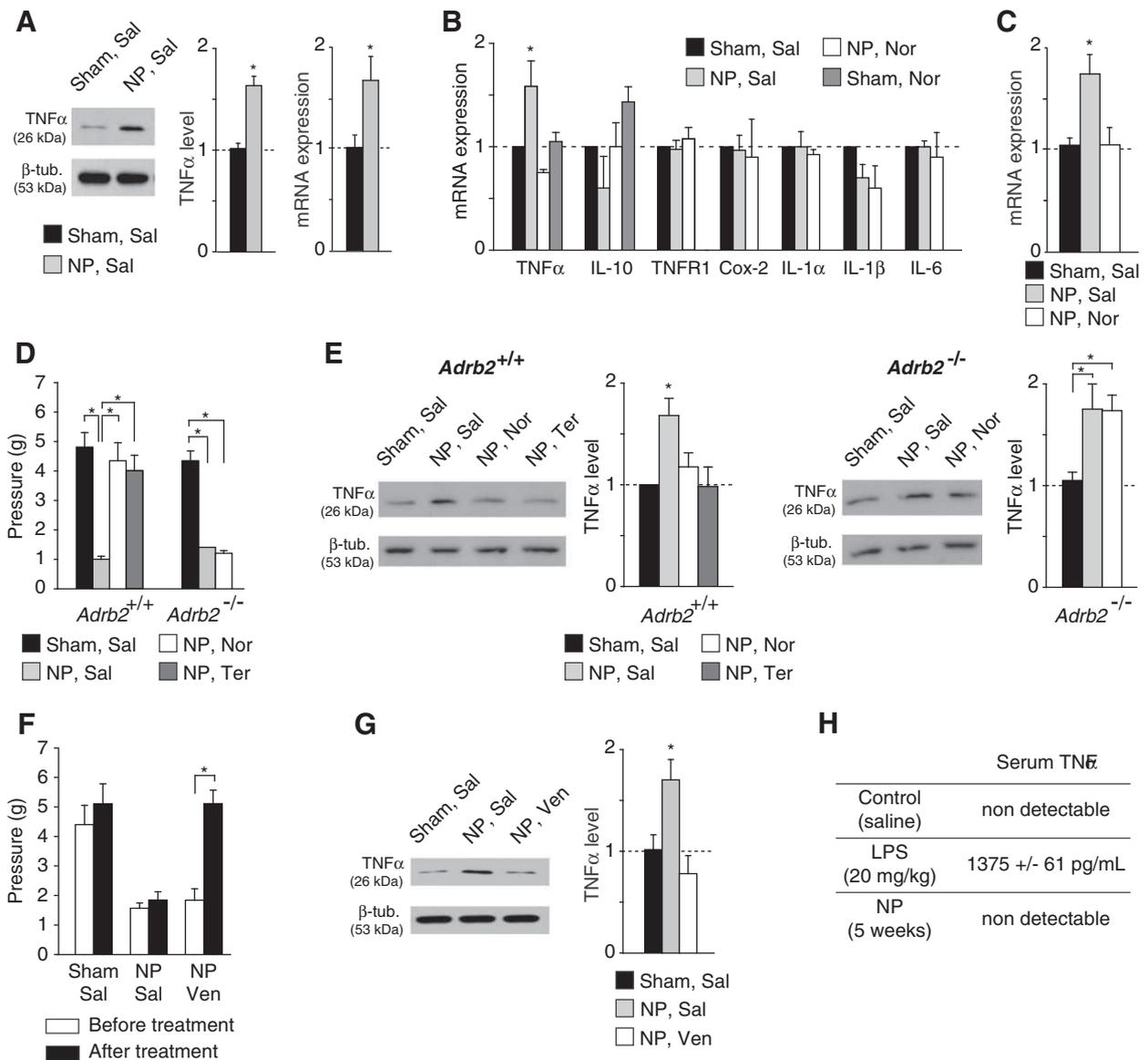
#### Antidepressants and a $\beta$ 2-AR agonist display anti-TNF $\alpha$ action

Cytokines produced by non-neuronal cells, such as glial and immune cells, participate in the development and maintenance of neuropathic pain (Austin and Moalem-Taylor, 2011; Thacker et al., 2007; Vallejo et al., 2010).

By Western blot ( $p < 0.001$ ) and mRNA analysis ( $p < 0.05$ ), we observed increased levels of TNF $\alpha$  in the lumbar dorsal root ganglia of C57BL/6J neuropathic mice at 5–6 weeks post-injury (Fig. 4A). To further examine the role of neuroinflammatory mediators in the neuropathic pain treatment by antidepressants or by a  $\beta$ 2-AR agonist, gene expression of TNF $\alpha$ , IL-10, Cox-2, IL-1 and IL-6 was analyzed in the lumbar dorsal root ganglia. The implication of some of these mediators is well established in the early phase following nerve injury (Lee et al., 2004; Uceyler et al., 2007). However, their role in the dorsal root ganglia is less clear at much later time-points, when chronic neuropathic pain is well installed. Five weeks post-injury, we observed a preferential role for local TNF $\alpha$ . Indeed, an increased mRNA expression of TNF $\alpha$  was observed in neuropathic mice (Fig. 4B) ( $H_{3,12} = 9.72$ ,  $p < 0.05$ ),



**Fig. 3.**  $\beta$ 2-Adrenoceptors are on dorsal root ganglia non-neuronal cells. (A) Single cell PCR analysis for NF200,  $\beta$ 2-AR (*Adrb2*) and GS mRNAs (M, molecular weight ladder; 1–3, examples of 3 cells; C, negative control). (B) Calcium imaging on dissociated dorsal root ganglia cell culture, example of a typical field in bright field (BF), at 350 nm fluorescence, after 4 second high KCl application, and after 20 second terbutaline (Ter) (N, neuron; nnc, non-neuronal cell; scale bar: 20  $\mu$ m). (C) Example of typical traces of calcium transients, represented as ratiometric change in fluorescence emission during bath application of high KCl (50 mM), ADP (50  $\mu$ M) or the  $\beta$ 2-AR agonist terbutaline (100  $\mu$ M). Response to terbutaline was only observed in non-neuronal cells, and in a higher proportion of cells in dorsal root ganglia culture from cuff mice ( $*p < 0.002$  vs. Sham-nnc). (D)  $\beta$ 2-AR mRNA expression in dorsal root ganglia, evaluated by quantitative real-time PCR ( $n = 3 \times 3$  per group). (Single cell PCR data are pooled from 8 independent experiments. Calcium imaging data are pooled from 6 independent experiments. Real-time PCR data represent 3 independent experiments, each of them pooling samples from 3 animals per group. ns, not significant.)



**Fig. 4.** Antidepressant drugs display anti-TNF $\alpha$  action. (A) Western blot and mRNA expression analysis on dorsal root ganglia, showing increased TNF $\alpha$  levels in C57BL/6J mice at 5–6 weeks after induction of the neuropathy (Western blot:  $n = 12$  per group; mRNA:  $n = 6$  per group;  $*p < 0.05$ ). (B) mRNA expression of different neuroinflammatory-related genes in dorsal root ganglia, evaluated by real-time PCR ( $n = 3 \times 3$  per group,  $*p < 0.05$ ). (C) mRNA expression analysis confirming that the TCA nortriptyline suppressed the neuropathy-induced overexpression of TNF $\alpha$  mRNA ( $n = 7–9$  per group,  $*p < 0.05$ ). (D) Behavioral analysis of neuropathic allodynia treatment in ADRB2<sup>+/+</sup> and ADRB2<sup>-/-</sup> mice. Twenty days of nortriptyline or terbutaline treatment suppressed the allodynia in wild-type mice, but nortriptyline was ineffective in ADRB2<sup>-/-</sup> mice ( $n = 5–6$  per group,  $*p < 0.01$  vs. Sham). (E) Western blot analysis of TNF $\alpha$  levels in the dorsal root ganglia of ADRB2<sup>+/+</sup> and ADRB2<sup>-/-</sup> mice. Nortriptyline or terbutaline treatment suppressed the overexpression of mTNF $\alpha$  in wild-type mice, but nortriptyline was ineffective in ADRB2<sup>-/-</sup> mice ( $n = 4$  per group,  $*p < 0.05$  vs. Sham-Sal). (F) Effect of a 2-week treatment with the serotonin and noradrenaline reuptake inhibitor venlafaxine on neuropathic allodynia ( $n = 10$  per group,  $*p < 0.01$  vs. pre-treatment). (G) Western blot analysis showing the anti-TNF $\alpha$  action of the long-term venlafaxine treatment ( $n = 8$  per group,  $*p < 0.05$  vs. Sham-Sal). (H) ELISA analysis of serum TNF $\alpha$ , LPS injection was used as positive control ( $n = 6$  per group).

whereas mRNA expression of TNF $\alpha$  receptor 1 (TNFR1) was not affected by the neuropathy (Fig. 4B). No significant change was observed for the other inflammatory related genes Cox-2, IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$  or IL-6, and a trend to a decrease was observed for the anti-inflammatory cytokine IL-10 (Fig. 4B).

The treatment with nortriptyline suppressed the mRNA overexpression of TNF $\alpha$  associated with the long-term neuropathy (Fig. 4B). This effect was confirmed at the mRNA level in an independent experiment in C57BL/6J mice (Fig. 4C) ( $H_{2,25} = 9.11$ ,  $p < 0.01$ ), and it was also observed at the protein level (Fig. 4E), using dorsal root ganglia from wild type (ADRB2<sup>+/+</sup>) and  $\beta$ 2-AR deficient (ADRB2<sup>-/-</sup>) mice ( $H_{5,24} = 15.46$ ,  $p < 0.01$ ). Indeed, in wild type animals, the membrane-bound form of TNF $\alpha$  (mTNF $\alpha$ ) increased in neuropathic mice ( $p < 0.05$  against Sham-Saline), and this increase was reversed by either nortriptyline or terbutaline treatments (Fig. 4E). In ADRB2<sup>-/-</sup> mice, the antidepressant

treatment was ineffective to suppress the neuropathy-induced increase in mTNF $\alpha$  (Fig. 4E) ( $p < 0.05$  against Sham-Saline), which is in agreement with its lack of antiallodynic action in these mice (Yalcin et al., 2009a; Fig. 4D) (ADRB2<sup>-/-</sup> mice:  $F_{2,15} = 77.5$ ,  $p < 0.0001$ ; post-hoc: (NP-Nortriptyline = NP-Saline) < Sham-Saline at  $p < 0.001$ ).  $\beta$ 2-ARs are thus indirectly mediating both the molecular and the behavioral actions of nortriptyline.

To test whether this action on TNF $\alpha$  may be generalized to other antidepressants, we tested the selective serotonin and noradrenaline reuptake inhibitor venlafaxine. Two-week venlafaxine treatment suppressed both the neuropathic allodynia (Fig. 4F) ( $F_{2,26} = 5.63$ ,  $p < 0.01$ ; post-hoc: (NP-Ven = Sham-Saline) > NP-Saline at  $p < 0.001$ ) and the neuropathic overexpression of mTNF $\alpha$  in the lumbar dorsal root ganglia (Fig. 4G) ( $H_{2,24} = 10.64$ ,  $p < 0.005$ ; (Sham-Saline = NP-Ven) < NP-Saline at  $p < 0.05$ ).

The Western blot approach allows differentiating mTNF $\alpha$  (26 kDa) from soluble TNF $\alpha$  (17 kDa). While mTNF $\alpha$  changed with neuropathic pain and its treatments, the soluble form of TNF $\alpha$  remained undetectable in the dorsal root ganglia. We also assessed soluble TNF $\alpha$  in serum by ELISA, and no soluble TNF $\alpha$  could be detected (Fig. 4H). These results support a preferential role of mTNF $\alpha$  in neuropathic pain (Zhou et al., 2010), and reveal mTNF $\alpha$  as a downstream target for antidepressant drug action.

#### Anti-TNF $\alpha$ relief of neuropathic allodynia

The concomitant loss of anti-TNF $\alpha$  and antiallodynic actions of nortriptyline in *Adrb2*<sup>-/-</sup> mice, suggested that mTNF $\alpha$  could be critical for both the pathophysiology and the treatment of neuropathic pain. Thus, we tested the influence of etanercept and infliximab – clinically used anti-TNF $\alpha$  drugs that do not cross the blood–brain barrier – on neuropathic allodynia. Both drugs suppressed this symptom, with infliximab displaying the fastest onset of therapeutic action and maintaining its antiallodynic action over 3 weeks following a single administration (Fig. 5A) (Infliximab:  $F_{24,192} = 7.68$ ,  $p < 0.0001$ ; post-hoc: NP-Infliximab > NP-Saline at  $p < 0.001$  on post-surgery days 16 to 35. Etanercept:  $F_{24,192} = 7.34$ ,  $p < 0.0001$ ; post-hoc: NP-Etanercept > NP-Saline at  $p < 0.001$  on post-surgery days 18 to 35, and < Sham-Saline until post-surgery day 24). This difference between infliximab and etanercept may be related not only to differences in their half-lives (8 to 9.5 days versus 70 h in humans; notice instructions), but also to the fact that infliximab binds to mTNF $\alpha$  with higher avidity and stability than etanercept (Scallon et al., 2002). Together, the results support a critical role of peripheral mTNF $\alpha$  in the maintenance of neuropathic allodynia. Moreover, the therapeutic efficacy of etanercept was still observed in *Adrb2*<sup>-/-</sup> mice (Fig. 5B), supporting the idea that mTNF $\alpha$  acts downstream of these adrenoceptors (Etanercept, *Adrb2*<sup>+/+</sup> mice:  $F_{3,20} = 14.80$ ,  $p < 0.0001$ ; post-hoc: NP-Etanercept > NP-Saline at  $p < 0.001$ . Etanercept, *Adrb2*<sup>-/-</sup> mice:  $F_{3,20} = 30.22$ ,  $p < 0.0001$ ; post-hoc: NP-Etanercept > NP-Saline at  $p < 0.001$ ).

#### Satellite cells are the source of TNF $\alpha$ in dorsal root ganglia

Infliximab is an artificial mouse/human monoclonal antibody directed against TNF $\alpha$ , and we observed that it was effective *in vivo* to suppress neuropathic allodynia. We thus perfused neuropathic mice after *in vivo* administration of infliximab, and detected this antibody to visualize its binding to mTNF $\alpha$ . The presence of infliximab in dorsal root ganglia after intraperitoneal injection (Fig. 6A) and its absence within the spinal cord and the brain (Figs. 6B, C) confirmed that this drug does not cross the blood–brain barrier and that its antiallodynic action is peripherally mediated. Co-staining with markers of satellite

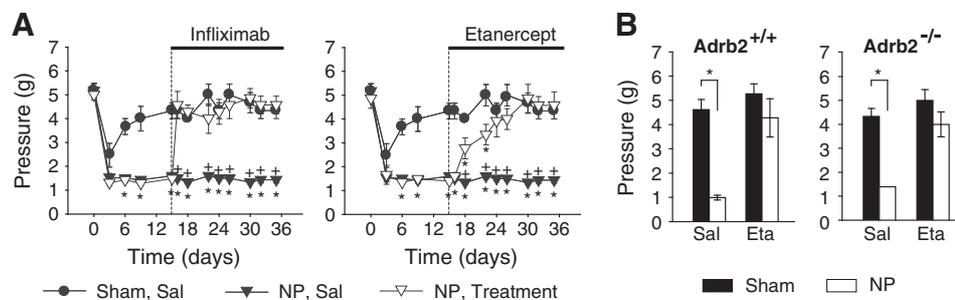
cells (GS, Fig. 7A) or neuronal cells (NT, Fig. 7A) (CGRP, NF200, SP, IB4, Fig. 7B) revealed that mTNF $\alpha$  was more selectively expressed by the satellite cells in the dorsal root ganglia.

#### Discussion

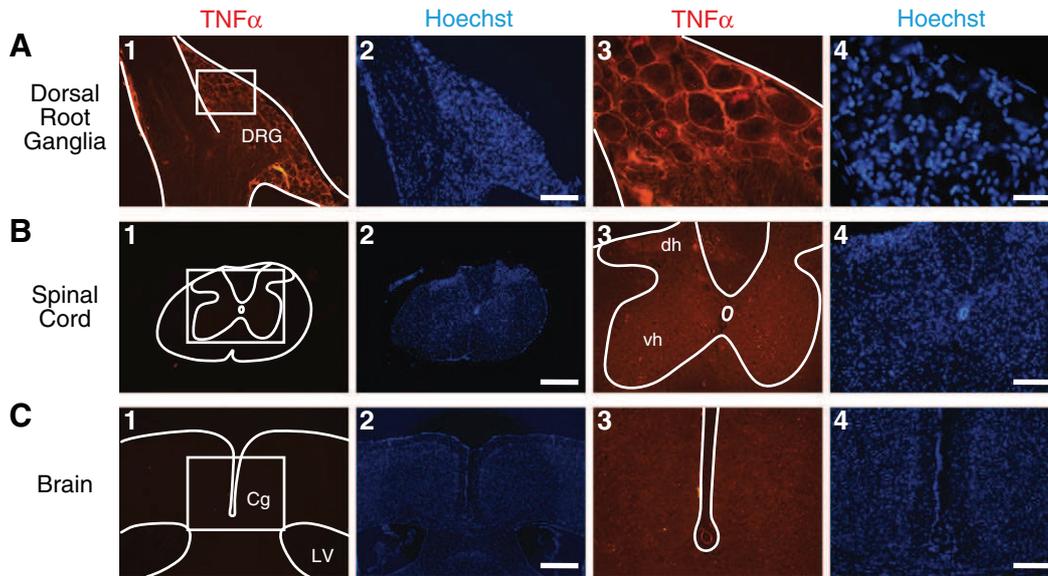
The need to improve neuropathic pain therapies is important with respect to the side effects and to the relative efficacy of existing treatments. In this context, decrypting the mechanism of existing treatments may help in improving them or in discovering new therapeutic targets. Our data show that the antiallodynic action of chronic antidepressant treatment involves the peripheral nervous system. We provide evidence that  $\beta_2$ -ARs present on dorsal root ganglia satellite cells are responsible for this action, and that local mTNF $\alpha$  expression can be important for the maintenance and treatment of neuropathic pain.

Noradrenaline is a major actor in the action of antidepressant treatment (Barrot et al., 2009, 2010). Previous studies in murine models of peripheral neuropathy showed that this therapeutic effect can be blocked by lumbar intrathecal manipulations (Suzuki et al., 2008; Yalcin et al., 2009b), which supports a common hypothesis implying the recruitment of noradrenergic descending pathways in the analgesic action of antidepressants (Millan, 2002; Yoshimura and Furue, 2006). However, intrathecal manipulations also affect the closest nearby dorsal root ganglia, preventing to distinguish between central and peripheral action. By comparing noradrenergic lesions at different levels of the nervous system, we show that the peripheral noradrenergic system is necessary for the antiallodynic property of nortriptyline. In this case the local source of noradrenaline would be provided by sympathetic fibers sprouting in dorsal root ganglia that accompanies peripheral nerve injury (McLachlan et al., 1993; Ramer and Bisby, 1998). Conversely, the antiallodynic action of the antidepressant is still present after destruction of noradrenergic descending pathways. While these descending pathways are well known to exert an inhibitory control over nociceptive information (Millan, 2002), our data show that they do not play a critical role in antidepressant action. Nevertheless, the peripheral mechanism for the relief of peripheral neuropathic pain does exclude that the central component of antidepressants also participates to their therapeutic action, particularly concerning anxiodepressive and cognitive co-morbidities that often accompanies neuropathic pain (Attal et al., 2011). Indeed, neuropathic pain does alter supraspinal noradrenergic systems (Alba-Delgado et al., 2013).

Dorsal root ganglia are composed of pseudo-unipolar type neurons whose afferent axons relay sensory information into the central nervous system, and of non-neuronal cells such as resident immune cells and satellite glial cells around the soma of neurons (Hanani, 2005; von Hehn et al., 2012).  $\beta_2$ -AR mRNA was previously detected in dorsal root ganglia (Maruo et al., 2006). In our study, we found that these receptors are more precisely expressed in non-neuronal cells, which



**Fig. 5.** Direct anti-TNF $\alpha$  treatments relieve neuropathic allodynia. (A) The direct anti-TNF $\alpha$  treatments with infliximab (10 mg/kg, injected once on day 15) or etanercept (2 mg/kg, every other day from day 15 onwards) relieved neuropathic allodynia ( $n = 6$ –7 per group, \* $p < 0.05$  vs. Sham, + $p < 0.05$  NP-treated vs. NP-Sal). (B) Etanercept effect in *Adrb2*<sup>+/+</sup> and *Adrb2*<sup>-/-</sup> mice. Etanercept (Eta, 5 mg/kg, once a day for 3 weeks, from day 15 onwards) was still effective in *Adrb2*<sup>-/-</sup> mice ( $n = 6$  per group, \* $p < 0.001$ ).

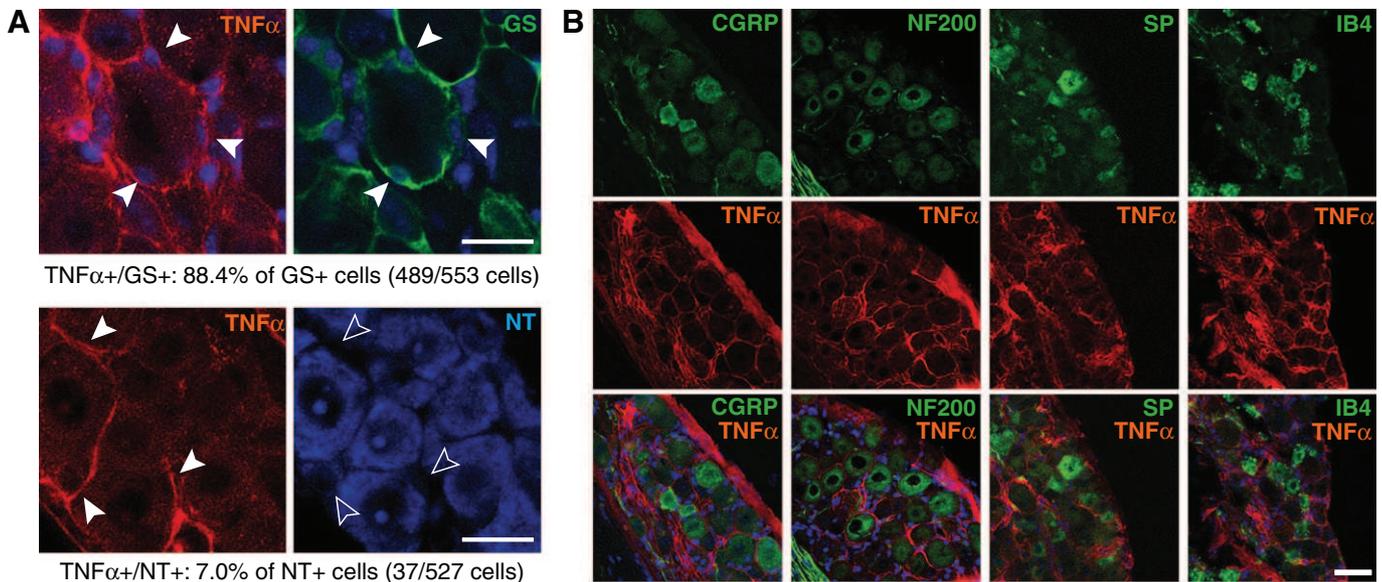


**Fig. 6.** Detection of TNF $\alpha$  by peripheral injection of infliximab. Cuff mice received acute infliximab (10 mg/kg, i.p.,  $n = 3$ ), an artificial mouse/human monoclonal antibody directed against TNF $\alpha$ , and were perfused 6 h post-injection. Pictures numbered 1 and 3 show TNF $\alpha$  detection (in red), and columns 2 and 4 show the Hoechst 33342 staining of nuclei of the same sections. Columns 3 and 4 show a larger view of the boxed areas in column 1 pictures. (A) A reticular TNF $\alpha$  staining was detected in the dorsal root ganglia after peripheral administration of infliximab. No staining was detected in the spinal cord (B) or brain (C) of the same animals, confirming that infliximab does not cross the blood–brain barrier. Scale bars: 500  $\mu$ m in B<sub>1,2</sub> and C<sub>1,2</sub>, 200  $\mu$ m in A<sub>1,2</sub>, B<sub>3,4</sub> and C<sub>3,4</sub>, and 50  $\mu$ m in A<sub>3,4</sub>. Abbreviations: Cg, cingulate cortex; dh, dorsal horn; DRG, dorsal root ganglion; LV, lateral ventricle; vh, ventral horn.

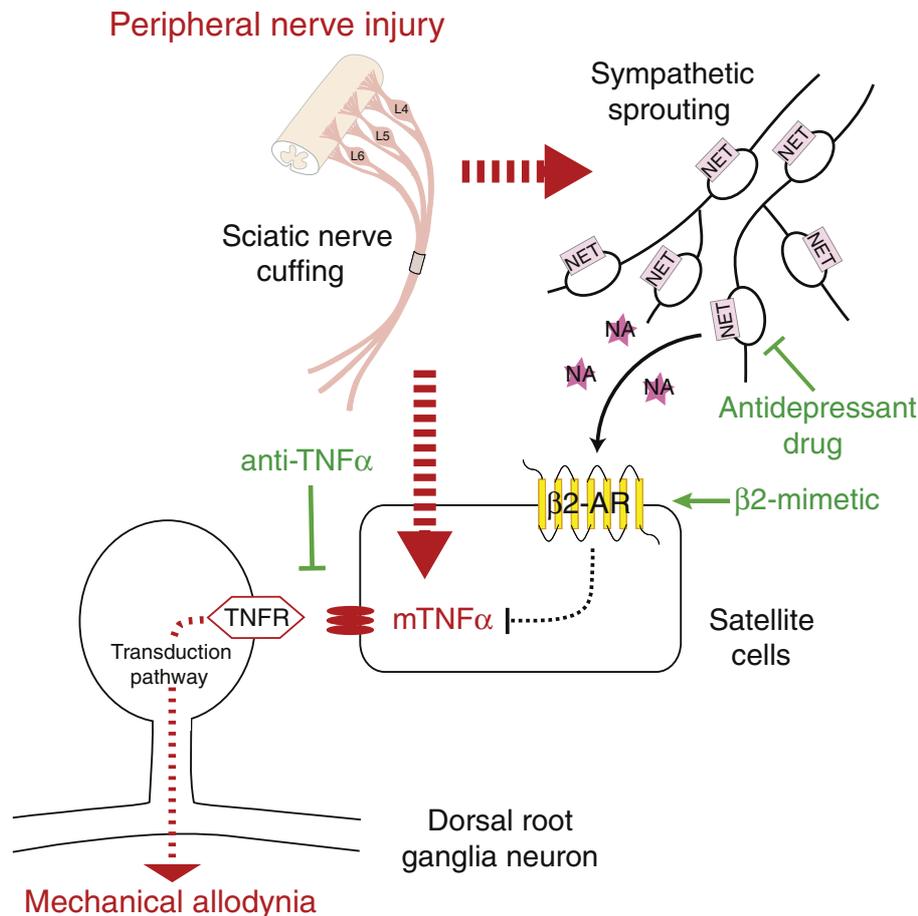
are likely satellite cells expressing mTNF $\alpha$ . These satellite cells are the peripheral analogs of the central nervous system's astrocytes which are also known to express  $\beta$ 2-AR on their membrane in various species including human (Mantyh et al., 1995; Trimmer et al., 1984). Moreover, we observed that the efficacy of  $\beta$ 2-AR coupling to a transduction pathway increasing intracellular calcium is enhanced in the lumbar dorsal root ganglia under neuropathic condition. Together, our data indicate

that the peripheral nerve injury does create the substrate – i.e. noradrenergic sprouting and enhanced  $\beta$ 2-AR functionality – through which the antidepressant treatment acts to relieve neuropathic allodynia.

Recent data indicate that neuropathic pain may partly be considered as a neuro-immune disorder, with a critical involvement of glial and/or immune cells following nerve injury (Austin and Moalem-Taylor, 2011; Thacker et al., 2007; Vallejo et al., 2010). The activation of these cells at



**Fig. 7.** Detection of TNF $\alpha$  in the dorsal root ganglia. Neuropathic mice received acute infliximab (10 mg/kg, i.p.,  $n = 3$ ), an artificial mouse/human monoclonal antibody directed against TNF $\alpha$ , and were perfused 6 h post-injection. (A) Confocal microscopy allowed to visualize TNF $\alpha$  (in red), cell nuclei (Hoechst 33342 in blue) and the satellite cell marker GS (in green). TNF $\alpha$  was detected in GS-positive satellite cells (top pictures, white arrows) in dorsal root ganglia. TNF $\alpha$  was rarely detected in neurons (NT in blue, bottom pictures, NeuroTrace™). Arrows on the confocal images show examples of non-neuronal TNF $\alpha$  staining. For both GS and NT staining, a quantification of TNF $\alpha$ -positive cells was done on 9 sections (3 sections  $\times$  3 animals). Scale bars: 50  $\mu$ m. (B) Neuronal staining and detection of TNF $\alpha$  in the dorsal root ganglia. Double-staining for infliximab detection and neuronal markers was done on DRG from cuff mice ( $n = 3$ ). The first line shows the neuronal staining, the second line shows the TNF $\alpha$  detection, and the third line is a merged picture. Calcitonin gene related peptide (CGRP), neurofilament 200 (NF200), substance P (SP) and the isolectin IB<sub>4</sub> (IB<sub>4</sub>) were used as markers of different neuronal cell populations. TNF $\alpha$  was not expressed by neurons, but the TNF $\alpha$  staining in the dorsal root ganglia formed a reticular network surrounding the neurons. Scale bar: 20  $\mu$ m.



**Fig. 8.** Schematic of the proposed peripheral action of antidepressant drugs in the context of a peripheral neuropathy. Following sciatic nerve injury, a noradrenergic sprouting is observed in dorsal root ganglia. Antidepressant drugs inhibit noradrenaline (NA) reuptake in sympathetic varicosities (NET: transporter), thus locally increasing noradrenaline levels. Noradrenaline stimulates  $\beta$ 2-AR expressed by non-neuronal satellite cells, which lead to decreased mTNF $\alpha$  production.

the lesion site or in the dorsal root ganglia for the peripheral nervous system, or in the spinal cord or supraspinal structures for the central nervous system, results in the production of cytokines (Austin and Moalem-Taylor, 2011; White et al., 2009). Pro-inflammatory cytokines produced in the peripheral nervous system after injury participate in the pathophysiology of neuropathic pain (Leung and Cahill, 2010; Sommer et al., 2001a; Wagner and Myers, 1996), particularly in its initiation. In installed neuropathic pain, some cytokines such as TNF $\alpha$  still display enhanced expression, which has pathophysiological relevance. Indeed, blocking TNF $\alpha$  can relieve neuropathic pain symptoms both in animals (Sommer et al., 2001a, 2001b; present results) and in humans (Korhonen et al., 2005; Tobinick and Davoodifar, 2004). Our results suggest that antidepressant drugs would act as indirect anti-TNF $\alpha$  drugs to relieve neuropathic allodynia. This anti-TNF $\alpha$  effect of antidepressants is partial as it suppresses neuropathy-induced TNF $\alpha$  overexpression without affecting basal expression of the cytokine. The mechanism is  $\beta$ 2-AR mediated, as indicated by the loss of both anti-TNF $\alpha$  and behavioral actions of nortriptyline in *Adrb2*<sup>-/-</sup> mice.

TNF $\alpha$  is primarily membrane-bound (mTNF $\alpha$ , 26 kDa), and this mTNF $\alpha$  is cleaved by the TNF $\alpha$  converting enzyme TACE to release the soluble peptide (sTNF $\alpha$ , 17 kDa). The diffusible sTNF $\alpha$  is the most studied form of TNF $\alpha$ . However, mTNF $\alpha$  is also biologically active as self-assembling non-covalent bound trimers (MacEwan, 2002). After chronic neuropathy, we did not detect sTNF $\alpha$  in the serum or in the dorsal root ganglia, but we found a significant increase of mTNF $\alpha$  within the dorsal root ganglia. While we cannot exclude the presence of concentrations of sTNF $\alpha$  that would be below detection threshold, our

data however support a preferential role for mTNF $\alpha$ . This preferential recruitment of mTNF $\alpha$  in neuropathic pain has also been observed by other groups in the spinal cord (Hao et al., 2007; Peng et al., 2006), where it is produced by glial cells (Zhou et al., 2010). In the dorsal root ganglia, we observed that the mTNF $\alpha$  was produced by satellite cells, which might participate in neuropathic allodynia by influencing the nearby nociceptors through a local cell–cell signaling communication (Cabal-Hierro and Lazo, 2012; McCoy and Tansey, 2008; Santello and Volterra, 2012). Moreover, this local mTNF $\alpha$  recruitment by the neuropathic condition should not be considered as a classical inflammatory cascade. Indeed, neither IL-1 nor IL-6 expression was affected by the neuropathy at late time-points (present data), and the inhibition of the inflammatory cascade through Cox targeting by ketoprofen has no antiallodynic action (Benbouzid et al., 2008a).

The noradrenaline, at the start point of the antidepressant's therapeutic cascade, originates from sympathetic fibers sprouting in the dorsal root ganglia. Interestingly, the sympathetic nervous system has also been shown to be a potent regulator of TNF $\alpha$  production after lipopolysaccharide (LPS) exposure (Elenkov et al., 2000; Szelenyi et al., 2000). In LPS-induced inflammation, noradrenaline released from sympathetic nerve fibers or  $\beta$ -AR agonists inhibit the production of TNF $\alpha$  by immune and glial cells (Severn et al., 1992; van der Poll et al., 1994) and this modulatory effect may be mediated via  $\beta$ 2-AR (Hetier et al., 1991; Nakamura et al., 1998). Our results support the idea that antidepressant drugs would act on neuropathic allodynia through a similar cascade of events (Fig. 8).

While a therapeutic action of anti-TNF $\alpha$  treatments can be observed in neuropathic pain, direct anti-TNF $\alpha$  therapies such as etanercept or

infliximab may not be appropriate for a large clinical use in the neuropathic pain context. Indeed, the balance of benefits/risks requires improvements as these compounds display major side effects, affecting the immune system and its ability to fight infections or cancer. Some of these risks are life-threatening with a notable incidence. Direct anti-TNF $\alpha$  therapy may thus be acceptable for the major inflammatory or auto-immune diseases for which these compounds are presently prescribed as second choice treatments (*i.e.* rheumatoid polyarthritis or psoriasis which is resistant to other known treatments), but they would be less acceptable for neuropathic pain which is a more widespread condition. These direct anti-TNF $\alpha$  treatments are fusion proteins capturing TNF $\alpha$ . They may be considered as too effective, blocking high pathological TNF $\alpha$  levels as well as physiologically relevant TNF $\alpha$ . Present data on the neuropathic pain models suggest that the indirect blunting of TNF $\alpha$  overexpression (as observed with antidepressants or  $\beta$ 2-mimetics) could be of interest, as it may preserve physiological levels of TNF $\alpha$  and thus prevent some of the adverse effects of direct anti-TNF $\alpha$  targeting. While this hypothesis is still speculative at this point, the exploration of other partial inhibitors of TNF $\alpha$  production warrants further research.

In conclusion, this study highlights a novel mechanistic substrate for antidepressant drug action against neuropathic pain. By recruiting noradrenaline from sympathetic fibers sprouting in the dorsal root ganglia, antidepressant drugs stimulate local  $\beta$ 2-ARs on non-neuronal cells. This action decreases mTNF $\alpha$  production and leads to the antiallodynic effect. This finding is an important step to understand the mechanism by which antidepressant drugs relieve this neurological condition. Our data obtained in a mouse model suggest that directly or indirectly targeting TNF $\alpha$  may potentially offer alternative therapeutics to antidepressant drugs for neuropathic pain management. It is important to note that this study was conducted in an animal model with intraperitoneal treatments. It will now require confirmation with oral administration of antidepressant drugs and a clinical validation. Such future validation will also be critical to confirm the value of this approach for translational research on neuropathic pain and its treatment.

## Acknowledgments

This work was supported by the Centre National de la Recherche Scientifique (contract UPR3212), the University of Strasbourg and Neurex. Y.B. was supported by a Neurex fellowship. We thank Stéphane Doridot for animal care and genotyping.

## References

- Alba-Delgado, C., et al., 2013. Chronic pain leads to concomitant noradrenergic impairment and mood disorders. *Biol. Psychiatry* 73, 54–62.
- Attal, N., et al., 2006. EFNS guidelines on pharmacological treatment of neuropathic pain. *Eur. J. Neurol.* 13, 1153–1169.
- Attal, N., et al., 2010. EFNS guidelines on the pharmacological treatment of neuropathic pain: 2010 revision. *Eur. J. Neurol.* 17, 1113–e88.
- Attal, N., et al., 2011. The specific disease burden of neuropathic pain: results of a French nationwide survey. *Pain* 152, 2836–2843.
- Austin, P.J., Moalem-Taylor, G., 2011. The neuro-immune balance in neuropathic pain: involvement of inflammatory immune cells, immune-like glial cells and cytokines. *J. Neuroimmunol.* 229, 26–50.
- Barrot, M., 2012. Tests and models of nociception and pain in rodents. *Neuroscience* 211, 39–50.
- Barrot, M., et al., 2009. From antidepressant drugs to beta-mimetics: preclinical insights on potential new treatments for neuropathic pain. *Recent Pat. CNS Drug Discov.* 4, 182–189.
- Barrot, M., et al., 2010. Antidepressant treatment of neuropathic pain: looking for the mechanism. *Future Neurol.* 5, 247–257.
- Benbouzid, M., et al., 2008a. Chronic, but not acute, tricyclic antidepressant treatment alleviates neuropathic allodynia after sciatic nerve cuffing in mice. *Eur. J. Pain* 12, 1008–1017.
- Benbouzid, M., et al., 2008b. Sciatic nerve cuffing in mice: a model of sustained neuropathic pain. *Eur. J. Pain* 12, 591–599.
- Bohren, Y., et al., 2010. Mu-opioid receptors are not necessary for nortriptyline treatment of neuropathic allodynia. *Eur. J. Pain* 14, 700–704.
- Cabal-Hierro, L., Lazo, P.S., 2012. Signal transduction by tumor necrosis factor receptors. *Cell. Signal.* 24, 1297–1305.
- Choucair-Jaafar, N., et al., 2009. Beta2-adrenoceptor agonists alleviate neuropathic allodynia in mice after chronic treatment. *Br. J. Pharmacol.* 158, 1683–1694.
- Choucair-Jaafar, N., et al., 2011. Cardiovascular effects of chronic treatment with a  $\beta$ 2-adrenoceptor agonist relieving neuropathic pain in mice. *Neuropharmacology* 61, 51–60.
- Chruscinski, A.J., et al., 1999. Targeted disruption of the beta2 adrenergic receptor gene. *J. Biol. Chem.* 274, 16694–16700.
- Cok, O.Y., et al., 2010. Is there a place for beta-mimetics in clinical management of neuropathic pain? Salbutamol therapy in six cases. *Anesthesiology* 112, 1276–1279.
- Dworkin, R.H., et al., 2007. Pharmacologic management of neuropathic pain: evidence-based recommendations. *Pain* 132, 237–251.
- El Mansari, M., et al., 2010. Relevance of norepinephrine–dopamine interactions in the treatment of major depressive disorder. *CNS Neurosci. Ther.* 16, e1–e17.
- Elenkov, I.J., et al., 2000. The sympathetic nerve—an integrative interface between two supersystems: the brain and the immune system. *Pharmacol. Rev.* 52, 595–638.
- Empl, M., et al., 2001. TNF-alpha expression in painful and nonpainful neuropathies. *Neurology* 56, 1371–1377.
- Hanani, M., 2005. Satellite glial cells in sensory ganglia: from form to function. *Brain Res. Brain Res. Rev.* 48, 457–476.
- Hao, S., et al., 2007. Gene transfer to interfere with TNFalpha signaling in neuropathic pain. *Gene Ther.* 14, 1010–1016.
- Hetier, E., et al., 1991. Modulation of interleukin-1 and tumor necrosis factor expression by beta-adrenergic agonists in mouse ameboid microglial cells. *Exp. Brain Res.* 86, 407–413.
- Ho, C., O'Leary, M.E., 2010. Single-cell analysis of sodium channel expression in dorsal root ganglion neurons. *Mol. Cell. Neurosci.* 46, 159–166.
- Jensen, T.S., et al., 2011. A new definition of neuropathic pain. *Pain* 152, 2204–2205.
- Kaufling, J., et al., 2010. Pharmacological recruitment of the GABAergic tail of the ventral tegmental area by acute drug exposure. *Br. J. Pharmacol.* 161, 1677–1691.
- Korhonen, T., et al., 2005. The treatment of disc herniation-induced sciatica with infliximab: results of a randomized, controlled, 3-month follow-up study. *Spine (Phila Pa 1976)* 30, 2724–2728.
- Krell, H.V., et al., 2005. Evaluation of reboxetine, a noradrenergic antidepressant, for the treatment of fibromyalgia and chronic low back pain. *Psychosomatics* 46, 379–384.
- Lee, H.L., et al., 2004. Temporal expression of cytokines and their receptors mRNAs in a neuropathic pain model. *Neuroreport* 15, 2807–2811.
- Leung, L., Cahill, C.M., 2010. TNF-alpha and neuropathic pain—a review. *J. Neuroinflammation* 7, 27.
- Lindenlaub, T., Sommer, C., 2003. Cytokines in sural nerve biopsies from inflammatory and non-inflammatory neuropathies. *Acta Neuropathol.* 105, 593–602.
- MacEwan, D.J., 2002. TNF receptor subtype signalling: differences and cellular consequences. *Cell. Signal.* 14, 477–492.
- Mantyh, P.W., et al., 1995. Beta 2-adrenergic receptors are expressed by glia *in vivo* in the normal and injured central nervous system in the rat, rabbit, and human. *J. Neurosci.* 15, 152–164.
- Maruo, K., et al., 2006. Modulation of P2X receptors via adrenergic pathways in rat dorsal root ganglion neurons after sciatic nerve injury. *Pain* 120, 106–112.
- McCoy, M.K., Tansey, M.G., 2008. TNF signaling inhibition in the CNS: implications for normal brain function and neurodegenerative disease. *J. Neuroinflammation* 5, 45.
- McLachlan, E.M., et al., 1993. Peripheral nerve injury triggers noradrenergic sprouting within dorsal root ganglia. *Nature* 363, 543–546.
- Mico, J.A., et al., 2006. Antidepressants and pain. *Trends Pharmacol. Sci.* 27, 348–354.
- Millan, M.J., 2002. Descending control of pain. *Prog. Neurobiol.* 66, 355–474.
- Mosconi, T., Kruger, L., 1996. Fixed-diameter polyethylene cuffs applied to the rat sciatic nerve induce a painful neuropathy: ultrastructural morphometric analysis of axonal alterations. *Pain* 64, 37–57.
- Nakamura, A., et al., 1998. Regulation of tumor necrosis factor and interleukin-6 gene transcription by beta2-adrenoceptor in the rat astrocytes. *J. Neuroimmunol.* 88, 144–153.
- Neil, A., et al., 1991. Effects of guanethidine on sensitization to natural stimuli and self-mutilating behaviour in rats with a peripheral neuropathy. *Brain Res.* 565, 237–246.
- Peng, X.M., et al., 2006. Tumor necrosis factor-alpha contributes to below-level neuropathic pain after spinal cord injury. *Ann. Neurol.* 59, 843–851.
- Ramer, M.S., Bisby, M.A., 1998. Normal and injury-induced sympathetic innervation of rat dorsal root ganglia increases with age. *J. Comp. Neurol.* 394, 38–47.
- Saarto, T., Wiffen, P.J., 2007. Antidepressants for neuropathic pain. *Cochrane Database Syst. Rev.* CD005454.
- Santello, M., Volterra, A., 2012. TNFalpha in synaptic function: switching gears. *Trends Neurosci.* 35, 638–647.
- Scallon, B., et al., 2002. Binding and functional comparisons of two types of tumor necrosis factor antagonists. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 301, 418–426.
- Schmittgen, T.D., Zakrajsek, B.A., 2000. Effect of experimental treatment on housekeeping gene expression: validation by real-time, quantitative RT-PCR. *J. Biochem. Biophys. Methods* 46, 69–81.
- Severn, A., et al., 1992. Regulation of tumor necrosis factor production by adrenaline and beta-adrenergic agonists. *J. Immunol.* 148, 3441–3445.
- Sommer, C., et al., 2001a. Anti-TNF-neutralizing antibodies reduce pain-related behavior in two different mouse models of painful mononeuropathy. *Brain Res.* 913, 86–89.
- Sommer, C., et al., 2001b. Ebanercept reduces hyperalgesia in experimental painful neuropathy. *J. Peripher. Nerv. Syst.* 6, 67–72.
- Suzuki, T., et al., 2008. Antiallodynic and antihyperalgesic effect of milnacipran in mice with spinal nerve ligation. *Anesth. Analg.* 106, 1309–1315 (table of contents).
- Szeleenyi, J., et al., 2000. Differential involvement of sympathetic nervous system and immune system in the modulation of TNF-alpha production by alpha2- and beta-adrenoceptors in mice. *J. Neuroimmunol.* 103, 34–40.
- Thacker, M.A., et al., 2007. Pathophysiology of peripheral neuropathic pain: immune cells and molecules. *Anesth. Analg.* 105, 838–847.

- Tobinick, E., Davoodifar, S., 2004. Efficacy of etanercept delivered by perispinal administration for chronic back and/or neck disc-related pain: a study of clinical observations in 143 patients. *Curr. Med. Res. Opin.* 20, 1075–1085.
- Trimmer, P.A., et al., 1984. Combination of immunocytochemistry and radioligand receptor assay to identify beta-adrenergic receptor subtypes on astroglia *in vitro*. *J. Neurosci.* 4, 1598–1606.
- Uceyler, N., et al., 2007. Early cytokine expression in mouse sciatic nerve after chronic constriction nerve injury depends on calpain. *Brain Behav. Immun.* 21, 553–560.
- Vallejo, R., et al., 2010. The role of glia and the immune system in the development and maintenance of neuropathic pain. *Pain Pract.* 10, 167–184.
- van der Poll, T., et al., 1994. Noradrenaline inhibits lipopolysaccharide-induced tumor necrosis factor and interleukin 6 production in human whole blood. *Infect. Immun.* 62, 2046–2050.
- von Hehn, C.A., et al., 2012. Deconstructing the neuropathic pain phenotype to reveal neural mechanisms. *Neuron* 73, 638–652.
- Wagner, R., Myers, R.R., 1996. Endoneurial injection of TNF-alpha produces neuropathic pain behaviors. *Neuroreport* 7, 2897–2901.
- White, F.A., et al., 2009. Chemokine signaling and the management of neuropathic pain. *Mol. Interv.* 9, 188–195.
- Yalcin, I., et al., 2009a. Beta(2)-adrenoceptors are critical for antidepressant treatment of neuropathic pain. *Ann. Neurol.* 65, 218–225.
- Yalcin, I., et al., 2009b. Beta2-adrenoceptors are essential for desipramine, venlafaxine or reboxetine action in neuropathic pain. *Neurobiol. Dis.* 33, 386–394.
- Yalcin, I., et al., 2010. Chronic treatment with agonists of beta(2)-adrenergic receptors in neuropathic pain. *Exp. Neurol.* 221, 115–121.
- Yoshimura, M., Furue, H., 2006. Mechanisms for the anti-nociceptive actions of the descending noradrenergic and serotonergic systems in the spinal cord. *J. Pharmacol. Sci.* 101, 107–117.
- Zhou, Z., et al., 2010. A novel cell-cell signaling by microglial transmembrane TNFalpha with implications for neuropathic pain. *Pain* 151, 296–306.

## II. Effet anti-TNF $\alpha$ d'un traitement prolongé par un iPDE4

### A. Introduction

L'effet anti-TNF $\alpha$  d'un traitement par les iPDE4 a été mis en évidence dans le cas de pathologies respiratoires (Bundschuh et al., 2001). De plus, une étude réalisée in vitro sur des cultures de membranes synoviales provenant de patients atteints de douleur inflammatoire chronique a démontré que l'aprémilast (iPDE4) inhibait la synthèse de TNF $\alpha$  (McCann et al., 2010). Par conséquent, nous avons cherché à déterminer si un traitement prolongé par un iPDE4 diminuait l'expression du TNF $\alpha$  dans les DRG.

### B. Protocole

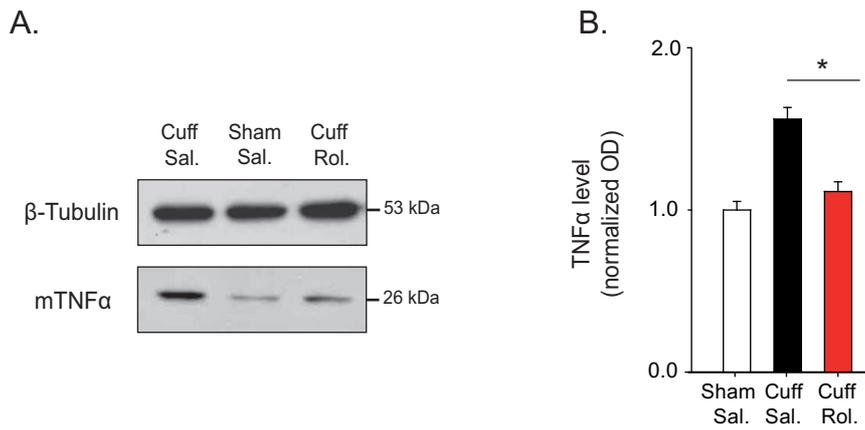
Les DRG correspondants aux segments lombaires L4, L5, L6 ont été prélevés chez des animaux neuropathiques traités par un iPDE4 ainsi que chez des animaux contrôles. La procédure d'extraction protéique et de Western blot est décrite dans la section **IV. des Méthodes générales**. Les bandes obtenues sont évaluées en niveaux de gris à l'aide du logiciel Adobe PhotoShop CS5. Un ratio TNF/Tubuline est calculé pour chaque échantillon et les valeurs obtenues sont exprimées en quantité relative par rapport aux animaux Sham.

### C. Résultats

Cinq semaines après l'induction de la neuropathie, nous observons une augmentation significative des taux de TNF $\alpha$  dans les DRG (**Figure R-13.B**). Par ailleurs, un traitement prolongé par le rolipram permet de restaurer des taux de TNF $\alpha$  semblables à ceux observés pour les animaux Sham (**Figure R-13.B**).

### D. Statistiques

Test statistique	Interaction	Statistique	P-valeur
Anova Kruskal-Wallis	Effet intergroupes	$H_{2,24} = 12,74$	<b>&lt; 0.01</b>
Test U-Mann Whitney	Sham Sal. X Cuff Sal.	$Z = 3,30$	<b>&lt; 0.01</b>
Test U-Mann Whitney	Cuff Sal. X Cuff Rol.	$Z = 2,67$	<b>&lt; 0.01</b>



**Figure R-13. Effet anti-TNF $\alpha$  d'un traitement prolongé par un iPDE4.** (A) Photographie représentant les bandes obtenues après révélation de la membrane de Western blot. A l'aide d'une analyse par densitométrie nous avons évalué la quantité relative de TNF $\alpha$  pour chacun des groupes expérimentaux. Les résultats indiquent une augmentation de l'intensité de marquage pour le mTNF $\alpha$  (26 kDa) chez les animaux neuropathiques, alors qu'une nette diminution est observée après traitement par le rolipram. (B) L'histogramme représente la quantité relative de TNF $\alpha$  normalisée par rapport au groupe contrôle Sham (n=8). La quantité de TNF $\alpha$  augmente significativement 5 semaines après induction de la neuropathie chez les animaux neuropathiques contrôles "Cuff Saline" (n=8) alors qu'une diminution est observée chez les animaux traités par le rolipram (n=8). Les données sont représentées en moyenne  $\pm$  SEM. Rol., Rolipram; Sal., Saline.

## **E. Conclusion**

L'effet antiallodynique d'un traitement prolongé par le rolipram semble corrélé à une diminution des taux de TNF $\alpha$  dans les DRG. Notre étude (Bohren et al., 2013) démontre que le TNF $\alpha$  serait préférentiellement exprimé par les SGCs du DRG. De plus, une étude suggère que l'effet anti-TNF $\alpha$  des  $\beta_2$ -agonistes serait dépendant de la production intracellulaire d'AMPc (Christiansen SH 2011). Néanmoins, le lien direct entre l'activation de la voie AMPc/PKA et l'inhibition de la synthèse de TNF $\alpha$  reste à déterminer. Dans notre modèle, nous avons également démontré qu'un traitement prolongé par un inhibiteur de la voie NF-kB, le PDTC, supprimait l'allodynie neuropathique (donnée non montrées). Nous pouvons donc supposer que l'expression du TNF $\alpha$  dans les DRG est dépendante de l'activation du facteur de transcription NF-kB. Si certaines études suggèrent que la voie AMPc/PKA inhibe la translocation du facteur de transcription NF-kB dans le noyau des cellules (Kwak et al., 2005), d'autres n'ont démontré aucun effet (Abdulla and Renton, 2005). Bien que l'effet anti-TNF $\alpha$  semble être un mécanisme commun aux antidépresseurs,  $\beta_2$ -agonistes et iPDE4, les études prochaines devront déterminer les voies de signalisation intracellulaire mises en jeu.



## **Chapitre 5**

### **Mécanisme d'action d'un inhibiteur de PDE4 : Utilisation d'une approche par imagerie calcium**

## I. Identification des neurones et des cellules non-neuronales du DRG

### A. Introduction

Afin de déterminer le mécanisme d'action d'un iPDE4, nous avons utilisé une approche d'imagerie calcium sur des cultures de DRG dissociés. Le DRG est une structure hétérogène constituée de neurones et de cellules non-neuronales. Il existe plusieurs sous-types de neurones classés en fonction du diamètre de leur corps cellulaire, de l'expression de récepteurs aux neurotrophines ou de certains neuropeptides (III. de la partie **Introduction**). Les cellules non-neuronales regroupent les SGCs ainsi que des cellules immunitaires résidentes. Nous avons donc cherché à établir des critères morphologiques et fonctionnels permettant de différencier les neurones des cellules non-neuronales sur nos cultures de DRG.

### B. Protocole

Les DRG correspondants aux segments lombaires L4, L5 et L6 sont prélevés et mis en culture (section V. des **Méthodes générales**). Le protocole d'introduction de la sonde dans les cellules, l'enregistrement et l'analyse des résultats sont décrits dans la section VI. des **Méthodes générales**.

### C. Résultats

#### 1. Identification des neurones du DRG : approche morphologique.

Nous avons procédé à des régressions non-linéaires de type gaussien pour déterminer si la distribution cumulée du diamètre des corps cellulaires ( $d_{cc}$ ) (**Figure R-14.B**) pouvait être ajustée par 2 ou 3 courbes gaussiennes.

La première équation (I) comporte deux gaussiennes :

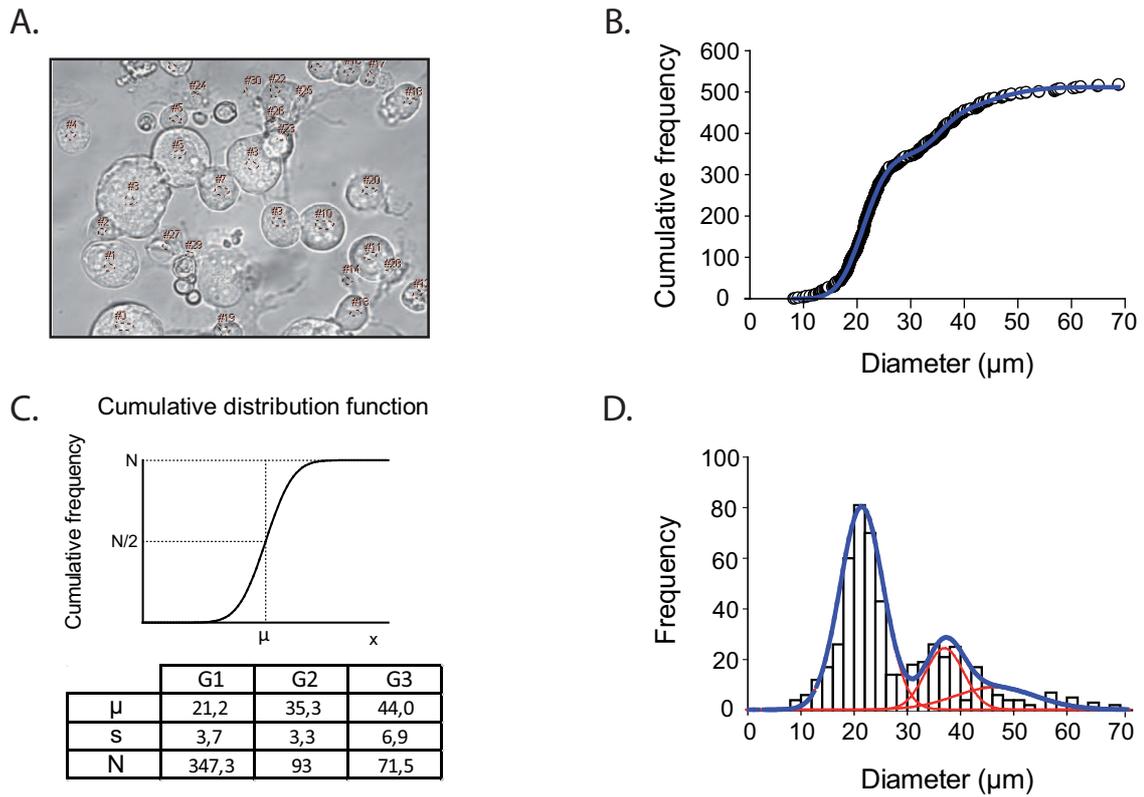
$$f(x) = (N_1/2) * (1 + \operatorname{erf}((X - \mu_1)/\sigma_1)/\sqrt{2})) + (N_2/2) * (1 + \operatorname{erf}((X - \mu_2)/\sigma_2)/\sqrt{2}))$$

$N$ ,  $\mu$  et  $\sigma$  décrivent respectivement l'effectif cumulé, la moyenne et la variance de chacune des distributions.

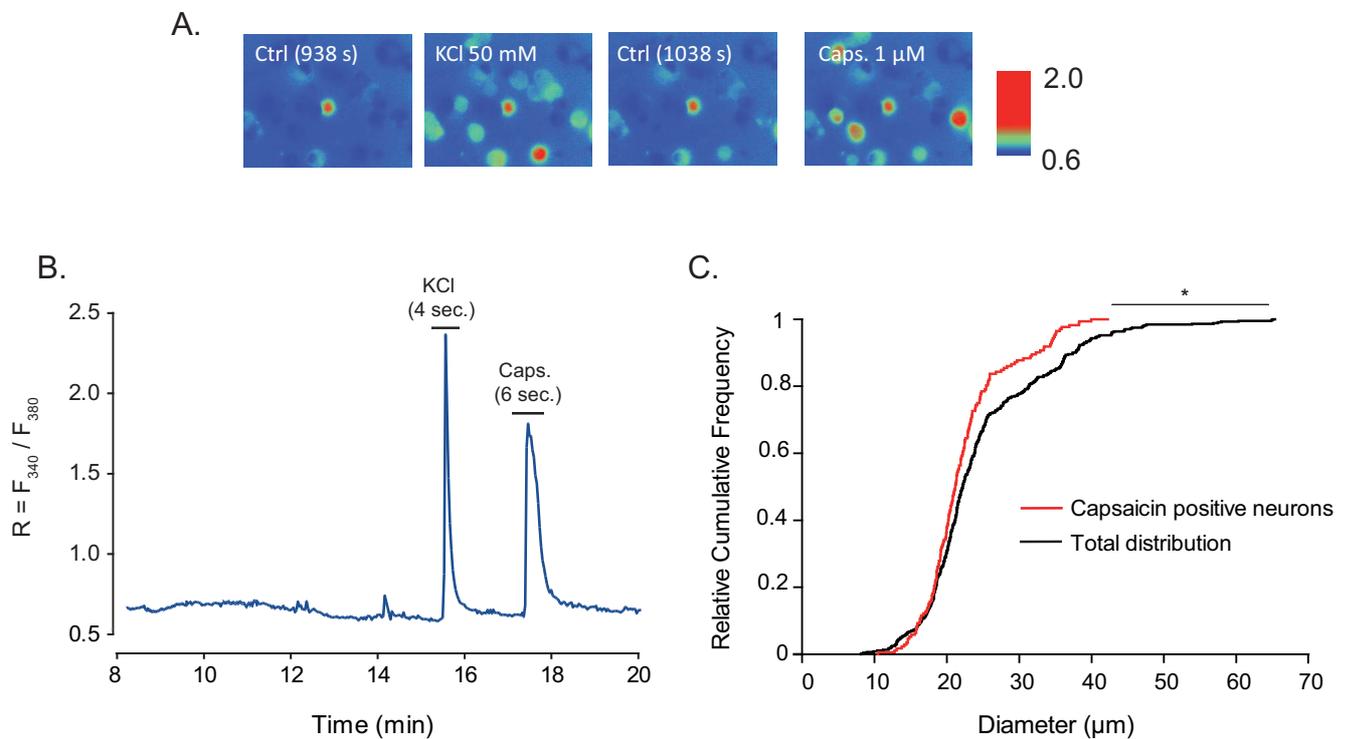
La seconde équation (II) comporte trois gaussiennes :

$$f(x) = (N_1/2) * (1 + \operatorname{erf}((X - \mu_1)/\sigma_1)/\sqrt{2})) + (N_2/2) * (1 + \operatorname{erf}((X - \mu_2)/\sigma_2)/\sqrt{2})) + (N_3/2) * (1 + \operatorname{erf}((X - \mu_3)/\sigma_3)/\sqrt{2}))$$

Les deux types d'ajustement sont effectués et comparés par un test statistique de Fischer. Si l'ajustement réalisé avec l'équation (II) est significatif par rapport à



**Figure R-14. Identification des neurones du DRG : approche morphologique.** (A) Photographie en fond clair d'un champ d'une culture de ganglions rachidiens. Les corps cellulaires des neurones sensoriels primaires sont arrondis et contrastés. Notons également la différence de diamètre entre les différents corps cellulaires. (B) Ajustement non-linéaire de la distribution cumulée du diamètre des neurones du DRG. La distribution cumulée a été ajustée par 3 courbes gaussiennes. (C) Les paramètres  $\mu$  (moyenne), s (déviatoin standard) et N (effectif cumulé) ont été déterminés pour chacun des ajustements. (D) La représentation graphique de l'ajustement à 3 courbes gaussiennes sur l'histogramme de distribution du diamètre des neurones du DRG. Notons que la population neuronale ayant un diamètre moyen de 44  $\mu\text{m}$  est faiblement représentée. Les différents modèles d'ajustements sont comparés par un test statistique de Fischer. Si un ajustement est significatif alors les paramètres  $\mu$ , s et N sont analysés statistiquement par la méthode des asymptotes.



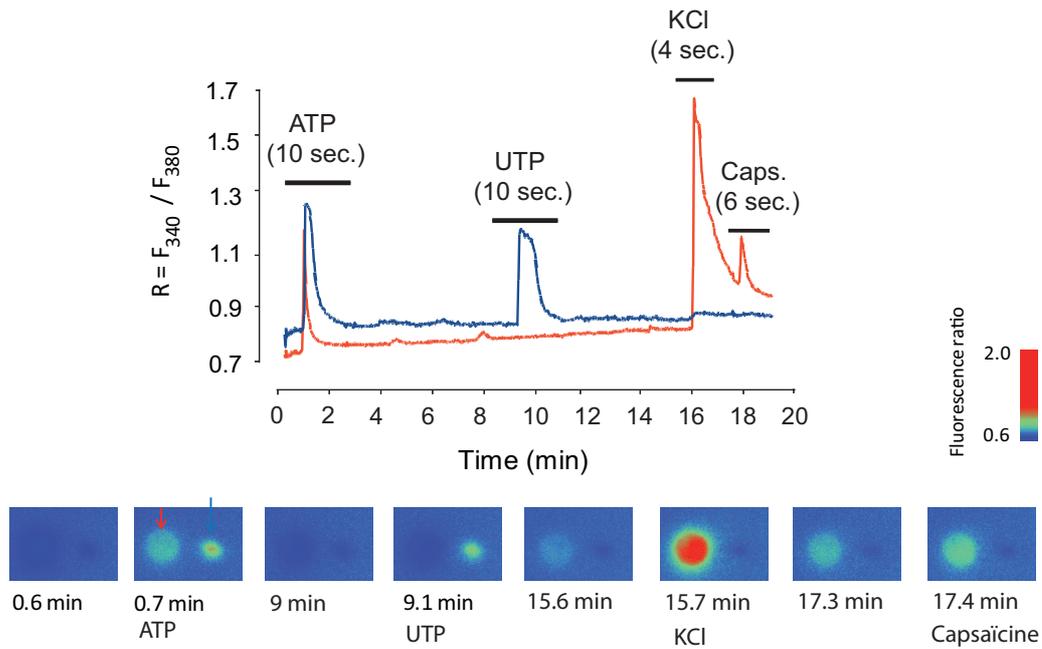
l'équation (I), alors les paramètres  $\mu$  et  $\sigma$  sont analysés statistiquement par la méthode des asymptotes. La distribution cumulée des  $d_{cc}$  se caractérise par un ajustement à 3 courbes gaussiennes (**Figure R-14.B**), pour laquelle les paramètres  $N$ ,  $\mu$  et  $\sigma$  ont été déterminés (**Figure R-14.C**). Ainsi, nous distinguons 3 classes de neurones. Les neurones de petit diamètre ( $\varnothing_{\text{moyen}} = 21,2 \mu\text{m}$ ), les neurones de diamètre moyen ( $\varnothing_{\text{moyen}} = 35,3 \mu\text{m}$ ) et enfin les neurones de gros diamètre ( $\varnothing_{\text{moyen}} = 44 \mu\text{m}$ ). L'histogramme indique que les neurones de petit diamètre, correspondants à des neurones de type C, sont les plus représentés (**Figure R-14.D**).

## **2. Identification des neurones du DRG : approche fonctionnelle.**

Des données obtenues chez la souris indiquent que le récepteur TRPV1 est majoritairement exprimé sur les neurones de petit diamètre (Zwick et al., 2002). L'application de capsaïcine (4 secondes) à  $2 \mu\text{M}$  induit une entrée massive de calcium provenant du milieu extracellulaire se traduisant par une augmentation du ratio de fluorescence (**Figure R-15.A et B**). Une distribution cumulée du  $d_{cc}$  de la population totale des neurones enregistrés a été comparée à la distribution des neurones ayant répondu à la capsaïcine par un test de Kolmogorov-Smirnov (**Figure R-15.C**). On remarque qu'environ 80% des neurones qui expriment ce récepteur ont un diamètre inférieur ou égale à  $25 \mu\text{m}$ .

## **3. Identification des cellules non-neuronales du DRG**

Sur nos cultures de DRG l'application d'ATP ( $50 \mu\text{M}$ ) entraîne une augmentation de la concentration intracellulaire de calcium dans les neurones et les cellules non-neuronales (**Figure R-16**). A l'inverse, l'application d'UTP ( $50 \mu\text{M}$ ), activant majoritairement les récepteurs de type P2Y, entraîne une réponse dans la cellule non-neuronale alors qu'aucun effet n'est observé dans le neurone. L'application de KCl ( $50 \text{mM}$ ) induit une dépolarisation des neurones et une entrée massive de calcium provenant du milieu extracellulaire. Ainsi, nous avons considéré que la cellule enregistrée était un neurone lorsqu'une réponse au KCl a été détectée. A l'inverse une cellule a été identifiée comme non-neuronale lorsqu'une absence de réponse au KCl et une réponse à l'UTP a été observée.



**Figure R-16. Identification des cellules neuronales et non-neuronales du DRG.** Cette illustration démontre l'existence de deux populations cellulaires distinctes. Les tracés représentent l'évolution du ratio de fluorescence d'un neurone (en rouge) et d'une cellule non-neuronale (en bleu) en fonction du temps. L'application d'ATP (50  $\mu$ M) augmente la concentration intracellulaire de calcium et cela se traduit par une augmentation du ratio  $R = F_{340} / F_{380}$  dans le neurone et la cellule non-neuronale. L'application d'UTP (50  $\mu$ M) induit une augmentation de R dans la cellule non-neuronale, alors qu'aucune variation n'est observée dans le neurone. Ainsi, une réponse suite à l'application d'UTP associée à une absence de réponse au KCl est le critère servant à identifier les cellules non-neuronales.

## D. Statistiques

	Estimation	Asymp. SE	P-valeur	Asymp. < 95%	Asymp. > 95%
$\mu_1$	21.18	0.04	< 0.001	21.11	21.26
$\sigma_1$	3.70	0.03	< 0.001	3.64	3.76
$N_1$	347.30	3.08	< 0.001	341.26	353.35
$\mu_2$	35.34	0.24	< 0.001	34.86	35.82
$\sigma_2$	3.27	0.55	< 0.001	2.19	4.35
$N_2$	93.02	40.95	< 0.05	12.56	173.47
$\mu_3$	43.98	5.08	< 0.001	34.01	53.96
$\sigma_3$	6.90	2.94	< 0.05	1.14	12.67
$N_3$	71.49	44.51	> 0.05	-15.95	158.93

## E. Conclusion

La caractérisation des différents types et sous-types cellulaires représente le point de départ de notre étude. L'ajustement gaussien de la distribution du  $d_{cc}$  démontre l'existence de 3 populations neuronales distinctes. Néanmoins l'analyse statistique des paramètres de l'ajustement a révélé que l'effectif cumulé  $N_3$  (de la 3<sup>ème</sup> population) était non significatif (**D. Statistiques**). La petite proportion de neurones A $\beta$  ex vivo peut s'expliquer par le fait qu'elle est la population cellulaire la plus faiblement représentée in vivo (Lawson et al., 1993). De plus, les procédures de dissociation enzymatique et mécanique utilisées lors de la mise en culture peuvent induire la perte d'un certain nombre de cellule.

## II. Sensibilité des neurones et des cellules non-neuronales à un iPDE4

### A. Introduction

Sur des cultures de DRG d'animaux neuropathiques, les récepteurs  $\beta_2$ -adrénergiques sont exclusivement portés par les cellules non-neuronales (Bohren et al., 2013, Chapitre 4 section I. des Résultats). A l'inverse, aucun effet de cet agoniste n'a été observé sur des cultures issues d'animaux contrôles. Considérant qu'une différence fonctionnelle puisse exister entre les cultures de DRG d'animaux neuropathiques et contrôles, nous avons voulu tester la différence de sensibilité à un iPDE4 entre ces deux conditions.

### B. Protocole

Les DRG ont été prélevés chez des animaux Cuff et Sham 5 semaines après la chirurgie. La mise en culture est effectuée selon le même schéma expérimental que précédemment (section **V. Méthodes générales**). Les expériences d'imagerie calcium ont débuté environ 18 heures après l'ensemencement.

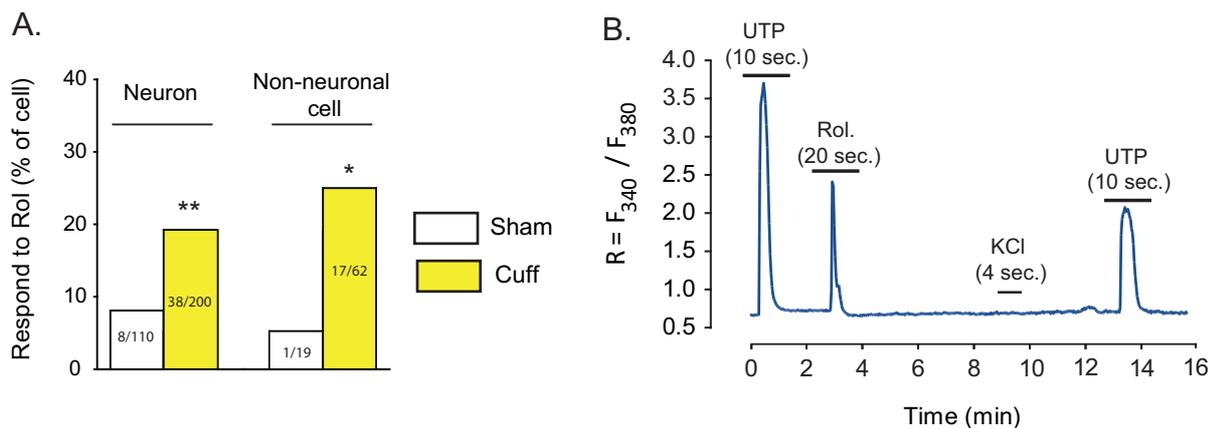
### C. Résultats

#### 1. Effet d'un iPDE4 sur des cultures de DRG d'animaux neuropathiques

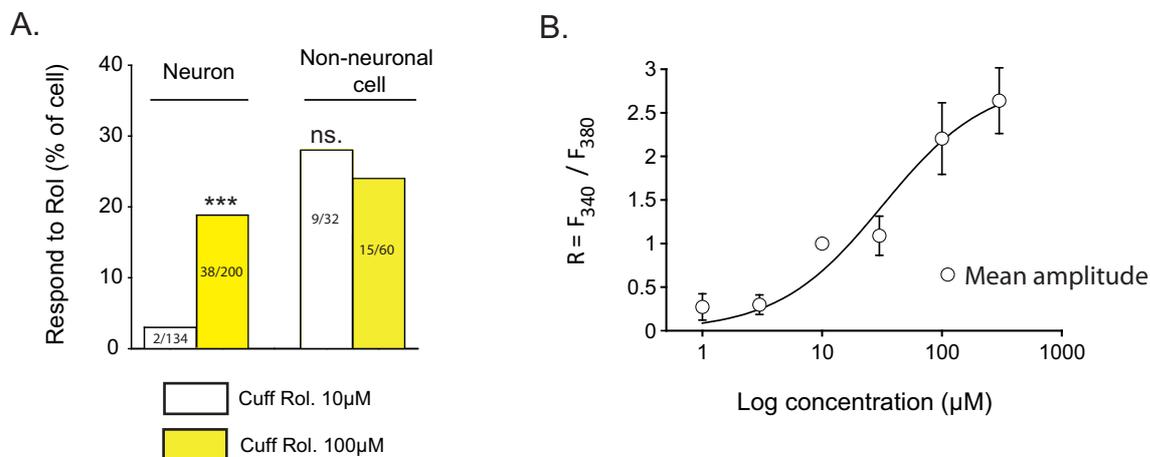
Le rolipram (100  $\mu\text{M}$ ) (iPDE4) stimule les neurones et les cellules non-neuronales du DRG. De plus, nous observons une augmentation significative du pourcentage de neurones répondant au rolipram chez les animaux Cuff par comparaison aux animaux Sham. Le même effet est observé pour les cellules non-neuronales, où environ 25% des cellules sont recrutés en condition neuropathique alors que ce chiffre tombe à 5% chez les animaux contrôles (**Figure R-17.A**). Le tracé représente l'enregistrement d'une cellule non-neuronale ayant répondu à l'application de rolipram. (**Figure R17.B**).

#### 2. Dose-réponse.

La dose-réponse a été effectuée sur des cultures de DRG issues d'animaux Cuff. Environ 15% des neurones enregistrés ont répondu à une concentration de rolipram de 100  $\mu\text{M}$  alors que seulement 1,4% sont activés lorsque la concentration est 10 fois moins importante (**Figure R-18.A**). A l'inverse, que ce soit à 10  $\mu\text{M}$  ou 100  $\mu\text{M}$ , le



**Figure R-17. Localisation de l'effet d'un iPDE4.** (A) Histogramme illustrant le pourcentage de neurones et de cellules non-neuronales ayant répondu au rolipram chez les animaux Sham (en blanc) et Cuff (en jaune). On observe une augmentation du nombre de réponses neuronales et non-neuronales sur les cultures de DRG provenant d'animaux Cuff par comparaison aux animaux Sham. (B) Tracé représentant l'évolution du ratio de fluorescence d'une cellule non-neuronale au cours du temps. L'application d'UTP (50  $\mu$ M) induit un changement de R alors qu'aucune réponse n'est observée après application de KCl (50 mM). De plus, une augmentation de la concentration intracellulaire de calcium est observée lors de l'application de rolipram (100  $\mu$ M).



**Figure R-18. Analyse de l'action d'un iPDE4 : dose-réponse.** (A) Histogramme représentant le pourcentage de neurones et de cellules non-neuronales ayant répondu au rolipram à 10  $\mu$ M et 100  $\mu$ M. Cette étude a été réalisée sur des cultures de DRG d'animaux Cuff. On observe une réduction du nombre de neurones répondant au rolipram à une concentration de 10  $\mu$ M. A l'inverse, aucun changement n'est observé pour les cellules non-neuronales. (B) Courbe de dose-réponse des neurones après application de rolipram à 1  $\mu$ M, 3  $\mu$ M, 10  $\mu$ M, 30  $\mu$ M, 100  $\mu$ M, et 300  $\mu$ M. Un ajustement par une courbe exponentielle a été effectué permettant de décrire l'amplitude du pic de fluorescence en fonction du logarithme de la concentration de rolipram. Les paramètres A1 (Vmax) et A2 (EC50) sont analysés statistiquement par la méthode des asymptotes.

rolipram recrute environ 25 à 30% des cellules non-neuronales (**Figure R-18.A**). La présence potentielle d'une désensibilisation des réponses non-neuronales a rendu impossible la réalisation d'une courbe complète de dose-réponse. En revanche, dans le cas des réponses neuronales, une étude de dose-réponse a pu être effectuée. Pour cela, des applications successives de rolipram à une concentration de 1  $\mu\text{M}$ , 3  $\mu\text{M}$ , 10  $\mu\text{M}$ , 30  $\mu\text{M}$ , 100  $\mu\text{M}$  et 300  $\mu\text{M}$  ont été réalisées. L'ajustement d'une courbe de dose-réponse a été effectué à partir des valeurs individuelles d'amplitude obtenues pour chaque cellule et normalisées par l'amplitude mesurée à la concentration de 10  $\mu\text{M}$ . La courbe de dose-réponse est décrite par l'équation suivante :  $f(x)=A_{\text{max}}*X/(X+K)$  où  $A_{\text{max}}$  représente l'amplitude maximum et  $K$  correspond à la valeur de la concentration efficace à 50% ( $CE_{50}$ ). Les paramètres  $A_{\text{max}}$  et  $K$  ont été analysés statistiquement (méthode des asymptotes). Pour un souci de clarté, l'ajustement de la courbe de dose-réponse illustré par la **figure R-18.B**, a été effectué à partir des amplitudes moyennes et exprimées en fonction du logarithme de la concentration de rolipram. La constante  $K$  ( $CE_{50}$ ) déterminée à partir de l'ajustement est de 30  $\mu\text{M}$ .

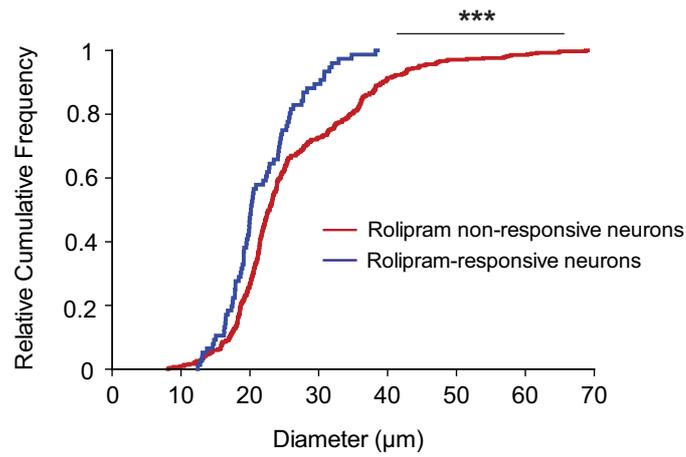
### 3. Identification du sous-type de neurone recruté par un iPDE4

La distribution cumulée du  $d_{cc}$  des neurones ayant répondu au rolipram (I) a été comparée à la distribution cumulée des neurones n'ayant pas répondu à cette substance (II) par un test de Kolmogorov-Smirnov. Nos données indiquent que la distribution (I) diffère significativement de la distribution (II). Cela signifie que le rolipram active un contingent de neurones dont le diamètre moyen diffère significativement de la distribution totale. En effet, environ 80% des neurones sensibles au rolipram ont un diamètre inférieur ou égal à 22  $\mu\text{m}$  (**Figure R-19**).

#### D. Statistiques

Interaction	Type cellulaire	Test statistique	P-valeur
Sham X Cuff	Neurones	Fischer	< 0,01
Sham X Cuff	Cellules non-neuronales	Fischer	< 0,05
Rol. sensible X Rol. insensible	Neurones	Kolmogorov-Smirnov	< 0,001

Paramètre	Estimation	Asymptote SE	P-valeur
Amax	2.85	0.33	< 0.001
K ( $CE_{50}$ )	29.86	12.13	< 0.05



**Figure R-19. Identification du sous-type de neurone recruté.** Comparaison de la distribution cumulée du diamètre des neurones du DRG répondant au rolipram et des neurones insensibles au rolipram. On observe que 80% des neurones répondant au rolipram ont un diamètre inférieur ou égal à 25 µm. L'analyse statistique est effectuée par un test non-paramétrique de Kolgomorov-Smirnov à \*  $p < 0,05$ .

## E. Discussion et conclusion

Sur une culture de DRG d'animaux neuropathiques, le pourcentage de neurones et de cellules non-neuronales répondant au rolipram augmente significativement par comparaison aux animaux contrôles. Nous avons montré que la terbutaline,  $\beta_2$ -agoniste, active sélectivement les cellules non-neuronales du DRG (Bohren et al., 2013, Chapitre 4 section I. des Résultats). Le récepteur  $\beta_2$ -adrénergique appartient à la famille des récepteurs couplés aux protéines Gs et sa stimulation entraîne une augmentation des taux intracellulaires d'AMPc. Les données moléculaires suggèrent que les PDE4 sont activées suite à la stimulation des récepteurs  $\beta_2$ -adrénergiques. Celles-ci sont responsables de l'hydrolyse de l'AMPc (Bruss et al., 2008), participant ainsi au mécanisme de rétrocontrôle négatif. L'augmentation de la sensibilité des cellules non-neuronales au rolipram suggère l'existence d'un tonus de production d'AMPc dans les neurones et les cellules non-neuronales. De plus, certaines données suggèrent que l'augmentation de la concentration d'AMPc dans les cellules non-neuronales conduit à l'inhibition de la synthèse de cytokines pro-inflammatoires comme le TNF $\alpha$  (Christiansen et al., 2011; Bohren et al., 2013).

A l'inverse, de nombreuses études indiquent que l'activation de la voie AMPc/PKA conduit à une hyperexcitabilité des neurones sensoriels, et cela a pu être observé *in vitro* (Wang et al., 2007) et *in vivo* (Cruz Duarte et al., 2012). Nos données semblent indiquer que les neurones sensibles au rolipram appartiennent à la classe des neurones de type C ou A $\delta$  ayant un diamètre inférieur à 22  $\mu$ m. Ces études *ex vivo* laissent à penser que le rolipram aurait un double effet sur la transmission de l'information nociceptive. Ainsi, son action sur les cellules non-neuronales serait corrélée à une activité antinociceptive alors que son action neuronale pourrait être considérée comme pronociceptive (voir aussi **Chapitre 5** section **IV.** des **Résultats** ci-après).

L'étude de dose-réponse révèle que le pourcentage de neurones répondant à une concentration de 10  $\mu$ M est quasi nul. A l'inverse, aucune différence significative n'a été observée dans le cas des réponses non-neuronales. La sous-famille des PDE4 comporte 4 sous-types, PDE4, A, B, C et D codés par 4 gènes indépendants, le rolipram étant un inhibiteur non sélectif de ces différents sous-types. Néanmoins, une étude a mis en évidence que le rolipram possédait une meilleure affinité pour la PDE4A et la PDE4B avec un IC<sub>50</sub> de 1,1 et 0,9 nM respectivement alors qu'il est de 61 nM pour la PDE4D (Wang et al., 1997). Cette différence de sensibilité pourrait

s'expliquer par le patron d'expression des sous-types de PDE. Par exemple, la PDE4B est majoritairement associée aux cellules gliales (Christiansen et al., 2011; Ghosh et al., 2012) alors que la PDE4D semble préférentiellement exprimée dans les neurones (Por et al., 2012).

### III. Origine du calcium et rôle du récepteur $\beta_2$ -adrénergique

#### A. Introduction

Les données de la littérature indiquent que l'application de rolipram sur des cultures de neurones augmente les taux intracellulaires d'AMPC (Mironov et al., 2009). Le recrutement de la voie AMPC/PKA peut conduire à l'activation de canaux calcium membranaires (Distler et al., 2003) ou stimuler la libération de calcium provenant des stocks intracellulaires (Lefkimmiatis et al., 2009). Par conséquent, nous avons voulu déterminer l'origine du calcium mis en jeu lors de l'activation des neurones et des cellules non-neuronales par un iPDE4. Enfin, de nombreuses études suggèrent l'existence d'un couplage entre les récepteurs  $\beta_2$ -adrénergiques et les PDE4. En ce sens, une approche in vivo et ex vivo a été utilisée afin d'évaluer l'effet du rolipram chez les souris sauvages et déficientes pour le récepteur  $\beta_2$ -adrénergiques.

#### B. Protocole

L'origine du calcium mis en jeu a été déterminée en utilisant des cultures de DRG d'animaux C57BL/6J prélevés entre 5 et 8 semaines après l'induction de la neuropathie.

Le rôle des récepteurs  $\beta_2$ -adrénergiques a été évalué ex vivo et in vivo. Pour cela, les DRG ont été prélevés chez des animaux Cuff sauvages et déficients pour les récepteurs  $\beta_2$ -adrénergiques. La mise en culture est effectuée selon le même schéma expérimental que précédemment (section **V. Méthodes générales**). Les expériences d'imagerie calcium ont été réalisées entre 18 et 24h après la mise en culture. Enfin, l'effet antiallodynique d'un traitement prolongé par le rolipram a été mesuré chez des souris sauvages ou déficientes pour les récepteurs  $\beta_2$ -adrénergiques.

#### C. Résultats

##### 1. Origine du calcium ( $\text{Ca}^{2+}$ )

Lorsque l'enregistrement a été effectué en présence de  $\text{Ca}^{2+}$  dans le milieu extracellulaire, 100% des neurones ont répondu au KCl alors que ce chiffre tombe à moins de 2% en absence de  $\text{Ca}^{2+}$  dans le milieu (**Figure R-20.B**). La dépolarisation de

la cellule engendrée par l'application de KCl entraîne l'ouverture de canaux voltage-dépendants provoquant une entrée massive de  $\text{Ca}^{2+}$  extracellulaire. Nous avons ensuite démontré que l'activation des cellules neuronales et non-neuronales par le rolipram nécessite le recrutement du  $\text{Ca}^{2+}$  provenant du milieu extracellulaire. En effet, environ 18% des neurones enregistrés répondent au rolipram alors que ce chiffre tombe à 5% en l'absence de  $\text{Ca}^{2+}$  extracellulaire (**Figure R-20.A**). De même, nous observons une diminution significative du pourcentage de cellules non-neuronales sensibles au rolipram en l'absence de  $\text{Ca}^{2+}$  extracellulaire (**Figure R-20.A**).

## 2. Rôle du récepteur $\beta_2$ -adrénergique

Respectivement 18% et 14% des neurones ont répondu au rolipram chez les souris sauvages et déficientes pour les récepteurs  $\beta_2$ -adrénergiques. De la même manière, environ 25% des cellules non-neuronales ont répondu chez les souris sauvages contre 20% chez les animaux déficients pour ce récepteur (**Figure R-21.A**). Ainsi, il semble que les réponses au rolipram ne soient pas dépendantes de la présence des récepteurs  $\beta_2$ -adrénergiques. Au niveau comportemental, nos résultats montrent que l'effet antialloodyne du rolipram apparaît après environ 12 jours de traitement chez les animaux sauvages et que ce délai est maintenu chez les animaux déficients pour les récepteurs  $\beta_2$ -adrénergiques (**Figure R-21.B et C**).

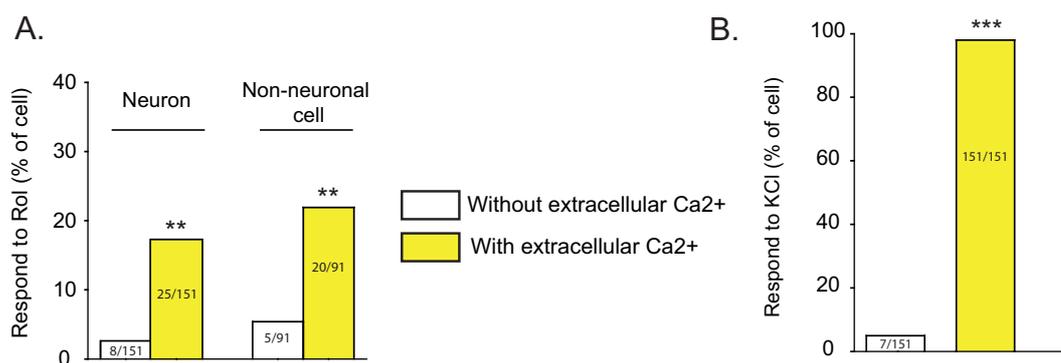
## D. Statistiques

Traitement	Génotype	Analyse de la variance (ANOVA)			Analyse post-hoc (Test de Duncan)		
		Interaction	Statistique	P-valeur	Comparaison des groupes	Jours	P-valeur
Rolipram	WT	Groupe X Temps	$F_{10,140} = 14,60$	< 0.001	Cuff Rolipram > Cuff Saline	Jour 27-37	< 0.001
					Cuff Rolipram = Sham Saline	Jour 34-37	> 0.05
Rolipram	$\beta_2\text{-AR}^{-/-}$	Groupe X Temps	$F_{10,140} = 12,60$	< 0.001	Cuff Rolipram > Cuff Saline	Jour 29-37	< 0.001
					Cuff Rolipram = Sham Saline	Jour 34-37	> 0.05

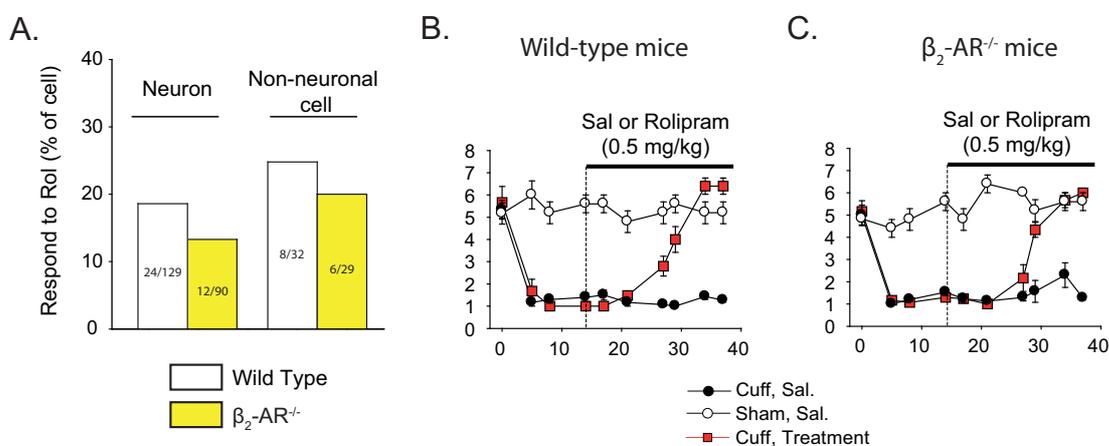
Interaction	Type cellulaire	Test statistique	P-valeur
Sans $\text{Ca}^{2+}$ X Avec $\text{Ca}^{2+}$	Neurones	Fischer	< 0,01
Sans $\text{Ca}^{2+}$ X Avec $\text{Ca}^{2+}$	Cellules non-neuronales	Fischer	< 0,01
KCl avec $\text{Ca}^{2+}$ X KCl sans $\text{Ca}^{2+}$	Neurones	Fischer	< 0,001
WT X KO $\beta_2\text{-AR}$	Neurones	Fischer	> 0,05
WT X KO $\beta_2\text{-AR}$	Cellules non-neuronales	Fischer	> 0,05

## E. Conclusion

L'effet du rolipram sur les neurones et les cellules non-neuronales semble dépendant de la présence de calcium extracellulaire. Cela nous indique que



**Figure R-20. Mécanisme d'action d'un iPDE4 : rôle du calcium extracellulaire.** (A) Histogramme illustrant le pourcentage de neurones et de cellules non-neuronales répondant au rolipram en présence et en absence de calcium extracellulaire. Ces expériences ont été réalisées sur des cultures de DRG provenant d'animaux Cuff. Lorsque le milieu extracellulaire est dépourvu de calcium on observe une diminution significative du pourcentage de neurones et de cellules non-neuronales répondant au rolipram. (B) Histogramme représentant la proportion de neurones répondant à une application de KCl (50 mM) en absence et en présence de calcium extracellulaire. Ce résultat est utilisé comme un contrôle des conditions expérimentales.



**Figure R-21. Mécanisme d'action d'un iPDE4 : rôle du récepteur  $\beta_2$ -adrénergique.** (A) Histogramme illustrant le pourcentage de cellules neuronales et non-neuronales répondant au rolipram. Aucune différence n'est observée entre les animaux sauvages et déficients pour le récepteur  $\beta_2$ -adrénergique. (B) (C) L'effet antialloodyne d'un traitement prolongé par le rolipram a été mesuré chez des animaux sauvages et déficients pour le récepteur  $\beta_2$ -adrénergique (n=6-8/groupe). L'effet thérapeutique apparaît après environ 14 jours de traitement. Les données sont exprimées en moyennes  $\pm$  SEM. Sal., Saline.

l'augmentation de la concentration de calcium intracellulaire est liée à l'ouverture de canaux membranaires sur les neurones et les cellules non-neuronales.

Une étude publiée en 2001, montre que les récepteurs  $\beta_2$ -adrénergiques peuvent s'associer à un canal calcium formant ainsi un macrocomplexe composé de l'adénylate cyclase et de la PKA (Davare et al., 2001). La régulation de la voie AMPc/PKA pourrait donc influencer l'état de phosphorylation de ces canaux et par conséquent leur probabilité d'ouverture. Mais l'effet du rolipram reste présent en l'absence des récepteurs  $\beta_2$ -adrénergiques. Ces résultats laissent supposer que l'effet du rolipram observé chez les animaux déficients pour le récepteur  $\beta_2$ -adrénergique pourrait être lié soit à l'activation d'autres récepteurs exprimés sur les SGCs du DRG, soit à une augmentation tonique de la production d'AMPc, ces deux mécanismes n'étant pas exclusifs l'un de l'autre. Les SGCs du DRG expriment d'autres récepteurs couplés aux protéines G, parmi lesquels nous pouvons citer les récepteurs aux purines (Kobayashi et al., 2013), et qui peuvent constituer autant de sources de production d'AMPc. L'observation de réponses calciques au rolipram pourrait également s'expliquer par une augmentation de l'activité de l'adénylate cyclase en condition neuropathique. En effet, une étude relate que l'hyperexcitabilité des neurones des DRG ex vivo serait lié à une activation accrue l'adénylate cyclase conduisant à la production d'AMPc (Song et al., 2006). Ainsi, l'effet du rolipram observé chez les animaux déficients pour le récepteur  $\beta_2$ -adrénergiques pourrait être lié à une suractivation de l'adénylate cyclase dans les SGCs se traduisant par une augmentation tonique de la production d'AMPc.

## IV. Rolipram et hyperalgésie : rôle du récepteur TRPV1

### A. Introduction

Dans notre étude, nous avons démontré que le rolipram activait les neurones et les cellules non-neuronales du DRG. De plus, nos données supposent que l'effet anti-TNF $\alpha$  du rolipram serait lié à son action sur les cellules non-neuronales, de la même manière que lors d'un traitement par les  $\beta_2$ -agonistes (Bohren et al., 2013, Chapitre 4 section I. des Résultats).

A l'inverse, certaines études suggèrent que l'activation de la voie AMPc/PKA induit une hyperexcitabilité des neurones du DRG, ce qui traduirait donc un effet pronociceptif de la molécule (Song et al., 2006). Nous avons démontré que l'effet neuronal était présent lorsque le rolipram était appliqué à de forte concentration ex vivo (Chapitre 5 section II. des Résultats). Aux doses utilisées dans nos études comportementales, nous n'avons pas réussi à mettre en évidence l'effet pronociceptif du rolipram. En effet, l'administration de rolipram par voie systémique à forte doses est rendu impossible par la présence de nombreux effets indésirables, notamment sédatifs de la molécule (Silvestre et al., 1999).

Le rolipram active un contingent particulier de neurones ayant un diamètre inférieur à 25  $\mu\text{m}$  (neurones C et/ou A $\delta$ ) où est majoritairement exprimé le récepteur TRPV1 (Zwick et al., 2002). L'activation du récepteur TRPV1 conduit au recrutement d'un complexe composé de l'adénylate cyclase et de la PKA modulant ainsi l'activité du récepteur (Efendiev et al., 2013). Par conséquent, nous avons testé ex vivo l'action du rolipram sur l'état de désensibilisation du récepteur TRPV1. In vivo, nous avons évalué l'effet d'une injection locale de rolipram sur l'hyper-sensibilité mécanique induite par une application topique de capsaïcine.

### B. Protocole

#### 1. Imagerie calcium : protocole de désensibilisation

Les DRG provenant des segments lombaires L4, L5 et L6 sont mis en culture selon le même protocole que décrit précédemment (section **V. Méthodes générales**)  
Le protocole de désensibilisation consiste en l'application répétée d'une solution de capsaïcine (2  $\mu\text{M}$ , 4 secondes), à intervalles de 3 minutes, sur une durée totale de 18 minutes (7 applications). Une perfusion de solution extracellulaire (pour les 5

premières applications et la 8<sup>ème</sup> application) ou de rolipram (pour la 6<sup>ème</sup> application) a été effectuée 1 minute avant chaque application de capsaïcine.

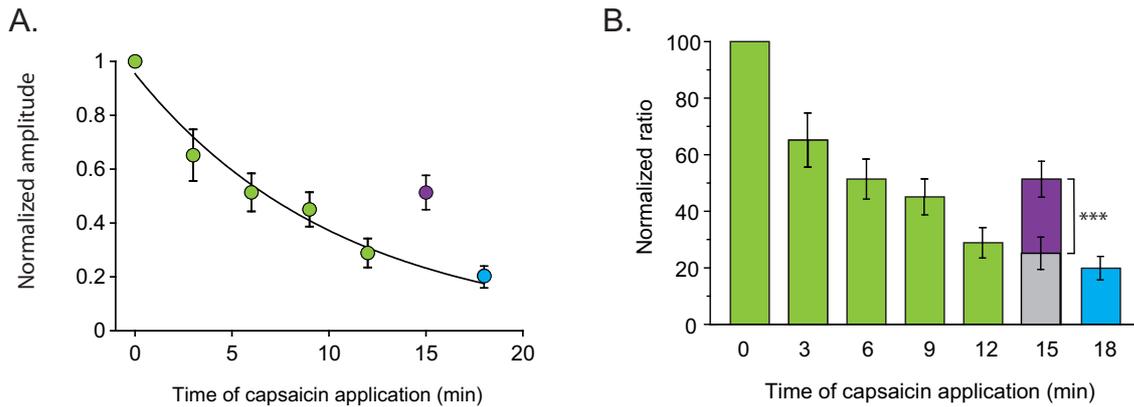
## 2. Effet d'une application topique de capsaïcine

Ces expériences ont été effectuées sur des souris mâles C57BL/6j âgées de 6 à 8 semaines. Le seuil de sensibilité mécanique est déterminé avant la procédure d'injection (test 1) (**Figure R-23.A**). Les animaux ont reçu une injection intraplantaire de rolipram (0,2 mg/ml) (Cunha et al., 1999) ou de solution véhicule. Brièvement, une seringue Hamilton de 50 µL est insérée sous la surface plantaire et un volume de 10 µL est injecté. L'injection est réalisée sous anesthésie gazeuse (Isoflurane 2%) et effectuée de façon unilatérale. Immédiatement après l'injection, une application topique d'une solution de capsaïcine (0,1 mM dans 50% d'éthanol avec du NaCl 0,9%) ou de véhicule a été effectuée à l'aide d'un coton tige sur la surface plantaire de l'animal préalablement traitée. Le seuil de sensibilité mécanique des animaux est évalué 15 minutes après l'injection (test 2) (**Figure R-23.A**)

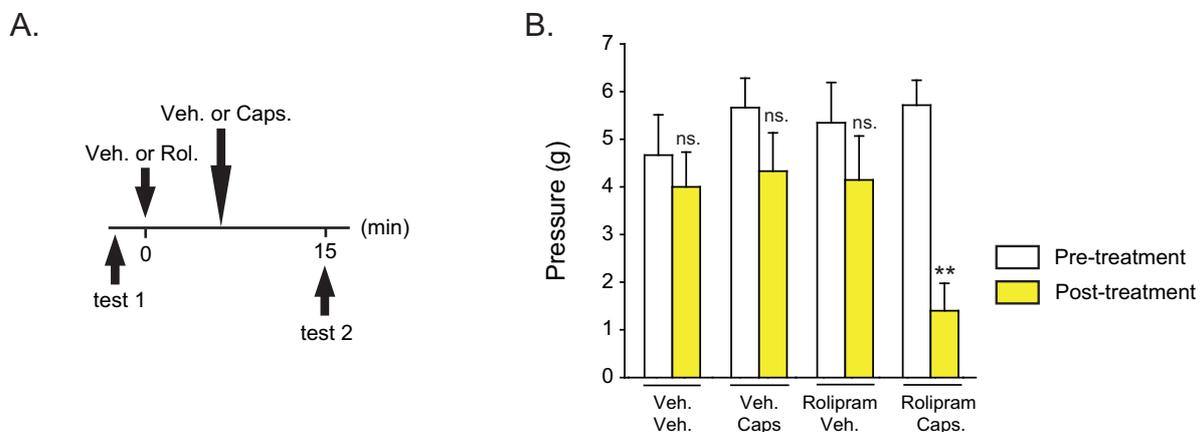
## C. Résultats

### 1. Rolipram et récepteur TRPV1

L'application répétée de capsaïcine entraîne une diminution progressive de l'amplitude des réponses calciques. Pour chaque cellule, la décroissance observée a été ajustée par une courbe exponentielle dont l'équation est la suivante :  $Y=A0*EXP (-Taux*X)$  où A0 correspond à l'amplitude au temps 0 et taux représente un constante de temps. La sixième application de capsaïcine, a été précédée par une perfusion de rolipram pendant 1 minute dans le bain. La valeur moyenne de l'amplitude correspondante est représentée par le point violet (**Figure R-22.A**). A l'aide de l'équation ci-dessus, nous avons déterminé la valeur théorique de l'amplitude de la réponse sans prétraitement par le rolipram. Cette valeur est représentée sur l'histogramme par la barre grise (**Figure R-22.B**). La valeur mesurée est comparée à la valeur théorique calculée à partir de l'ajustement, en utilisant un test T de Student. Ainsi, nous avons montré que la valeur de l'amplitude mesurée est significativement supérieure à la valeur théorique.



**Figure R-22. Mécanisme d'action d'un iPDE4 : rôle du récepteur TRPV1. (A)** Tracé représentant la décroissance de l'amplitude du pic de fluorescence lors d'applications répétées de capsaïcine (2  $\mu$ M) pendant 4 secondes à intervalles de 3 minutes. Les 5 premières applications de capsaïcine (en vert) ont été précédées d'une perfusion de solution extracellulaire. La sixième application (en violet) est précédée d'une perfusion de rolipram (100  $\mu$ M, 20 s). Enfin, une période de "wash" de 3 minutes est effectuée avant une dernière application de capsaïcine (en bleu). Le profil de désensibilisation de la réponse calcique a été ajusté à l'aide d'un courbe exponentielle pour chacune des cellules enregistrées (n=16), et l'ajustement a été réalisé à partir des valeurs d'amplitudes observées lors des 5 premières applications. La mesure des paramètres A1 et A2 de la courbe exponentielle nous a permis de déterminer la valeur théorique du ratio de fluorescence sans pré-traitement par le rolipram. **(B)** Histogramme représentant la décroissance de l'amplitude des réponses suite à une application répétée de capsaïcine. La valeur mesurée (en violet) est comparée à la valeur théorique (en gris) calculée à partir de l'ajustement, et qui représente l'amplitude de la réponse théorique sans pré-traitement par le rolipram.



**Figure R-23. Rôle du récepteur TRPV1 : données comportementales. (A)** La sensibilité mécanique est évaluée par le test des filaments de von Frey. Les valeurs de seuil avant le traitement (en blanc) et après le traitement (en jaune) sont représentées pour chacun des groupes expérimentaux (n=6/groupe). Les animaux ont reçu une injection intraplantaire de rolipram (10  $\mu$ L) ou de solution véhicule. Celle-ci est suivie d'une application topique, sur la surface plantaire de l'animal, d'une solution de capsaïcine (0,1 mM). Les valeurs de seuil de sensibilité sont déterminées avant l'injection (test 1) et 15 minutes après l'injection intraplantaire et l'application topique (test 2). **(B)** Chez les animaux ayant reçu une injection intraplantaire de solution véhicule, l'application topique de capsaïcine n'a aucun effet sur le seuil de sensibilité mécanique. De la même façon l'administration intraplantaire de rolipram ne modifie pas le seuil de sensibilité mécanique. Enfin, l'injection intraplantaire de rolipram induit une hypersensibilité mécanique après application topique de capsaïcine. Les valeurs sont exprimées en moyennes  $\pm$  SEM. Caps.,capsaïcine ; Rol., Rolipram ; Veh.,véhicule.

## 2. Sensibilité mécanique.

L'application topique de capsaïcine à faible concentration (0,1 mM) faisant suite à une administration intraplantaire de solution véhicule n'induit aucun changement du seuil de sensibilité mécanique (**figure R-23.B**). L'injection intraplantaire de rolipram potentialise l'effet de la capsaïcine. En effet, nous observons une diminution significative de la valeur du seuil de sensibilité mécanique (test 2) (**Figure R-23.B**).

## D. Statistiques

<b>Données <i>ex vivo</i></b>			
<b>Interaction</b>	<b>Test</b>	<b>Statistique</b>	<b>P-valeur</b>
Valeur théorique X Valeur mesurée	Student	F = 5,32	< 0,001
<b>Données <i>in vivo</i></b>			
<b>Interaction</b>	<b>Test</b>	<b>Statistique</b>	<b>P-valeur</b>
Intraplantaire X Topique X Temps	Anova	F <sub>1,20</sub> = 5,74	< 0,05

## E. Discussion et conclusion

L'application répétée de capsaïcine induit diminue progressivement l'amplitude des réponses au cours du temps. Nous avons démontré que le rolipram potentialise transitoirement l'effet de la capsaïcine sur son récepteur. En effet, la valeur de l'amplitude mesurée après application de rolipram est significativement supérieure à l'amplitude détectée lors de la précédente application. Ainsi, ces données nous permettent d'affirmer que le rolipram potentialise l'effet d'un agoniste des récepteurs TRPV1.

Nous avons également montré que la pente de la courbe exponentielle n'était pas modifiée par l'application de rolipram. En effet, l'amplitude mesurée lors de la 7<sup>ème</sup> application de capsaïcine est inférieure à celle obtenue lors de 5<sup>ème</sup> application. Cette donnée indique que l'effet du rolipram est transitoire et le profil de désensibilisation du récepteur ne semble pas modifié sur le long terme. Par contre, d'autres données obtenues sur des cultures de ganglions trigéminaux semblent démontrer que le rolipram (Por et al., 2012) et la forskoline (Efendiev et al., 2013) bloquent la désensibilisation du récepteur TRPV1.

Dans notre étude, l'action de la capsaïcine sur son récepteur a été évaluée sur une même cellule, et un seul point temporel a été utilisé pour mesurer l'effet du rolipram. Cela nous a permis d'utiliser chaque cellule comme son propre contrôle et ainsi de diminuer considérablement le nombre de cellules nécessaires pour l'analyse statistique. Afin de déterminer l'implication potentielle du rolipram sur l'état de désensibilisation du récepteur, les prochaines études devront être réalisées sur deux

groupes de cellules indépendants. De cette manière, nous pourrions comparer le profil complet de désensibilisation du récepteur avec ou sans application de rolipram.

Au niveau comportemental, nous avons observé une diminution significative du seuil de sensibilité mécanique chez les animaux ayant reçu une administration intraplantaire de rolipram comparés aux animaux traités par la solution véhicule. L'absence de réponse suite à une application de capsaïcine à faible concentration, suggère que la stimulation du récepteur TRPV1 n'a pas atteint le seuil nécessaire au déclenchement d'un effet comportemental. En revanche, un prétraitement par le rolipram potentialise l'effet de la capsaïcine sur son récepteur. Au niveau physiologique l'effet observé pourrait être lié à l'activation de fibres nociceptives exprimant le récepteur TRPV1, avec une intensité suffisante au déclenchement d'une réponse comportementale. Par conséquent, en utilisant une approche *ex vivo* et *in vivo*, nous avons mis en évidence que l'effet neuronal pronociceptif du rolipram pourrait être lié à son action sur le récepteur TRPV1.

Néanmoins, il convient de noter que l'expression du récepteur TRPV1 ne se limite pas aux neurones du DRG. En effet, des données ont révélé l'expression de ce récepteur dans les kératinocytes de l'épiderme (Inoue et al., 2002). Ainsi, l'hypersensibilité induite par la capsaïcine pourrait être liée à une activation locale de ces récepteurs. Enfin, bien que l'effet de la capsaïcine sur la sensibilité mécanique ait déjà été démontré (Yalcin et al., 2011), il semblerait toutefois nécessaire de tester son effet sur la sensibilité thermique des animaux.

Pour résumer, nos résultats indiquent que le rolipram peut induire des effets opposés sur le système nociceptif. En effet, son action non-neuronale, présente à faible concentration *ex vivo*, serait corrélée à l'activité anti-TNF $\alpha$  de la molécule dans les DRG comme cela avait pu être observé lors d'un traitement par  $\beta_2$ -agonistes (Bohren et al., 2013, Chapitre 4, Section I. des Résultats). A l'inverse, l'action neuronale du rolipram, présente à de fortes concentrations *ex vivo*, semble traduire un effet pronociceptif de la molécule via le recrutement du récepteur TRPV1. Ainsi, l'effet antinociceptif ou pronociceptif de rolipram semble dépendre du type cellulaire recruté, de la dose ainsi que de la voie d'administration utilisée.



# *Discussion générale*

---



## I. Considérations relatives au modèle *in vivo* de douleur neuropathique

Un modèle animal est un outil permettant l'étude et la modélisation d'un processus physiopathologique préalablement décrit chez l'Homme. Un modèle animal pertinent doit répondre à plusieurs critères : **une validité homologique** (similarité des étiologies et des mécanismes biologiques sous-jacents), une **validité phénoménologique** (le modèle est capable de reproduire les symptômes de la pathologie) et **une validité prédictive** (les traitements efficaces en clinique doivent l'être chez le modèle) (Willner, 1984).

### A. Validité homologique

La validité homologique d'un modèle évalue la similarité des processus physiopathologiques qui caractérisent la maladie décrite chez l'Homme (Belzung and Lemoine, 2011). De nombreux modèles de douleurs neuropathiques ont été développés chez le rongeur. Une grande partie des études réalisées dans ce domaine utilisent des modèles de douleurs neuropathiques d'origine traumatique liés à des lésions mécaniques du système nerveux périphérique (Bennett and Xie, 1988; Seltzer et al., 1990; Kim and Chung, 1992; Decosterd and Woolf, 2000). La facilité d'accès du nerf sciatique en fait une cible privilégiée dans la plupart des modèles utilisés (Barrot, 2012).

Au niveau clinique, les névralgies se définissent comme des lésions ou des irritations du nerf périphérique, se traduisant par l'apparition de douleur chez le patient, dont la chronicisation n'est pas systématique. Dans certains cas, les névralgies du sciatique proviennent de compressions en amont situées dans les racines lombaires correspondant à l'insertion du nerf au niveau spinal, et se définissent alors comme des radiculopathies nerveuse. Les neuropathies d'origine traumatique peuvent également intervenir à la suite d'interventions chirurgicales. En effet, cela est observé lors de thoracotomies où la compression des nerfs intercostaux entraîne l'apparition de douleurs chroniques à composante neuropathique (Guastella et al., 2011). De plus, les compressions nerveuses observées chez les patients s'accompagnent de modifications histopathologiques dans le nerf lésé (Koike et al., 2010). De telles modifications ont également été observées dans le modèle du Cuff. En effet, la compression du nerf sciatique entraîne une diminution du nombre de fibres myélinisées de gros diamètre mais

également une altération des fibres amyéliniques de petit diamètre (Mosconi and Kruger, 1996). Ces modifications s'accompagnent d'une dégénérescence Wallerienne correspondant à la démyélinisation des axones au site de lésion (Mosconi and Kruger, 1996).

Les enregistrements microneurographiques réalisés chez les patients douloureux neuropathiques révèlent l'apparition d'activités électriques spontanées au sein du nerf lésé pouvant traduire l'apparition de douleurs spontanées chez le patient (Serra, 2012). De telles modifications électrophysiologiques des fibres afférentes primaires ont également été décrites dans des modèles animaux de douleur neuropathique d'origine traumatique (Nakamura and Atsuta, 2004).

Dans la majorité des cas, il semble que l'apparition de douleurs neuropathiques d'origine traumatique chez le patient soit liée à l'apparition de compression des nerfs périphériques (syndrome canalaire, syndrome radiculaire, polykystose). Les syndromes canauxaires correspondent à une réduction de la taille du canal où cheminent les nerfs périphériques. A l'inverse, les syndromes radiculaires représentent une réduction du foramen intervertébral se traduisant par une compression de la racine. Dans le modèle du Cuff, la compression réalisée à l'aide du manchon se situe sur le trajet du nerf périphérique se rapprochant un peu plus de syndromes canauxaires observés chez l'Homme. Il convient de noter que les compressions nerveuses observées en clinique sont liées à des mécanismes physiologiques (compression liée à un muscle) ou physiopathologiques (compression liée à une tumeur bénigne ou maligne). Dans notre modèle, l'introduction d'un corps étranger permettant d'induire une compression ne reflète pas forcément les mécanismes physiopathologiques observés chez l'Homme, mais offre une grande reproductibilité. Ces modèles tentent ainsi de se rapprocher de l'étiopathogénie clinique des neuropathies d'origine traumatique chez les patients, et semblent suffisamment pertinents pour l'étude des mécanismes sous-tendant l'apparition de telles pathologies.

## **B. Validité phénoménologique**

La validité phénoménologique ou isomorphique se définit par la présence ou non de signes de comportements douloureux similaires aux symptômes observés chez l'Homme. Les comportements observés chez l'animal font suite à l'apparition de douleurs « spontanées » ou de douleurs « provoquées » par un stimulus externe, ces

dernières étant de ce fait considérées comme des phénomènes d'hyperalgésie et d'allodynie. Les modifications comportementales liées à la compression nerveuse induite par le Cuff peuvent être corrélées avec certains symptômes présents chez l'Homme.

### **1. Modélisation de comportements provoqués**

Nous observons quelques jours après l'induction de la neuropathie le développement d'une allodynie mécanique statique et ipsilatérale à la lésion. L'appréciation de l'hypersensibilité mécanique en clinique tient compte de la mesure d'une allodynie statique et dynamique chez le patient (Bouhassira et al., 2004) bien que cette dernière soit plus fréquemment observée (Hansson, 2003). De plus, il semblerait que ces 2 types d'allodynies soient liés à la stimulation de fibres sensorielles différentes (Field et al., 1999). L'appréciation de l'allodynie dynamique peut présenter des difficultés d'étude chez la souris et peu d'équipes y sont parvenues (Sasaki et al., 2008). Les essais réalisés au sein du laboratoire se sont révélés pour l'instant peu concluants, notamment à cause de la faible reproductibilité des résultats.

Dans le modèle du Cuff, nous observons l'apparition d'une hypersensibilité thermique qualifiée d'hyperalgésie. Celle-ci se met en place dès les premiers jours suivant la chirurgie mais disparaît environ 3 semaines après l'induction de la neuropathie (Benbouzid et al., 2008b). Ce résultat semble peu étonnant compte tenu du fait que le développement de troubles de la sensibilité thermique peut varier en fonction du modèle utilisé. En effet, dans un modèle de constriction du nerf sciatique l'hypersensibilité thermique se développe rapidement et perdure pendant plusieurs semaines (Bennett and Xie, 1988) alors qu'elle est le plus souvent absente dans un modèle de ligature des nerfs spinaux (Roytta et al., 1999). A l'exception de certains types de neuropathies, l'hyperalgésie au chaud est un signe clinique souvent absent (Hansson, 2003) et par conséquent peu utilisé comme outil d'aide au diagnostic des patients douloureux chroniques (Bouhassira et al., 2004).

L'allodynie au froid s'observe dans la plupart des modèles de douleur neuropathique (Gregory et al., 2013) mais les essais réalisés dans le modèle du Cuff se sont avérés peu probants. Contrairement à l'hyperalgésie au chaud, la présence d'une allodynie au froid semble être un symptôme fréquemment observé chez les patients (Jorum et al., 2003). Une étude menée en France sur 106 patients atteints de

douleurs neuropathiques révèle que les hypoesthésies (au chaud ou au froid) sont les signes cliniques les plus souvent observés et pour lesquels des mesures chez l'animal n'ont pas été proposées (Bouhassira et al., 2005).

En clinique, les douleurs neuropathiques se traduisent par l'apparition de symptômes parfois différents pour des étiologies semblables (von Hehn et al., 2012). Cette différence peut être liée à la diversité des mécanismes physiopathologiques sous-jacents. Bien que la qualité du modèle puisse être en lien avec le nombre de symptômes décrits, un modèle pertinent ne doit pas forcément rendre compte de l'intégralité des symptômes pouvant être présent chez l'Homme, sachant que ces symptômes sont rarement tous présents chez un même patient.

## **2. Modélisation de comportements spontanés**

L'expérience douloureuse chez l'Homme comprend une dimension sensorielle, affective et cognitive. En clinique, les douleurs neuropathiques se caractérisent par l'apparition de douleurs spontanées chez le patient et constituant l'un des symptômes les plus fréquemment observés (Klein et al., 2005). L'évaluation de douleurs spontanées nécessite l'utilisation d'outils d'aide au diagnostic reposant sur des questionnaires comme le DN4 (douleur neuropathique en 4 questions) (Bouhassira et al., 2005) ou encore le pain DETECT (Freyenhagen et al., 2006). Cette mesure traduit la nécessité d'une expression verbale de la sensation douloureuse, ce qui ne peut être mesuré chez l'animal.

L'expression douloureuse comprend une composante émotionnelle pouvant aussi être mesurée par l'expression faciale du patient, notamment lorsqu'il ne peut s'exprimer. En effet, l'échelle des « visages » est un outil d'aide au diagnostic classiquement utilisé en clinique et permettant d'évaluer l'intensité douloureuse chez le petit enfant. Récemment, des études ont montré que la mesure de l'expression faciale chez la souris (Langford et al., 2010) et le rat (Sotocinal et al., 2011) pouvaient constituer un bon critère d'évaluation de la douleur spontanée chez l'animal dans différents modèles animaux de douleurs aiguës. L'évaluation d'une telle expression chez les rongeurs comprend la mesure du resserrement orbital, de la position du nez, des oreilles ou encore des vibrisses (Langford et al., 2010). Toutefois, chez les animaux neuropathiques, la chronicisation de la douleur entraîne une disparition de cette signature émotionnelle rendant ainsi plus difficile l'utilisation d'une telle mesure dans notre modèle (Langford et al., 2010).

Plus récemment, l'utilisation de conditionnements de place a permis d'étudier les comportements douloureux dits « spontanés » chez l'animal constituant ainsi une avancée dans le domaine (Qu et al., 2011). En effet, ces tests vont permettre de mesurer le soulagement de la douleur spontanée induit par un analgésique aux propriétés intrinsèques non récompensantes chez l'animal non douloureux. En utilisant cette même procédure de conditionnement de place chez la souris, les travaux récemment menés par de l'équipe ont permis de mettre en évidence la présence de douleur spontanée dans le modèle du Cuff (Barthas et al., 2014). Enfin, environ 30% des patients atteints de douleur neuropathique développent des troubles de l'humeur. L'utilisation de tests comportementaux a permis là aussi de mettre en évidence l'apparition de phénotypes de type anxieux et dépressifs dans le modèle du Cuff (Benbouzid et al., 2008b; Yalcin et al., 2011a).

### **C. Validité prédictive**

Une des fonctions d'un modèle animal de pathologie est de permettre d'évaluer l'efficacité thérapeutique de nouveaux traitements. La validation prédictive d'un modèle de douleur repose sur sa sensibilité aux analgésiques classiquement utilisés. Pour la douleur neuropathique, ce sont les antidépresseurs ou les anticonvulsivants. Dans le modèle du Cuff, l'effet antialloodyne des antidépresseurs et des anticonvulsivants est observé à doses modérées lors d'une administration prolongée. Par ailleurs, le délai thérapeutique semble similaire à celui observé en clinique chez les patients traités par antidépresseurs (Attal et al., 2010) renforçant ainsi la pertinence clinique du modèle utilisé. Cet effet s'observe dans le modèle du Cuff pour des molécules efficaces en clinique comme les ATC (amitriptyline) et les IRSN (duloxétine). Par contre, la fluoxétine n'a aucun effet thérapeutique dans notre modèle ce qui rejoint les données cliniques obtenues chez l'Homme démontrant une efficacité limitée des ISRS dans le traitement de la douleur neuropathique. Enfin, les douleurs neuropathiques sont connues pour être résistantes aux anti-inflammatoires non-stéroïdiens et cela a pu être confirmé dans notre modèle où un traitement par le kétoprofène n'a pas effet sur l'allodynie neuropathique (Benbouzid et al., 2008b).

La valeur prédictive d'un modèle de douleur repose d'une part sur sa sensibilité aux analgésiques utilisés en clinique et d'autre part sur sa capacité à prédire l'efficacité de nouveaux traitements pharmacologiques. Néanmoins, il convient de

noter que le potentiel analgésique de médicaments est souvent évalué chez l'animal sur le développement de comportements « provoqués » comme l'allodynie ou l'hyperalgésie (Mogil and Crager, 2004). Dans les études cliniques, l'effet analgésique des médicaments est par contre mesuré sur les états de douleurs spontanées continues, réduisant ainsi la possibilité d'une comparaison avec les études menées chez l'animal (Le Bars et al., 2012). Les moyens mis en œuvre pour mesurer l'effet analgésique des médicaments dans les domaines clinique et préclinique pourraient participer pour partie au succès limité du passage de la paillasse à la clinique humaine. Ce succès limité pourrait aussi être lié aux différents protocoles d'administrations utilisés. En effet, lors d'études précliniques, l'effet analgésique des composés est souvent testé en aigu, à doses fortes ne reflétant pas la condition dans laquelle est utilisé le médicament en clinique (Berge, 2011). Dans le modèle du Cuff, nous avons démontré qu'un traitement prolongé par un  $\beta_2$ -agoniste a un effet antiallodynique. Au niveau clinique, une étude dont le but est d'évaluer l'efficacité des  $\beta_2$ -agonistes dans le traitement de la douleur neuropathique est actuellement en cours aux Hôpitaux Universitaires de Strasbourg. L'efficacité d'un tel traitement chez l'Homme constituerait un argument de poids quant à la valeur prédictive du modèle et des procédures utilisés.

La grande complexité des symptômes observés chez les patients qui peuvent être différents pour des étiologies semblables (Defrin et al., 2001) rend la modélisation animale difficile et assurément incomplète. En conclusion, le modèle du Cuff n'a pas la prétention de reproduire les douleurs neuropathiques d'origine traumatique observées chez l'Homme, mais selon Bennett et son « principe de similarité » l'essentiel est de s'en rapprocher.

## II. Considérations relatives au modèle *ex vivo*

### A. Hypersensibilité des neurones à un iPDE4

Nous avons utilisé une approche d'imagerie calcium sur des cultures de DRG dissociés provenant d'animaux neuropathiques et contrôles. Bien que l'utilisation de tels modèles soit répandue (Kage et al., 2002; Andre et al., 2003; Tan et al., 2006), certains points méritent d'être discutés. En effet, des données récentes suggèrent que le processus de dissociation utilisé lors de la mise en culture pourrait contribuer à l'hyperexcitabilité des neurones observée *ex vivo* (Zheng et al., 2007). Cette hyperexcitabilité se traduit par une diminution du seuil de déclenchement des potentiels d'action et par une augmentation de l'activité spontanée. En effet, dans les premières heures suivant la dissociation les auteurs ont observé une augmentation de la fréquence spontanée des potentiels d'action dans les neurones du DRG, phénomène qui semble indépendant de la lésion nerveuse réalisée *in vivo* (Zheng et al., 2007). De plus, il semblerait que ce mécanisme soit dépendant de l'activation de la voie AMPc/PKA (Zheng et al., 2007). Ainsi, le tonus de production d'AMPc à l'origine de l'hyperexcitabilité neuronale pourrait favoriser l'apparition des réponses au rolipram dans notre étude.

Il convient de noter que cette étude (Zheng et al., 2007) a été réalisée sur des cultures de DRG fraîchement dissociés, c'est-à-dire environ 2 heures après l'ensemencement. Or, le temps semble être un facteur primordial pour la présence ou non de tels mécanismes d'hyperexcitabilité. En effet, lorsque les enregistrements sont réalisés 24 heures après la mise en culture, comme dans notre cas, l'activité spontanée des neurones du DRG issus d'animaux contrôles est atténuée par comparaison aux animaux neuropathiques (Ma and LaMotte, 2005). A l'inverse, aucune différence n'a été observée entre les deux conditions lorsque les enregistrements sont réalisés 2 heures après la mise en culture (Ma and LaMotte, 2005). De plus, les résultats obtenus lors de l'enregistrement des neurones de DRG intacts (sans dissociation) semblent similaires à ceux observés après 24 heures de mise en culture (Ma and LaMotte, 2005). Par conséquent, lorsque des modèles *ex vivo* ont pour objectif la comparaison de conditions neuropathique et contrôle, l'enregistrement de l'activité neuronale après 24 heures de mise en culture semble plus approprié. Dans notre étude, les cultures de DRG ont été comparées après environ 1 jour de culture. Par ailleurs, le pourcentage de réponse au rolipram

observé chez les animaux neuropathiques (19% des neurones) est comparé à celui d'animaux contrôles « Sham » (8% des neurones). L'utilisation de cultures « contrôles » permet de limiter l'apparition de biais liés à l'état intrinsèque de la culture. En effet, en considérant que la dissociation contribue de manière égale à l'hyperexcitabilité des neurones *ex vivo*, les différences résiduelles observées entre les animaux Cuff et Sham pourraient ainsi refléter l'activité cellulaire *in vivo* faisant suite à une lésion nerveuse périphérique.

## **B. Imagerie calcium et signal AMPc**

Nous avons montré qu'une application de rolipram augmente la concentration intracellulaire de calcium, effet qui semble lié à la stimulation de la voie AMPc (Mironov et al., 2009).

Il convient de noter que l'hydrolyse de l'AMPc par la PDE4 peut être régulée de manière différente en fonction de la localisation subcellulaire du signal AMPc généré (Castro et al., 2014). En effet, le rolipram est capable d'augmenter de manière tonique la concentration d'AMPc au sein de microdomaines situés à proximité de la membrane plasmique des neurones alors que son effet sur la concentration cytosolique d'AMPc reste négligeable (Castro et al., 2010). L'existence d'une différence de régulation du signal AMPc pourrait s'expliquer par un ratio surface/volume plus important au sein des microdomaines facilitant une augmentation rapide de la concentration d'AMPc. A l'inverse, le faible ratio surface/volume du cytosol n'est pas propice à une augmentation tonique de la concentration d'AMPc du fait de la rapide diffusion de ce second messager dans le milieu intracellulaire (Castro et al., 2010; Castro et al., 2014). L'augmentation de la concentration cytosolique de calcium suite à l'application de rolipram pourrait être liée à l'action de ce dernier sur la production tonique d'AMPc au sein des microdomaines cytoplasmiques. Ainsi, les réponses calciques dans notre étude pourraient être liées à l'activation de canaux membranaires situés à proximité du microdomaine cytoplasmique activé.

L'utilisation d'une approche d'imagerie AMPc (Castro et al., 2010) nous permettrait de détecter la cinétique de l'effet du rolipram sur les taux d'AMPc intracellulaire ainsi que sa possible localisation au sein de microdomaines cytoplasmiques. De plus, nous avons vu précédemment que la localisation subcellulaire des PDE peut varier en fonction du sous-type (Figure **I-8** section **V**.

**Introduction**). Ainsi, la localisation des microdomaines activés lors de l'application de rolipram pourrait peut-être donner des indications sur le(s) sous-type(s) de PDE impliqué(s) dans les réponses calciques observées.

### **C. Mise en évidence de l'origine du calcium dans les réponses à un iPDE4**

Nous avons montré que l'effet neuronal du rolipram sur des cultures de DRG d'animaux neuropathiques était perdu en l'absence de calcium extracellulaire (Chapitre 5 section **III.** des **Résultats**). Bien que l'effet du rolipram semble dépendre de l'activité de canaux membranaires perméables au calcium, l'implication potentielle d'une composante intracellulaire ne peut être exclue.

Tout d'abord, il convient de noter que certains iPDE sont capables de stimuler la libération de calcium provenant des stocks intracellulaire (Usachev and Verkhatsky, 1995) et cette libération peut stimuler l'entrée de calcium provenant du milieu extracellulaire (Gemes et al., 2011).

De cette manière, le rolipram pourrait induire une libération de calcium provenant des stocks intracellulaires. Cette stimulation sous-liminaire, c'est-à-dire ne déclenchant pas de réponse calcique, permettrait a posteriori le recrutement de canaux membranaires perméables au calcium. Ainsi, lorsque le milieu est dépourvu de calcium, la stimulation unique des stocks intracellulaires de calcium n'induirait pas le déclenchement d'une réponse calcique. Afin de s'assurer d'une action exclusive de canaux membranaires dans les réponses calciques au rolipram, il semblerait nécessaire de tester l'effet du rolipram en présence de thapsigargine, bloquant sélectif des ATPases calciques situées sur le réticulum endoplasmique.

Certaines données suggèrent que la neuropathie elle-même pourrait modifier la concentration intracellulaire de calcium dans les neurones sensoriels primaires (Rigaud et al., 2009). En effet, dans un modèle de lésion du nerf sciatique une diminution de la concentration de calcium dans le réticulum endoplasmique des neurones sensoriels a été observée (Gemes et al., 2011). Dans notre modèle les comparaisons des réponses au rolipram en présence et en absence de calcium extracellulaire ont été effectuées chez des animaux neuropathique. Par conséquent, nous pouvons considérer que les concentrations intracellulaires de calcium sont équivalentes dans les deux conditions.

### **III. Mécanisme d'action d'un iPDE4 dans les cellules non-neuronales du DRG**

#### **A. Recrutement du Ca<sup>2+</sup>**

Dans notre étude, nous avons montré que les réponses non-neuronales observées après application de rolipram étaient abolies en absence de calcium extracellulaire. La dépendance de l'effet observé vis-à-vis de la présence de calcium extracellulaire semble indiquer une action indirecte du rolipram sur l'activité de canaux membranaires perméables au calcium.

Nos données préliminaires indiquent que l'effet du rolipram sur les neurones et les cellules non-neuronales est indépendant de l'activation de la PKA (données non montrées). Bien qu'il s'agisse de résultats préliminaires, cela suggère que les réponses calciques pourraient être liées à l'activation de canaux directement sensibles aux nucléotides cycliques. Des données récentes indiquent que les canaux cationiques CNG (Cyclic Nucleotide Gated-Channel) sensibles à l'AMPC ou au GMPC seraient préférentiellement exprimés par les cellules gliales du système nerveux (Podda et al., 2012). Un canal CNG, le CNGA3, est exprimé par les SGCs du DRG et la délétion sélective de ce canal aggrave les signes d'hyperalgésie et d'allodynie dans un modèle de douleur inflammatoire (Heine et al., 2011). Le mécanisme de cette aggravation n'est pas clairement établi, mais certains auteurs suggèrent que l'entrée de calcium liée à l'activation de ces canaux pourrait contribuer au recrutement secondaire de canaux potassium activés par le calcium (K<sub>Ca</sub><sup>2+</sup>) (Podda et al., 2012). Il serait intéressant de déterminer si ce canal CNG dans les SGCs, ou d'autres dans les neurones, pourraient être impliqués dans les réponses calciques au rolipram.

#### **B. Inhibition de la production de TNFα**

##### **1. AMPc et TNFα**

De nombreuses données suggèrent que la voie AMPc peut moduler l'expression du TNFα (Zhu et al., 2001). Dans notre étude, nous avons montré que les antidépresseurs, les β<sub>2</sub>-agonistes et les iPDE4 ont un effet anti-TNFα après un traitement prolongé. Bien qu'à l'origine ces molécules soient différentes, les antidépresseurs, β<sub>2</sub>-agonistes et iPDE4 ont tous trois la capacité d'activer la voie

AMPC/PKA (Elenkov et al., 2000; Morioka et al., 2009). Ainsi, ces données laissent à penser qu'un lien entre la voie AMPC et le TNFa pourrait exister.

Sur des cultures d'astrocytes, l'effet anti-TNFa du clenbutérol ( $\beta_2$ -agoniste) est potentialisé par un iPDE4, le rolipram, mais pas par un iPDE3 (Christiansen et al., 2011) et cet effet serait lié à une augmentation de la concentration intracellulaire d'AMPC. Ces données laissent supposer l'existence d'une synergie d'action de ces molécules dans les effets anti-TNFa observés (Christiansen et al., 2011). Cette synergie d'action, probablement liée à une surproduction d'AMPC intracellulaire, laissent à penser qu'une approche combinatoire utilisant de faibles doses d'un  $\beta_2$ -agoniste et d'un iPDE4 pourrait permettre d'obtenir le même effet thérapeutique. Néanmoins, des essais préliminaires utilisant un traitement combiné par un antidépresseur et un  $\beta_2$ -agoniste à doses sous-liminaire se sont révélés peu concluants (donnée non montrées).

## 2. Rôle de la voie NF-kB

La voie NF-kB joue un rôle important dans la synthèse de cytokines pro-inflammatoires comme le TNFa (Makarov, 2000) et l'administration locale d'ARN antisens dirigé contre ce facteur de transcription atténue l'allodynie mécanique dans un modèle de douleur neuropathique (Sun et al., 2006). De plus, le développement de comportement nocifensifs peut dépendre de la dégradation du répresseur I $\kappa$ Ba (inhibiteur endogène de NF-kB, Figure **I-4** section **VI. Introduction**) dans les cellules gliales, activant ainsi la voie NF-kB (Fu et al., 2010). Dans notre étude, il semble que la neuropathie elle-même ne modifie pas l'expression d'I $\kappa$ Ba dans les DRG, alors qu'un traitement prolongé par un antidépresseur augmenterait l'expression de ce répresseur (données non montrées). Cela suggère que les antidépresseurs pourraient recruter une voie de signalisation intracellulaire différente de celle altérée par la neuropathie. De la même façon, nous avons observé qu'un traitement prolongé par un iPDE4 diminuait l'expression du TNFa dans les DRG (Chapitre 4 section **II. Résultats**), effet qui semble lié à une surexpression d'I $\kappa$ Ba (données non montrées).

La question se pose alors du lien entre voie AMPC et voie NF-kB. Certaines données suggèrent que l'augmentation de la concentration intracellulaire d'AMPC induite par les antidépresseurs pourrait inhiber de manière indirecte l'activité de la voie NF-kB (Obuchowicz et al., 2014). Le lien entre l'activation de la voie AMPC et NF-kB n'est pas clairement établi, mais pourrait être nucléaire, jouant sur l'expression

génique. En effet, la stimulation de la voie AMPc/PKA permettrait de phosphoryler le facteur de transcription CREB, cette activation conduisant au recrutement préférentiel par CREB de la CBP et facilitant de ce fait la dissociation du complexe CBP/NF-kB, dont l'association est indispensable à la synthèse de cytokines pro-inflammatoires (Delgado, 2002). D'autres données suggèrent que l'interaction entre les voies AMPc et NF-kB se situerait dans le cytoplasme de la cellule. En effet, la stimulation de la voie AMPc/PKA pourrait bloquer la dégradation d'IkBa se traduisant par une séquestration du facteur de transcription NF-kB dans le cytoplasme (Farmer and Pugin, 2000). Nos données préliminaires indiquent que l'effet anti-TNFa des antidépresseurs et des iPDE4 pourrait nécessiter une surexpression d'IkBa. Par conséquent, l'effet de la voie AMPc sur la voie NF-kB pourrait dans notre cas se localiser au niveau cytoplasmique après modification d'expression génique.

Il est maintenant bien établi que la synthèse de cytokines pro-inflammatoires est dépendante l'activation de la voie NF-kB. Néanmoins, il est à préciser que le TNFa lui-même peut moduler la voie NF-kB (Patrizio, 2004). De manière intéressante, la stimulation de la voie NF-kB par le TNFa est associée à une diminution de la concentration intracellulaire d'AMPc liée à la suractivation de la PDE4B (Ghosh et al., 2012). La mise en évidence d'un mécanisme d'action réciproque entre TNFa et voie NF-kB suggère l'existence d'un rétrocontrôle positif pouvant participer au maintien d'un état pathologique. Ainsi, nous pouvons supposer que l'activation de la voie AMPc par les antidépresseurs, les  $\beta_2$ -agonistes ou les iPDE4 permettrait de bloquer l'activation de la voie NF-kB, venant ainsi empêcher la pérennisation d'une boucle d'auto-régulation positive de la synthèse de cytokine pro-inflammatoire comme le TNFa.

### **3. Rôle de la voie des MAP kinases**

D'autres données suggèrent que l'effet anti-TNFa d'un antidépresseur, d'un  $\beta_2$ -agoniste ou d'un iPDE4 ne serait pas forcément dépendant de la voie NF-kB (Christiansen et al., 2011). En effet, un traitement par un antidépresseur, la désipramine, diminue la production de TNFa induite par une injection de LPS et cet effet est lié à la déphosphorylation de la protéine p38 des MAPK (Liu et al., 2011). Par ailleurs, la production d'AMPc induite par la stimulation du récepteur  $\beta$ -adrénergique déphosphoryle aussi p38, atténuant ainsi la production de TNFa (Morioka et al.,

2009). Cette déphosphorylation de p38 implique l'activation d'une phosphatase de type MKP-1 (MAP kinase phosphatase 1) dont l'expression dépend de la concentration intracellulaire d'AMPc (Korhonen et al., 2013). En ce sens, une étude a montré l'effet anti-TNFa d'un traitement par le rolipram (iPDE4) dans un modèle de douleur inflammatoire (Korhonen et al., 2013), effet semblant impliquer la déphosphorylation de p38 par la phosphatase MKP-1 (Korhonen et al., 2013).

Les résultats obtenus dans notre étude associés aux données de la littérature indiquent que la stimulation de la voie AMPc/PKA dans les cellules non-neuronales du DRG régule l'expression de cytokines pro-inflammatoires comme le TNFa. Cet effet pourrait être lié à une inhibition de la voie NF-kB, mais une participation de la voie des MAP kinases ne peut être exclue.

Il convient de noter que les analyses moléculaires que nous avons effectuées se heurtent à des difficultés techniques. En effet, le DRG est une structure hétérogène composée de neurones et de cellules gliales. Par conséquent, les variations d'expression protéiques mesurées pourraient être biaisées, l'effet global observé correspondant à la résultante de l'expression neuronale et non-neuronale de la protéine. La mise place de techniques peut permettre de séparer neurones et cellules gliales (Guez-Barber et al., 2012). L'utilisation d'une telle approche nous permettrait de visualiser séparément l'expression de la protéine d'intérêt dans ces sous-populations cellulaires.

## IV. Mécanisme d'action d'un iPDE4 sur les neurones du DRG

### A. AMPc et récepteur TRPV1

Au cours de ce travail nous avons montré que les réponses neuronales au rolipram dépendent de la présence de calcium dans le milieu extracellulaire. Cette donnée suggère que le rolipram recrute des canaux ou des récepteurs membranaires perméables au calcium. De plus, des données préliminaires indiquent que l'effet neuronal du rolipram ne dépendrait pas du recrutement de canaux calcium voltage-dépendants. En effet, l'application de cadmium, bloquant non-sélectif des canaux calcium voltage-dépendants (Shoudai et al., 2010), ne modifie pas la proportion de réponses neuronales au rolipram (données non montrées). Ce résultat suggère que l'entrée de calcium induite par l'application de rolipram serait liée au recrutement de canaux calcium non voltage-dépendants ou à la stimulation de récepteurs canaux perméables au calcium.

Par ailleurs, nous avons observé que le rolipram recrutait essentiellement des fibres de petit diamètre où est majoritairement exprimé le récepteur TRPV1 (Zwick et al., 2002). Ensuite, nos données préliminaires montrent que le rolipram active préférentiellement des neurones sensibles à la capsaïcine. Le récepteur TRPV1 est un récepteur canal cationique non-sélectif impliqué dans la détection de chaleurs nociceptives (Caterina et al., 2000). Des données récentes suggèrent que l'activation pharmacologique de TRPV1 entraîne la production locale d'AMPc et l'activation de la PKA favorisant ainsi la phosphorylation du récepteur sur sa partie N-terminale (Mohapatra and Nau, 2003; Xu et al., 2012). La phosphorylation du récepteur entraîne le recrutement d'un complexe  $\beta$ -arrestine/PDE4D, mécanisme qui semble participer à la désensibilisation de TRPV1 (Por et al., 2013). L'inhibition pharmacologique de la PDE4 pourrait donc augmenter la concentration locale d'AMPc ce qui se traduirait par une phosphorylation accrue du récepteur TRPV1 par la PKA et un blocage transitoire de la désensibilisation de ce même récepteur. Néanmoins, il semble que le pourcentage de réponses neuronales au rolipram soit similaire en présence d'inhibiteur de PKA (données non montrées). Ce résultat bien que préliminaire, suggère que la modulation du récepteur TRPV1 pourrait être liée au recrutement d'autres protéines kinases, parmi lesquelles nous pouvons citer la protéine kinase C (Varga et al., 2006).

La phosphorylation du récepteur TRPV1 peut bloquer son internalisation (Sanz-Salvador et al., 2012). Dans notre étude, nous avons montré que l'amplitude de la réponse à la 7<sup>ème</sup> application de capsaïcine (en présence de rolipram) était significativement supérieure à celle observée lors de la 6<sup>ème</sup> application (sans rolipram). Or, si l'effet du rolipram était lié à un blocage de l'internalisation des récepteurs TRPV1, les réponses mesurées lors de la 7<sup>ème</sup> et la 6<sup>ème</sup> application auraient du avoir la même amplitude. Ainsi, il semble que l'effet du rolipram sur les réponses à la capsaïcine ne soit pas lié à un simple blocage de l'internalisation des récepteurs TRPV1, mais plutôt à une amplification de cette réponse. Cette potentialisation des réponses à la capsaïcine observée dans notre étude pourrait peut-être s'expliquer par une augmentation du nombre de récepteurs disponibles à la membrane.

## **B. AMPc et récepteurs $\delta$ des opioïdes (DOR)**

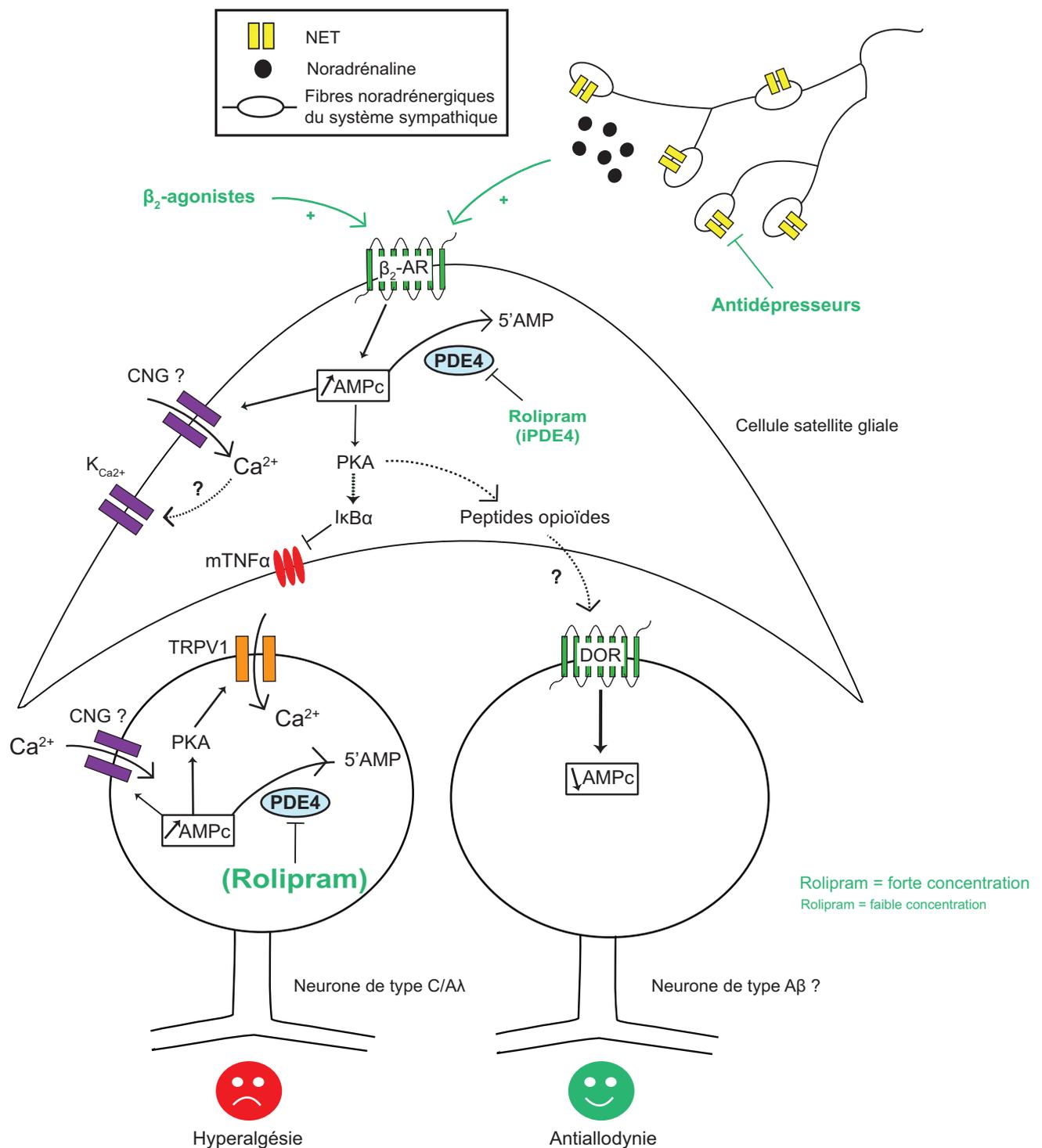
Les résultats antérieurs de l'équipe ont mis en évidence le rôle prépondérant des DOR dans l'effet antiallodynique des antidépresseurs (Benbouzid et al., 2008c). De la même façon, nous montrons que l'effet antiallodynique des  $\beta_2$ -agonistes et des iPDE4 nécessite le recrutement du système opioïdergique endogène et plus particulièrement des DOR.

En dépit du rôle primordial de ces récepteurs dans l'effet antiallodynique des antidépresseurs, des  $\beta_2$ -agonistes ou des iPDE4, leur localisation neuroanatomique n'a pu à ce jour être clairement démontrée. Les données comportementales semblent indiquer un rôle préférentiel du système nerveux périphérique bien qu'une implication du système nerveux central ne peut être exclue. Dans le système nerveux périphérique, les DOR sont majoritairement exprimés sur les corps cellulaires et sur les axones des neurones de type A $\beta$  (Bardoni et al., 2014). Dans notre modèle, plusieurs arguments viennent étayer l'hypothèse d'une expression neuronale des DOR. En effet, les données de l'équipe montrent que le blocage de l'effet antiallodynique des antidépresseurs nécessite 4 jours de co-administration avec un antagoniste des récepteurs  $\beta_2$ -adrénergiques (Yalcin et al., 2009a). A l'inverse, l'effet de la naltrindole (antagoniste des DOR) est immédiat suggérant que les DOR se situent en aval des récepteurs  $\beta_2$ -adrénergiques (Benbouzid et al., 2008c). Il est maintenant bien établi que la stimulation de DOR est corrélée à une inhibition de l'activité de canaux calcium sur les neurones du DRG (Acosta and Lopez, 1999). Néanmoins, des

données obtenues à partir de cultures de DRG indiquent qu'un agoniste des DOR peut quand même augmenter la concentration intracellulaire de calcium dans les neurones (Tang et al., 1996), de la même manière que cela a pu être observé dans notre étude (données non montrées). Certains auteurs suggèrent que les réponses calciques observées après application d'un agoniste DOR seraient liées à une activation des stocks intracellulaires de calcium (Brailoiu et al., 2012). Ainsi, nos données préliminaires indiquent que les DOR seraient préférentiellement exprimés sur les neurones du DRG.

Par ailleurs, nous avons observé que les récepteurs  $\beta_2$ -adrénergiques étaient préférentiellement exprimés sur les SGCs du DRG (Chapitre 4 section I. des Résultats), et leur stimulation par un  $\beta_2$ -agoniste ou la noradrénaline augmente les taux intracellulaires d'AMPc (Elenkov et al., 2000). Ce mécanisme est étroitement régulé par les PDE4 responsables de l'hydrolyse de l'AMPc suite à la stimulation des récepteurs adrénergiques (Richter et al., 2008). Le lien entre la stimulation des récepteurs  $\beta_2$ -adrénergiques et les DOR n'est pas clairement établi. Une étude suggère que la stimulation des récepteurs  $\beta_2$ -adrénergiques, activant la voie AMPc/PKA, conduit à la libération de peptides opioïdes dans les cellules immunitaires (Binder et al., 2004). Ainsi, en renforçant les voies de signalisation cellulaire mises en jeu, le rolipram pourrait induire la libération de peptides opioïdes agissant sur les DOR situés sur les neurones du DRG.

Enfin, nous avons observé que le rolipram à forte concentration est également capable d'activer les neurones du DRG. Les DOR sont des récepteurs couplés négativement à l'adénylate cyclase diminuant la production d'AMPc (Law and Loh, 1999). Le rolipram pourrait donc en théorie contrecarrer les effets d'une stimulation des DOR en augmentant la concentration intracellulaire de ce second messenger. Cependant, l'étude de dose-réponse révèle que l'effet neuronal du rolipram, potentiellement pronociceptif, n'est présent qu'à forte concentration *ex vivo* et lors de l'administration locale à forte dose *in vivo* (Chapitre 5 section IV. des Résultats). Dans notre étude, l'effet antiallodynique du rolipram a été mesuré pour de faibles doses lors d'un traitement prolongé par voie systémique (Chapitre 2 section I. des Résultats). Il semble donc que les conditions dans lesquelles le rolipram a été utilisé *in vivo* ne soient pas propices au recrutement de la voie AMPc dans les neurones du DRG.



**Figure D-1. Mécanisme d'action d'un iPDE4 dans les DRG.** La noradrénaline recrutée par les antidépresseurs stimule les récepteurs  $\beta_2$ -adrénergiques situés sur les cellules satellites gliales du DRG. Le rolipram à faible concentration recrute les cellules gliales du DRG et augmente la concentration intracellulaire d'AMPc. L'AMPc stimule l'entrée de calcium provenant du milieu extracellulaire via le recrutement de canaux membranaires. La stimulation de la voie AMPc induit une diminution de l'expression de TNF $\alpha$ . L'activation de la voie AMPc pourrait stimuler la libération de péptides opioïdes agissant sur les DOR exprimés par les neurones. Le rolipram à forte concentration stimule les neurones de petit diamètre exprimant le récepteur TRPV1. L'AMPc produit sensibilise ces récepteurs se traduisant par une entrée de calcium provenant du milieu extracellulaire. Liste d'abréviations : AMPc, adénosine monophosphate cyclique; CNG, cyclic nucleotide-gated channel; DOR, delta-opioid receptor; NET, norepinephrine transporter; PDE4, phosphodiésterase de type 4; PKA, protéine kinase A; TRPV1, transient receptor potential vanilloid 1.

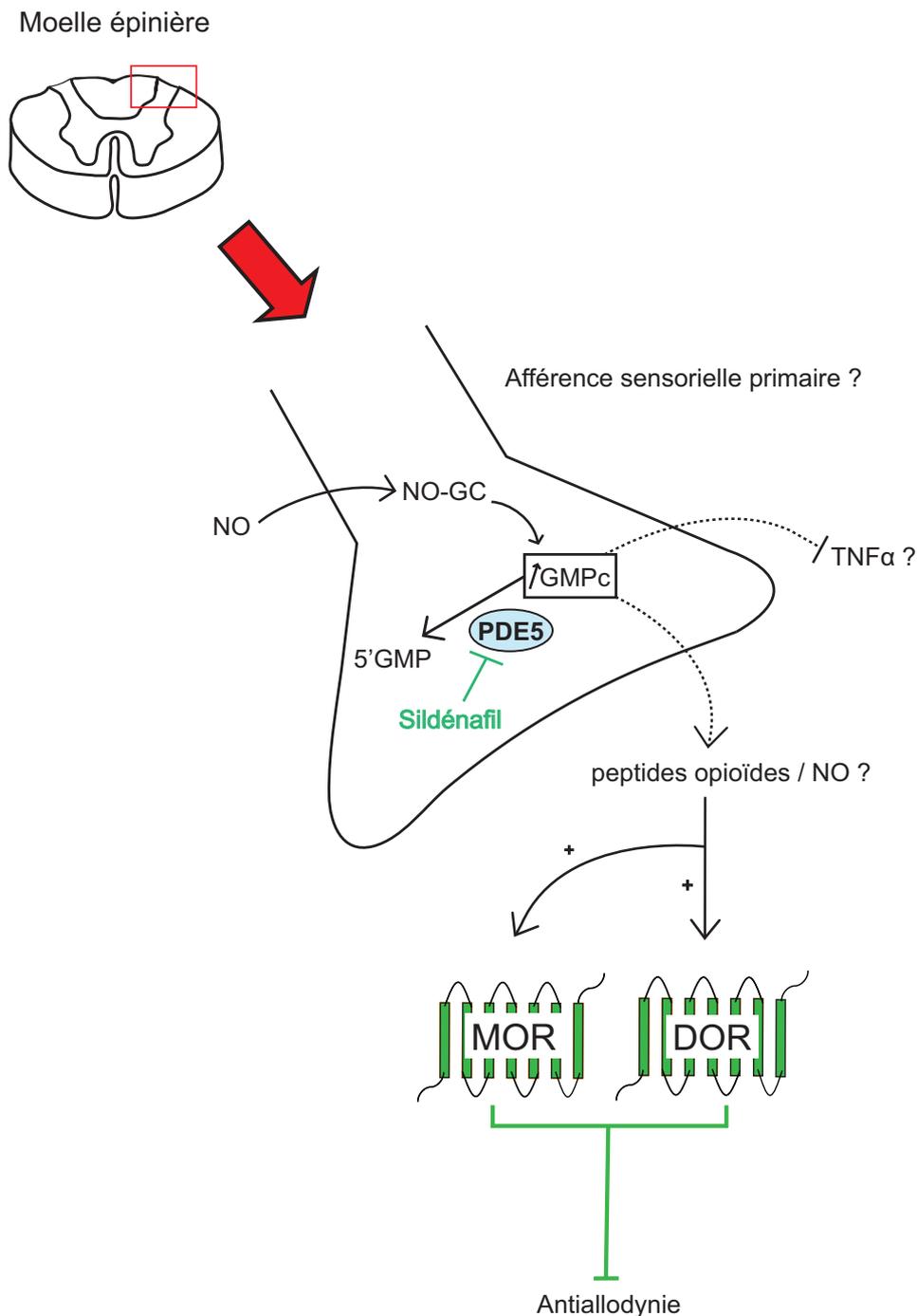
Au cours de ces travaux, nous avons montré que le rolipram avait un double effet sur la transmission de l'information nociceptive. Un traitement prolongé par un iPDE4 induit un effet antiallodynique lorsque celui-ci est administré à faible dose par voie systémique. De plus, l'effet antiallodynique est corrélé à une diminution des taux de TNF $\alpha$  dans les DRG. A l'inverse, une injection locale de rolipram potentialise l'hypersensibilité mécanique induite par la capsaïcine, traduisant un effet pronociceptif de la molécule. Enfin, comme cela avait pu être observé pour les antidépresseurs et les  $\beta_2$ -agonistes, il semble que les DOR soient indispensables à l'effet antiallodynique du rolipram (**Figure D-1**).

## V. Mécanisme d'action d'un iPDE5

Nos résultats indiquent qu'un traitement prolongé par un iPDE5 soulage l'allodynie neuropathique. De manière intéressante, l'effet thérapeutique du sildénafil (iPDE5) reste présent pour de faibles doses, allant jusqu'à une dose minimum efficace de 7,5 µg/kg, cent fois inférieure aux doses utilisées chez l'homme pour le traitement de l'hypertension pulmonaire.

La notion de dose semble primordiale lorsque l'on souhaite évaluer l'effet antinociceptif de médicaments stimulant la voie NO-GMPc. En effet, des auteurs ont montré que l'administration intrathécale de faibles doses d'un activateur non-hydrolysable du GMPc (8 bromo GMPc) a un effet antihyperalgésique dans un modèle de douleur inflammatoire (Tegeder et al., 2002). A l'inverse, l'injection de d'une forte dose de cette molécule se traduit par une aggravation des signes d'hyperalgésie chez l'animal (Tegeder et al., 2002). La double action de la voie NO-GMPc sur le système nociceptif suggère que le niveau d'activation de cette voie de signalisation est un élément clef dans les effets comportementaux observés. En effet, des données suggèrent qu'une forte stimulation de la voie NO-GMPc se traduit par une activation de la protéine kinase G responsable des effets pronociceptifs alors que les effets antinociceptifs sont indépendants de l'activation de cette protéine kinase (Cury et al., 2011). Aux doses utilisées dans notre étude, qui restent relativement faibles comparées aux données de la littérature (Vale et al., 2007; Wang et al., 2011a), l'effet hyperalgésique du sildénafil n'a pas été observé.

Par ailleurs, nous avons montré que l'effet thérapeutique du sildénafil nécessite le recrutement du système opioïdérique endogène. Par une approche comportementale, combinant des outils pharmacologiques et transgéniques, nous avons mis en évidence que l'effet antiallodynique du sildénafil nécessite le recrutement des DOR et des MOR (voir **Chapitre 3** section **III.** des **Résultats**). Le rôle des récepteurs des opioïdes avait déjà été montré dans des modèles de douleurs inflammatoires (Yoon et al., 2008a; Yoon et al., 2008b). Néanmoins, les résultats obtenus dans notre étude constituent à notre connaissance la première évidence du rôle des DOR et des MOR dans l'effet antiallodynique du sildénafil dans un contexte de douleur neuropathique. Par ailleurs, les données obtenues avec la naloxone méthiodide suggèrent que ces récepteurs seraient préférentiellement exprimés dans le système nerveux central, offrant la possibilité d'une action spinale ou supraspinale de la molécule.



**Figure D-2. Mécanisme d'action d'un iPDE5.** Le NO est un neuromédiateur qui diffuse librement à travers les membranes plasmiques des neurones. Le sildénafil inhibe la PDE5 se traduisant par une augmentation de la concentration intracellulaire de GMPc. L'effet antiallodygique du sildénafil nécessite le recrutement des DOR et des MOR suggérant que la stimulation de la voie NO-GMPc pourrait induire une libération de peptides opioïdes. Liste d'abréviations: DOR, delta opioid receptor; GMPc, guanosine monophosphate cyclique; MOR, mu opioid receptor; NO-GC, guanylate-cyclase NO-sensible; NO, nitric oxide; TNF $\alpha$ , tumor necrosis factor-alpha.

Nos résultats préliminaires indiquent que l'effet antiallodynique du sildénafil dépendrait de la production de NO. En effet, une administration de bloquant de la NO-synthase supprime aussi l'effet antiallodynique d'un iPDE5 (données non montrées). De plus, certaines données suggèrent que le NO pourrait induire la libération de peptides opioïdes (Armstead, 1998). Nous pouvons donc supposer que l'activation de la voie NO-GMPc liée à l'inhibition de la PDE5 induirait la libération de peptides opioïdes stimulant ainsi les MOR et les DOR.

Il semblerait que l'expression concomitante des DOR et des MOR soit nécessaire à l'effet antiallodynique du sildénafil. Les données histologiques indiquent que les DOR et les MOR sont exprimés par les terminaisons des afférences sensorielles primaires situées dans les couches I et II de la corne dorsale de la moelle épinière (Scherrer et al., 2009). Par ailleurs, les DOR seraient majoritairement exprimés sur les fibres non-peptidergiques de gros diamètre alors que l'expression des MOR est détectée sur les fibres peptidergiques de petit diamètre (Scherrer et al., 2009). A cela s'ajoute des données de microscopie électronique démontrant que les DOR seraient exprimés sur les axones des afférences primaires alors que les MOR seraient également présent sur le soma et les dendrites des neurones résidents de la moelle épinière (Cheng et al., 1997). L'ensemble de ces données suggère que l'effet observé dans notre étude pourrait résulter d'une action en cascade se traduisant par une activation successive des MOR et des DOR, tout deux nécessaires à l'effet antiallodynique du sildénafil (**Figure D-2**). Néanmoins la possibilité d'une mise en jeu d'hétéromères MOR/DOR (Erbs et al., 2014) ne doit pas forcément être exclue.

Enfin, il convient de noter qu'une étude récente a montré que le tadalafil (iPDE5) diminuait l'expression du TNF $\alpha$  dans un modèle de douleur inflammatoire chronique (Rocha et al., 2011). L'effet anti-TNF $\alpha$  observé est dépendant de l'activation de la voie NO-GMPc, soulevant ainsi la question d'une implication éventuelle de cette cytokine dans l'effet antiallodynique du sildénafil.

## VI. Délai thérapeutique

Comme cela a pu être observé pour un antidépresseur ou un  $\beta_2$ -agoniste, un traitement prolongé par un iPDE4 est nécessaire pour soulager l'allodynie neuropathique. De plus, le délai d'action de ces molécules est largement indépendant de la dose utilisée (Benbouzid et al., 2008a; Choucair-Jaafar et al., 2009), même si dans le cas du rolipram un décalage de quelques jours est présent en fonction de la dose, suggérant la mise en place d'un mécanisme de neuroplasticité cellulaire et moléculaire.

De manière intéressante, nous avons montré que le délai d'action peut varier en fonction de l'inhibiteur de PDE utilisé. En effet, l'ibudilast (iPDE non-sélectif) soulage l'allodynie neuropathique après une semaine traitement alors qu'environ 2 semaines de traitement par le rolipram (iPDE4) sont nécessaires pour obtenir le même effet. Le délai d'action différent de ces molécules peut s'expliquer par le recrutement de types cellulaires différents dans les systèmes nerveux périphérique et central. Il semblerait que le recrutement de cellules microgliales ou macrogliales (astrocytes) soient respectivement impliquées dans l'induction et le maintien de la douleur neuropathique (Mika et al., 2013). En effet, une activation des cellules microgliales est observée au niveau spinal et supraspinal quelques jours seulement après l'induction de la neuropathie (Mika et al., 2010) mais cette activation est transitoire et disparaît 2 à 3 semaines après (Wei et al., 2008). Le profil d'activation astrocytaire est différent. En effet, les astrocytes s'activent lentement mais l'effet peut se maintenir jusqu'à 8 semaines après l'induction de la neuropathie (Tanga et al., 2004). Ces données histologiques peuvent être mises en relation avec l'effet antiallodynique observé lors d'un traitement par l'ibudilast ou le rolipram. Des données suggèrent que l'ibudilast pourrait inhiber l'activation microgliale (Kiebala and Maggirwar, 2011; Hama et al., 2012) alors que le rolipram agirait préférentiellement sur les astrocytes dans le système nerveux central (Christiansen et al., 2011). De plus, nos résultats indiquent que le rolipram active les SGCs du DRG. Récemment, une étude a montré que le profil d'activation des SGCs serait similaire à celui décrit pour les astrocytes (Liu et al., 2012). En quantifiant le niveau d'expression de la GFAP, les auteurs ont montré que l'activation des SGCs peut se maintenir jusqu'à 8 semaines après l'induction de la neuropathie (Liu et al., 2012).

De part son effet possible sur les cellules microgliales, l'ibudilast pourrait ainsi moduler le développement de l'allodynie mécanique dans les premières semaines

suivant la chirurgie. A l'inverse, l'effet du rolipram sur les SGCs pourrait nécessiter la mise en place de mécanismes de plasticité à long terme se traduisant ainsi par un effet thérapeutique plus tardif de la molécule.

Par ailleurs, l'effet anti-TNF $\alpha$  observé après un traitement par les antidépresseurs ou les iPDE4 pourrait être lié à l'inhibition de la voie NF- $\kappa$ B. Cette voie de signalisation est importante dans la synthèse de cytokines pro-inflammatoires (Mika et al., 2013). La modulation indirecte de l'activité de voies de signalisation intracellulaire n'est pas immédiate, et un traitement prolongé pourrait être nécessaire pour obtenir l'effet thérapeutique. De plus, nous avons montré que les DOR étaient nécessaires à l'effet antialloodyne d'un iPDE4. Par conséquent, la modulation de voies de signalisation intracellulaire ainsi que le temps nécessaire au recrutement du système opioïdérique endogène pourrait en partie expliquer le délai d'action de ces molécules dans le traitement de la douleur neuropathique.

Enfin, nous avons mis en évidence qu'un traitement prolongé par l'éta nercept (agent anti-TNF $\alpha$ ) soulageait l'allodynie un peu plus rapidement que les antidépresseurs (Chapitre 4 section I. des **Résultats**). Bien que le délai d'action soit difficilement modulable dans le cas des antidépresseurs ou des iPDE4, cela ne semble pas se vérifier pour les traitements anti-TNF $\alpha$ . En effet, un traitement par l'infliximab (anticorps monoclonal dirigé contre le TNF $\alpha$ ) soulage l'allodynie de façon durable et cet effet s'observe après la première injection (Chapitre 4 section I. des **Résultats**). Cette donnée est à rapprocher d'une autre étude ayant montré l'efficacité d'une unique injection d'infliximab dans un modèle de neuropathie diabétique (Yamakawa et al., 2011). Certains auteurs suggèrent que la différence de délai d'action observée entre l'éta nercept et l'infliximab pourrait être liée à l'affinité de ces molécules pour le TNF $\alpha$ . En effet, il semble que l'affinité de l'infliximab pour le TNF $\alpha$  soit 3 à 4 fois supérieure à celle observée pour l'éta nercept (Scallon et al., 2002). Le TNF $\alpha$  constitue un des maillons finaux de la chaîne d'événements moléculaire contribuant au développement et au maintien de l'allodynie neuropathique. Ainsi, le blocage de l'activité de cette cytokine par l'utilisation d'agents anti-TNF $\alpha$  permettrait de moduler plus facilement le délai thérapeutique. Enfin, la variation du délai action observée entre les différents anti-TNF $\alpha$  pourrait s'expliquer par les propriétés intrinsèques de ces molécules, traduisant une capacité plus ou moins importante à moduler l'action de cette cytokine et les comportements nocifensifs qui y sont associés.



# *Perspectives*

---



Au cours de ce travail de thèse nous avons cherché à établir un lien thérapeutique entre les antidépresseurs, les  $\beta_2$ -agonistes et les iPDE4. Nous avons montré que l'effet antiallodynique de ces molécules nécessitait d'une part une diminution de l'expression du TNF $\alpha$  dans les DRG et d'autre part le recrutement du système opioïdérique endogène via les DOR.

Nous avons mis en évidence une augmentation de l'expression du TNF $\alpha$  membranaire dans les DRG d'animaux neuropathiques préférentiellement exprimé par les SGCs. La question du récepteur du TNF $\alpha$  membranaire (mTNF $\alpha$ ) qui est mis en jeu se pose alors. La littérature sur le mTNF $\alpha$  évoque préférentiellement son action sur le récepteur au TNF $\alpha$  de type 2 (TNFR2). Dans un premier temps, une étude immunohistochimique permettrait de localiser ce récepteur dans les DRG. Cette étude pourra être complétée par des analyses et manipulations moléculaires afin de détecter des variations éventuelles d'expression de ce récepteur en condition neuropathique et lors d'un traitement par les antidépresseurs, les  $\beta_2$ -agonistes ou les iPDE4, et d'étudier l'effet de sa délétion.

Les DOR semblent également avoir un rôle primordial dans l'effet antiallodynique de ces traitements. Nous disposons maintenant d'animaux génétiquement modifiés chez lesquels les DOR sont couplés à la protéine fluorescente GFP, facilitant ainsi leur visualisation. Il serait intéressant de réaliser une cartographie de l'expression de ces récepteurs dans les DRG. De cette façon, nous pourrions comparer leur profil d'expression chez des animaux traités ou non par un antidépresseur, un  $\beta_2$ -agoniste ou un iPDE4. A plus long terme, des expériences de co-localisation pourront être menées afin de caractériser si des populations cellulaires expriment les récepteurs au TNF $\alpha$  et les DOR.

Au cours de cette étude nous avons également montré que l'effet *ex vivo* du rolipram était dose-dépendant. Par conséquent, il serait d'un intérêt certain de déterminer l'origine de cette différence de sensibilité au rolipram entre les neurones et les cellules non-neuronales. En ce sens, l'objectif principal d'une telle étude serait la mise au point de cultures purifiées de neurones et de cellules gliales permettant de réaliser une quantification de l'expression de l'ARN messager des différents sous-types de PDE4 dans chacun des types cellulaires du DRG.

De plus, la différence de sensibilité observée *ex vivo* entre neurones et SGCs laisse à penser que les effets comportementaux pourraient être liés à l'implication de différents sous-types de PDE4. Les outils pharmacologiques à notre disposition ne

permettant pas de répondre à cette question, l'utilisation d'outils génétiques devient nécessaire. En effet, des souris déficientes pour les PDE4D et les PDE4B existent (Jin et al., 1999). L'utilisation de telles lignées de souris nous permettrait de déterminer l'implication respective de ces sous-types de PDE dans le traitement de la douleur neuropathique.

Enfin, nous avons démontré que l'effet thérapeutique des iPDE5 dépendait des MOR et des DOR probablement exprimés dans le système nerveux central. De la même manière, il serait intéressant de déterminer le profil d'expression de ces récepteurs au niveau spinal. Cette approche morphologique nous permettrait ainsi de mieux comprendre la nécessité d'une co-expression de ces récepteurs dans l'effet antiallodynique des iPDE5. A moyen terme, nous pourrions déterminer si l'effet thérapeutique du sildénafil nécessite l'inhibition de cytokines pro-inflammatoires comme le TNF $\alpha$ . Enfin, à plus long terme, une approche de pharmacologie comportementale pourrait permettre de déterminer le rôle des différents acteurs de cette voie de signalisation. Nos données préliminaires indiquent que la NO-synthase pourrait participer à l'effet analgésique des iPDE5. A mon sens, il serait d'un intérêt certain d'évaluer le rôle d'autres acteurs potentiels de cette voie de signalisation parmi lesquels nous pouvons citer la protéine kinase G.

# *Bib lio g ra p h ie*

---



- Abdulla D, Renton KW (2005) Beta-adrenergic receptor modulation of the IPS-mediated depression in CYP1A activity in astrocytes. *Biochem Pharmacol* 69:741-750.
- Abrahamson B, Zhao J, Asante CO, Cendan CM, Marsh S, Martinez-Barbera JP, Nassar MA, Dickenson AH, Wood JN (2008) The cell and molecular basis of mechanical, cold, and inflammatory pain. *Science* 321:702-705.
- Abraira VE, Ginty DD (2013) The sensory neurons of touch. *Neuron* 79:618-639.
- Acosta CG, Lopez HS (1999) delta opioid receptor modulation of several voltage-dependent Ca(2+) currents in rat sensory neurons. *J Neurosci* 19:8337-8348.
- Aggarwal BB (2003) Signaling pathways of the TNF superfamily: a double-edged sword. *Nat Rev Immunol* 3:745-756.
- Alexander SP, Benson HE, Faccenda E, Pawson AJ, Shyman JL, Spedding M, Peters JA, Hammar AJ (2013) The Concise Guide to PHARMACOLOGY 2013/14: G protein-coupled receptors. *Br J Pharmacol* 170:1459-1581.
- Amarante LH, Duarte ID (2002) The kappa-opioid agonist (+/-)-bremazocine elicits peripheral antinociception by activation of the L-arginine/nitric oxide/cyclic GMP pathway. *Eur J Pharmacol* 454:19-23.
- Ambroz-Tututi M, Velazquez-Zamora DA, Urquiza-Marin H, Granados-So to V (2005) Analysis of the mechanism underlying the peripheral antinociceptive action of sildenafil in the formalin test. *Eur J Pharmacol* 512:121-127.
- Amir R, Michaelis M, Devor M (1999) Membrane potential oscillations in dorsal root ganglion neurons: role in normal electrogenesis and neuropathic pain. *J Neurosci* 19:8589-8596.
- Amir R, Liu CN, Kocsis JD, Devor M (2002) Oscillatory mechanism in primary sensory neurons. *Brain* 125:421-435.
- Anbar M, Gratt BM (1997) Role of nitric oxide in the physiopathology of pain. *J Pain Symptom Manage* 14:225-254.
- Andre S, Boukhaddaoui H, Campo B, Al-Jumaily M, Mayeux V, Grœuet D, Valmier J, Scamps F (2003) Axotomy-induced expression of calcium-activated chloride current in subpopulations of mouse dorsal root ganglion neurons. *J Neurophysiol* 90:3764-3773.
- Andres KH (1961) [Research on the fine-structure of spinal ganglia]. *Z Zellforsch Mikrosk Anat* 55:1-48.
- Anjaneyulu M, Chopra K (2006) Possible involvement of cholinergic and opioid receptor mechanisms in fluoxetine mediated antinociception response in streptozotocin-induced diabetic mice. *Eur J Pharmacol* 538:80-84.
- Antkiewicz-Michaluk L, Michaluk J, Rokosz-Pelc A, Marona-Lewicka D, Vetulani J (1987) The effect of chronic imipramine and electroconvulsive shock treatment on [3H]DADLE binding to cortical membranes of rats pretreated with chronic reserpine or 6-hydroxydopamine. *Pharmacol Biochem Behav* 26:203-206.
- Araiza-Saldana CI, Reyes-Garcia G, Bermudez-Ocana DY, Perez-Severiano F, Granados-So to V (2005) Effect of diabetes on the mechanisms of intrathecal antinociception of sildenafil in rats. *Eur J Pharmacol* 527:60-70.
- Ardid D, Alloui A, Brousse G, Jourdan D, Picard P, Dubray C, Eschalier A (2001) Potentiation of the antinociceptive effect of clomipramine by a 5-HT(1A) antagonist in neuropathic pain in rats. *Br J Pharmacol* 132:1118-1126.
- Armstead WM (1998) Nitric oxide contributes to opioid release from glia during hypoxia. *Brain Res* 813:398-401.
- Arnold IM, Lu Y, Crofford LJ, Wohrlich M, Detke MJ, Iyengar S, Goldstein DJ (2004) A double-blind, multicenter trial comparing duloxetine with placebo in the treatment of fibromyalgia patients with or without major depressive disorder. *Arthritis Rheum* 50:2974-2984.
- Attal N (2008) [Drug treatment for neuropathic pain]. *Presse Med* 37:346-353.
- Attal N (2011) [Therapeutic advances in pharmaceutical treatment of neuropathic pain]. *Rev Neurol (Paris)* 167:930-937.
- Attal N, Cruccu G, Baron R, Haanpaa M, Hansson P, Jensen TS, Numikko T (2010) EFNS guidelines on the pharmacological treatment of neuropathic pain: 2010 revision. *Eur J Neurol* 17:1113-e1188.
- Attal N, Cruccu G, Haanpaa M, Hansson P, Jensen TS, Numikko T, Sampaio C, Sindrup S, Wiffen P (2006) EFNS guidelines on pharmacological treatment of neuropathic pain. *Eur J Neurol* 13:1153-1169.
- Bao F, Fleming JC, Golshani R, Pearse DD, Kasabov L, Brown A, Weaver LC (2011) A selective phosphodiesterase-4 inhibitor reduces leukocyte infiltration, oxidative processes, and tissue damage after spinal cord injury. *J Neurotrauma* 28:1035-1049.
- Barclay J, Clark AK, Ganju P, Gentry C, Patel S, Wotherspoon G, Buxton F, Song C, Ullah J, Winter J, Fox A, Bevan S, Malcangio M (2007) Role of the cysteine protease cathepsin S in neuropathic hyperalgesia. *Pain* 130:225-234.
- Bardin L, Lavarenne J, Eschalier A (2000) Serotonin receptor subtypes involved in the spinal antinociceptive effect of 5-HT in rats. *Pain* 86:11-18.

- Bardoni R, Tawfik VL, Wang D, Francis A, Solozano C, Shuster SA, Choudhury P, Betelli C, Cassidy C, Smith K, de Nooij JC, Mennicken F, O'Donnell D, Kieffer BL, Woodbury CJ, Basbaum AI, MacDermott AB, Scherer G (2014) Delta opioid receptors presynaptically regulate cutaneous mechanosensory neuron input to the spinal cord dorsal horn. *Neuron* 81:1312-1327.
- Baron R (2006) Mechanisms of disease: neuropathic pain--a clinical perspective. *Nat Clin Pract Neurol* 2:95-106.
- Barot M (2012) Tests and models of nociception and pain in rodents. *Neuroscience* 211:39-50.
- Barot M, Yalcin I, Choucair-Jaafar N, Benbouzid M, Freund-Mercier MJ (2009) From antidepressant drugs to beta-mimetics: preclinical insights on potential new treatments for neuropathic pain. *Recent Pat CNS Drug Discov* 4:182-189.
- Bauer CS, Tian-Van-Minh A, Kadurin I, Dolphin AC (2010) A new look at calcium channel  $\alpha 2\delta$  subunits. *Curr Opin Neurobiol* 20:563-571.
- Beavo JA (1995) Cyclic nucleotide phosphodiesterases: functional implications of multiple isoforms. *Physiol Rev* 75:725-748.
- Belkouch M, Danseureau MA, Reaux-Le Goazigo A, Van Steenwinkel J, Beaudet N, Chraïbi A, Melik-Parsadaniantz S, Sarrat P (2011) The chemokine CCL2 increases Nav1.8 sodium channel activity in primary sensory neurons through a Gbetagamma-dependent mechanism. *J Neurosci* 31:18381-18390.
- Belzung C, Le Moine M (2011) Criteria of validity for animal models of psychiatric disorders: focus on anxiety disorders and depression. *Biol Mood Anxiety Disord* 1:9.
- Benbouzid M, Choucair-Jaafar N, Yalcin I, Waltisperger E, Muller A, Freund-Mercier MJ, Barot M (2008a) Chronic, but not acute, tricyclic antidepressant treatment alleviates neuropathic allodynia after sciatic nerve cuffing in mice. *Eur J Pain* 12:1008-1017.
- Benbouzid M, Pallage V, Rajalu M, Waltisperger E, Doridot S, Poisebeau P, Freund-Mercier MJ, Barot M (2008b) Sciatic nerve cuffing in mice: a model of sustained neuropathic pain. *European journal of pain* 12:591-599.
- Benbouzid M, Gaveriaux-Ruff C, Yalcin I, Waltisperger E, Tessier LH, Muller A, Kieffer BL, Freund-Mercier MJ, Barot M (2008c) Delta-opioid receptors are critical for tricyclic antidepressant treatment of neuropathic allodynia. *Biol Psychiatry* 63:633-636.
- Bennett GJ, Xie YK (1988) A peripheral mononeuropathy in rat that produces disorders of pain sensation like those seen in man. *Pain* 33:87-107.
- Berge OG (2011) Predictive validity of behavioural animal models for chronic pain. *Br J Pharmacol* 164:1195-1206.
- Bermoso E, Rojas-Comales MO, Mico JA (2004) Non-selective opioid receptor antagonism of the antidepressant-like effect of venlafaxine in the forced swimming test in mice. *Neurosci Lett* 363:25-28.
- Bermoso E, De Benito MD, Mico JA (2007) Role of serotonin 5-HT1A and opioid receptors in the antiallodynic effect of tramadol in the chronic constriction injury model of neuropathic pain in rats. *Psychopharmacology (Berl)* 193:97-105.
- Berta T, Poirot O, Pertin M, Ji RR, Kellenberger S, Decosterd I (2008) Transcriptional and functional profiles of voltage-gated Na(+) channels in injured and non-injured DRG neurons in the SNI model of neuropathic pain. *Mol Cell Neurosci* 37:196-208.
- Bezerra MM, Lima V, Giraó VC, Teixeira RC, Graca JR (2008) Antinociceptive activity of sildenafil and adrenergic agents in the writhing test in mice. *Pharmacol Rep* 60:339-344.
- Bhargoo SK, Ren D, Miller RJ, Chan DM, Ripsh MS, Weiss C, McGinnis C, White FA (2007) CXCR4 chemokine receptor signaling mediates pain hypersensitivity in association with antiretroviral toxic neuropathy. *Bra in Behav Immun* 21:581-591.
- Biegon A, Samuel D (1980) Interaction of tricyclic antidepressants with opiate receptors. *Biochem Pharmacol* 29:460-462.
- Binder W, Mousa SA, Sitte N, Kaiser M, Stein C, Schafer M (2004) Sympathetic activation triggers endogenous opioid release and analgesia within peripheral inflamed tissue. *Eur J Neurosci* 20:92-100.
- Black JA, Liu S, Tanaka M, Cummins TR, Waxman SG (2004) Changes in the expression of tetrodotoxin-sensitive sodium channels within dorsal root ganglia neurons in inflammatory pain. *Pain* 108:237-247.
- Black RA, Rauch CT, Kozlosky CJ, Peschon JJ, Slack JL, Wolfson MF, Castner BJ, Stocking KL, Reddy P, Srinivasan S, Nelson N, Boiani N, Schooley KA, Gerhart M, Davis R, Fitzner JN, Johnson RS, Paxton RJ, March CJ, Cemerli DP (1997) A metalloprotease disintegrin that releases tumour necrosis factor- $\alpha$  from cells. *Nature* 385:729-733.
- Bohren Y, Karavelic D, Tessier LH, Yalcin I, Gaveriaux-Ruff C, Kieffer BL, Freund-Mercier MJ, Barot M (2010) Mu-opioid receptors are not necessary for nortrityline treatment of neuropathic allodynia. *Eur J Pain* 14:700-704.
- Bohren Y, Tessier LH, Megat S, Petitjean H, Hugel S, Daniel D, Kremer M, Fomel S, Hein L, Schlichter R, Freund-Mercier MJ, Yalcin I, Barot M (2013) Antidepressants suppress neuropathic pain by a peripheral beta-2-adrenoceptor mediated anti-TNF $\alpha$  mechanism. *Neurobiol Dis* 60:39-50.
- Bonic JJ (1990) Evolution and current status of pain programs. *J Pain Symptom Manage* 5:368-374.

- Bo uha ssira D, Lante ri-Minet M, Attal N, Laurent B, Touboul C (2008) Prevalence of chronic pain with neuropathic characteristics in the general population. *Pain* 136:380-387.
- Bo uha ssira D, Attal N, Fermanian J, Alchaar H, Gautron M, Masqueler E, Roasting S, Lante ri-Minet M, Collin E, Grisar J, Boureau F (2004) Development and validation of the Neuropathic Pain Symptom Inventory. *Pain* 108:248-257.
- Bo uha ssira D, Attal N, Alchaar H, Boureau F, Brochet B, Bruelle J, Cunin G, Fermanian J, Ginies P, Grun-Overdyking A, Ja fari-Sc hluep H, Lante ri-Minet M, Laurent B, Mick G, Serie A, Valade D, Vic aut E (2005) Comparison of pain syndromes associated with nervous or somatic lesions and development of a new neuropathic pain diagnostic questionnaire (DN4). *Pain* 114:29-36.
- Bouinet E, Altier C, Hildebrand ME, Tang T, Salter MW, Zamponi GW (2014) Calcium-permeable ion channels in pain signaling. *Physiol Rev* 94:81-140.
- Bra iloiu GC, De liu E, Hooper R, Dun NJ, Undieh AS, Adler MW, Benamar K, Bra iloiu E (2012) Agonist-selective effects of opioid receptor ligands on cytosolic calcium concentration in rat striatal neurons. *Drug Alcohol Depend* 123:277-281.
- Brazda V, Klusakova I, Hradlova Svizenska I, Dubovy P (2013) Dynamic response to peripheral nerve injury detected by in situ hybridization of IL-6 and its receptor mRNAs in the dorsal root ganglia is not strictly correlated with signs of neuropathic pain. *Mol Pain* 9:42.
- Broadbear JH, Negus SS, Butelman ER, de Costa BR, Woods JH (1994) Differential effects of systemically administered nor-binaltorphimine (nor-BNI) on kappa-opioid agonists in the mouse writhing assay. *Psychopharmacology (Berl)* 115:311-319.
- Buchas MR, Yang T, Schreiber S, Defino M, Kwan SC, Li S, Chavkin C (2007) Long-acting kappa opioid antagonists disrupt receptor signaling and produce noncompetitive effects by activating c-Jun N-terminal kinase. *J Biol Chem* 282:29803-29811.
- Brunton LL, Hayes JS, Mayer SE (1981) Functional compartmentation of cyclic AMP and protein kinase in heart. *Adv Cyclic Nucleotide Res* 14:391-397.
- Buss MD, Richter W, Homer K, Jin SL, Conti M (2008) Critical role of PDE4D in beta2-adrenoceptor-dependent cAMP signaling in mouse embryonic fibroblasts. *J Biol Chem* 283:22430-22442.
- Bundschuh DS, Eltze M, Barsig J, Wolin L, Hatzelmann A, Beume R (2001) In vivo efficacy in airway disease models of roflumilast, a novel orally active PDE4 inhibitor. *J Pharmacol Exp Ther* 297:280-290.
- Buraei Z, Yang J (2013) Structure and function of the beta subunit of voltage-gated Ca(2+)(+) channels. *Biochim Biophys Acta* 1828:1530-1540.
- Burgess PR, Perl ER (1967) Myelinated afferent fibres responding specifically to noxious stimulation of the skin. *J Physiol* 190:541-562.
- Butelman ER, Negus SS, Ai Y, de Costa BR, Woods JH (1993) Kappa opioid antagonist effects of systemically administered nor-binaltorphimine in a thermal antinociception assay in rhesus monkeys. *J Pharmacol Exp Ther* 267:1269-1276.
- Cabal-Hierro L, Lazo PS (2012) Signal transduction by tumor necrosis factor receptors. *Cell Signal* 24:1297-1305.
- Calvo M, Dawes JM, Bennett DL (2012) The role of the immune system in the generation of neuropathic pain. *Lancet Neurol* 11:629-642.
- Campana WM, Li X, Shubayev VI, Angert M, Cai K, Myers RR (2006) Erythropoietin reduces Schwann cell TNF-alpha, Wallerian degeneration and pain-related behaviors after peripheral nerve injury. *Eur J Neurosci* 23:617-626.
- Cao L, DeLeo JA (2008) CNS-infiltrating CD4+ T lymphocytes contribute to murine spinal nerve transection-induced neuropathic pain. *Eur J Immunol* 38:448-458.
- Cao XH, Byun HS, Chen SR, Cai YQ, Pan HL (2010) Reduction in voltage-gated K+ channel activity in primary sensory neurons in painful diabetic neuropathy: role of brain-derived neurotrophic factor. *J Neurochem* 114:1460-1475.
- Carr PA, Nagy JI (1993) Emerging relationships between cytochemical properties and sensory modality transmission in primary sensory neurons. *Brain Res Bull* 30:209-219.
- Castro IR, Guiot E, Polito M, Paupardin-Titsch D, Vincent P (2014) Decoding spatial and temporal features of neuronal cAMP/PKA signaling with FRET biosensors. *Bio Technol J* 9:192-202.
- Castro IR, Gervasi N, Guiot E, Cavellini L, Nikolaev VO, Paupardin-Titsch D, Vincent P (2010) Type 4 phosphodiesterase plays different integrating roles in different cellular domains in pyramidal cortical neurons. *J Neurosci* 30:6143-6151.
- Caterina MJ, Leffler A, Malmberg AB, Martin WJ, Trafton J, Petersen-Zeitz KR, Klitznerburg M, Basbaum AI, Julius D (2000) Impaired nociception and pain sensation in mice lacking the capsaicin receptor. *Science* 288:306-313.
- Cegiel ska -Pe run K, Buja l ska -Za drozny M, Ta ta rkie wicz J, Ga sinska E, Ma kulska -No wak HE (2013) Venlafaxine and neuropathic pain. *Pharmacology* 91:69-76.
- Chacur M, Matsos RJ, Alves AS, Rodrigues AC, Gutierrez V, Cury Y, Brito IR (2010) Participation of neuronal nitric oxide synthase in experimental neuropathic pain induced by sciatic nerve transection. *Braz J Med Biol Res* 43:367-376.

- Chaplan SR, Guo HQ, Lee DH, Luo L, Liu C, Kuei C, Velumian AA, Butler MP, Brown SM, Dubin AE (2003) Neuronal hyperpolarization-activated pacemaker channels drive neuropathic pain. *J Neurosci* 23:1169-1178.
- Chappell AS, Bradley IA, Wiltse C, Detke MJ, D'Souza DN, Spaeth M (2008) A six-month double-blind, placebo-controlled, randomized clinical trial of duloxetine for the treatment of fibromyalgia. *Int J Gen Med* 1:91-102.
- Cheng PY, Liu-Chen LY, Pickel VM (1997) Dual ultrastructural immunocytochemical labeling of mu and delta opioid receptors in the superficial layers of the rat cervical spinal cord. *Brain Res* 778:367-380.
- Cho HJ, Kim DS, Lee NH, Kim JK, Lee KM, Han KS, Kang YN, Kim KJ (1997) Changes in the alpha 2-adrenergic receptor subtypes gene expression in rat dorsal root ganglion in an experimental model of neuropathic pain. *Neuroreport* 8:3119-3122.
- Choucair-Jaafar N, Salvat E, Freund-Mercier MJ, Barrot M (2014) The antiallodynic action of nortriptyline and terbuthaline is mediated by beta(2) adrenoceptors and delta opioid receptors in the ob/ob model of diabetic polyneuropathy. *Brain Res* 1546:18-26.
- Choucair-Jaafar N, Yalcin I, Rodeau JL, Waltisperger E, Freund-Mercier MJ, Barrot M (2009) Beta2-adrenoceptor agonists alleviate neuropathic allodynia in mice after chronic treatment. *Br J Pharmacol* 158:1683-1694.
- Choucair-Jaafar N, Beetz N, Gilsbach R, Yalcin I, Waltisperger E, Freund-Mercier MJ, Monassier L, Hein L, Barrot M (2011) Cardiovascular effects of chronic treatment with a beta2-adrenoceptor agonist relieving neuropathic pain in mice. *Neuropharmacology* 61:51-60.
- Christiansen SH, Selige J, Dunken T, Rasso VA, Leist M (2011) Combined anti-inflammatory effects of beta2-adrenergic agonists and PDE4 inhibitors on astrocytes by upregulation of intracellular cAMP. *Neurochem Int* 59:837-846.
- Chung K, Kim HJ, Na HS, Park MJ, Chung JM (1993) Abnormalities of sympathetic innervation in the area of an injured peripheral nerve in a rat model of neuropathic pain. *Neurosci Lett* 162:85-88.
- Cohen SP, Bogduk N, Dragovich A, Buckenmaier CC, 3rd, Griffith S, Kurihara C, Raymond J, Richter PJ, Williams N, Yaksh TL (2009) Randomized, double-blind, placebo-controlled, dose-response, and preclinical safety study of transforaminal epidural etanercept for the treatment of sciatica. *Anesthesiology* 110:1116-1126.
- Cok OY, Eker HE, Yalcin I, Barrot M, Anbogan A (2010) Is there a place for beta-mimetics in clinical management of neuropathic pain? Salbutamol therapy in six cases. *Anesthesiology* 112:1276-1279.
- Conti M, Beavo J (2007) Biochemistry and physiology of cyclic nucleotide phosphodiesterases: essential components in cyclic nucleotide signaling. *Annu Rev Biochem* 76:481-511.
- Covey WC, Ignatowski TA, Knight PR, Spengler RN (2000) Brain-derived TNF $\alpha$ : involvement in neuroplastic changes implicated in the conscious perception of persistent pain. *Brain Res* 859:113-122.
- Covey WC, Ignatowski TA, Renauld AE, Knight PR, Nader ND, Spengler RN (2002) Expression of neuron-associated tumor necrosis factor  $\alpha$  in the brain is increased during persistent pain. *Reg Anesth Pain Med* 27:357-366.
- Coward K, Jowett A, Plumpton C, Powell A, Birch R, Tate S, Bountra C, Anand P (2001) Sodium channel beta1 and beta2 subunits parallel SNS/PN3  $\alpha$ -subunit changes in injured human sensory neurons. *Neuroreport* 12:483-488.
- Coyle DE (1998) Partial peripheral nerve injury leads to activation of astroglia and microglia which parallels the development of allodynic behavior. *Glia* 23:75-83.
- Cruz Duarte P, St-Jacques B, Ma W (2012) Prostaglandin E2 contributes to the synthesis of brain-derived neurotrophic factor in primary sensory neuron in ganglion explant cultures and in a neuropathic pain model. *Exp Neurol* 234:466-481.
- Cummins TR, Howe JR, Waxman SG (1998) Slow closed-state inactivation: a novel mechanism underlying ramp currents in cells expressing the hNE/PN1 sodium channel. *J Neurosci* 18:9607-9619.
- Cunha FQ, Teixeira MM, Ferreira SH (1999) Pharmacological modulation of secondary mediator systems-cyclic AMP and cyclic GMP--on inflammatory hyperalgesia. *Br J Pharmacol* 127:671-678.
- Cury Y, Picolo G, Gutierrez VP, Ferreira SH (2011) Pain and analgesia: The dual effect of nitric oxide in the nociceptive system. *Nitric Oxide* 25:243-254.
- Czeschik JC, Hagenacker T, Schafers M, Busseberg D (2008) TNF- $\alpha$  differentially modulates ion channels of nociceptive neurons. *Neurosci Lett* 434:293-298.
- Davare MA, Avdonin V, Hall DD, Peden EM, Burette A, Weinberg RJ, Home MC, Hoshi T, Hell JW (2001) A beta2 adrenergic receptor signaling complex assembled with the Ca<sup>2+</sup> channel Cav1.2. *Science* 293:98-101.
- Davis JL, Lewis SB, Gerich JE, Kaplan RA, Schultz TA, Wallin JD (1977) Peripheral diabetic neuropathy treated with amitriptyline and fluphenazine. *JAMA* 238:2291-2292.
- De Felipe MC, De Ceballos ML, Gil C, Fuentes JA (1985) Chronic antidepressant treatment increases enkephalin levels in nucleus accumbens and striatum of the rat. *Eur J Pharmacol* 112:119-122.
- Decosterd I, Woolf CJ (2000) Spared nerve injury: an animal model of persistent peripheral neuropathic pain. *Pain* 87:149-158.

- Defrin R, Ohry A, Blumen N, Urc G (2001) Characterization of chronic pain and somatosensory function in spinal cord injury subjects. *Pain* 89:253-263.
- DeLeo JA, Tanga FY, Tawfik VL (2004) Neuroimmune activation and neuroinflammation in chronic pain and opioid tolerance/hyperalgesia. *Neuroscientist* 10:40-52.
- DeLeo JA, Rutkowski MD, Stalder AK, Campbell IL (2000) Transgenic expression of TNF by astrocytes increases mechanical allodynia in a mouse neuropathy model. *Neuroreport* 11:599-602.
- Delgado M (2002) Vasoactive intestinal peptide and pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide inhibit CBP-NF-kappaB interaction in activated microglia. *Biochem Biophys Res Commun* 297:1181-1185.
- Dello Russo C, Bouleme AI, Gavriluk V, Feinstein DL (2004) Inhibition of microglial inflammatory responses by norepinephrine: effects on nitric oxide and interleukin-1beta production. *J Neuroinflammation* 1:9.
- Devor M (1999) Unexplained peculiarities of the dorsal root ganglion. *Pain Suppl* 6:S27-35.
- Devor M (2009) Ectopic discharge in A-beta afferents as a source of neuropathic pain. *Exp Brain Res* 196:115-128.
- Dickson CT, Magistretti J, Shalinsky MH, Franzen E, Hasselmo ME, Alonso A (2000) Properties and role of Ih in the pacing of subthreshold oscillations in entorhinal cortex layer II neurons. *J Neurophysiol* 83:2562-2579.
- Distler C, Rathee PK, Lips KS, Obreja O, Neuhuber W, Kress M (2003) Fast Ca<sup>2+</sup>-induced potentiation of heat-activated ionic currents requires cAMP/PKA signaling and functional AKAP anchoring. *J Neurophysiol* 89:2499-2505.
- Djohri L, Lawson SN (2004) A-beta-fiber nociceptive primary afferent neurons: a review of incidence and properties in relation to other afferent A-fiber neurons in mammals. *Brain Res Brain Res Rev* 46:131-145.
- Djohri L, Fang X, Okuse K, Wood JN, Berry CM, Lawson SN (2003) The TTX-resistant sodium channel Nav1.8 (SNS/PN3): expression and correlation with membrane properties in rat nociceptive primary afferent neurons. *J Physiol* 550:739-752.
- Dodge-Kafka KL, Sougayer J, Pare GC, Carlsle Michel JJ, Langeberg IK, Kapiloff MS, Scott JD (2005) The protein kinase A anchoring protein mAKAP coordinates two integrated cAMP effector pathways. *Nature* 437:574-578.
- Dolan S, Nolan AM (2001) Biphasic modulation of nociceptive processing by the cyclic AMP-protein kinase A signaling pathway in sheep spinal cord. *Neurosci Lett* 309:157-160.
- Dolphin AC (2012) Calcium channel auxiliary alpha2delta and beta subunits: trafficking and one step beyond. *Nat Rev Neurosci* 13:542-555.
- Donnelly LE, Tidhope SJ, Fenwick PS, Bames PJ (2010) Effects of formoterol and salmeterol on cytokine release from monocyte-derived macrophages. *Eur Respir J* 36:178-186.
- Dora zil-Dudzik M, Mika J, Schaffer MK, Li Y, Obara I, Wordliczek J, Przewlocka B (2004) The effects of local pentoxyfylline and propentoxyfylline treatment on formalin-induced pain and tumor necrosis factor-alpha messenger RNA levels in the inflamed tissue of the rat paw. *Anesth Analg* 98:1566-1573, table of contents.
- Dublin P, Hanani M (2007) Satellite glial cells in sensory ganglia: their possible contribution to inflammatory pain. *Brain Behav Immun* 21:592-598.
- Dubovy P, Klusakova I, Svizenska I, Brazda V (2010a) Satellite glial cells express IL-6 and corresponding signal-transducing receptors in the dorsal root ganglia of rat neuropathic pain model. *Neuron Glia Biol* 6:73-83.
- Dubovy P, Klusakova I, Svizenska I, Brazda V (2010b) Spatio-temporal changes of SDF1 and its CXCR4 receptor in the dorsal root ganglia following unilateral sciatic nerve injury as a model of neuropathic pain. *Histochem Cell Biol* 133:323-337.
- Dubovy P, Brazda V, Klusakova I, Hradilova-Svizenska I (2013) Bilateral elevation of interleukin-6 protein and mRNA in both lumbar and cervical dorsal root ganglia following unilateral chronic compression injury of the sciatic nerve. *J Neuroinflammation* 10:55.
- Dworkin RH, O'Connor AB, Backonja M, Farrar JT, Finne rup NB, Jensen TS, Kalso EA, Loeser JD, Miaskowski C, Numikko TJ, Portenoy RK, Rice AS, Stacey BR, Teede RD, Turk DC, Wallace MS (2007) Pharmacologic management of neuropathic pain: evidence-based recommendations. *Pain* 132:237-251.
- Efendiev R, Bavenoffe A, Hu H, Zhu MX, Dessauer CW (2013) Scaffoldin by A-kinase anchoring protein enhances functional coupling between adenylyl cyclase and TRPV1 channel. *J Biol Chem* 288:3929-3937.
- Elenkov IJ, Wilder RL, Chrousos GP, Vizi ES (2000) The sympathetic nerve--an integrative interface between two supersystems: the brain and the immune system. *Pharmacol Rev* 52:595-638.
- Emery EC, Young GT, Bercooso EM, Chen L, McNaughton PA (2011) HCN2 ion channels play a central role in inflammatory and neuropathic pain. *Science* 333:1462-1466.
- Endoh T, Matsuura H, Tanaka C, Nagase H (1992) Norbinaltorphimine: a potent and selective kappa-opioid receptor antagonist with long-lasting activity in vivo. *Arch Int Pharmacodyn Ther* 316:30-42.

- Ebbs E, Faget L, Scherer G, Matifas A, Filliol D, Vonesch JL, Koch M, Kessler P, Hentsch D, Birling MC, Koutsourakis M, Vasseur L, Veinante P, Kieffer BL, Massotte D (2014) A mu-delta opioid receptor brain atlas reveals neuronal co-occurrence in subcortical networks. *Brain Struct Funct*.
- Escalier A, Montastruc JL, Devouze JL, Rigal F, Gaillard-Plaza G, Pechadre JC (1981) Influence of naloxone and methysergide on the analgesic effect of clomipramine in rats. *Eur J Pharmacol* 74:1-7.
- Farmer P, Pugin J (2000) beta-adrenergic agonists exert their "anti-inflammatory" effects in monocytic cells through the I kappa B/NF-kappa B pathway. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 279:L675-682.
- Feinstein DL, Heneka MT, Gavriluk V, DeLo Russo C, Weinberg G, Galea E (2002) Noradrenergic regulation of inflammatory gene expression in brain. *Neurochem Int* 41:357-365.
- Ferreira SH, Duarte ID, Lorenzetti BB (1991) The molecular mechanism of action of peripheral morphine analgesia: stimulation of the cGMP system via nitric oxide release. *Eur J Pharmacol* 201:121-122.
- Field MJ, Bramwell S, Hughes J, Singh L (1999) Detection of static and dynamic components of mechanical allodynia in rat models of neuropathic pain: are they signalled by distinct primary sensory neurons? *Pain* 83:303-311.
- Field MJ, Cox PJ, Stott E, Melrose H, Offord J, Su TZ, Bramwell S, Comadini L, England S, Winks J, Kinloch RA, Hendrich J, Dolphin AC, Webb T, Williams D (2006) Identification of the alpha2-delta-1 subunit of voltage-dependent calcium channels as a molecular target for pain mediating the analgesic actions of pregabalin. *Proc Natl Acad Sci USA* 103:17537-17542.
- Fields RD, Stevens-Graham B (2002) New insights into neuron-glia communication. *Science* 298:556-562.
- Filliol D, Ghozland S, Chluba J, Martin M, Matthes HW, Simonin F, Belfort K, Gaveriaux-Ruff C, Dieckhoff A, LeMeur M, Valverde O, Maldonado R, Kieffer BL (2000) Mice deficient for delta- and mu-opioid receptors exhibit opposing alterations of emotional responses. *Nat Genet* 25:195-200.
- Finnerup NB, Otto M, McQuay HJ, Jensen TS, Sindrup SH (2005) Algorithm for neuropathic pain treatment: an evidence based proposal. *Pain* 118:289-305.
- Fisher K, Fundytus ME, Cahill CM, Codere TJ (1998) Intrathecal administration of the mGluR compound, (S)-4CPG, attenuates hyperalgesia and allodynia associated with sciatic nerve constriction injury in rats. *Pain* 77:59-66.
- Francis SH, Blount MA, Corbin JD (2011) Mammalian cyclic nucleotide phosphodiesterases: molecular mechanisms and physiological functions. *Physiol Rev* 91:651-690.
- Francis JN, Yokoro CM, Poole S, Tafuni WL, Cunha FQ, Teixeira MM (2000) Anti-inflammatory and analgesic effects of the phosphodiesterase 4 inhibitor roflumilast in a rat model of arthritis. *Eur J Pharmacol* 399:243-249.
- Freyhagen R, Baron R, Gockel U, Tolle TR (2006) painDETECT: a new screening questionnaire to identify neuropathic components in patients with back pain. *Curr Med Res Opin* 22:1911-1920.
- Fu ES, Zhang YP, Sagen J, Candiotto KA, Morton PD, Liebl DJ, Bethea JR, Brambilla R (2010) Transgenic inhibition of glial NF-kappa B reduces pain behavior and inflammation after peripheral nerve injury. *Pain* 148:509-518.
- Gao YJ, Zhang L, Samad OA, Suter MR, Yasuhiko K, Xu ZZ, Park JY, Lind AL, Ma Q, Ji RR (2009) JNK-induced MCP-1 production in spinal cord astrocytes contributes to central sensitization and neuropathic pain. *J Neurosci* 29:4096-4108.
- Garrison CJ, Dougherty PM, Kajander KC, Carlton SM (1991) Staining of glial fibrillary acidic protein (GFAP) in lumbar spinal cord increases following a sciatic nerve constriction injury. *Brain Res* 565:1-7.
- Gaveriaux-Ruff C, Karhewski IA, Hever X, Matifas A, Kieffer BL (2008) Inflammatory pain is enhanced in delta opioid receptor-knockout mice. *Eur J Neurosci* 27:2558-2567.
- Gaveriaux-Ruff C, Nozaki C, Nadal X, Hever XC, Weibel R, Matifas A, Reiss D, Filliol D, Nassar MA, Wood JN, Maldonado R, Kieffer BL (2011) Genetic ablation of delta opioid receptors in nociceptive sensory neurons increases chronic pain and abolishes opioid analgesia. *Pain* 152:1238-1248.
- Gemes G, Bangaru ML, Wu HE, Tang Q, Wehrauch D, Koopmeiners AS, Cruikshank JM, Kwok WM, Hogan QH (2011) Store-operated Ca<sup>2+</sup> entry in sensory neurons: functional role and the effect of painful nerve injury. *J Neurosci* 31:3536-3549.
- Genevay S, Gueme PA, Gabay C (2004) [Efficacy of tumor necrosis factor-alpha blockade for severe sciatica?]. *Rev Med Suisse Romande* 124:543-545.
- Geoffroy V, Fouque F, Nivet V, Clot JP, Lugnier C, Desbuquois B, Benelli C (1999) Activation of a cGMP-stimulated cAMP phosphodiesterase by protein kinase C in a liver Golgi-endosomal fraction. *Eur J Biochem* 259:892-900.
- George A, Buehl A, Sommer C (2005) Tumor necrosis factor receptor 1 and 2 proteins are differentially regulated during Wallerian degeneration of mouse sciatic nerve. *Exp Neurol* 192:163-166.
- George A, Schmidt C, Weishaupf A, Tyka KV, Sommer C (1999) Serial determination of tumor necrosis factor-alpha content in rat sciatic nerve after chronic constriction injury. *Exp Neurol* 160:124-132.
- Ghosh M, Garcia-Castillo D, Aguirre V, Golshani R, Atkins CM, Bramlett HM, Dietrich WD, Pearce DD (2012) Proinflammatory cytokine regulation of cyclic AMP-phosphodiesterase 4 signaling in microglia in vitro and following CNS injury. *Glia* 60:1839-1859.

- Gibson IC, Hastings SF, McPhee I, Clayton RA, Damoch CE, Mackenzie A, Mackenzie FL, Nagasawa M, Stevens PA, Mackenzie SJ (2006) The inhibitory profile of ibudilast against the human phosphodiesterase enzyme family. *Eur J Pharmacol* 538:39-42.
- Goldstein DJ, Lu Y, Detke MJ, Lee TC, Iyengar S (2005) Duloxetine vs. placebo in patients with painful diabetic neuropathy. *Pain* 116:109-118.
- Granados-Soto V, Rufino MO, Gomes Lopes LD, Ferreira SH (1997) Evidence for the involvement of the nitric oxide-cGMP pathway in the antinociception of morphine in the formalin test. *Eur J Pharmacol* 340:177-180.
- Gray AM, Spencer PS, Sewell RD (1998) The involvement of the opioidergic system in the antinociceptive mechanism of action of antidepressant compounds. *Br J Pharmacol* 124:669-674.
- Gregory NS, Hamis AL, Robinson CR, Dougherty PM, Fuchs PN, Sluka KA (2013) An overview of animal models of pain: disease models and outcome measures. *J Pain* 14:1255-1269.
- Grell M, Douni E, Wajant H, Lohden M, Clauss M, Maxeiner B, Georgopoulos S, Lesslauer W, Kollias G, Pfizenmaier K, Schurich P (1995) The transmembrane form of tumor necrosis factor is the prime activating ligand of the 80 kDa tumor necrosis factor receptor. *Cell* 83:793-802.
- Gryniewicz Z, Poenie M, T sien RY (1985) A new generation of Ca<sup>2+</sup> indicators with greatly improved fluorescence properties. *J Biol Chem* 260:3440-3450.
- Guastella V, Mick G, Soriano C, Vallet L, Escande G, Dubray C, Escalier A (2011) A prospective study of neuropathic pain induced by thoracotomy: incidence, clinical description, and diagnosis. *Pain* 152:74-81.
- Guez-Barber D, Fanous S, Harvey BK, Zhang Y, Lehmann E, Becker KG, Piccotto MR, Hope BT (2012) FACS purification of immunolabeled cell types from adult rat brain. *J Neurosci Methods* 203:10-18.
- Guinmand F, Le Bars D (1996) [Physiology of nociception]. *Ann Fr Anesth Reanim* 15:1048-1079.
- Hall FS, Schwarzbau JM, Perona MT, Templin JS, Caron MG, Leach KP, Murphy DL, Uhl GR (2011) A greater role for the norepinephrine transporter than the serotonin transporter in murine nociception. *Neuroscience* 175:315-327.
- Hama AT, Broadhead A, Lora in DS, Sagen J (2012) The antinociceptive effect of the asthma drug ibudilast in rat models of peripheral and central neuropathic pain. *J Neurotrauma* 29:600-610.
- Hamon M, Gozlan H, Bourgo in S, Benoliel JJ, Mauborgne A, Taquet H, Cesselin F, Mic o JA (1987) Opioid receptors and neuropeptides in the CNS in rats treated chronically with amoxapine or amitriptyline. *Neuropharmacology* 26:531-539.
- Hanani M, Huang TY, Cherkas PS, Ledda M, Panne se E (2002) Glial cell plasticity in sensory ganglia induced by nerve damage. *Neuroscience* 114:279-283.
- Hannington-Kiff JG (1974) Intravenous regional sympathetic block with guanethidine. *Lancet* 1:1019-1020.
- Hansson P (2003) Difficulties in stratifying neuropathic pain by mechanisms. *Eur J Pain* 7:353-357.
- Hao S, Mata M, Glorioso JC, Fink DJ (2007) Gene transfer to interfere with TNF $\alpha$  signaling in neuropathic pain. *Gene Ther* 14:1010-1016.
- Hayashi R, Xiao W, Kawamoto M, Yuge O, Bennett GJ (2008) Systemic glucocorticoid therapy reduces pain and the number of endoneurial tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF $\alpha$ )-positive mast cells in rats with a painful peripheral neuropathy. *J Pharmacol Sci* 106:559-565.
- He C, Chen F, Li B, Hu Z (2014) Neurophysiology of HCN channels: from cellular functions to multiple regulations. *Prog Neurobiol* 112:1-23.
- Heine S, Michalak S, Kaltenbom-Gerhardt W, Lu R, Lim HY, Weiland J, Del Turco D, Deller T, Tegeder I, Biel M, Geisslinger G, Schmidtke A (2011) CNGA3: a target of spinal nitric oxide/cGMP signaling and modulation of inflammatory pain hypersensitivity. *J Neurosci* 31:11184-11192.
- Hernandez A, Constan dil L, La urido C, Pelissier T, Marchand F, Ardid D, Aloui A, Escalier A, Soto-Moyano R (2004) Venlafaxine-induced depression of wind-up activity in mono neuropathic rats is potentiated by inhibition of brain 5-HT<sub>1A</sub> receptor expression in vivo. *Int J Neurosci* 114:229-242.
- Hervera A, Negrete R, Leanez S, Martin-Campos JM, Polo (2011) Peripheral effects of morphine and expression of mu-opioid receptors in the dorsal root ganglia during neuropathic pain: nitric oxide signaling. *Mol Pain* 7:25.
- Hirschfeld RM, Mallinckrodt C, Lee TC, Detke MJ (2005) Time course of depression-symptom improvement during treatment with duloxetine. *Depress Anxiety* 21:170-177.
- Hogan QH (2010) Labat lecture: the primary sensory neuron: where it is, what it does, and why it matters. *Reg Anesth Pain Med* 35:306-311.
- Honda M, Uchida K, Tanabe M, Ono H (2006) Fluvoxamine, a selective serotonin reuptake inhibitor, exerts its antiallo dynamic effects on neuropathic pain in mice via 5-HT<sub>2A/2C</sub> receptors. *Neuropharmacology* 51:866-872.
- Hong S, Morrow TJ, Paulson PE, Isom LL, Wiley JW (2004) Early painful diabetic neuropathy is associated with differential changes in tetrodotoxin-sensitive and -resistant sodium channels in dorsal root ganglion neurons in the rat. *J Biol Chem* 279:29341-29350.
- Horan P, Taylor J, Yamamura HI, Pomeca F (1992) Extremely long-lasting antagonistic actions of norbinaltorphimine (nor-BND) in the mouse tail-flick test. *J Pharmacol Exp Ther* 260:1237-1243.

- Horuchi T, Mitoma H, Harashima S, Tsukamoto H, Shimoda T (2010) Transmembrane TNF- $\alpha$ : structure, function and interaction with anti-TNF agents. *Rheumatology (Oxford)* 49:1215-1228.
- Houslay MD (2010) Underpinning compartmentalised cAMP signalling through targeted cAMP breakdown. *Trends Biochem Sci* 35:91-100.
- Hsu H, Shu HB, Pan MG, Goeddel DV (1996) TRADD-TRAF2 and TRADD-FADD interactions define two distinct TNF receptor 1 signal transduction pathways. *Cell* 84:299-308.
- Hu P, Bembrick AL, Keay KA, McLachlan EM (2007) Immune cell involvement in dorsal root ganglia and spinal cord after chronic constriction or transection of the rat sciatic nerve. *Brain Behav Immun* 21:599-616.
- Huang LJ, Yoon MH, Choi JI, Kim WM, Lee HG, Kim YO (2010a) Effect of sildenafil on neuropathic pain and hemodynamics in rats. *Yonsei Med J* 51:82-87.
- Huang TY, Belzer V, Hanani M (2010b) Gap junctions in dorsal root ganglia: possible contribution to visceral pain. *Eur J Pain* 14:49 e41-11.
- Ignatowski TA, Covey WC, Knight PR, Severin CM, Nikola TJ, Spengler RN (1999) Brain-derived TNF $\alpha$  mediates neuropathic pain. *Brain Res* 841:70-77.
- Ikedo T, Ishida Y, Naono R, Takeda R, Abe H, Nakamura T, Nishimori T (2009) Effects of intrathecal administration of newer antidepressants on mechanical allodynia in rat models of neuropathic pain. *Neurosci Res* 63:42-46.
- Inoue K, Koizumi S, Fuziwara S, Denda S, Denda M (2002) Functional vanilloid receptors in cultured normal human epidermal keratinocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 291:124-129.
- Ishikawa T, Miyagi M, Kamoda H, Orita S, Eguchi Y, Arai G, Suzuki M, Sakuma Y, Oikawa Y, Inoue G, Aoki Y, Toyone T, Takahashi K, Ohtani S (2013) Differences between tumor necrosis factor- $\alpha$  receptors types 1 and 2 in the modulation of spinal glial cell activation and mechanical allodynia in a rat sciatic nerve injury model. *Spine (Phila Pa 1976)* 38:11-16.
- Jackson KC, 2nd, St Onge EL (2003) Antidepressant pharmacotherapy: considerations for the pain clinician. *Pain Pract* 3:135-143.
- Jain NK, Patil CS, Singh A, Kulka mi SK (2001) Sildenafil-induced peripheral analgesia and activation of the nitric oxide-cyclic GMP pathway. *Brain Res* 909:170-178.
- Jasmin L, Vit JP, Bhargava A, Ohara PT (2010) Can satellite glial cells be therapeutic targets for pain control? *Neuron Glia Biol* 6:63-71.
- Jensen TS, Baron R, Haanpaa M, Kalso E, Loeser JD, Rice AS, Treede RD (2011) A new definition of neuropathic pain. *Pain* 152:2204-2205.
- Jeong CY, Choi JI, Yoon MH (2004) Roles of serotonin receptor subtypes for the antinociception of 5-HT in the spinal cord of rats. *Eur J Pharmacol* 502:205-211.
- Jessen KR, Thorpe R, Mirsky R (1984) Molecular identity, distribution and heterogeneity of glial fibrillary acidic protein: an immunoblotting and immunohistochemical study of Schwann cells, satellite cells, enteric glia and astrocytes. *J Neurocytol* 13:187-200.
- Jin SL, Richard FJ, Kuo WP, D'Ecole AJ, Conti M (1999) Impaired growth and fertility of cAMP-specific phosphodiesterase PDE4D-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 96:11998-12003.
- 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* 26:246-255.
- Jorum E, Wamcke T, Stubhaug A (2003) Cold allodynia and hyperalgesia in neuropathic pain: the effect of N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptor antagonist ketamine -- a double-blind, cross-over comparison with alfentanil and placebo. *Pain* 101:229-235.
- Joseph EK, Levine JD (2004) Caspase signalling in neuropathic and inflammatory pain in the rat. *Eur J Neurosci* 20:2896-2902.
- Julius D, Basbaum AI (2001) Molecular mechanisms of nociception. *Nature* 413:203-210.
- Jung H, Toth PT, White FA, Miller RJ (2008) Monocyte chemoattractant protein-1 functions as a neuro modulator in dorsal root ganglia neurons. *J Neurochem* 104:254-263.
- Kage K, Niforatos W, Zhu CZ, Lynch KJ, Honore P, Jarvis MF (2002) Alteration of dorsal root ganglion P2X3 receptor expression and function following spinal nerve ligation in the rat. *Exp Brain Res* 147:511-519.
- Kalmansohn RB, Kalmansohn RW, Markham CH, Schiff DL (1988) Treatment of diabetic neuropathy with pentoxifylline: case report. *Angiology* 39:371-374.
- Karppinen J, Korhonen T, Malmivara A, Paimela L, Kyllonen E, Lindgren KA, Rantanen P, Teronen O, Niimaki J, Seitsa S, Humi H (2003) Tumor necrosis factor- $\alpha$  monoclonal antibody, infliximab, used to manage severe sciatica. *Spine (Phila Pa 1976)* 28:750-753; discussion 753-754.
- Kato K, Kikuchi S, Shubayev VI, Myers RR (2009) Distribution and tumor necrosis factor- $\alpha$  isoform binding specificity of locally administered etanercept into injured and uninjured rat sciatic nerve. *Neuroscience* 160:492-500.
- Kato T, Kajiyama S, Hamada H, Kawamoto M (2013) Long-term administration of fluvoxamine attenuates neuropathic pain and involvement of spinal serotonin receptors in diabetic model rats. *Hiroshima J Med Sci* 62:83-89.

- Keita H, Kayser V, Guillaud G (1995) Antinociceptive effect of a kappa-opioid receptor agonist that minimally crosses the blood-brain barrier (ICI 204448) in a rat model of mononeuropathy. *Eur J Pharmacol* 277:275-280.
- Keravis T, Lugnier C (2012) Cyclic nucleotide phosphodiesterase (PDE) isozymes as targets of the intracellular signaling network: benefits of PDE inhibitors in various diseases and perspectives for future therapeutic developments. *Br J Pharmacol* 165:1288-1305.
- Keshavarzian A, Mutlu E, Guzman JP, Forsyth C, Banan A (2007) Phosphodiesterase 4 inhibitors and inflammatory bowel disease: emerging therapies in inflammatory bowel disease. *Expert Opin Investig Drugs* 16:1489-1506.
- Kettenmann H, Ransom BR (1988) Electrical coupling between astrocytes and between oligodendrocytes studied in mammalian cell cultures. *Glia* 1:64-73.
- Kieba M, Maggirwar SB (2011) Ibudilast, a pharmacologic phosphodiesterase inhibitor, prevents human immunodeficiency virus-1 Tat-mediated activation of microglial cells. *PLoS One* 6:e18633.
- Kiguchi N, Kobayashi Y, Kishio S (2012) Chemokines and cytokines in neuroinflammation leading to neuropathic pain. *Curr Opin Pharmacol* 12:55-61.
- Kilkenny C, Browne W, Cuthill IC, Emerson M, Altman DG (2010) Animal research: reporting in vivo experiments: the ARRIVE guidelines. *Br J Pharmacol* 160:1577-1579.
- Kim CF, Moalem-Taylor G (2011) Detailed characterization of neuro-immune responses following neuropathic injury in mice. *Brain Res* 1405:95-108.
- Kim CH, Oh Y, Chung JM, Chung K (2002a) Changes in three subtypes of tetrodotoxin sensitive sodium channel expression in the axotomized dorsal root ganglion in the rat. *Neurosci Lett* 323:125-128.
- Kim DS, Choi JO, Rim HD, Cho HJ (2002b) Downregulation of voltage-gated potassium channel  $\alpha$  gene expression in dorsal root ganglia following chronic constriction injury of the rat sciatic nerve. *Brain Res Mol Brain Res* 105:146-152.
- Kim SH, Chung JM (1992) An experimental model for peripheral neuropathy produced by segmental spinal nerve ligation in the rat. *Pain* 50:355-363.
- Kim SH, Park BN, Kim SW (2011a) The effect of phosphodiesterase-4-specific inhibitor in the rat model of spinal nerve ligation. *J Korean Neurosurg Soc* 50:109-113.
- Kim SH, Na HS, Sheen K, Chung JM (1993) Effects of sympathectomy on a rat model of peripheral neuropathy. *Pain* 55:85-92.
- Kim SH, Nam JS, Choi DK, Koh WW, Suh JH, Song JG, Shin JW, Lee JG (2011b) Tumor Necrosis Factor- $\alpha$  and Apoptosis Following Spinal Nerve Ligation Injury in Rats. *Korean J Pain* 24:185-190.
- Kirchner S, Boldt S, Kolch W, Haffner S, Kazak S, Janosch P, Holler E, Andreessen R, Eissner G (2004) I $\beta$ S resistance in monocytic cells caused by reverse signaling through transmembrane TNF (mTNF) is mediated by the MAPK/ERK pathway. *J Leukoc Biol* 75:324-331.
- Kishio S, Kiguchi N, Kobayashi Y, Yamamoto C, Saika F, Wakida N, Ko MC, Woods JH (2013) Pharmacokinetic evidence for the long-lasting effect of norbinaltorphimine, a potent kappa opioid receptor antagonist, in mice. *Neurosci Lett* 552:98-102.
- Kitto KF, Haley JE, Wilcox GL (1992) Involvement of nitric oxide in spinally mediated hyperalgesia in the mouse. *Neurosci Lett* 148:1-5.
- Klein T, Magerl W, Rolke R, Treede RD (2005) Human surrogate models of neuropathic pain. *Pain* 115:227-233.
- Kobayashi K, Yamanaka H, Noguchi K (2013) Expression of ATP receptors in the rat dorsal root ganglion and spinal cord. *Anat Sci Int* 88:10-16.
- Koike H et al. (2010) Clinicopathological features of acute autonomic and sensory neuropathy. *Brain* 133:2881-2896.
- Korhonen R, Hommo T, Keranen T, Laavola M, Hamalainen M, Vuolteenaho K, Lehtimäki L, Kankaanranta H, Moilanen E (2013) Attenuation of TNF production and experimentally induced inflammation by PDE4 inhibitor rolipram is mediated by MAPK phosphatase-1. *Br J Pharmacol* 169:1525-1536.
- Korhonen T, Karpainen J, Malmivaara A, Autio R, Niinimäki J, Paimela L, Kyllönen E, Lindgren KA, Tervonen O, Seitsalo S, Humi H (2004) Efficacy of infliximab for disc herniation-induced sciatica: one-year follow-up. *Spine (Phila Pa 1976)* 29:2115-2119.
- Krell HV, Leuchter AF, Cook IA, Abrams M (2005) Evaluation of reboxetine, a noradrenergic antidepressant, for the treatment of fibromyalgia and chronic low back pain. *Psychosomatics* 46:379-384.
- Kwak HJ, Song JS, Heo JY, Yang SD, Nam JY, Cheon HG (2005) Rolipram inhibits lipopolysaccharide-induced inflammatory mediators via suppression of nuclear factor-kappaB, p38 mitogen-activated protein kinase, and c-Jun NH2-terminal kinase activation. *J Pharmacol Exp Ther* 315:1188-1195.
- Lakis V, Karan EH, Boess FG (2010) Quantitative comparison of phosphodiesterase mRNA distribution in human brain and peripheral tissues. *Neuropharmacology* 59:367-374.
- Langford DJ, Bailey AL, Chanda ML, Clarke SE, Drummond TE, Echols S, Glick S, Ingrao J, Klassen-Ross T, Lacroix-Fralich ML, Matsumiya L, Sorge RE, Sotocinal SG, Tabaka JM, Wong D, van den Maagdenberg AM, Ferrari MD, Craig KD, Mogil JS (2010) Coding of facial expressions of pain in the laboratory mouse. *Nat Methods* 7:447-449.

- Law PY, Loh HH (1999) Regulation of opioid receptor activities. *J Pharmacol Exp Ther* 289:607-624.
- Lawson SN, Waddell PJ (1991) Somatoneurofilament immunoreactivity is related to cell size and fibre conduction velocity in rat primary sensory neurons. *J Physiol* 435:41-63.
- Lawson SN, Pery MJ, Prabhakar E, McCarthy PW (1993) Primary sensory neurons: neurofilament, neuropeptides, and conduction velocity. *Brain Res Bull* 30:239-243.
- Ledeboer A, Sloane EM, Milligan ED, Frank MG, Mahony JH, Maier SF, Watkins LR (2005) Minocycline attenuates mechanical allodynia and proinflammatory cytokine expression in rat models of pain facilitation. *Pain* 115:71-83.
- Ledeboer A, Liu T, Shumilla JA, Mahoney JH, Vijay S, Gross MI, Vargas JA, Sultzbaugh L, Claypool MD, Sanftner IM, Watkins LR, Johnson KW (2006) The glial modulatory drug AV411 attenuates mechanical allodynia in rat models of neuropathic pain. *Neuron Glia Biol* 12:279-291.
- Lee BH, Yoon YW, Chung K, Chung JM (1998) Comparison of sympathetic sprouting in sensory ganglia in three animal models of neuropathic pain. *Exp Brain Res* 120:432-438.
- Leffkimmias K, Sikanthan M, Maieffaro I, Moyer MP, Curci S, Hofer AM (2009) Store-operated cyclic AMP signalling mediated by STIM1. *Nat Cell Biol* 11:433-442.
- Leiphart JW, Dills CV, Levy RM (2003) Decreased spinal alpha2a- and alpha2c-adrenergic receptor subtype mRNA in a rat model of neuropathic pain. *Neurosci Lett* 349:5-8.
- Leung L, Cahill CM (2010) TNF-alpha and neuropathic pain--a review. *J Neuroinflammation* 7:27.
- Li CY, Zhang XL, Matthews EA, Li KW, Kurwa A, Boroujerdi A, Gross J, Gold MS, Dickenson AH, Feng G, Luo ZD (2006) Calcium channel alpha2delta1 subunit mediates spinal hyperexcitability in pain modulation. *Pain* 125:20-34.
- Li L, Cao XH, Chen SR, Han HD, Lopez-Berstein G, Sood AK, Pan HL (2012) Up-regulation of Cavbeta3 subunit in primary sensory neurons increases voltage-activated Ca<sup>2+</sup> channel activity and nociceptive input in neuropathic pain. *J Biol Chem* 287:6002-6013.
- Li X, Wang J, Wang Z, Dong C, Dong X, Jing Y, Yuan Y, Fan G (2008) Tumor necrosis factor-alpha of Red nucleus involved in the development of neuropathic allodynia. *Brain Res Bull* 77:233-236.
- Liefner M, Siebert H, Sachse T, Michel U, Kollias G, Buck W (2000) The role of TNF-alpha during Wallerian degeneration. *J Neuroimmunol* 108:147-152.
- Lindenlaub T, Teuteberg P, Hartung T, Sommer C (2000) Effects of neutralizing antibodies to TNF-alpha on pain-related behavior and nerve regeneration in mice with chronic constriction injury. *Brain Res* 866:15-22.
- Lindia JA, Kohler MG, Martin WJ, Abbadie C (2005) Relationship between sodium channel NaV1.3 expression and neuropathic pain behavior in rats. *Pain* 117:145-153.
- Link A, Selezan S, Maack C, Lezn M, Bohm M (2008) Phosphodiesterase 4 inhibition but not beta-adrenergic stimulation suppresses tumor necrosis factor-alpha release in peripheral blood mononuclear cells in septic shock. *Crit Care* 12:R159.
- Liu D, Wang Z, Liu S, Wang F, Zhao S, Hao A (2011) Anti-inflammatory effects of fluoxetine in lipopolysaccharide (LPS)-stimulated microglial cells. *Neuropharmacology* 61:592-599.
- Liu FY, Sun YN, Wang FT, Li Q, Su L, Zhao ZF, Meng XL, Zhao H, Wu X, Sun Q, Xing GG, Wan Y (2012) Activation of satellite glial cells in lumbar dorsal root ganglia contributes to neuropathic pain after spinal nerve ligation. *Brain Res* 1427:65-77.
- Liu J, Feng X, Yu M, Xie W, Zhao X, Li W, Guan R, Xu J (2007a) Pentoxifylline attenuates the development of hyperalgesia in a rat model of neuropathic pain. *Neurosci Lett* 412:268-272.
- Liu YL, Zhou LJ, Hu NW, Xu JT, Wu CY, Zhang T, Li YY, Liu XG (2007b) Tumor necrosis factor-alpha induces long-term potentiation of C-fiber evoked field potentials in spinal dorsal horn in rats with nerve injury: the role of NF-kappa B, JNK and p38 MAPK. *Neuropharmacology* 52:708-715.
- Locksley RM, Killen N, Leonardo MJ (2001) The TNF and TNF receptor superfamily: integrating mammalian biology. *Cell* 104:487-501.
- Lugnier C (2006) Cyclic nucleotide phosphodiesterase (PDE) superfamily: a new target for the development of specific therapeutic agents. *Pharmacol Ther* 109:366-398.
- Lugnier C, Schoeffter P, Le Bec A, Strouthou E, Stoclet JC (1986) Selective inhibition of cyclic nucleotide phosphodiesterases of human, bovine and rat aorta. *Biochem Pharmacol* 35:1743-1751.
- Lugnier C, Muller B, Le Bec A, Beaudry C, Rousseau E (1993) Characterization of indolide- and rolipram-sensitive cyclic nucleotide phosphodiesterases in canine and human cardiac microsomal fractions. *J Pharmacol Exp Ther* 265:1142-1151.
- Luo ZD, Chaplan SR, Higuera ES, Sorokin IS, Staudeman KA, Williams ME, Yaksh TL (2001) Upregulation of dorsal root ganglion (alpha)2(delta) calcium channel subunit and its correlation with allodynia in spinal nerve-injured rats. *J Neurosci* 21:1868-1875.
- Ma C, LaMotte RH (2005) Enhanced excitability of dissociated primary sensory neurons after chronic compression of the dorsal root ganglion in the rat. *Pain* 113:106-112.
- Machelska H, Przewlocki R, Radomski MW, Przewlocka B (1998) Differential effects of intracerebrally and intracerebroventricularly administered nitric oxide donors on noxious mechanical and thermal stimulation. *Pol J Pharmacol* 50:407-415.

- Makarov SS (2000) NF-kappaB as a therapeutic target in chronic inflammation: recent advances. *Mol Med Today* 6:441-448.
- Marchand F, Ardid D, Chapuy E, Alloui A, Jourdan D, Eschalier A (2003) Evidence for an involvement of supraspinal delta- and spinal mu-opioid receptors in the antihyperalgesic effect of chronically administered clomipramine in mono-neuropathic rats. *J Pharmacol Exp Ther* 307:268-274.
- Maruo K, Yamamoto H, Yamamoto S, Nagata T, Fujikawa H, Kanno T, Yaguchi T, Maruo S, Yoshiya S, Nishizaki T (2006) Modulation of P2X receptors via adrenergic pathways in rat dorsal root ganglion neurons after sciatic nerve injury. *Pain* 120:106-112.
- Matthes HW, Maldonado R, Simonin F, Valverde O, Slowe S, Kitchen I, Befort K, Dierich A, Le Meur M, Dole P, Tzavara E, Hanoune J, Roques BP, Kieffer BL (1996) Loss of morphine-induced analgesia, reward effect and withdrawal symptoms in mice lacking the mu-opioid-receptor gene. *Nature* 383:819-823.
- Maurice DH, Ke H, Ahmad F, Wang Y, Chung J, Manganiello VC (2014) Advances in targeting cyclic nucleotide phosphodiesterases. *Nat Rev Drug Discov* 13:290-314.
- Max MB, Lynch SA, Muir J, Shoaf SE, Smoller B, Dubner R (1992) Effects of desipramine, amitriptyline, and fluoxetine on pain in diabetic neuropathy. *N Engl J Med* 326:1250-1256.
- McCahill AC, Huston E, Li X, Houslay MD (2008) PDE4 associates with different scaffolding proteins: modulating interactions as a treatment for certain diseases. *Handb Exp Pharmacol*:125-166.
- McCann FE, Palfreeman AC, Andrews M, Perocheau DP, Inglis JJ, Schafer P, Feldmann M, Williams RO, Brennan FM (2010) Apremilast, a novel PDE4 inhibitor, inhibits spontaneous production of tumour necrosis factor- $\alpha$  from human rheumatoid synovial cells and ameliorates experimental arthritis. *Arthritis Res Ther* 12:R107.
- McCoy MK, Tansey MG (2008) TNF signaling inhibition in the CNS: implications for normal brain function and neurodegenerative disease. *J Neuroinflammation* 5:45.
- McDemott AM, Telle TR, Rowbotham DJ, Schaefer CP, Duke EM (2006) The burden of neuropathic pain: results from a cross-sectional survey. *Eur J Pain* 10:127-135.
- McGrath JC, Drummond GB, McLachlan EM, Kilkeny C, Wainwright CL (2010) Guidelines for reporting experiments involving animals: the ARRIVE guidelines. *Br J Pharmacol* 160:1573-1576.
- Meller ST, Gebhart GF (1993) Nitric oxide (NO) and nociceptive processing in the spinal cord. *Pain* 52:127-136.
- Meller ST, Pechman PS, Gebhart GF, Maves TJ (1992) Nitric oxide mediates the thermal hyperalgesia produced in a model of neuropathic pain in the rat. *Neuroscience* 50:7-10.
- Menendez L, Andres-Telles F, Hidalgo A, Baamonde A (1993) Involvement of spinal kappa opioid receptors in a type of footshock induced analgesia in mice. *Brain Res* 611:264-271.
- Micheau O, Tschopp J (2003) Induction of TNF receptor I-mediated apoptosis via two sequential signaling complexes. *Cell* 114:181-190.
- Mico JA, Ardid D, Bercooso E, Eschalier A (2006) Antidepressants and pain. *Trends Pharmacol Sci* 27:348-354.
- Mico JA, Gibert-Rahola J, Casas J, Rojas O, Serano MI, Serano JS (1997) Implication of beta 1- and beta 2-adrenergic receptors in the antinociceptive effect of tricyclic antidepressants. *Eur Neuropharmacol* 17:139-145.
- Mika J, Rojewska E, Makuch W, Przewlocka B (2010) Mincycline reduces the injury-induced expression of prodynorphin and pronociceptin in the dorsal root ganglion in a rat model of neuropathic pain. *Neuroscience* 165:1420-1428.
- Mika J, Zychowska M, Popielek-Barczyk K, Rojewska E, Przewlocka B (2013) Importance of glial activation in neuropathic pain. *Eur J Pharmacol* 716:106-119.
- Millan MJ (2002) Descending control of pain. *Prog Neurobiol* 66:355-474.
- Minnehan KP, Iversen IL (1976) Enkephalin and opiate narcotics increase cyclic GMP accumulation in slices of rat neostriatum. *Nature* 262:313-314.
- Mironov SL, Skorova E, Tscheneberger G, Hartelt N, Nikolaev VO, Lohse MJ, Kugler S (2009) Imaging cytoplasmic cAMP in mouse brainstem neurons. *BMC Neurosci* 10:29.
- Mixcoatl-Zecuatl T, Aguirre-Banuelos P, Granados-Soto V (2000) Sildenafil produces antinociception and increases morphine antinociception in the formalin test. *Eur J Pharmacol* 400:81-87.
- Moalem G, Xu K, Yu L (2004) T lymphocytes play a role in neuropathic pain following peripheral nerve injury in rats. *Neuroscience* 129:767-777.
- Mogil JS, Cragger SE (2004) What should we be measuring in behavioral studies of chronic pain in animals? *Pain* 112:12-15.
- Mohapatra DP, Nau C (2003) Desensitization of capsaicin-activated currents in the vanilloid receptor TRPV1 is decreased by the cyclic AMP-dependent protein kinase pathway. *J Biol Chem* 278:50080-50090.
- Molliver DC, Snider WD (1997) Nerve growth factor receptor TrkA is down-regulated during postnatal development by a subset of dorsal root ganglion neurons. *J Comp Neurol* 381:428-438.

- Morin N, Owolabi SA, Harty MW, Papa EF, Tracy TF, Jr, Shaw SK, Kim M, Saab CY (2007) Neutrophils invade lumbar dorsal root ganglia after chronic constriction injury of the sciatic nerve. *J Neuroimmunol* 184:164-171.
- Morioka N, Tanabe H, Inoue A, Dohi T, Nakata Y (2009) Noradrenaline reduces the ATP-stimulated phosphorylation of p38 MAP kinase via beta-adrenergic receptors-cAMP-protein kinase A-dependent mechanism in cultured rat spinal microglia. *Neurochem Int* 55:226-234.
- Mosconi T, Kruger L (1996) Fixed-diameter polyethylene cuffs applied to the rat sciatic nerve induce a painful neuropathy: ultrastructural morphometric analysis of axonal alterations. *Pain* 64:37-57.
- Myers RR, Shubayev VI (2011) Theology of neuropathy: an integrative review of the role of neuroinflammation and TNF-alpha axonal transport in neuropathic pain. *J Peripher Nerv Syst* 16:277-286.
- Myers RR, Heckman HM, Rodriguez M (1996) Reduced hyperalgesia in nerve-injured WLD mice: relationship to nerve fiber phagocytosis, axonal degeneration, and regeneration in normal mice. *Exp Neurol* 141:94-101.
- Myers RR, Yamamoto T, Yaksh TL, Powell HC (1993) The role of focal nerve ischemia and Wallerian degeneration in peripheral nerve injury producing hyperesthesia. *Anesthesiology* 78:308-316.
- Naik AK, Tandan SK, Kumar D, Dudhgaonkar SP (2006) Nitric oxide and its modulators in chronic constriction injury-induced neuropathic pain in rats. *Eur J Pharmacol* 530:59-69.
- Nakai K, Nakae A, Oba S, Mashimo T, Ueda K (2010) P2X4 receptor expression in a rat model of trigeminal neuropathic pain. *Neuroreport* 21:559-563.
- Nakamura S, Atsuta Y (2004) Electrophysiological study on primary afferent properties of a chronic constriction nerve injury model in spinal rats. *J Orthop Sci* 9:386-391.
- Nassar MA, Levato A, Stirling LC, Wood JN (2005) Neuropathic pain develops normally in mice lacking both Na(v)1.7 and Na(v)1.8. *Mol Pain* 1:24.
- Nassar MA, Baker MD, Levato A, Ingram R, Mallucci G, McMahon SB, Wood JN (2006) Nerve injury induces robust allodynia and ectopic discharges in Nav1.3 null mutant mice. *Mol Pain* 2:33.
- Neil A, Attal N, Guilbaud G (1991) Effects of guanethidine on sensitization to natural stimuli and self-mutilating behaviour in rats with a peripheral neuropathy. *Brain Res* 565:237-246.
- Newton RA, Bingham S, Case PC, Sanger GJ, Lawson SN (2001) Dorsal root ganglion neurons show increased expression of the calcium channel alpha2delta-1 subunit following partial sciatic nerve injury. *Brain Res Mol Brain Res* 95:1-8.
- Nicholas AP, Pierbone VA, Eldred R, Hokfelt T (1991) Initial observations on the localization of mRNA for alpha and beta adrenergic receptors in brain and peripheral tissues of rat using in situ hybridization. *Mol Cell Neurosci* 2:344-350.
- Nicholson R, Dixon AK, Spanswick D, Lee K (2005) Noradrenergic receptor mRNA expression in adult rat superficial dorsal horn and dorsal root ganglion neurons. *Neurosci Lett* 380:316-321.
- Nozaki-Taguchi N, Yamamoto T (1998) Involvement of nitric oxide in peripheral antinociception mediated by kappa- and delta-opioid receptors. *Anesth Analg* 87:388-393.
- Nozaki C, Kamei J (2006) Possible involvement of opioidergic systems in the antinociceptive effect of the selective serotonin reuptake inhibitors in sciatic nerve-injured mice. *Eur J Pharmacol* 552:99-104.
- Obata H, Saito S, Sasaki M, Ishizaki K, Goto F (2001) Antiallodynic effect of intrathecally administered 5-HT<sub>2</sub> agonists in rats with nerve ligation. *Pain* 90:173-179.
- Obuchowicz E, Bielecka AM, Paul-Samojedny M, Pudelko A, Kowalski J (2014) Imipramine and fluoxetine inhibit IPS-induced activation and affect morphology of microglial cells in the rat glial culture. *Pharmacol Rep* 66:34-43.
- Ohara PT, Vit JP, Bhargava A, Jasmin L (2008) Evidence for a role of connexin 43 in trigeminal pain using RNA interference in vivo. *J Neurophysiol* 100:3064-3073.
- Ohtori S, Takahashi K, Moriya H, Myers RR (2004) TNF-alpha and TNF-alpha receptor type 1 upregulation in glia and neurons after peripheral nerve injury: studies in murine DRG and spinal cord. *Spine (Phila Pa 1976)* 29:1082-1088.
- Okamoto K, Martin DP, Schmelzer JD, Mitsui Y, Low PA (2001) Pro- and anti-inflammatory cytokine gene expression in rat sciatic nerve chronic constriction injury model of neuropathic pain. *Exp Neurol* 169:386-391.
- Okruhlicova L, Tibulova N, Eckly A, Lugnier C, Slezak J (1996) Cytochemical distribution of cyclic AMP-dependent 3',5'-nucleotide phosphodiesterase in the rat myocardium. *Histochem J* 28:165-172.
- Onghe na P, Van Houdenhove B (1992) Antidepressant-induced analgesia in chronic non-malignant pain: a meta-analysis of 39 placebo-controlled studies. *Pain* 49:205-219.
- Oto shi K, Kikuchi S, Konno S, Sekiguchi M (2010) The reactions of glial cells and endoneurial macrophages in the dorsal root ganglion and their contribution to pain-related behavior after application of nucleus pulposus onto the nerve root in rats. *Spine (Phila Pa 1976)* 35:264-271.
- Otto M, Bach FW, Jensen TS, Brosen K, Sindrup SH (2008) Escitalopram in painful polyneuropathy: a randomized, placebo-controlled, cross-over trial. *Pain* 139:275-283.

- Ouseph AK, Khasar SG, Levine JD (1995) Multiple second messenger systems act sequentially to mediate rolipram-induced prolongation of prostaglandin E<sub>2</sub>-induced mechanical hyperalgesia in the rat. *Neuroscience* 64:769-776.
- Ozdogan UK, Lahdesmaki J, Mansikka H, Scheinin M (2004) Loss of amitriptyline analgesia in alpha 2A-adrenoceptor deficient mice. *Eur J Pharmacol* 485:193-196.
- Ozturk Y, Aydin S, Beis R, Herkman-Demir T (2006) The involvement of endogenous opioid mechanisms in the antinociceptive effects induced by antidepressant drugs, desipramine and trimipramine. *Pharmacol Biochem Behav* 83:592-597.
- Pannese E, Ledda M, Cherkas PS, Huang TY, Hanani M (2003) Satellite cell reactions to axon injury of sensory ganglion neurons: increase in number of gap junctions and formation of bridges connecting previously separate perineuronal sheaths. *Anat Embryol (Berl)* 206:337-347.
- Paoli F, Darcourt G, Cossa P (1960) [Preliminary note on the action of imipramine in painful states]. *Rev Neurol (Paris)* 102:503-504.
- Para MC, Nguyen TN, Hurley RW, Hammond DL (2002) Persistent inflammatory nociception increases levels of dynorphin 1-17 in the spinal cord, but not in supraspinal nuclei involved in pain modulation. *J Pain* 3:330-336.
- Pataki I, Tegledy G (1998) Further evidence that nitric oxide modifies acute and chronic morphine actions in mice. *Eur J Pharmacol* 357:157-162.
- Patel R, Bauer CS, Nieto-Rostro M, Margas W, Femon L, Chaggar K, Crews K, Ramirez JD, Bennett DL, Schwartz A, Dickenson AH, Dolphin AC (2013) alpha2delta-1 gene deletion affects somatosensory neuron function and delays mechanical hyperalgesia in response to peripheral nerve damage. *J Neurosci* 33:16412-16426.
- Pathan E, Abraham S, Van Rossen E, Withrington R, Keat A, Charles PJ, Paterson E, Chowdhury M, McClinton C, Taylor PC (2013) Efficacy and safety of apremilast, an oral phosphodiesterase 4 inhibitor, in ankylosing spondylitis. *Ann Rheum Dis* 72:1475-1480.
- Patil CS, Singh VP, Singh S, Kulkarni SK (2004) Modulatory effect of the PDE-5 inhibitor sildenafil in diabetic neuropathy. *Pharmacology* 72:190-195.
- Patil CS, Padi SV, Singh VP, Kulkarni SK (2006) Sildenafil induces hyperalgesia via activation of the NO-cGMP pathway in the rat neuropathic pain model. *Inflammopharmacology* 14:22-27.
- Patkar KA, Wu J, Ganno ML, Singh HD, Ross NC, Rasakham K, Toll L, McLaughlin JP (2013) Physical presence of nor-binaltorphimine in mouse brain over 21 days after a single administration corresponds to its long-lasting antagonistic effect on kappa-opioid receptors. *J Pharmacol Exp Ther* 346:545-554.
- Patrizio M (2004) Tumor necrosis factor reduces cAMP production in rat microglia. *Glia* 48:241-249.
- Pedersen LH, Nielsen AN, Blackburn-Munro G (2005) Anti-nociception is selectively enhanced by parallel inhibition of multiple subtypes of monoamine transporters in rat models of persistent and neuropathic pain. *Psychopharmacology (Berl)* 182:551-561.
- Pera G, Araque A (2006) Synaptic information processing by astrocytes. *J Physiol Paris* 99:92-97.
- Perry VH, Brown MC, Lunn ER, Tee P, Gordon S (1990) Evidence that Very Slow Wallerian Degeneration in C57BL/Ola Mice is an Intrinsic Property of the Peripheral Nerve. *Eur J Neurosci* 2:802-808.
- Pertovaara A (2013) The noradrenergic pain regulation system: a potential target for pain therapy. *Eur J Pharmacol* 716:2-7.
- Peters CM, Jimenez-Andrade JM, Kuskowski MA, Ghilardi JR, Mantyh PW (2007) An evolving cellular pathology occurs in dorsal root ganglia, peripheral nerve and spinal cord following intravenous administration of paclitaxel in the rat. *Brain Res* 1168:46-59.
- Pichon X, Wattiez AS, Becamel C, Ehrlich I, Bockaert J, Escalier A, Marin P, Courteix C (2010) Disrupting 5-HT<sub>2A</sub> receptor/PDZ protein interactions reduces hyperalgesia and enhances SSRI efficacy in neuropathic pain. *Mol Ther* 18:1462-1470.
- Piretti S, Dominici L, Di Giannuario A, Cesari N, Dal Piaz V (2006) Local anti-inflammatory effect and behavioral studies on new PDE4 inhibitors. *Life Sci* 79:791-800.
- Podda MV, Leone L, Piacentini R, Cocco S, Mezzogori D, D'Ascenzo M, Grassi C (2012) Expression of olfactory-type cyclic nucleotide-gated channels in rat cortical astrocytes. *Glia* 60:1391-1405.
- Pollock J, McFarlane SM, Conneil MC, Zehavi U, Vandenaabeele P, MacEwan DJ, Scott RH (2002) TNF-alpha receptors simultaneously activate Ca<sup>2+</sup> mobilisation and stress kinases in cultured sensory neurons. *Neuropharmacology* 42:93-106.
- Por ED, Gomez R, Akopian AN, Jeske NA (2013) Phosphorylation regulates TRPV1 association with beta-arrestin-2. *Biochem J* 451:101-109.
- Por ED, Bierbower SM, Berg KA, Gomez R, Akopian AN, Wetzel WC, Jeske NA (2012) beta-Arrestin-2 desensitizes the transient receptor potential vanilloid 1 (TRPV1) channel. *J Biol Chem* 287:37552-37563.
- Pradhan AA, Befort K, Nozaki C, Gaveriaux-Ruff C, Kieffer BL (2011) The delta opioid receptor: an evolving target for the treatment of brain disorders. *Trends Pharmacol Sci* 32:581-590.
- Praado WA, Schiavon VF, Cunha FQ (2002) Dual effect of local application of nitric oxide donors in a model of incision pain in rats. *Eur J Pharmacol* 441:57-65.

- Press R, Nennesmo I, Kouwenhoven M, Huang YM, Link H, Pashenkov M (2005) Dendritic cells in the cerebrospinal fluid and peripheral nerves in Guillain-Barre syndrome and chronic inflammatory demyelinating polyradiculoneuropathy. *J Neuroimmunol* 159:165-176.
- Pricc TJ, Flores CM (2007) Critical evaluation of the colocalization between calcitonin gene-related peptide, substance P, transient receptor potential vanilloid subfamily type 1 immunoreactivities, and isolectin B4 binding in primary afferent neurons of the rat and mouse. *J Pain* 8:263-272.
- Qu C, King T, Okun A, Lai J, Fields HL, Pomera F (2011) Lesion of the rostral anterior cingulate cortex eliminates the aversiveness of spontaneous neuropathic pain following partial or complete axotomy. *Pain* 152:1641-1648.
- Rall TW, Sutherland EW (1958) Formation of a cyclic adenine ribonucleotide by tissue particles. *J Biol Chem* 232:1065-1076.
- Ramer MS, Bisby MA (1998) Differences in sympathetic innervation of mouse DRG following proximal or distal nerve lesions. *Exp Neurol* 152:197-207.
- Ramer MS, Bisby MA (1999) Adrenergic innervation of rat sensory ganglia following proximal or distal painful sciatic neuropathy: distinct mechanisms revealed by anti-NGF treatment. *Eur J Neurosci* 11:837-846.
- Rasband MN, Park EW, Vanderah TW, Lai J, Pomera F, Timmer JS (2001) Distinct potassium channels on pain-sensing neurons. *Proc Natl Acad Sci USA* 98:13373-13378.
- Ren K, Dubner R (2008) Neuron-glia crosstalk gets serious: role in pain hypersensitivity. *Curr Opin Anaesthesiol* 21:570-579.
- Richter W, Conti M (2004) The oligomerization state determines regulatory properties and inhibitor sensitivity of type 4 cAMP-specific phosphodiesterases. *J Biol Chem* 279:30338-30348.
- Richter W, Day P, Agrawal R, Bruss MD, Granier S, Wang YL, Rasmussen SG, Homer K, Wang P, Lei T, Patterson AJ, Kobilka B, Conti M (2008) Signaling from beta1- and beta2-adrenergic receptors is defined by differential interactions with PDE4. *EMBO J* 27:384-393.
- Rigaud M, Gemes G, Weyer PD, Cruikshank JM, Kawano T, Wu HE, Hogan QH (2009) Axotomy depletes intracellular calcium stores in primary sensory neurons. *Anesthesiology* 111:381-392.
- Riviere PJ (2004) Peripheral kappa-opioid agonists for visceral pain. *Br J Pharmacol* 141:1331-1334.
- Rocha FA, Silva FS, Jr., Leite AC, Leite AK, Gira VC, Castro RR, Cunha FQ (2011) Tadalafil analgesia in experimental arthritis involves suppression of intra-articular TNF release. *Br J Pharmacol* 164:828-835.
- Rodriguez M, Cabal-Hierro L, Carcedo MT, Iglesias JM, Artime N, Damay BG, Lazo PS (2011) NF-kappa B signaling triggering and termination by tumor necrosis factor receptor 2. *J Biol Chem* 286:22814-22824.
- Rohrer DK, Bemstein D, Chrusinski A, Desai KH, Schauble E, Kobilka BK (1998) The developmental and physiological consequences of disrupting genes encoding beta 1 and beta 2 adrenoceptors. *Adv Pharmacol* 42:499-501.
- Rolan P, Gibbons JA, He L, Chang E, Jones D, Gross MI, Davidson JB, Sanftner LM, Johnson KW (2008) Ibuprofen in healthy volunteers: safety, tolerability and pharmacokinetics with single and multiple doses. *Br J Clin Pharmacol* 66:792-801.
- Rothe M, Wong SC, Henzel WJ, Goeddel DV (1994) A novel family of putative signal transducers associated with the cytoplasmic domain of the 75 kDa tumor necrosis factor receptor. *Cell* 78:681-692.
- Rothe M, Pan MG, Henzel WJ, Ayres TM, Goeddel DV (1995) The TNFR2-TRAF signaling complex contains two novel proteins related to baculoviral inhibitor of apoptosis proteins. *Cell* 83:1243-1252.
- Rowbotham MC, Goli V, Kunz NR, Lei D (2004) Venlafaxine extended release in the treatment of painful diabetic neuropathy: a double-blind, placebo-controlled study. *Pain* 110:697-706.
- Roytta M, Wei H, Pertovaara A (1999) Spinal nerve ligation-induced neuropathy in the rat: sensory disorders and correlation between histology of the peripheral nerves. *Pain* 80:161-170.
- Ruoff GE (1996) Depression in the patient with chronic pain. *J Fam Pract* 43:S25-33; discussion S34.
- Sarto T, Wiffen PJ (2007) Antidepressants for neuropathic pain. *Cochrane Database Syst Rev*:CD005454.
- Sacerdote P, Franchi S, Tiova AE, Valsecchi AE, Panerai AE, Colleoni M (2008) Transient early expression of TNF-alpha in sciatic nerve and dorsal root ganglia in a mouse model of painful peripheral neuropathy. *Neurosci Lett* 436:210-213.
- Sadeghi H, Hajhashemi V, Minaian M, Movahedian A, Talebi A (2011) A study on the mechanisms involving the anti-inflammatory effect of amitriptyline in carrageenan-induced paw edema in rats. *Eur J Pharmacol* 667:396-401.
- Saegusa H, Kurihara T, Zong S, Kazuno A, Matsuda Y, Nonaka T, Han W, Toriyama H, Tanabe T (2001) Suppression of inflammatory and neuropathic pain symptoms in mice lacking the N-type Ca<sup>2+</sup> channel. *EMBO J* 20:2349-2356.
- Sandelin M, Zabih S, Liu L, Wicher G, Kozlova EN (2004) Metastasis-associated S100A4 (Mts1) protein is expressed in subpopulations of sensory and autonomic neurons and in Schwann cells of the adult rat. *J Comp Neurol* 473:233-243.
- Sanz-Salvador L, Andres-Borderia A, Ferrer-Montiel A, Planells-Cases R (2012) Agonist- and Ca<sup>2+</sup>-dependent desensitization of TRPV1 channel targets the receptor to lysosomes for degradation. *J Biol Chem* 287:19462-19471.

- Sasaki A, Serizawa K, Andoh T, Shiraki K, Takahata H, Kuraishi Y (2008) Pharmacological differences between static and dynamic allodynia in mice with herpetic or postherpetic pain. *J Pharmacol Sci* 108:266-273.
- Scallon B, Cai A, Solowski N, Rosenberg A, Song XY, Shealy D, Wagner C (2002) Binding and functional comparisons of two types of tumor necrosis factor antagonists. *J Pharmacol Exp Ther* 301:418-426.
- Sc hafers M, Sor kin LS, Geis C, Shubayev VI (2003a) Spinal nerve ligation induces transient upregulation of tumor necrosis factor receptors 1 and 2 in injured and adjacent uninjured dorsal root ganglia in the rat. *Neurosci Lett* 347:179-182.
- Sc hafers M, Svensson CI, Sommer C, Sor kin LS (2003b) Tumor necrosis factor- $\alpha$  induces mechanical allodynia after spinal nerve ligation by activation of p38 MAPK in primary sensory neurons. *J Neurosci* 23:2517-2521.
- Sc hafers M, Brinkhoff J, Neukirch S, Marziniak M, Sommer C (2001) Combined epineurial therapy with neutralizing antibodies to tumor necrosis factor- $\alpha$  and interleukin-1 receptor has an additive effect in reducing neuropathic pain in mice. *Neurosci Lett* 310:113-116.
- Sc hafers M, Geis C, Bors D, Yaksh TL, Sommer C (2002) Anterograde transport of tumor necrosis factor- $\alpha$  in the intact and injured rat sciatic nerve. *J Neurosci* 22:536-545.
- Sc hepers RJ, Mahoney JL, Gehrke BJ, Shippenberg TS (2008) Endogenous kappa-opioid receptor systems inhibit hyperalgesia associated with localized peripheral inflammation. *Pain* 138:423-439.
- Sc herer G, Imamachi N, Cao YQ, Contet C, Mennicken F, O'Donnell D, Kieffer BL, Basbaum AI (2009) Dissociation of the opioid receptor mechanisms that control mechanical and heat pain. *Cell* 137:1148-1159.
- Sc herer G, Tiyoen-Toth P, Filliol D, Matifas A, Laustriat D, Cao YQ, Basbaum AI, Dieich A, Vonesh JL, Gaveriaux-Ruff C, Kieffer BL (2006) Knockin mice expressing fluorescent delta-opioid receptors uncover G-protein-coupled receptor dynamics in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA* 103:9691-9696.
- Sc hmidt R, Schmelz M, Forster C, Ringkamp M, Trebbjork E, Handwerker H (1995) Novel classes of responsive and unresponsive C nociceptors in human skin. *J Neurosci* 15:333-341.
- Sc hmidt A, Tegeder I, Geisslinger G (2009) No NO, no pain? The role of nitric oxide and cGMP in spinal pain processing. *Trends Neurosci* 32:339-346.
- Sc holz J, Woolf CJ (2007) The neuropathic pain triad: neurons, immune cells and glia. *Nat Neurosci* 10:1361-1368.
- Sc hreiber S, Backer MM, Pick CG (1999) The antinociceptive effect of venlafaxine in mice is mediated through opioid and adrenergic mechanisms. *Neurosci Lett* 273:85-88.
- Sc hreiber S, Bleich A, Pick CG (2002) Venlafaxine and mirtazapine: different mechanisms of antidepressant action, common opioid-mediated antinociceptive effects--a possible opioid involvement in severe depression? *J Mol Neurosci* 18:143-149.
- Sc hreiber S, Backer MM, Herman I, Shamir D, Boniel T, Pick CG (2000) The antinociceptive effect of trazodone in mice is mediated through both mu-opioid and serotonergic mechanisms. *Behav Brain Res* 114:51-56.
- Se kiguchi M, Se kiguchi Y, Konno S, Kobayashi H, Homma Y, Kikuchi S (2009) Comparison of neuropathic pain and neuronal apoptosis following nerve root or spinal nerve compression. *Eur Spine J* 18:1978-1985.
- Se ltzer Z, Dubner R, Shir Y (1990) A novel behavioral model of neuropathic pain disorders produced in rats by partial sciatic nerve injury. *Pain* 43:205-218.
- Se ra J (2012) Micro neurography: towards a biomarker of spontaneous pain. *Pain* 153:1989-1990.
- Sheets PL, Heers C, Stoehr T, Cummins TR (2008) Differential block of sensory neuronal voltage-gated sodium channels by lacosamide [(2R)-2-(acetylamino)-N-benzyl-3-methoxypropylamide], lidocaine, and carbamazepine. *J Pharmacol Exp Ther* 326:89-99.
- Shi Y, Gelman BB, Lisinichia JG, Tang SJ (2012) Chronic-pain-associated astrocytic reaction in the spinal cord dorsal horn of human immunodeficiency virus-infected patients. *J Neurosci* 32:10833-10840.
- Shinder V, Amir R, Devor M (1998) Cross-excitation in dorsal root ganglia does not depend on close cell-to-cell apposition. *Neuroreport* 9:3997-4000.
- Shinder V, Govin-Lippmann R, Cohen S, Belenky M, Ilin P, Fried K, Wilkinson HA, Devor M (1999) Structural basis of sympathetic-sensory coupling in rat and human dorsal root ganglia following peripheral nerve injury. *J Neurocytol* 28:743-761.
- Shoudai K, Peters JH, McDougall SJ, Fawley JA, Andresen MC (2010) The mally active TRPV1 tonically drives central spontaneous glutamate release. *J Neurosci* 30:14470-14475.
- Shubayev VI, Myers RR (2000) Upregulation and interaction of TNF $\alpha$  and gelatinases A and B in painful peripheral nerve injury. *Brain Res* 855:83-89.
- Shubayev VI, Myers RR (2001) Axonal transport of TNF $\alpha$  in painful neuropathy: distribution of ligand and TNF receptors. *J Neuroimmunol* 114:48-56.
- Shubayev VI, Myers RR (2002) Anterograde TNF $\alpha$  transport from rat dorsal root ganglion to spinal cord and injured sciatic nerve. *Neurosci Lett* 320:99-101.
- Si Q, Nakamura Y, Ogata T, Kataoka K, Schuber P (1998) Differential regulation of microglial activation by propentofylline via cAMP signaling. *Brain Res* 812:97-104.

- Silvestre JS, Fernandez AG, Palacios JM (1999) Preliminary evidence for an involvement of the cholinergic system in the sedative effects of rolipram in rats. *Pharmacol Biochem Behav* 64:1-5.
- Simone DA, Kajander KC (1997) Responses of cutaneous A-fiber nociceptors to noxious cold. *J Neurophysiol* 77:2049-2060.
- Simonin F, Valverde O, Smadja C, Slowe S, Kitchen I, Dieich A, Le Meur M, Roques BP, Maldonado R, Kieffer BL (1998) Disruption of the kappa-opioid receptor gene in mice enhances sensitivity to chemical visceral pain, impairs pharmacological actions of the selective kappa-agonist U-50,488H and attenuates morphine withdrawal. *EMBO J* 17:886-897.
- Sindrup SH, Gram LF, Broesen K, Eshoj O, Mogensen EF (1990) The selective serotonin reuptake inhibitor paroxetine is effective in the treatment of diabetic neuropathy symptoms. *Pain* 42:135-144.
- Smith HS, Deer TR, Staats PS, Singh V, Sehgal N, Corder H (2008) Intrathecal drug delivery. *Pain Physician* 11:S89-S104.
- Snider WD (1998) How do you feel? Neurotrophins and mechanotransduction. *Nat Neurosci* 1:5-6.
- Sommer C (2006) Is serotonin hyperalgesic or analgesic? *Curr Pain Headache Rep* 10:101-106.
- Sommer C, Schafers M (1998) Painful mononeuropathy in C57BL/Wld mice with delayed wallerian degeneration: differential effects of cytokine production and nerve regeneration on thermal and mechanical hypersensitivity. *Brain Res* 784:154-162.
- Sommer C, Schmidt C, George A (1998) Hyperalgesia in experimental neuropathy is dependent on the TNF receptor 1. *Exp Neurol* 151:138-142.
- Sommer C, Galbraith JA, Heckman HM, Myers RR (1993) Pathology of experimental compression neuropathy producing hyperesthesia. *J Neuropathol Exp Neurol* 152:223-233.
- Song XJ, Wang ZB, Gan Q, Walters ET (2006) cAMP and cGMP contribute to sensory neuron hyperexcitability and hyperalgesia in rats with dorsal root ganglia compression. *J Neurophysiol* 95:479-492.
- Sora I, Takahashi N, Funada M, Ujike H, Revay RS, Donovan DM, Miner LL, Uhl GR (1997) Opiate receptor knockout mice define mu receptor roles in endogenous nociceptive responses and morphine-induced analgesia. *Proc Natl Acad Sci USA* 94:1544-1549.
- Sotocinal SG, Sorge RE, Zabum A, Tuttle AH, Martin LJ, Wieskopf JS, Mapplebeck JC, Wei P, Zhan S, Zhang S, McDougall JJ, King OD, Mogil JS (2011) The Rat Grimace Scale: a partially automated method for quantifying pain in the laboratory rat via facial expressions. *Mol Pain* 7:55.
- Sousa AM, Prado WA (2001) The dual effect of a nitric oxide donor in nociception. *Brain Res* 897:9-19.
- Spanagel R, Almeida OF, Shippenberg TS (1994) Evidence that nor-binaltorphimine can function as an antagonist at multiple opioid receptor subtypes. *Eur J Pharmacol* 264:157-162.
- Spencer CM, Wilde MI (1998) Milnacipran. A review of its use in depression. *Drugs* 56:405-427.
- Stephenson JL, Byers MR (1995) GFAP immunoreactivity in trigeminal ganglion satellite cells after tooth injury in rats. *Exp Neurol* 131:11-22.
- Stevens CW, Kajander KC, Bennett GJ, Seybold VS (1991) Bilateral and differential changes in spinal mu, delta and kappa opioid binding in rats with a painful, unilateral neuropathy. *Pain* 46:315-326.
- Streit WJ, Semple-Rowlan SL, Hurley SD, Miller RC, Popovich PG, Stokes BT (1998) Cytokine mRNA profiles in contused spinal cord and axotomized facial nucleus suggest a beneficial role for inflammation and gliosis. *Exp Neurol* 152:74-87.
- Sun T, Song WG, Fu ZJ, Liu ZH, Liu YM, Yao SL (2006) Allelization of neuropathic pain by intrathecal injection of antisense oligonucleotides to p65 subunit of NF-kappa B. *Br J Anaesth* 97:553-558.
- Suzuki T, Ueta K, Tamagaki S, Mashimo T (2008) Antiallodynic and antihyperalgesic effect of milnacipran in mice with spinal nerve ligation. *Anesth Analg* 106:1309-1315, table of contents.
- Suzumura A, Ito A, Yoshikawa M, Sawada M (1999) Ibuprofen suppresses TNFalpha production by glial cells functioning mainly as type III phosphodiesterase inhibitor in the CNS. *Brain Res* 837:203-212.
- Svensson CI, Schafers M, Jones TL, Powell H, Sorokin IS (2005) Spinal blockade of TNF blocks spinal nerve ligation-induced increases in spinal P-p38. *Neurosci Lett* 379:209-213.
- Sweitzer S, DeLeo J (2011) Probenecid: glial modulation, neuroprotection, and alleviation of chronic pain. *Handb Exp Pharmacol* 235-250.
- Sweitzer SM, Schubert P, DeLeo JA (2001) Probenecid, a glial modulating agent, exhibits antiallodynic properties in a rat model of neuropathic pain. *J Pharmacol Exp Ther* 297:1210-1217.
- Szabo C, Hasko G, Zingarelli B, Nemeth ZH, Salzman AL, Kvetan V, Pastores SM, Vizi ES (1997) Isoproterenol regulates tumor necrosis factor, interleukin-10, interleukin-6 and nitric oxide production and protects against the development of vascular hyporeactivity in endotoxemia. *Immunology* 90:95-100.
- Takeda M, Tanimoto T, Kadoi J, Nasu M, Takahashi M, Kitagawa J, Matsumoto S (2007) Enhanced excitability of nociceptive trigeminal ganglion neurons by satellite glial cytokine following peripheral inflammation. *Pain* 129:155-166.
- Takemori AE, Ho BY, Naeseht JS, Portoghesse PS (1988) Nor-binaltorphimine, a highly selective kappa-opioid antagonist in analgesic and receptor binding assays. *J Pharmacol Exp Ther* 246:255-258.
- Tan ZY, Donnelly DF, LaMotte RH (2006) Effects of a chronic compression of the dorsal root ganglion on voltage-gated Na<sup>+</sup> and K<sup>+</sup> currents in cutaneous afferent neurons. *J Neurophysiol* 95:1115-1123.

- Tanaka S, Tsutsui M, Kishida T, Souma S, Kuroda J, Yoshida T (2010) Salbutamol inhibits lipopolysaccharide-induced inflammatory responses in rat peritoneal macrophages. *J Toxicol Sci* 35:327-334.
- Tanaka T, Minami M, Nakagawa T, Satoh M (2004) Enhanced production of monocyte chemoattractant protein-1 in the dorsal root ganglia in a rat model of neuropathic pain: possible involvement in the development of neuropathic pain. *Neurosci Res* 48:463-469.
- Tang T, Stevens BA, Cox BM (1996) Opioid regulation of intracellular free calcium in cultured mouse dorsal root ganglion neurons. *J Neurosci Res* 44:338-343.
- Tanga FY, Raghavendra V, DeLeo JA (2004) Quantitative real-time RTPCR assessment of spinal microglial and astrocytic activation markers in a rat model of neuropathic pain. *Neurochem Int* 45:397-407.
- Tartaglia LA, Ayres TM, Wong GH, Goeddel DV (1993) A novel domain within the 55 kd TNF receptor signals cell death. *Cell* 74:845-853.
- Tawfik VL, Nutile-McMenemy N, Lacroix-Fralish ML, DeLeo JA (2007) Efficacy of propentofylline, a glial modulating agent, on existing mechanical allodynia following peripheral nerve injury. *Brain Behav Immun* 21:238-246.
- Tegeder I, Schmidtke A, Niederberger E, Ruth P, Geisslinger G (2002) Dual effects of spinally delivered 8-bromo-cyclic guanosine mono-phosphate (8-bromo-cGMP) in formalin-induced nociception in rats. *Neurosci Lett* 332:146-150.
- Thorburn A (2004) Death receptor-induced cell killing. *Cell Signal* 16:139-144.
- Tomes-Lopez JE, Arguelles CF, Granados-Soto V (2002) Participation of peripheral and spinal phosphodiesterases 4 and 5 in inflammatory pain. *Proc West Pharmacol Soc* 45:141-143.
- Tiede RD, Meyer RA, Campbell JN (1998) Myelinated mechanically insensitive afferents from monkey hairy skin: heat-response properties. *J Neurophysiol* 80:1082-1093.
- Tsantoulas C, McMahon SB (2014) Opening paths to novel analgesics: the role of potassium channels in chronic pain. *Trends Neurosci* 37:146-158.
- Turko IV, Ballard SA, Francis SH, Corbin JD (1999) Inhibition of cyclic GMP-binding cyclic GMP-specific phosphodiesterase (Type 5) by sildenafil and related compounds. *Mol Pharmacol* 56:124-130.
- Umann L, Hirbec H, Rassegnren F (2010) P2X4 receptors mediate PGE2 release by tissue-resident macrophages and initiate inflammatory pain. *EMBO J* 29:2290-2300.
- Umann L, Rodeau JL, Danoux L, Contet-Audonnoeau JL, Pauly G, Schlichter R (2007) Trophic effects of keratinocytes on the axonal development of sensory neurons in a coculture model. *Eur J Neurosci* 26:113-125.
- Usachev Y, Verkhratsky A (1995) IBMX induces calcium release from intracellular stores in rat sensory neurons. *Cell Calcium* 17:197-206.
- Vale ML, Rolim DE, Cavalcante IF, Ribeiro RA, Souza MH (2007) Role of NO/cGMP/KATP pathway in antinociceptive effect of sildenafil in zymosan writhing response in mice. *Inflamm Res* 56:83-88.
- Vallejo R, Tillely DM, Vogel L, Benyamin R (2010) The role of glia and the immune system in the development and maintenance of neuropathic pain. *Pain Pract* 10:167-184.
- Varga A, Bokskei K, Szoke E, Almasi R, Czeh G, Szolcsanyi J, Petho G (2006) Relative roles of protein kinase A and protein kinase C in modulation of transient receptor potential vanilloid type 1 receptor responsiveness in rat sensory neurons in vitro and peripheral nociceptors in vivo. *Neuroscience* 140:645-657.
- Vit JP, Jasmin L, Bhargava A, Ohara PT (2006) Satellite glial cells in the trigeminal ganglion as a determinant of orofacial neuropathic pain. *Neuron Glia Biol* 2:247-257.
- Vit JP, Ohara PT, Bhargava A, Kelley K, Jasmin L (2008) Silencing the Kir4.1 potassium channel subunit in satellite glial cells of the rat trigeminal ganglion results in pain-like behavior in the absence of nerve injury. *J Neurosci* 28:4161-4171.
- Vogel C, Mossner R, Gerlach M, Heinemann T, Murphy DL, Riederer P, Leusch KP, Sommer C (2003) Absence of the malar hyperalgesia in serotonin transporter-deficient mice. *J Neurosci* 23:708-715.
- von Hehn CA, Baron R, Woolf CJ (2012) Deconstructing the neuropathic pain phenotype to reveal neural mechanisms. *Neuron* 73:638-652.
- Wagner R, Myers RR (1996) Endoneurial injection of TNF-alpha produces neuropathic pain behaviors. *Neuroreport* 7:2897-2901.
- Wang C, Li GW, Huang LY (2007) Prostaglandin E2 potentiation of P2X3 receptor mediated currents in dorsal root ganglion neurons. *Mol Pain* 3:22.
- Wang H, Rivero-Melian C, Robertson B, Grant G (1994) Transganglionic transport and binding of the isolectin B4 from Griffonia simplicifolia I in rat primary sensory neurons. *Neuroscience* 62:539-551.
- Wang L, Chopp M, Szalad A, Liu Z, Bolz M, Alvarez FM, Lu M, Zhang L, Cui Y, Zhang RL, Zhang ZG (2011a) Phosphodiesterase-5 is a therapeutic target for peripheral neuropathy in diabetic mice. *Neuroscience* 193:399-410.
- Wang P, Myers JG, Wu P, Cheewatra koolpong B, Egan RW, Billa h MM (1997) Expression, purification, and characterization of human cAMP-specific phosphodiesterase (PDE4) subtypes A, B, C, and D. *Biochem Biophys Res Commun* 234:320-324.

- Wang W, Gu J, Li YQ, Tao YX (2011b) Are voltage-gated sodium channels on the dorsal root ganglion involved in the development of neuropathic pain? *Mol Pain* 7:16.
- Wang Z, Gardell LR, Ossipov MH, Vanderah TW, Brennan MB, Hochgeschwender U, Hruby VJ, Malan TP, Jr., Lai J, Porreca F (2001) Pronociceptive actions of dynorphin maintain chronic neuropathic pain. *J Neurosci* 21:1779-1786.
- Warwick RA, Hanani M (2013) The contribution of satellite glial cells to chemotherapy-induced neuropathic pain. *Eur J Pain* 17:571-580.
- Watkins LR, Hutchinson MR, Ledebor A, Wieseler-Frank J, Milligan ED, Maier SF (2007) Norman Cousins Lecture. Glia as the "bad guys": implications for improving clinical pain control and the clinical utility of opioids. *Brain Behav Immun* 21:131-146.
- Waxman SG, Zamponi GW (2014) Regulating excitability of peripheral afferents: emerging ion channel targets. *Nat Neurosci* 17:153-163.
- Waxman SG, Kocsis JD, Black JA (1994) Type III sodium channel mRNA is expressed in embryonic but not adult spinal sensory neurons, and is reexpressed following axotomy. *J Neurophysiol* 72:466-470.
- Wei F, Guo W, Zou S, Ren K, Dubner R (2008) Supraspinal glial-neuronal interactions contribute to descending pain facilitation. *J Neurosci* 28:10482-10495.
- Wei H, Pertovaara A (2006) 5-HT<sub>1A</sub> receptors in endogenous regulation of neuropathic hyperalgesia in the rat. *Eur J Pharmacol* 535:157-165.
- Wemicke JF, Pritchett YL, D'Souza DN, Waninger A, Tian P, Iyengar S, Raskin J (2006) A randomized controlled trial of duloxetine in diabetic peripheral neuropathic pain. *Neurology* 67:1411-1420.
- White FA, Sun J, Waters SM, Ma C, Ren D, Ripsch M, Steflik J, Cortright DN, Lamotte RH, Miller RJ (2005) Excitatory monocyte chemoattractant protein-1 signaling is up-regulated in sensory neurons after chronic compression of the dorsal root ganglion. *Proc Natl Acad Sci USA* 102:14092-14097.
- Willner P (1984) The validity of animal models of depression. *Psychopharmacology (Berl)* 83:1-16.
- Wolf CJ, Mannion RJ (1999) Neuropathic pain: aetiology, symptoms, mechanisms, and management. *Lancet* 353:1959-1964.
- Xie RG, Zheng DW, Xing JL, Zhang XJ, Song Y, Xie YB, Kuang F, Dong H, You SW, Xu H, Hu SJ (2011) Blockade of persistent sodium currents contributes to the riluzole-induced inhibition of spontaneous activity and oscillations in injured DRG neurons. *PLoS One* 6:e18681.
- Xu L, Huang Y, Yu X, Yue J, Yang N, Zuo P (2007) The influence of p38 mitogen-activated protein kinase inhibitor on synthesis of inflammatory cytokine tumor necrosis factor alpha in spinal cord of rats with chronic constriction injury. *Anesth Analg* 105:1838-1844, table of contents.
- Xu M, Petraschka M, McLoughlin JP, Westnbmek RE, Caron MG, Lefkowitz RJ, Czyzyk TA, Pintar JE, Terman GW, Chavkin C (2004) Neuropathic pain activates the endogenous kappa opioid system in mouse spinal cord and induces opioid receptor tolerance. *J Neurosci* 24:4576-4584.
- Xu YP, Zhang JW, Li L, Ye ZY, Zhang Y, Gao X, Li F, Yan XS, Liu ZG, Liu LJ, Cao XH (2012) Complex regulation of capsaicin on intracellular second messengers by calcium dependent and independent mechanisms in primary sensory neurons. *Neurosci Lett* 517:30-35.
- Yakovlev AG, Faden AI (1994) Sequential expression of c-fos protooncogene, TNF-alpha, and dynorphin genes in spinal cord following experimental traumatic injury. *Mol Chem Neurobiol* 23:179-190.
- Yalcin I, Tessier LH, Petit-Demouliere N, Doridot S, Hein L, Freund-Mercier MJ, Barrot M (2009a) Beta2-adrenoceptors are essential for desipramine, venlafaxine or reboxetine action in neuropathic pain. *Neurobiol Dis* 33:386-394.
- Yalcin I, Tessier LH, Petit-Demouliere N, Waltisperger E, Hein L, Freund-Mercier MJ, Barrot M (2010) Chronic treatment with agonists of beta(2)-adrenergic receptors in neuropathic pain. *Exp Neurol* 221:115-121.
- Yalcin I, Bohren Y, Waltisperger E, Sage-Ciocca D, Yin JC, Freund-Mercier MJ, Barrot M (2011a) A time-dependent history of mood disorders in a murine model of neuropathic pain. *Biol Psychiatry* 70:946-953.
- Yalcin I, Choucair-Jaafar N, Benbouzid M, Tessier LH, Muller A, Hein L, Freund-Mercier MJ, Barrot M (2009b) beta(2)-adrenoceptors are critical for antidepressant treatment of neuropathic pain. *Ann Neurol* 65:218-225.
- Yalcin I, Charlet A, Cordero-Erasquin M, Tessier LH, Picciotto MR, Schlichter R, Poisebeau P, Freund-Mercier MJ, Barrot M (2011b) Nociceptive thresholds are controlled through spinal beta2-subunit-containing nicotinic acetylcholine receptors. *Pain* 152:2131-2137.
- Yamakawa I, Kojima H, Terashima T, Katagi M, Oi J, Urabe H, Sanada M, Kawai H, Chan L, Yasuda H, Maegawa H, Kimura H (2011) Inactivation of TNF-alpha ameliorates diabetic neuropathy in mice. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 301:E844-852.
- Yoon MH, Kim WM, Lee HG, Kim YO, Huang LJ, An TH (2008a) Roles of opioid receptor subtypes on the antinociceptive effect of intrathecal sildenafl in the formalin test of rats. *Neurosci Lett* 441:125-128.
- Yoon MH, Park KD, Lee HG, Kim WM, An TH, Kim YO, Huang LJ, Hua CJ (2008b) Additive antinociception between intrathecal sildenafl and morphine in the rat formalin test. *J Korean Med Sci* 23:1033-1038.
- Yoon YW, Sung B, Chung JM (1998) Nitric oxide mediates behavioral signs of neuropathic pain in an experimental rat model. *Neuroreport* 9:367-372.

- Zarei M, Sabetkasaei M, Moini Zanjani T (2014) Paroxetine attenuates the development and existing pain in a rat model of neuropathic pain. *Iran Biomed J* 18:94-100.
- Zelenka M, Schafers M, Sommer C (2005) Intraneural injection of interleukin-1beta and tumor necrosis factor-alpha into rat sciatic nerve at physiological doses induces signs of neuropathic pain. *Pain* 116:257-263.
- Zhang H, Dougherty PM (2013) Dynamic effects of TNF-alpha on synaptic transmission in mice over time following sciatic nerve chronic constriction injury. *J Neurophysiol* 110:1663-1671.
- Zhao X, Tang Z, Zhang H, Atianjoh FE, Zhao JY, Liang L, Wang W, Guan X, Kao SC, Twari V, Gao YJ, Hoffman PN, Cui H, Li M, Dong X, Tao YX (2013) A long noncoding RNA contributes to neuropathic pain by silencing Kcna2 in primary afferent neurons. *Nat Neurosci* 16:1024-1031.
- Zheng JH, Walters ET, Song XJ (2007) Dissociation of dorsal root ganglion neurons induces hyperexcitability that is maintained by increased responsiveness to cAMP and cGMP. *J Neurophysiol* 97:15-25.
- Zheng W, Ouyang H, Zheng X, Liu S, Mata M, Fink DJ, Hao S (2011) Glial TNFalpha in the spinal cord regulates neuropathic pain induced by HIV gp120 application in rats. *Mol Pain* 7:40.
- Zhu J, Mix E, Winblad B (2001) The antidepressant and antiinflammatory effects of rolipram in the central nervous system. *CNS Drug Rev* 7:387-398.
- Zhu J, Wei X, Feng X, Song J, Hu Y, Xu J (2008) Repeated administration of mirtazapine inhibits development of hyperalgesia/allodynia and activation of NF-kappaB in a rat model of neuropathic pain. *Neurosci Lett* 433:33-37.
- Zwick M, Davis BM, Woodbury CJ, Burkett JN, Koerber HR, Simpson JF, Albers KM (2002) Glial cell line-derived neurotrophic factor is a survival factor for isolectin B4-positive, but not vanilloid receptor 1-positive, neurons in the mouse. *J Neurosci* 22:4057-4065.



## Traitement de la douleur neuropathique : des antidépresseurs aux inhibiteurs de phosphodiesterases

---

### Résumé

Les antidépresseurs ont un effet antialloodyne qui dépend de la stimulation des récepteurs  $\beta_2$ -adrénergiques. Ceux-ci stimulent la production d'adénosine monophosphate cyclique (AMPC), qui est régulé par les phosphodiesterases de type 4 (PDE4). Nous avons ici étudié l'effet d'inhibiteurs de PDE (iPDE) sur la douleur neuropathique, grâce à des approches de pharmacologie comportementale chez la souris complétées par de l'imagerie calcium et des approches moléculaires. Nos résultats montrent un effet antialloodyne des iPDE4 et des iPDE5. L'action des iPDE4 est liée à une diminution d'expression du TNF $\alpha$  dans le ganglion rachidien et au recrutement des récepteurs delta des opioïdes. Celle des iPDE5 nécessite à la fois les récepteurs mu et delta. Nous montrons aussi que l'action d'un iPDE4 dépend de la dose, l'activation de cellules gliales semblant corrélée à l'effet antialloodyne à faible dose, alors que celle des neurones à forte dose a un effet pronociceptif via les récepteurs TRPV1.

Mots-clés : douleur neuropathique, PDE4, PDE5, TNF $\alpha$ , ganglion rachidien, TRPV1

### Abstract

Antidepressants have an antialloodynic action that is dependent on  $\beta_2$ -adrenoceptor stimulation. These receptors stimulate the cAMP production, which is regulated by type 4 phosphodiesterases (PDE4). Here, we studied that action of PDE inhibitors (iPDE) on neuropathic pain, using behavioral pharmacology approaches in mice, completed by calcium imaging and molecular approaches. Our results show the iPDE4s and iPDE5s have an antialloodynic action. The iPDE4s act through a decreased expression of TNF $\alpha$  in dorsal root ganglia and the recruitment of the delta opioid receptors. The action of iPDE5 requires both mu and delta opioid receptors. We also show that the action of an iPDE4 depends on the dose, the activation of glial cells at low dose being correlated with an antialloodynic action, while the recruitment of neurons at higher doses has a pronociceptive action via TRPV1 receptors.

Keywords: neuropathic pain, PDE4, PDE5, TNF $\alpha$ , dorsal root ganglia, TRPV1